

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
(СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*

Смирнов Валерий Валерьевич

**Разработка комплексного подхода оценки активности основных  
изоферментов метаболизма лекарственных средств для изучения их  
фармакокинетики на различных этапах исследований *in vivo*, а также  
персонализации фармакотерапии**

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора фармацевтических наук

Научный консультант:  
доктор фармацевтических наук, профессор  
Раменская Галина Владиславовна

Научный консультант:  
академик РАН, доктор медицинских наук, профессор  
Кукес Владимир Григорьевич

Москва – 2020

## Оглавление

<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>15</b>
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>16</b>
1.1. ..Изучение биотрансформации низкомолекулярных химических веществ in vivo .....	16
1.2. Существующие стратегии фенотипирования по активности изоферментов системы P450 с использованием маркеров .....	19
1.2.1. Ксенобиотики.....	19
1.2.2. Эндогенные маркеры .....	24
1.2.2.1. Маркеры активности CYP1A2 .....	25
1.2.2.2. Маркеры активности CYP2C19.....	28
1.2.2.3. Маркеры активности CYP2D6 .....	30
1.2.2.4. Маркеры активности CYP3A .....	34
1.3. .... Применение оценки активности изоферментов CYP450 на различных стадиях жизненного цикла ЛС .....	54
1.3.1. Доклинические исследования .....	54
1.3.2. Клинические исследования .....	54
1.3.3. Клиническая практика .....	55
<b>ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1 .....</b>	<b>56</b>
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>59</b>
2.1. Исследуемые вещества.....	59
2.2. Выбор внутреннего стандарта .....	67
2.3. Реактивы и оборудование .....	68
2.3.1. Реактивы .....	68

2.3.2. Оборудование .....	69
2.4. Методика отбора проб .....	71
2.5. Методики определения субстратов и их метаболитов в биологических жидкостях .....	73
2.5.1. 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол.....	73
2.5.2. 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин.....	76
2.5.3. 6-НО-ТНВС/Пинолин.....	78
2.5.4. EXP-3174/Лозартан .....	81
2.5.5. 5-гидроксиомепразол/Омепразол .....	83
2.5.6. Параксантин /Кофеин.....	85
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>89</b>
3.1. Валидация разработанных методик количественного определения аналитов в плазме биологических объектов.....	89
3.1.1. Валидация методики количественного определением 6 $\beta$ -гидрокортизола и кортизола в плазме крови. ....	91
3.1.2. Валидация методики количественного определением 6 $\beta$ -гидрокортизола и кортизола в моче .....	97
3.1.3. Валидация методики количественного определением 4 $\beta$ -гидроксихолестерина и холестерина в плазме крови.....	103
3.1.4. Валидация методики количественного определением 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболина и пинолина в моче.....	107
3.1.5. Валидация методики количественного определением EXP-3174 и лозартана в моче.....	112
3.1.6. Валидация методики количественного определением EXP-3174 и лозартана в плазме крови крыс.....	117
3.1.7. Валидация методики количественного определением 5-гидроксиомепразол и омепразола в моче .....	123

3.1.8. Валидация методики количественного определением параксантина и кофеина в моче .....	127
3.2. Сравнение разработанных методик количественного определения эндогенных субстратов и методик оценки метаболической активности на их основе.....	132
3.2.1. Сравнение методик количественного определения эндогенных субстратов (с использованием и без использования дейтерированных внутренних стандартов).....	132
3.2.2. Сравнение методик оценки активности изофермента CYP3A4 с помощью отношения концентраций 6-β-гидрокортизол/кортизол и 4β-гидроксихолестерин/холестерин .....	163
3.3. Использование разработанных методик в доклинических исследованиях лекарственных средств .....	167
3.4. Использование разработанных методик в клинических исследованиях лекарственных средств .....	184
3.4.1. Клинические исследования лекарственных средств, влияющих на сердечно-сосудистую систему .....	188
3.4.2. Исследования противоязвенных препаратов .....	197
3.4.3. Изучение корреляции между метаболической активностью и возрастом .....	204
3.5. Использование разработанных методик в клинической практике .....	210
3.5.1. Корреляция терапии у кардиологических пациентов .....	214
3.5.2. Рационализация фармакотерапии у больных, страдающих алкогольной зависимостью.....	217
<b>ОБЩИЕ ВЫВОДЫ .....</b>	<b>224</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>234</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность темы исследования.**

Направления стратегического развития Российской Федерации, установленные Указом Президента России от 7 мая 2018 года № 204 «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года» затрагивают вопросы обеспечения качества будущей жизни всех граждан страны, а национальные проекты «Наука», «Образование» и «Здравоохранение» вплотную касаются вопросов оказания медицинской и лекарственной помощи с учетом современных научных достижений в области фармации и медицины, цифровых технологий, инжиниринга, молекулярной биологии и других.

Вопросы персонализированной фармакотерапии остаются актуальными, а появление высокочувствительных и селективных методов анализа предоставляет новые возможности в детальном изучении лекарственных средств (ЛС) на различных этапах исследования, а в последующем оптимизации и индивидуализации режима дозирования. Повышение эффективности и безопасности фармакотерапии важный социальный аспект, связанный с качеством жизни, активным долголетием и экономическим ростом.

Одним из подходов при индивидуальном подборе дозы лекарственных средств является проведение генотипирования и фенотипирования ферментов метаболизма и транспортеров ЛС. Основным недостатком генотипирования считается неспособность оценить влияние факторов окружающей среды в процессе лечения, а основным недостатком фенотипирования является “инвазивность” процедуры с введением препаратов-маркеров, что может вызвать нежелательные реакции, а также невозможно для применения у уязвимых групп населения (беременные женщины, дети, лица пожилого возраста). Следовательно, замена препаратов-маркеров, традиционно используемых при фенотипировании, эндогенными биомаркерами может быть более приемлемой и устранил риски, связанные с приемом ксенобиотиков.

Однако использование эндогенных маркеров в ряде случаев имеет существенный недостаток в виде сложности количественного определения эндогенных веществ в биоматрицах, связанный с невозможностью получения полностью идентичной биоматрицы без анализируемого эндогенного соединения для построения калибровочных кривых. Одним из решений проблемы является использование дейтерированных аналогов определяемых веществ в качестве внутреннего стандарта.

Более новым методом, который также может использоваться для схожих задач является метаболомика. Для проведения метаболомного анализа, прежде всего, требуется определение изучаемой популяции. При исследовании изофермента с хорошо описанным генетическим полиморфизмом, участники могут быть набраны в соответствии с их генотипами. Например, Tay-Sontheimer с соавторами [11] выполнили глобальный анализ метаболома у детей, разделенных на две группы: нормальные и «медленные» метаболитаторы CYP2D6. Другие изоформы цитохрома тоже имеют описанные генетические полиморфизмы, что позволяет проводить аналогичные исследования [12].

Регуляция активности ферментов CYP450 с помощью индукторов или ингибиторов является еще одним подходом, который можно использовать для идентификации эндогенных биомаркеров CYP450 с использованием метаболомного анализа. Эта область широко исследована во многих работах [10][13], целью которых было выявление эндогенных маркеров CYP3A4. Был исследован эффект рифампицина (индуктор CYP3A) и кетоконазола (ингибитор CYP3A) на метаболизм различных стероидов с применением стратегий целенаправленного профилирования [14][15][16,17].

Разработка комплексного подхода к оценке активности изоферментов системы P450 с учетом современных аналитических возможностей и этически бережного отношения к пациенту способствует рациональному проведению фармакотерапии и более активному внедрению персонализированного подхода.

**Степень разработанности темы исследования.**

Исследованиям по фармакокинетике, изучению взаимодействия лекарственных средств, в том числе на уровне их метаболизма за последние 20 лет посвящено большое количество работ российских (Кукес В.Г., Раменская Г.В., Сычев Д.А., Ших Е.В., Арзамасцев А.П., Жердев В.П., Литвин А.А., Чистяков В.В. и др.) и зарубежных (Lin JH, Wilkinson GR, McGraw J, Tanaka E, F. Shin K-N., Bosilkovska M., Bodin K и др.) ученых.

В настоящее время фенотипирование в основном используется для изучения потенциальных лекарственных взаимодействий у новых биомолекул на стадии доклинических и клинических исследований [18].

Также в научных, научно-методических трудах и практических рекомендациях Кукеса В.Г., Раменской Г.В., Сычева Д.А., Ших Е.В. приводится целый ряд методик и клинических ситуаций по применению фенотипирования для оптимизации фармакотерапии и индивидуализации режима дозирования ЛС в рамках персонализированной медицины.

Однако необходимо отметить, что остается целый ряд проблем, связанных как с анализом лекарственных средств и их метаболитов, так и с техникой и методологией проведения фенотипирования, в том числе:

- количественное определение эндогенных маркеров и их метаболитов при отсутствии биологической жидкости, не содержащей определяемых соединений;
- отсутствие иди другие причины не позволяющие использовать дейтерированные стандарты веществ;
- большое число методик оценки активности изоферментов системы CYP450, участвующих в биотрансформации лекарственных средств, без приложения их к различным задачам доклинических и клинических исследований на различных стадиях жизненного цикла и этапах обращения лекарственных средств, в том числе на этапе применения, а также при персонализации фармакотерапии.

Необходимость совершенствования методологии и техники проведения фенотипирования изоферментов системы P450 определило цель и задачи настоящего исследования.

**Целью** настоящего исследования являлась научная разработка, с использованием современных методов анализа и методологии фенотипирования, комплексного подхода оценки активности изоферментов системы цитохрома Р450 для изучения фармакокинетики лекарственных средств на различных этапах их исследования *in vivo* и персонализации фармакотерапии при их применении.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Провести научно обоснованный выбор наиболее актуальных и клинически значимых изоферментов СYP450, участвующих в биотрансформации большинства ксенобиотиков, их субстратов и маркеров из числа эндогенных и лекарственных средств.
2. Разработать и валидировать методики количественного определения маркеров – субстратов и их метаболитов с использованием современных хроматографических методов анализа.
3. Разработать метод количественного определения эндогенных субстратов без использования очищенных биоматриц и дейтерированных аналогов.
4. Провести сравнение альтернативных методик определения активности одного и того же изофермента СYP450 с помощью различных субстратов.
5. Оценить возможность использования разработанных методик для выявления индуцирующего или ингибирующего воздействия ЛС на систему СYP450 на этапе доклинических исследований, на примере препарата Афобазол.
6. Изучить связь генотипирования и фенотипирования пациентов по активности СYP450 при фармакотерапии антикоагулянтами.
7. Провести сопоставление активности СYP450 у пациентов разных возрастных групп с помощью разработанных методик.
8. Оценить возможность использования разработанных методик для повышения эффективности и безопасности фармакотерапии на примере пациентов, больных алкоголизмом.

**Научная новизна исследования.**

В результате проведенных исследований автором впервые:

- предложена и обоснована математическая методика расчета концентрации эндогенных соединений в биообъектах, определяемых методом хроматографии без использования, так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых, а также дорогостоящих дейтерированных аналогов маркеров – субстратов изоферментов CYP450, и их метаболитов. Данный подход позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при регистрации хроматограммы. Для подтверждения достоверности разработанного математического подхода установлена сходимость результатов, полученных данным методом и при использовании дейтерированных стандартов;

- на основании проведенного сопоставления результатов оценки активности изофермента CYP3A4, полученных с использованием различных эндогенных субстратов – кортизола и холестерина, и их метаболитов, установлена взаимозаменяемость данных методик в указанных целях;

- с помощью препаратов – маркёров активности CYP1A2 и CYP2C9 показано, что ЛС афобазол в эффективной, анксиолитической дозе не вызывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия в доклинических исследованиях (на крысах). Увеличение дозы в 5 раз приводит к достоверной умеренной индукции афобазолом изофермента CYP2C9;

- в доклинических исследованиях на животных показано влияние афобазола в дозе 5 мг/кг, индукторов (рифампицина и фенитоина) и ингибиторов (флуконазола и ципрофлоксацина) после введения внутрь на метаболическое отношение параксантина к кофеину и лозартановой кислоты к лозартану, как маркеров активности CYP1A2 и CYP2C9 соответственно. Установлено, что афобазол не вызывал изменений фармакокинетики субстратов, метаболизируемых изучаемыми изоформами цитохрома P-450. После введения внутрь индукторов и ингибиторов выявлены статистически значимые изменения, доказывающие правильность выбора экспериментальной модели отобранных соединений, маркёров, а также индукторов и ингибиторов активности CYP2C9 и CYP1A2, для сравнительной оценки эффектов изучаемых в доклинических исследованиях

веществ. Изучение активности CYP1A2 рекомендовано изучать по отношению концентраций параксантина к кофеину, а CYP2C9 — по E-3174 к лозартану;

- выявлено существенное влияние активности CYP2D6 и CYP3A4 на эффективность и безопасность галоперидола у больных, страдающих алкогольной зависимостью. Исходя из значений коэффициентов уравнения регрессии, можно установить, что чем выше активность данных изоферментов, тем ниже показатели эффективности терапии галоперидолом, что, связано с ускорением биотрансформации галоперидола и элиминацией его из организма. Показатели безопасности растут с увеличением активности изоферментов, что также связано с ускорением элиминации галоперидола из организма пациентов.

### **Теоретическая и практическая значимость исследования.**

Теоретическая значимость исследования заключается в формировании подхода и комплексной методики оценки активности изоферментов системы цитохрома P450 для изучения фармакокинетики лекарственных средств при проведении доклинических и клинических исследований на различных стадиях жизненного цикла и этапах обращения лекарственных средств, в том числе на этапе применения, а также при персонализации фармакотерапии.

Разработан и представлен алгоритм количественного определения (хроматографическими методами) эндогенных веществ в биообъектах, позволяющий получить достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений, в то время как существующие методики ограничиваются точечной оценкой концентрации, которая определяется по калибровочной кривой. На примере препарата Афобазол показано, что разработанный комплексный подход оценки активности CYP450 позволяет определить является ли исследуемое ЛС субстратом, индуктором или ингибитором основных изоферментов CYP450. Кроме того автором получены экспериментальные данные, позволяющие более глубоко охарактеризовать фармакокинетику применяемых в клинике препаратов, таких как ривароксабан, омепразол, аписабан, феназепам, галоперидол, карбамазепин, этилметилгидроксипиридин, а так же их взаимодействие с другими ЛС при совместном применении.

Полученные автором экспериментальные данные позволяют оценить эффективность и безопасность фармакотерапии пациентов с различными нозологическими формами, в том числе, такими как сердечная недостаточность, алкоголизм, язва желудка, бронхиальная астма. В результате проведенных исследований был получен патент «Способ активации изофермента P450 (CYP) 3A4 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью», разработаны Методические Рекомендации «Обследование больных бронхиальной астмой для диагностики стероидной резистентности с учетом клинико-иммунологических и генетических особенностей с целью оптимизации эффективности лечения».

Проведенное сопоставление активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 у пациентов пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста продемонстрировало статистически значимое снижение активности CYP2C9 в данной возрастной группе, а также разработан проект Методических Рекомендаций по применению методик для определения активности различных изоферментов цитохрома P450 с целью персонификации фармакотерапии.

Предложено использование разработанных методик для коррекции фармакотерапии феназепамом и карбомазепином при совместном применении у больных алкоголизмом.

### **Положения выносимые на защиту.**

1. Разработанные методики количественного определения кортизола, 6 $\beta$ -гидрокортизола, холестерина, 4 $\beta$ -гидроксихолестерина, пинолина, 6-НО-ТНВС, кофеина, параксантина, лозартана, EXP-3174, омепразола, 5-гидроксиомепразола в различных биологических жидкостях и их валидационные характеристики.

2. Разработанная математическая методика расчета концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренных методом хроматографии, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации, а так же позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект

при регистрации хроматограммы, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых, а так же дейтерированных веществ, в качестве внутренних стандартов.

3. Результаты сравнения альтернативных методик определения активности CYP3A4 с помощью концентрационных соотношений его эндогенных субстратов: кортизола и холестерина.

4. Результаты определения индуцирующего и ингибирующего воздействия афобазола на изоферменты CYP1A2 и CYP2C9, оцененного на разработанной модели с использованием лабораторных животных (крыс) на этапе доклинических исследований.

5. Результаты изучения корреляции экспериментальных данных, полученных методами генотипирования и фенотипирования активности системы CYP450 у пациентов с глубоким тромбозом вен при проведении фармакотерапии антикоагулянтами.

6. Результаты корреляции возраста человека с метаболической активностью системы CYP450 на примере изофермента CYP 2C9.

7. Результаты использования комплексного подхода для оценки метаболической активности основных изоферментов CYP450 с целью рационализации и персонализации фармакотерапии на примере лечения больных алкоголизмом галоперидолом.

#### **Методология и методы исследования.**

Методология исследования базируется на анализе литературных данных, оценке степени изученности и актуальности темы исследования. Теоретическую основу исследования составили труды российских (Кукеса В.Г., Раменской Г.В., Сычева Д.А., Ших Е.В., Арзамасцева А.П., Жердева В.П., Литвина А.А., Чистякова В.В. и др.) и зарубежных (Lin JH, Wilkinson GR, McGraw J, Tanaka E, F. Shin K-N., Bosilkovska M., Vodin K и др.) исследователей, работы которых были направлены на решение проблем изучения метаболической активности системы CYP450.

В работе использовался современный метод твердофазной экстракции (ТФЭ) для пробоподготовки. Для анализа использовался метод высокоэффективной

жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектором (ВЭЖХ-МС/МС или LC-MS/MS). Для реализации вычислительной части алгоритма для количественного определения эндогенных веществ использовалась программа инженерных расчетов Mathcad версии 15.0 от корпорации PTC (Parametric Technology Corporation), которая функционирует под управлением семейства операционных систем Windows (XP, 7, Vista, 8). Для работы использовали биообъекты, полученные в различных учреждениях города Москвы с 2011 по 2019 г.г. (все организации указаны в соответствующих главах). Основными нормативными документами, регламентирующими процесс разработки и валидации биоаналитических методик, являлись действующие регуляторные документы НЦ ЭСМП Минздрава России, FDA, EMA.

Статистическая обработка полученных результатов измерения проводилась с использованием программ IBM SPSS Statistics 23.0.0.0 и Microsoft Excel 2016.

#### **Достоверность научных положений и выводов.**

Полученные результаты, выводы и практические рекомендации базируются на достаточном количестве повторных измерений, выполненных на сертифицированном оборудовании, имеющем свидетельства о поверке, достоверность исследований также подтверждается большим количеством табличного материала, хроматограммами и рисунками. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны, согласно требованиям действующей нормативной документации. Проработан достаточный объем литературных источников отечественных и иностранных авторов.

#### **Апробация работы.**

Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на EAACI Congress (Европейская академия аллергии и клинической иммунологии) (г. Москва, 2015 г.), IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность», (г. Москва, 2017), EAACI Congress (г. Барселона, 2015 г.), 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование-2016. Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых

физиологически активных веществ» (г. Воронеж, 2016 г.) XIII Congress EACPT (Конгресс Европейского общества клинических фармакологов и терапевтов) (г. Прага, 2017 г.), 4-м ежегодном Московском конгрессе "Вотчаловские чтения", посвященном вопросам клинической фармакологии с позиции основоположника академика Вотчала Б.Е. (г. Москва, 2018 г.), EAACI Congress (г. Лиссабон, 2019 г.), Международной научно-практической конференции «Современные аспекты медицины и фармации: образование, наука и практика» (г. Шымкент, 2019 г.), 5-я ежегодном Московском конгрессе "Вотчаловские чтения" (г. Москва, 2019 г.), International Conference on Advances in Pharmaceutical Drug Development, Quality Control and Regulatory Sciences (DDRS 2020) (г. Будапешт, 2020 г.). Апробация работы проведена на совместном заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина, кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины имени Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Протокол № 7 от 10.02.2020).

#### **Личный вклад автора.**

Автором лично проведен выбор научного направления и разработана концепция исследования. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация биоаналитических методик исследуемых аналитов методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическая обработка результатов исследования, и математические расчеты. Вклад автора является определяющим на всех этапах исследования: от постановки задач, их экспериментально – теоретической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения в практику.

Все результаты совместных научных исследований опубликованы в соавторстве. Главы диссертации и автореферат написаны автором лично.

### **Внедрение результатов исследования.**

Проведенные исследования послужили основой для разработки патента № 2554775 «Способ активации изофермента P450 (CYP) 3A4 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью», разработки Методических Рекомендаций «Обследование больных бронхиальной астмой для диагностики стероидной резистентности с учетом клинико-иммунологических и генетических особенностей с целью оптимизации эффективности лечения» (Методические рекомендации рег. №60 – 2017, Москва, 2017 г.), а также для разработки проекта Методических Рекомендаций по применению методик для определения активности различных изоферментов цитохрома P450 с целью персонификации фармакотерапии. Полученные результаты также отражены в учебно-методических пособиях.

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Института фармации им. А.П. Нелюбина и кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского Сеченовского Университета. Полученные результаты внедрены в работу лаборатории клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, в работу отдела клинической фармакокинетики Центра Клинической Фармакологии ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, в работу лаборатории фармакокинетики ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В.Закусова" РАН.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно области исследования пункт 4 и паспорту научной специальности 14.03.06 - фармакология, клиническая фармакология, а именно области исследования пункты 4, 7, 8.

### **Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук.**

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева Первого МГМУ им. И.М. Сеченова «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237. Соответствует плану научных исследований кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств». Номер государственной регистрации 01.2.009.07145.

### **Публикации.**

Основное содержание диссертационного исследования достаточно полно отражено в 59 научных работах автора, в том числе 37 из них в журналах SCOPUS и ВАК Минобрнауки России.

### **Объем и структура диссертации.**

Текст диссертационной работы изложен на 251 странице печатного текста, содержит 79 таблиц, 35 рисунков. Диссертация включает в себя введение, обзор литературы, описание объектов, материалов и методов исследования, осуждение собственных экспериментальных исследований, общие выводы, заключение, перечень сокращений и терминов, список литературы, включающий 161 источник, в том числе 142 зарубежных.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Изучение биотрансформации низкомолекулярных химических веществ *in vivo*

Индивидуальная изменчивость ответа на прием лекарств является основной проблемой в клинической практике, которая может приводить к токсичности препарата или снижению его эффективности. Фармакодинамические и фармакокинетические процессы способствуют вариабельности в клиническом ответе пациента на лекарственное средство (ЛС) [1]. Изучением процессов взаимодействия ЛС и конкретной мишени занимается фармакодинамика. Фармакокинетика в свою очередь изучает трансформацию лекарства в организме и включает в себя четыре основных этапа: всасывание, распределение, метаболизм и выведение. Стадия метаболизма обычно отвечает за снижение токсичности ксенобиотика и способствует его выведению из организма, однако, в некоторых случаях может приводить и к его биоактивации. Этот процесс включает в себя I и II фазу [2]. Ферменты семейства цитохрома P450 (CYP450) участвуют в большинстве реакций биотрансформации I фазы, включая гидроксилирование, эпоксилирование, деалкилирование, окисление и дегалогенирование [3]. Они могут катализировать метаболизм различных экзогенных и эндогенных веществ. Активность этих ферментов подвержена высокой индивидуальной изменчивости, что влияет на фармакокинетику ЛС. Основными источниками фармакокинетической изменчивости в реакции на ЛС являются факторы окружающей среды, лекарственные взаимодействия или генетические полиморфизмы [4].

Для оценки активности изоферментов P450 могут быть использованы два подхода: генотипирование и фенотипирование. Генотипирование основано на анализе ДНК и обнаружении конкретного полиморфизма [5]. Его основным

недостатком является неспособность оценить влияние факторов окружающей среды на активность изоферментов. Для некоторых изоферментов (например, CYP1A2 или CYP3A4) изменчивость в основном обусловлена факторами окружающей среды, а не влиянием генов, и оценка полиморфизмов дает мало информации о ферментативной активности [6][7]. Более того, некоторые редкие изоформы могут не проверяться при анализе или могут быть уникальными для пациента. В результате интерпретация генотипа может быть сложной, так как аллель может быть ошибочно классифицирован как функциональный, в то время как реализация генотипа в фенотип может оказаться невозможной [8].

Следовательно, для характеристики активности этих ферментов в реальном времени обычно используют фенотипирование путем введения специального «маркерного» лекарственного средства, метаболизируемого конкретным изоферментом. Тесты на фенотипирование могут быть выборочными или смешанными, также известен «коктейльный» метод фенотипирования [9]. Селективное фенотипирование включает введение одного специфического «маркерного» лекарственного средства, тогда как смешанное фенотипирование позволяет одновременно определять активность нескольких ферментов.

Основным недостатком фенотипирования с применением "маркерных" препаратов является «инвазивность» процедуры. В самом деле, потребление таких веществ часто плохо воспринимается пациентами. Кроме того, при введении ксенобиотиков все еще существуют некоторые проблемы с безопасностью (например, ошибки в дозировке и неожиданные реакции на исследуемые лекарственные препараты). Также необходимо дождаться всасывания и метаболизма препарата перед отбором проб, что может быть клинически нецелесообразно. Кроме того, такие препараты вряд ли можно назначать уязвимым группам населения (то есть беременным женщинам, детям и пожилым людям).

Следовательно, замена специфических субстратов, используемых в обычном фенотипировании, эндогенными биомаркерами может быть более приемлемой для пациентов и добровольцев, участвующих в исследованиях, позволяет избежать задержек перед отбором проб и устраняет риски, связанные с приемом

ксенобиотиков. Можно выделить три возможных метода для обнаружения изоформ P450, описанных в литературе: случайный, гипотетический и метаболомный.

Например, 4 $\beta$ -гидроксихолестерол является примером биомаркера, который был открыт совершенно случайно при проведении исследований продуктов окисления холестерина. Один субъект имел очень высокие уровни 4 $\beta$ -гидроксихолестерола в плазме по сравнению со средними уровнями, наблюдаемыми у здоровых добровольцев. Оказывается, что этого пациента лечили карбамазепином, и на основании этих данных был проанализирован эффект и других противоэпилептических препаратов (вальпроат, фенитоин, фенобарбитал) [23].

Гипотетический метод, вероятно, до настоящего времени являлся основным подходом, который применялся для открытия биомаркеров изоферментов P450. Это имело место, например, в случае O-деметилирования 5-метокситриптамина (5-МТ) с помощью CYP2D6, приводящему к трансформации 5-МТ в серотонин (5-НТ) [24]. Фактически, для завершения цикла серотонин-мелатонин требовалось определение недостающего звена, в результате было предложено изучение CYP2D6, поскольку было известно, что он метаболизирует основные соединения.

Наконец, метаболомика является более современным методом, который также может использоваться для схожих задач, включая целевые или нецелевые методы. Первый метод позволяет обнаруживать и количественно определять заранее выбранный набор метаболитов, охватывающий определенный каскад или химическую группу соединений. Следовательно, он также может быть отнесен к гипотетическому методу фенотипирования. При проведении нецелевого метаболомного анализа, широкий спектр метаболитов может быть обнаружен без какого-либо предварительного отбора. В отличие от целевого профилирования, в данном случае требуется процесс идентификации [10].

Для проведения метаболомного анализа прежде всего требуется определение изучаемой популяции. При исследовании изофермента с хорошо описанным генетическим полиморфизмом (например, CYP2D6), участники могут

быть набраны в соответствии с их генотипами. Tay-Sontheimer с соавторами [11] выполнили, например, глобальный анализ метаболома у детей, разделенных на две группы: нормальные и «медленные» метаболитаторы CYP2D6. Другие изоформы цитохрома тоже имеют хорошо описанные генетические полиморфизмы, включая CYP2C9 и CYP2C19, что позволяет провести аналогичные исследования [12].

Однако, использование эндогенных маркеров имеет существенный недостаток в виде сложности количественного определения эндогенных веществ в биоматрицах. Сложность определения концентрации эндогенного соединения в биообъекте с использованием хроматографического метода заключается в невозможности получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых. Эту проблему в основном решают получением «чистых» или модельных биожидкостей путем разного рода очисток, в процессе которых происходит очистка не только от интересующего эндогенного соединения, но и от других веществ, влияющих на общий уровень базовой линии при хроматографировании, на неидентичность условий пробоподготовки модельных и анализируемых образцов. Другое решение данной проблемы использование дорогих дейтерированных аналогов определяемых веществ в качестве внутреннего стандарта.

## **1.2. Существующие стратегии фенотипирования по активности изоферментов системы P450 с использованием маркеров**

### **1.2.1. Ксенобиотики**

Большинство современных методик количественного определения ксенобиотиков в биологической матрице основаны на методе ВЭЖХ с тандемным масс-спектрометрическим детектированием. Хотя можно встретить также и более

старые методы ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС. Далее мы рассмотрим основные изоферменты системы P450 и их экзогенные субстраты маркеры.

## **CYP1A2**

Изофермент CYP1A2, чья активность обладает значительной внутрииндивидуальной вариабельностью, участвует в метаболизме большого количества сильнодействующих ЛС, в том числе нетипичных нейрорептиков клозапина и оланзапина. Из этого следует, что фармакокинетика, а значит и эффективность и безопасность, данных ЛВ будет напрямую зависеть от активности CYP1A2 [25]. Для гена, кодирующего синтез CYP1A2 характерен генетический полиморфизм, кроме этого его экспрессия сильно зависит от фенотипических факторов окружающей среды организма, которые не зависят от генетических особенностей, определение его активности обычно проводится методом фенотипирования с каким-либо субстратом. В качестве специфического субстрата для определения активности изофермента CYP1A2 широко используется кофеин [26]. Заметным плюсом данной методики является то, что кофеин при назначении в дозах, при приеме которых возможно определить в биожидкостях параксантин и сам кофеин, кофеин не вызывает нежелательных лекарственных явлений. Следует отметить, что процесс биотрансформации N-деметилирования при котором кофеин превращается в параксантин катализируется исключительно CYP1A2 [27]; [28].

При анализе существующей литературы было выяснено, что методика определения активности CYP1A2 с использованием кофеина в качестве субстрата-маркера применялась при изучении таких заболеваний, как малярийная гемоглобинурия (или лихорадка черной воды), а кроме того активно применяется для изучения ингибиторной или индукторной активности различных лекарственных растительных средств (например, масло лаванды, гинко и фрутинон А)[27]; [28]; [29]; [30].

Для определения активности CYP1A2 с помощью кофеина в качестве биообъекта подходит как моча, так и венозная кровь (плазма или сыворотка). Одно

из самых крупных исследований определение активности CYP1A2 с использованием кофеина в качестве субстрата-маркера проводилось на 73 добровольцах [31].

## **CYP2C9**

В литературе описано не мало методик определения активности этого изофермента CYP450. Все из этих методик обладают общим недостатком – они мало селективны, с точки зрения биотрансформации, по отношению к используемым субстратам. К тому же, в большинстве используемых методик используются дозировки ЛВ субстратов-маркеров, которые близки к терапевтическим значениям, что может привести к развитию нежелательных лекарственных явлений у пациентов.

Толбутамид – один из вариантов субстрата-маркера для определения активности CYP2C9. Методика с его использованием заключается в введении 125 мг ЛП *Per Os*. В качестве биообъекта выступает плазма крови, которую собирают через 24 ч после приема лекарственного вещества. Кроме этого, описаны исследования, в которых определяли субстрат и метаболиты также и в моче [32]. Метаболизируется толбутамид под действием CYP2C9 (не специфично) до 4-гидрокситолбутамида и карбокситолбутамида. В данной методике не учитывается метаболическая активность другого изофермента, а именно CYP2C19, в отношении толбутамида.

Другой субстрат-маркер – это Фенитоин. Его использование заключается в введении 300 мг фенитоина *Per Os* [33]. Описана работа, в которой фенотипирование CYP2C9 проводилось путем измерения концентрации фенитоина и его метаболита, п-гидроксифенилгидантиона в плазме крови пациентов [34].

В данной методике, как и в предыдущей, также не учитывается метаболическая активность других изоферментов, а именно CYP2C19 и CYP3A4 [35].

Существующая проба с использованием лозартана как субстрата-маркера CYP2C9 заключается в однократном приеме препарата дозой 50 мг [36]; [37]. Метаболитом лозартана является лозартановая кислота или EXP-3174. Известно, что в метаболизме лозартана участвует другой изофермент – CYP3A4, что не учитывается в данной методике и может привести к получению неточных данных по активности изофермента CYP2C9. Однако, в дальнейших анализах *in vitro* окислительных процессов с использованием дрожжей и микросомальных ферментов печени человека было установлено, что при физиологических концентрациях CYP2C9 является определяющим ферментом в процессе метаболизма лозартана, а CYP3A4 включается в метаболизм только при высоких концентрациях препарата [11].

### **CYP2C19**

Фермент CYP2C19 отвечает за метаболизм большого количества часто используемых лекарств (например, омепразола, клопидогрела, циталопрама) [38]. До настоящего времени было идентифицировано более 30 аллельных вариантов, что свидетельствует о значительной вариабельности активности CYP2C19 среди людей [39]. *CYP2C19\*2* и *\*3* являются распространенными вариантами, которые приводят к потере функции данного фермента, аллель *CYP2C19\*17*, напротив, ассоциируется с повышенной ферментативной активностью. Фенотипирование также широко используется для определения фенотипа CYP2C19 у пациентов. Для этого часто используют омепразол, несмотря на его сложный метаболизм и ингибирующие свойства [40]. Метаболитом омепразола, образующимся под действием CYP2C19, является 5-гидроксиомепразол.

### **CYP2D6**

Дебризохин был первым субстратным препаратом, применяемым в качестве маркера для исследования активности изофермента CYP2D6. Дебризохин и его метаболит (4-гидроксибризохин) определяется в моче. Недостатком методик с

использованием дебризохина является тот факт, что в метаболизме данного вещества помимо CYP2D6 участвует изофермент CYP1A1 [41]; [42].

Описаны методики с использованием метопролола.

Метопролол может применяться как субстрат-маркер только при использовании плазмы крови в качестве биообъекта, так как при определении в моче отношения  $\alpha$ -гидроксиметопролола к метопрололу, наблюдается влияние значения pH мочи на «метаболическое отношение». Что затрудняет использование методики с применением метопролола. К тому же, около 20% биотрансформации метопролола катализируется другими изоферментами (CYP1A2, CYP1A11) [43].

В литературе можно встретить множество методик, использующих в качестве субстрата CYP2D6 декстрометорфан. В качестве биожидкости используются как плазма, так и моча; в некоторых методиках используется слюна. Основными недостатками данных методик является возможная индивидуальная непереносимость субстрата. К тому же, зачастую в методиках используются дозы декстрометорфана, близкие к терапевтическим. Являясь сильнодействующим веществом, декстрометорфан может вызывать различные нежелательные лекарственные явления. Более того, около 15% вещества метаболизируется другими ферментами (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19) [44]; [45]. В РФ декстрометорфан не зарегистрирован в качестве ЛС.

### **CYP3A4**

Самым быстрым из достоверных методов определения активности изофермента CYP3A4 считается эритромицин дыхательный тест.

Данный тест использует дозу радиоактивно меченого эритромицина как субстрата для фермента CYP3A4. Субстрат вводят внутривенно. В печени изофермент метаболизирует эритромицин, превращая меченую метильную группу в формальдегид (реакция N-деметиляции), который затем метаболизируется в диоксид углерода. Меченый диоксид углерода выводится организмом через легкие, поэтому его можно определить спустя 20-30 минут после инъекции тестовой дозы эритромицина. Количество изотопа C-14, с помощью

которого наносят радиоактивную метку, в выдыхаемом воздухе коррелирует с количеством эритромицина, подвергшегося метаболизму за единицу времени [46]; [47].

Несмотря на быстроту данного метода, он обладает рядом недостатков, важнейшим из которых является использование радиоактивно меченных молекул, что само по себе является сравнительно вредным для организма; к тому же, меченные препараты повышают стоимость методики [48].

Основные недостатки данных методик заключаются в риске возникновения нежелательных лекарственных явлений при приеме субстратов, что ограничивает их использование и делает невозможным для использования в рутинной практике.

Внутривенное введение субстратов, а также использование плазмы крови в качестве биообъекта, делают методики пригодными только для использования в стационарах. К тому же, данные тесты не применимы для беременных женщин ввиду тератогенности некоторых субстратов.

### **1.2.2. Эндогенные маркеры**

В данном разделе мы сфокусируемся на описании эндогенных маркеров системы P450, причем с упором на описанные и количественно определенные эндобиотики у человека. Мы не будем рассматривать биомаркеры, оцениваемые исключительно *in vitro* или в организме модельных животных. В этом обзоре будут обсуждаться эндогенные маркеры наиболее важных изоформ CYP450, включая CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A. Несмотря на свою значимость, CYP2C9 не был включен в этот список из-за отсутствия релевантных клинических данных относительно потенциальных биомаркеров для этого фермента.

Оцениваются различные эндогенные маркеры в зависимости от субстрата и биологической жидкости. Для мочи определяется показатель «метаболический индекс (МИ) мочи» [то есть концентрация субстрата в моче, деленный на уровень его концентрации в моче]. Данный показатель минимально инвазивен, но довольно

неудобен так как анализы нужно собирать не позднее 24 часов. При параллельности колебаний уровней субстрата и метаболита в течение 24 часов, можно использовать точечный сбор мочи. Основным недостатком МИ мочи связан с изменением pH мочи, что может существенно влиять на этот параметр [41]. Этот показатель также зависит от почечного клиренса, который имеет широкую индивидуальную вариабельность. Поэтому более целесообразно определять клиренс, характеризующий образование (КХО) метаболита, или метаболическое отношение (МО) измеряемый путем деления количества метаболита, выделяемого в моче в течение периода сбора мочи, на площадь под концентрационной кривой (AUC) субстрата для временного интервала сбора мочи [49].

Если препарат не экскретируется в мочу, то можно использовать концентрации в сыворотке или плазме. Для анализа достаточно всего одного образца крови. Однако, уровни аналита, как правило низкие и, следовательно, требуют более чувствительных методов количественного определения [41].

Статистически значимый порог обычно устанавливается на уровне  $p < 0,05$ . Другие более конкретные статистические тесты могут также применяться в каждом конкретном случае. Кроме того, в метаболомном анализе, как и в случае других "омиксных" исследований, значение  $p$  должно корректироваться методом ложного обнаружения для повышения точности множественных тестирований.

### **1.2.2.1. Маркеры активности CYP1A2**

Цитохром P450 1A2 участвует в метаболизме нескольких ксенобиотиков, а также многих клинически важных лекарственных средств (например, клозапин, оланзапин, теофиллин, тизанидин). Его активность может варьировать вплоть до 60 раз между индивидами [7]. Генетические полиморфизмы гена CYP1A2 обычно проявляются клинически весьма незначительно [50]. Наиболее изученным вариантом является *CYP1A2\*1F*, который приводит к повышенной индуцируемости цитохрома в присутствии индуктора по сравнению с таковыми без

этого полиморфизма [51]. Однако этот полиморфизм не объясняет основные факторы, связанные с вариабельностью CYP1A2 (например, болезненные состояния, индукция/ингибирование фермента, беременность). По этой причине фенотипирование является лучшим методом для прогнозирования активности CYP1A2 в настоящее время [7]. Кофеин является наиболее распространенным маркерным препаратом для CYP1A2, несмотря на тот факт, что потенциальное потребление кофеина с пищей - критический фактор для интерпретации результатов, при этом диета, не содержащая метилксантин, часто является труднодостижимой задачей [40].

Эндогенные субстраты для CYP1A2 плохо изучены в клинике, за исключением мелатонина и его метаболита - 6-гидроксимелатонина. Далее мы приводим описание некоторых эндогенных маркеров с ознакомительной целью, ввиду того, что на сегодняшний момент нет экспериментального подтверждения эффективности данных методик.

### **Мелатонин/6 - гидроксимелатонин**

Мелатонин - это гормон, синтезируемый эпифизом ночью из 5-НТ посредством двухступенчатого процесса [52]. Мелатонин почти исключительно биотрансформируется подсемейством CYP1A в 6-гидроксимелатонин, который является основным ферментом, участвующим в 6-гидроксилировании мелатонина. Внепеченочные изоферменты CYP1A1 и CYP1B1 также оказывают влияние на данный процесс, но с меньшей каталитической эффективностью [53,54].

Были измерены уровни мелатонина в плазме у здоровых добровольцев после введения различных антидепрессантов [55]. Авторы исследования обнаружили, что однократная доза 150 мг фувоксамина в 9 часов вечера значительно повышала уровень мелатонина в плазме на следующее утро. Мелатонин увеличился с  $3,2 \pm 1,8$  до  $19,1 \pm 9,8$  пг/мл ( $p < 0,05$ ). Схожие результаты были продемонстрированы в другой работе [56]: в дополнение к увеличению уровня AUC мелатонина в 2,9 раза ( $p < 0,01$ ), однократная доза 100 мг фувоксамина снижала экскрецию 6-сульфатоксимелатонина ночью у восьми здоровых мужчин

( $p < 0,01$ ). Даже при однократном приеме 50 мг флувоксамина увеличивали AUC мелатонина в 2,8 раза у семи здоровых добровольцев. При этом экскреция мелатонина с мочой возрастала в 2,1 раза по сравнению с контрольной группой в течение 14 часов ( $p < 0,05$ ) [57].

Было также проведено исследование на восьми здоровых добровольцах, которые ежедневно курили более 20 сигарет в день в течение как минимум 1 года [58]. Образцы крови собирали с 8 утра до 8 вечера для анализа уровней мелатонина в сыворотке до и после 7 дней воздержания от курения. Авторы не обнаружили существенных изменений в концентрации мелатонина до и после периода без курения. Отказ от курения, возможно, был компенсирован более высокой секрецией эпифиза, которая могла скрыть эффект индукции активности цитохромов табаком. К сожалению, измерения уровней 6-гидроксимелатонина, синтез которого почти исключительно контролируется CYP1A2, проведены не были.

В другом исследовании [59] оценивался клиренс после перорального приема 100 мг кофеина 12 здоровыми добровольцами. Двенадцать месяцев спустя была также измерена AUC для мелатонина этих же участников. С этой целью образцы крови собирались с 8 вечера 8 часов утра каждые 2 часа и определялся уровень мелатонина в сыворотке. Как оказалось, AUC для мелатонина и клиренс кофеина не коррелировали ( $r = -0,012$ ,  $p = 0,95$ ). Тем не менее, представляется неуместным сравнивать активность CYP1A2 с использованием двух показателей, измеренных с интервалом в 1 год. Вполне вероятно, что активность CYP1A2 будет колебаться в результате факторов окружающей среды. Два разных показателя следует сравнивать в течение короткого периода времени. Кроме того, представляется более надежным измерять либо субстрат с сопутствующим его метаболитом, либо только один метаболит для оценки эффективности конкретно изофермента CYP, а не только концентрации субстрата.

Помимо оценки эндогенного мелатонина и его метаболита, следует подчеркнуть, что экзогенный мелатонин в настоящее время также используется в качестве специфичного субстрата для CYP1A2 [60]. Однако его применение

вызывает ряд вопросов в связи с отсутствием знаний и данных в отличие от кофеина [7].

Для использования эндогенного мелатонина в качестве маркера (субстрата) для CYP1A2 следует измерять подходящий показатель. Например, МИ 6-гидроксимелатонин/мелатонин в моче в течение 24 часов может быть использован для исключения эффекта циркадного ритма. МО 6-гидроксимелатонина также может быть ценным показателем для устранения любого потенциального влияния почечного клиренса мелатонина на результаты эксперимента [61].

### **1.2.2.2. Маркеры активности CYP2C19**

Имеются некоторые данные о метаболизме арахидоновой кислоты (АК) при помощи CYP2C19, которые описаны далее, однако, как и в предыдущем случае не представляется возможным использование данной методики на практике.

#### **Арахидоновая кислота, эпоксиэйкозатриеновая и гидроксиэйкозатетраеновые кислоты**

Арахидоновая кислота метаболизируется ферментами CYP450, образуя 15 различных производных: четыре эпоксиэйкозатриеновые кислоты (EETs) (5-, 6-, 8-, 9-, 11-, 12- и 14-, 15-EETs) и одиннадцать гидроксиэйкозатетраеновых кислот (HETEс) [5-, 8-, 9-, 11-, 12-, 15-, 16-, 17-, 18-, 19- и 20-HETEс] [62]. 20-НЕТЕ, наиболее изученный вариант, который известен своими провоспалительными и вазоконстрикторными эффектами. EETs при этом проявляют противовоспалительное, сосудорасширяющее и кардиопротекторное действие [63].

Недавно была исследована биотрансформация АК при помощи панели 16 человеческих рекомбинантных ферментов CYP450 [64]. Было обнаружено, что все протестированные ферменты CYP450 способны метаболизировать АК, но с разной скоростью образования и специфичностью продукта. У CYP2C19 был самый высокий уровень метаболизма АК и более высокие скорости формирования четырех EETs и 19-НЕТЕ. Эти свойства делают АК потенциальным кандидатом для

фенотипирования активности CYP2C19. CYP2C8 и CYP2C9 также обладают способностью метаболизировать АК, хотя скорость образования четырех EETs и 19-НЕТЕ у них ниже. Это следует принимать во внимание, поскольку содержание CYP2C19 в печени относительно низкое (<4%) по сравнению с CYP2C8 и CYP2C9 (> 4%), что может повлиять на специфичность CYP2C19 к АК в клинической практике [4].

Akasaka и соавт. [65] проанализировали влияние вариантов CYP2C19 на микрососудистую стенокардию у 81 пациента. Сначала они разделили участников на две группы: нормальные и «медленные» метаболизаторы CYP2C19. Они отметили, что уровни С-реактивного белка (биомаркера воспаления) в сыворотке крови были ниже в группе активных метаболизаторов CYP2C19 в сравнении с группой «медленных» ( $0,097 \pm 0,113$  против  $0,165 \pm 0,116$  мг/дл,  $p = 0,026$ ). Это различие, вероятно, связано с противовоспалительными свойствами EETs, синтез которых, вероятно, будет снижен у «медленных» метаболизаторов CYP2C19, что приведет к более высоким уровням С-реактивного белка в этой группе. Путем количественной оценки сывороточной 11,12- и 14,15-дигидроксиэйкозатриеновой кислоты (DHET) в качестве суррогата уровней EETs у 42 пациентов, они также обнаружили, что уровни были выше в группе активных метаболизаторов CYP2C19 в сравнении с группой «медленных» (11,12-DHET:  $15,6 \pm 11,1$  против  $10,4 \pm 4,58$  нг/мл,  $p = 0,003$ ; 14,15-DHET:  $17,3 \pm 6,49$  против  $12,1 \pm 3,79$  нг/мл,  $p = 0,019$ ). Эти результаты означают, что синтез EETs уменьшается, когда CYP2C19 имеет пониженную активность. Низкие уровни EET могут привести к распространению воспаления и ухудшению микроциркуляции.

Несмотря на эти предварительные результаты, еще рано говорить об использовании EETs в качестве специфических субстратов. В вышеупомянутом исследовании косвенное измерение 11, 12- и 14, 15-EETs было выполнено лишь путем мониторинга уровней 11, 12- и 14, 15-DHET, соответственно. Однако DHET могут синтезироваться из EETs путем еще одной реакции, катализируемой EPHX2 (soluble epoxide hydrolase) [63]. Таким образом, на результаты могут повлиять изменения активности EPHX2, т.к. производились измерения концентрации

метаболитов не только CYP2C19. Необходимы дальнейшие исследования для выявления подходящего метаболита. Например, интересно измерить уровни EETs в сыворотке (нормализованные/ненормализованные по уровням АК) и одновременно оценить 19-НЕТЕ, образование которого также опосредовано CYP2C19 [64]. Кроме того, важно оценить специфичность метаболического пути путем измерения клинического воздействия CYP2C8 и CYP2C9 на эти метаболиты по сравнению с CYP2C19, используя специфические ингибиторы (например, гемфиброзил против омепразола) [66,67].

### **1.2.2.3. Маркеры активности CYP2D6**

CYP2D6 является одним из наиболее важных ферментов, которые метаболизируют в печени различные препараты, такие как опиаты, антипсихотики или антидепрессанты [68]. CYP2D6 является высоко полиморфным, что приводит к значительной изменчивости активности CYP2D6 в популяции. Действительно, МИ пахикарпина, специфического субстрата, известного для CYP2D6, может варьировать в 1000 раз между двумя индивидуумами [69]. В настоящее время представляется, что МИ DEM/декстрометорфан (DOR) в моче является одним из лучших показателей для оценки активности CYP2D6, несмотря на его некоторые недостатки. Он может быть подвержен значительной внутри- и межиндивидуальной вариабельности вследствие зависимости от pH мочи [41]. Кроме того, он участвует в метаболизме DEM в 3-метоксиморфинан, хотя и в незначительной степени [70]. Уридиндифосфатглюкуронозилтрансферазы также ответственны за глюкуронидирование метаболита DOR [71]. Следовательно, гидролиз DOR O-глюкуронида или измерение как DOR, так DOR O-глюкуронида, является предпочтительным.

Существование эндогенного субстрата или продукта CYP2D6 было первоначально предположено Bertilsson и соавт. [72] и Llerena и соавт. [73], когда они обнаружили, что медленные метаболизаторы более склонны к тревоге и менее успешно социализированы, чем люди с активным метаболизмом - активные

метаболизаторы. Эти открытия показали, что CYP2D6 может быть вовлечен в метаболизм эндобиотиков. Эта гипотеза подтверждается еще и тем фактом, что CYP2D6 также присутствует в мозге, а не только в печени [74].

На сегодняшний день эндогенные биомаркеры CYP2D6 широко изучены методами *in vitro* и *in vivo*. Только четыре эндогенных биомаркера были частично изучены в клинике и обсуждаются ниже, однако, количество данных, полученных при изучении этих маркеров у человека, недостаточно для фенотипирования CYP2D6 с помощью эндобиотиков [75].

### **Кодеин/Морфин**

Биотрансформация кодеина в морфин с помощью CYP2D6 была значительно изучена в течение последних нескольких лет. Хотя это и незначительный метаболический путь, 5–15% кодеина специфически биоактивируется в морфин с помощью CYP2D6. Известно, что у субъектов с низким уровнем метаболизма после введения кодеина наблюдались очень низкие уровни морфина, в то время как активные метаболизаторы могут испытывать интоксикацию морфинов в этих условиях [76]. Как и у растений, эндогенный морфин и кодеин были физиологически идентифицированы у людей в различных биологических жидкостях, таких как спинномозговая жидкость, моча и плазма [77,78]. Биосинтез, однако, изучен не полностью. Группа Mikus и соавт. [79] исследовала влияние генетических факторов и хинидина (сильный ингибитор CYP2D6) на уровни эндогенного кодеина и морфина. Основная цель исследования состояла в том, чтобы увидеть, может ли эндогенный морфин образовываться посредством эндогенного O-деметиляции кодеина при помощи CYP2D6, так же, как и экзогенный морфин. Они показали, что CYP2D6, по-видимому, не участвует в метаболизме кодеина, т.к. не было значительной разницы в МИ кодеин/морфин в моче между двадцатью активными и двадцатью «медленными» метаболизаторами ( $0,542 \pm 0,485$  против  $1,092 \pm 1,062$ ,  $p > 0,05$ ) [79].

Аналогично, введение однократной дозы 50 мг хинидинсульфата не оказывало влияния на МИ кодеин/морфин в моче по сравнению с исходным

уровнем ( $p > 0,05$ ) [79]. Однако для этого эксперимента была проанализирована моча лишь от четырех активных метаболизаторов, что неадекватно для таких измерений.

Кроме того, внутрииндивидуальная вариабельность МИ кодеин/морфин в моче довольно высока и может достигать до 17 раз для индивида в период между 2 и 3 днями во время контрольных замеров (без введения препарата) [79]. Такая изменчивость не позволяет использовать МИ кодеин/морфин в моче до и после приема ингибитора CYP2D6 или при исследовании противоположных генотипов. Кроме того, межиндивидуальная изменчивость также должна учитываться: МИ кодеин/морфин в моче может отличаться до 288 раз между двумя участниками (активными метаболизаторами) перед введением хинидина. Все эти наблюдения показывают, что МИ кодеин/морфин в моче в случае эндогенных субстратов является непригодным для фенотипирования CYP2D6.

### **5-Метокситриптамиин/Серотонин**

5-Метокситриптамиин является метоксииндолом и продуцируется в эпифизе [80]. Его метаболизм был изучен более подробно в работе Yu и соавт. [24], в которой изучались некоторые недостающие части в метаболическом цикле серотонин-мелатонин. Авторы показали, что среди 15 различных человеческих рекомбинантных ферментов CYP450 только CYP2D6 обладает способностью O-деметилировать 5-МТ в 5-НТ. Кроме того, было показано, что CYP2D6-трансгенные мыши продуцировали более высокие уровни 5-НТ от 5-МТ по сравнению с мышами дикого типа. Таким образом пара 5-МТ и 5-НТ может быть многообещающим маркером из-за ее специфического метаболизма.

В другом исследовании было обнаружено, что в начале исследования уровни тромбоцитарного 5-НТ у здоровых добровольцев были низкими у трех пациентов – «медленных» метаболизаторов, средними у 12 пациентов с активным метаболизмом и высокими у 11 субъектов с очень активным метаболизмом ( $p < 0,001$ ). Эти участники также получали однократную пероральную дозу 75 мг доксепина (субстрат и ингибитор CYP2D6), но уровень тромбоцитарного 5-НТ не

изменялся. Поскольку взятие крови было произведено в течение 24 часов после приема доксемина, снижение уровня тромбоцитарного 5-НТ могло остаться незамеченным. Период полураспада 5-НТ в тромбоцитах превышает 3 дня, поэтому 24 ч недостаточно для наблюдения каких-либо значительных колебаний [81]. Необходимы дальнейшие исследования в клинике для валидации применения пары 5-НТ и 5-МТ в качестве биомаркера для фенотипирования CYP2D6.

### **Пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин**

Пинолин - это индоламин эпифиза, обладающий антиоксидантными свойствами, особенно отмеченными в сетчатке [82]. Он специфически O-деметируется в 6-гидрокси-1,2,3,4 тетрагидро-β-карболин (6-НО-ТНВС) с помощью CYP2D6, как продемонстрировано при помощи человеческих рекомбинантных ферментов CYP450 [83]. С использованием рекомбинантных ферментов было также подчеркнуто, что вариант CYP2D6\*10 (аллель, связанный с пониженной активностью) не обладает активностью O-деметиلاзы по отношению к пинолину в отличие от CYP2D6\*1 и CYP2D6\*2. МИ пинолин/6-НОТНВС в моче был выше у мышей дикого типа по сравнению с CYP2D6-гуманизированными трансгенными мышами после внутрибрюшинной инъекции пинолина. Кроме того, O-деметилирование пинолина в высокой степени коррелировало с содержанием CYP2D6 в десяти микросомах печени человека (МПЧ) и с 1'-гидроксилированием буфуралола. При этом, активность пинолин-O-деметилазы полностью ингибировалась в присутствии хинидина в МПЧ [84]. Эти данные показывают, что метаболизм пинолина специфически опосредуется ферментом CYP2D6 и что пара пинолин/6-НО-ТНВС является перспективным кандидатом для фенотипирования.

До настоящего времени эффекты генетических факторов и модуляции активности CYP2D6 при помощи ингибиторов никогда не испытывались в клинике с использованием пары пинолин/6-НО-ТНВС. Сравнения с другими специфическими препаратами-субстратами также не проводились. Несмотря на отсутствие этой информации, Сычев и соавт. [85][86] определяли МИ 6-НО-ТНВС/пинолин в моче для измерения активности CYP2D6 у 69–70 мужчин с

алкогольной зависимостью. Аналитический метод, используемый для количественного определения пинолина и 6-НО-ТНВС в моче, еще не до конца охарактеризован.

### **M1 (m/z 444.3102)**

Tay-Sontheimer и соавт. [11] провели метаболомный анализ мочи у 189 здоровых детей для выявления эндогенного маркера, ассоциированного с активностью CYP2D6.

В результате этого исследования был обнаружен метаболит, M1 (m/z 444,3102), образование которого катализируется CYP2D6. Тем не менее, идентификация структуры этого потенциального маркера для фенотипирования CYP2D6 до сих пор не была возможна. M1 не был обнаружен у детей, являвшихся «медленными» метаболиторами ( $n = 5$ ), однако его можно было количественно оценить у тех, кто не относился к данной группе ( $n = 90$ ). Действительно, МИ креатинин/M1 в моче был более чем в 100 раз выше у группы «медленных» метаболиторов по сравнению с другой группой ( $p < 0,0001$ ). Эти результаты были подтверждены у десяти взрослых испытуемых, получивших в первый день 20 мг флуоксетина (ингибитор CYP2D6), а затем по 60 мг в течение следующих 13 дней [87]. После приема флуоксетина МИ креатинин/M1 в моче увеличился в 9,56 раза по сравнению с исходным уровнем ( $p = 0,029$ ) [11]. Логарифм МИ креатинин/M1 в моче значительно коррелировал с тем же показателем пары DEM/DOR у взрослых участников эксперимента до и после приема флуоксетина ( $r = 0,55$ ,  $p = 0,012$ ) [11].

Результаты вышеприведенных исследований демонстрируют многообещающий потенциал метаболомного анализа, однако также показывают то, что метаболиты CYP2D6 до сих пор остаются неизвестными и эта проблема требует решения. Насколько известно, дальнейшие анализы для обнаружения его эндогенных маркеров проведены не были.

#### **1.2.2.4. Маркеры активности CYP3A**

Семейство CYP3A включает следующие изоформы: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 и CYP3A43. Однако за метаболизм ЛВ в основном отвечают CYP3A4 и CYP3A5 [88]. CYP3A является наиболее важным ферментом, который экспрессируется в печени и метаболизирует более 30% всех продаваемых лекарств. На изменение активности CYP3A в основном влияют индукция, пол человека и воспалительные процессы [4]. Генетические полиморфизмы чаще всего описаны для CYP3A5. Наиболее распространенным аллельным вариантом является CYP3A5\*3, характеризующийся резким снижением активности фермента [89]. Тем не менее прогноз реализации генотипа в фенотип практически не описан для подсемейства CYP3A, а фенотипирование обычно используется для оценки активности CYP3A [90]]. Биотрансформация MDZ в 1-ОН-MDZ в настоящее время является золотым стандартом для измерения активности CYP3A. При пероральном приеме это позволяет провести фенотипирование общей активности CYP3A (то есть печеночной и кишечной), в то время как при внутривенном введении можно определить только печеночный метаболизм [40].

CYP3A содержится в большом количестве в кишечных энтероцитах, представляя почти 80% общего кишечного пула CYP450 [91]. В отличие от экзогенных маркерных веществ, принимаемых перорально, неизвестно, возможно ли оценить пресистемный метаболизм с помощью эндогенных маркеров, что может быть проблематичным, когда целью фенотипирования является оценка активности как печеночной, так и кишечной CYP3A.

Эндогенные биомаркеры активности CYP3A стали предметом многочисленных исследований. Два обзора посвящены двум из этих маркеров, а именно парам кортизол/ 6 $\beta$ -гидрокортизол [92] и холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин [93], что указывает на большое количество клинических данных.

## Кортизол/6β-гидрокортизол

Ged и соавт. [94] были первыми, кто обнаружил, что CYP3A катализирует образование 6β-гидрокортизола, который экскретируется в составе мочи. Они продемонстрировали, что кортизол-6β-гидроксилазная активность была выше в МПЧ пациентов, получавших рифампицин, в сравнении с контрольными донорами ( $87 \pm 31$  пмоль/мин/мг против  $15 \pm 6$  пмоль/мин/мг). Когда кортизол инкубировали в МПЧ вместе с различными ингибиторами CYP450, наибольшее ингибирование достигалось при инкубации кетоконазолом, активным ингибитором CYP3A [95]. Peng и соавт. [96] также подчеркнули, что кортизол подвергался 6β-гидроксилированию преимущественно CYP3A4. CYP2B6 показал лишь незначительную активность в отношении кортизола, тогда как CYP2C9, CYP2C19 и CYP2D6 вообще не проявляли активности.

В клинических исследованиях, МИ 6β-гидрокортизол/кортизол, определенный в моче по истечении 24 ч, был хорошо изучен и часто используется для характеристики активности CYP3A вместо экзогенных маркеров. Использование эндогенных субстратов в качестве маркеров позволяет выявить изменения, обусловленные ингибированием или индукцией ЛВ, что описано в большом количестве исследований.

В 2003 году был опубликован обзор, посвященный определению 6β-гидрокортизола в моче [92], поэтому в этой работе кратко обсуждаются только ключевые моменты и последние данные. Вследствие большой межиндивидуальной вариабельности МИ 6β-гидрокортизол/кортизол в моче Galteau и соавт. [92] предложили, что каждый участник исследования должен являться его/ее собственным контролем. В действительности, межиндивидуальная вариабельность измеренного в моче по истечении 24 ч МИ 6β-гидрокортизол/кортизол, который представлен коэффициентом вариации, больше чем вариабельность почечного клиренса, внутривенно введенного MDZ, который был определен у 20 здоровых добровольцев в начале исследования (68,4% против 22,5% соответственно). Такая же тенденция наблюдалась касательно внутрииндивидуальной вариабельности

(26% против 8% соответственно) [97]. Тем не менее, кажется, что меж- и внутрииндивидуальная вариабельность ниже при измерении КХО 6 $\beta$ -гидрокортизола чем при определении метаболического индекса по истечении 24 ч, что неудивительно, потому что последний показатель не учитывает почечный клиренс кортизола. В самом деле, Shibasaki и соавт. [98] сообщили, что КХО 6 $\beta$ -гидрокортизола отличался небольшой межиндивидуальной вариабельностью среди 49 здоровых добровольцев (коэффициент вариации = 32,9%). Внутрииндивидуальная вариабельность, оцененная у 14 участников исследования, также была довольно низкой (коэффициент вариации = 20,0  $\pm$  4,5%).

Сбор мочи необходимо осуществлять в течение 24 часов, поскольку экскреция кортизола подчиняется циркадному ритму. Некоторые исследователи также предложили использовать единый образец мочи, поскольку МИ 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче, оставался стабильным во времени [15]. Однако это предположение противоречило другим исследовательским группам [99]. К тому же, похоже, что КХО 6 $\beta$ -гидрокортизола имеет меньше колебаний из-за циркадного ритма, чем МО 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче.

Связь между МО 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче и генетическим полиморфизмом *CYP3A5*, а именно аллельным вариантом *CYP3A5\*3*, плохо изучена, а данные несколько противоречивы. В исследовании, проведенном среди 200 непальцев, живущих в Бангладеше, было установлено, что носители генотипа *CYP3A5\*1/\*1* имели значительно более высокий МИ 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче (6,28  $\pm$  3,43) по сравнению с теми, кто являлся носителем вариантов *CYP3A5 \*1/\*3* (3,68  $\pm$  1,37) или *CYP3A5\*3/\*3* (3,58  $\pm$  1,95). Однако исследование на 98 здоровых корейских добровольцах не выявило существенных различий в генотипах [13]. Необходимы дополнительные исследования, особенно в разных популяциях, чтобы лучше понять эти расхождения.

Исследование Луо и соавт., касающееся КХО 6 $\beta$ -гидрокортизола, включившее 67 участников, выявило, что этот показатель был значительно понижен ( $p < 0,05$ ) в случае носительства варианта *CYP3A5\*3/\*3* (91,51  $\pm$  67,79 мл/

ч) по сравнению с носителями вариантов *CYP3A5\*1/\*1* и *CYP3A5\*1/\*3* ( $173,5 \pm 121,4$  мл/ч). Они также обнаружили, что МИ в моче пар  $6\beta$ -гидрокортизол/кортизол и  $6\beta$ -гидрокортизон/кортизон, измеренные одновременно, не менялись, независимо от генотипа *CYP3A5*.

Что касается модуляции *CYP3A*, похоже, что МИ  $6\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче или КХО  $6\beta$ -гидрокортизола являются хорошими маркерами для контроля индукции *CYP3A* [106]. Тем не менее, их способность оценивать ингибирование фермента иногда противоречива, потому что эффект может быть слабым, а динамичный диапазон ниже по сравнению с MDZ [101].

Корреляция между любым из показателей фенотипирования, проведенного с помощью MDZ, (то есть клиренсом при пероральном приеме препарата, клиренсом при внутривенном приеме препарата, МИ и МИ  $6\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче или КХО  $6\beta$ -ОН-F в начале эксперимента) являлась слабой или незначительной в выявленных исследованиях [13], [97], [100], [101], [102]. Однако Ни и соавт. [100] наблюдали у мужчин сильную корреляцию между КХО  $6\beta$ -гидрокортизола, определенным в разные периоды времени, и клиренсом при пероральном приеме MDZ ( $r = 0,829-1,000$ , все  $p < 0,042$ ), что может указывать на возможное влияние гормонального статуса на метаболизм кортизола у женщин. Эта исследовательская группа также обнаружила значительную корреляцию между МИ  $6\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче, определенным в разные периоды времени, и клиренсом при пероральном приеме MDZ ( $r = 0,678-0,706$ , все  $p < 0,015$ ). В некоторых публикациях предполагают, что методика, основанная на использовании кортизола как эндогенного маркера, отражает только печеночный метаболизм гормона *CYP3A*, не учитывая кишечный метаболизм, в отличие определения клиренса при пероральном приеме MDZ [100], [101]. Это предположение может частично объяснить частое отсутствие корреляции между показателями. Тем не менее, стоит отметить, что 600 мл грейпфрутового сока, который является ингибитором *CYP3A* в энтероцитах, значительно уменьшило МИ  $6\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче у восьми здоровых добровольцев по

сравнению с исходным уровнем, что может указывать на метаболизм кортизола в кишечнике [103]. Необходимы дополнительные исследования, чтобы лучше понять отсутствие корреляции с фенотипированием, основанным на использовании экзогенного маркерного субстрата, то есть MDZ.

### **Кортизон/6 $\beta$ -гидрокортизон**

Abel и соавт. [104], [105] были первыми, кто предположил участие CYP3A в биотрансформации кортизона в 6 $\beta$ -гидрокортизон. Это было подтверждено Peng и соавт. [96] при инкубировании МПЧ с различными специфическими ингибиторами CYP450 и без них. Специфические ингибиторы CYP3A, тролеандомицин и кетоконазол, снижали 6 $\beta$ -гидроксилирование кортизона на 93% по сравнению с контролем. Они также использовали человеческие рекомбинантные ферменты CYP450 для того, чтобы оценить влияние различных изоферментов на метаболизм кортизона, и пришли к выводу, что биотрансформация в основном опосредуется CYP3A.

В клинических испытаниях те же исследователи сообщили, что *in vivo* КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона значительно снижался после приема итраконазола. Шесть здоровых добровольцы приняли перорально разовую дозу итраконазола (50, 200 или 400 мг), а через 4 часа - 2 мг MDZ. Только прием 200 или 400 мг приводил к значительному снижению КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона по сравнению с контролем ( $p = 0,006$ ). Однако этот показатель был менее чувствителен к ингибированию фермента, чем при приеме MDZ [96].

После приема кетоконазола 24 здоровыми добровольцами в дозировке 400 мг в течение 4 дней или рифампицина в дозировке 600 мг в течение 10 дней, МИ 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в моче значительно уменьшился или увеличился, соответственно, по сравнению с исходным уровнем (0,21-кратно или 5,01-кратно;  $p < 0,0001$ ). Соотношение 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в плазме, однако, не изменилось в обоих испытаниях, но авторы это не обсуждали [16]. Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях, особенно относительно приема рифампицина, в том числе для КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона [15], [17], [106].

МИ 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в моче был позже изучен Lee и соавт. [13]]у 98 здоровых корейцев. Они обнаружили значительную корреляцию Пирсона между данным эндогенным маркером и клиренсом MDZ при базовых условиях ( $r = 0,330$ ,  $p < 0,01$ ). Они также заметили, что полиморфизм *CYP3A5*\*3 не влияет на МИ 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в моче. Тем не менее, Luo и соавт. [101] показали значительное ( $p < 0,01$ ) снижение КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона у носителей аллельного варианта *CYP3A5*\*3/\*3 ( $n = 34$ ) по сравнению с гомозиготными носителями аллеля дикого типа (*CYP3A5*\*1/\*1) и гетерозиготами (*CYP3A5*\*1/\*3) ( $n = 33$ ).

Два эндогенных маркера, МИ 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в моче и КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона, могут быть использованы при фенотипировании активности *CYP3A4*. КХО 6 $\beta$ -гидрокортизона, в отличие от МИ 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон в моче, по-видимому, также позволяет оценить активность *CYP3A5* и не зависит от почечного клиренса.

### **Холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин**

Эндогенная пара холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин была тщательно изучена в последние годы. Обзор, опубликованный Мао и соавт. [93], суммирует накопленные знания об этом биомаркере. Следовательно, в этой статье он будет обсуждаться кратко.

В 2001 году Vodin и соавт. [107], исследуя метаболизм холестерина, по счастливой случайности нашли, что пациенты, которых лечили антиэпилептическими лекарственными средствами (то есть карбамазепином, фенитоином, фенобарбиталом) имели очень высокий уровень 4 $\beta$ -гидроксихолестерина по сравнению с нелечеными индивидуумами. Они также инкубировали холестерин с четырьмя различными рекомбинантными ферментами, включая *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9* и *CYP3A4*. Только *CYP3A4* катализировал 4 $\beta$ -гидроксилирование холестерина. Возможно, что *CYP3A5* также метаболизирует холестерин в 4 $\beta$ -гидроксихолестерин. Действительно, у здоровых добровольцев из трех разных групп населения (136 танзанийцев, 136 шведов и 146 корейцев) уровни

4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме увеличивались с увеличением количества аллелей *CYP3A5\*1* [107]. Те же наблюдения были сделаны при исследовании на 150 эфиопах [108]. Однако недавно Hole и соавт. [109], а также Lee и соавт. [110] не обнаружили значительного влияния аллельного варианта *CYP3A5\*3* на уровень 4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме. Необходимы дополнительные исследования, чтобы лучше понять влияние *CYP3A5* на 4 $\beta$ -гидроксилирование холестерина.

Diczfalusy и соавт. [111] измерили кажущийся период полураспада 4 $\beta$ -гидроксихолестерина (17 дней), приводящий к стабильному уровню этого метаболита в плазме с течением времени. Долгий период полураспада может быть проблемой, когда необходимо зафиксировать быстрые изменения в активности *CYP3A*.

Как обобщено в обзоре Мао и соавт. [93], наблюдается значительная корреляция между уровнем 4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме или соотношением 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/ холестерин и клиренсом перорально или внутривенно введенного MDZ [112], [32]. Похоже, что использование соотношения 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин обеспечивает лучшие результаты, чем уровень метаболита в плазме [113]. Различные корреляции, однако, являются относительно слабыми, и описано много расхождений между данными маркерами. Действительно, несмотря на то, что холестерин как эндогенный маркер отражал слабую индукцию активности *CYP3A4* пропиверином в статье Tomalik-Sharte и соавт. [113], показатели, полученные при приеме MDZ, указывали на ингибирование фермента. Ингибирование *CYP3A* ритонавиром также больше отразилось на клиренсе MDZ, чем на показателях холестерина. В исследовании Björkhem-Bergman и соавт. [112] выявлено более выраженное влияние индукции *CYP3A4* после приема рифампицина внутрь на клиренс MDZ, чем на МИ 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин в плазме. Кроме того, Lee и соавт. [110] не обнаружили корреляции между уровнем 4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме и клиренсом MDZ, введенного внутривенно. Одной из причин этих несоответствий может быть большая разница между периодами полураспада MDZ и 4 $\beta$ -гидроксихолестерина [113].

Мао и соавт. [93] также определили влияние различных индукторов и ингибиторов СYP3A на данный биомаркер. В общем и целом, 4 $\beta$ -гидроксихолестерин является хорошим маркером индукции СYP3A. Величина индукции обычно похожа на ту, что определяется клиренсом внутривенно введенного MDZ, но меньше, чем клиренс перорально введенного MDZ. Это может объясняться тем, что клиренс перорально введенного MDZ отражает как кишечный, так и печеночный метаболизм ферментом СYP3A, в то время как уровень 4 $\beta$ -гидроксихолестерина в плазме или соотношение 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин отражают только печеночный метаболизм [93]. Что касается ингибирования, данные также собраны в обзоре, описанном ранее. Эндогенный 4 $\beta$ -гидроксихолестерин является менее подходящим маркером, реагирующим на ингибирование СYP3A, если ингибитор фермента не обладает большой активностью и/или не назначается на достаточно длительный период [93].

Таким образом, несмотря на то, что соотношение 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин в плазме является хорошим маркером индукции активности СYP3A и обладает низкой внутрииндивидуальной вариабельностью, данная пара имеет некоторые недостатки. Например, большой период полураспада 4 $\beta$ -гидроксихолестерина ограничивает использование этого маркера для долгосрочных исследований, так как делает невозможным определение быстрых изменений в активности СYP3A (например, при ингибировании СYP3A). Кроме того, необходимо исследовать, будет ли соотношение 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин в плазме также отражать и кишечный метаболизм СYP3A, как в случае с перорально введенными маркерами активности СYP3A.

Дегидроэпиандростерон/(7 $\beta$ -ОН-дегидроэпиандростерон плюс 16 $\alpha$ -ОН-дегидроэпиандростерон)

Slaunwhite и соавт. [114] были одной из первых исследовательских групп, кто обнаружил 16-гидроксилирование дегидроэпиандростерона (DHEA) в печени плода человека при инкубации с восстановленным никотинамидадениндинуклеотидфосфатом (НАДФН).

Эти результаты привели к дальнейшим исследованиям, в частности, изучению онтогенеза CYP3A [115]. После этого было продемонстрировано, что CYP3A специфически участвует в образовании 7 $\alpha$ -ОН-DHEA, 7 $\beta$ -ОН-DHEA и 16 $\alpha$ -ОН-DHEA при использовании человеческих рекомбинантных ферментов CYP450 [116], [117].

В 2013 году Shin и соавт. [16], проанализировав данные метаболома, показали значительное увеличение МИ 7 $\beta$ -ОН-DHEA/DHEA в моче (в 1,88 раза,  $p < 0,0001$ ) и 16 $\alpha$ -ОН-DHEA/DHEA (3,97 раза,  $p < 0,0001$ ) после приема рифампицина (600 мг в течение 10 дней) 24 здоровыми добровольцами по сравнению с исходным уровнем.

Аналогичные результаты были получены и в других исследованиях, проведенных той же исследовательской группой [14], [17]. МИ 7 $\beta$ -ОН-DHEA/DHEA в моче также значительно снижался при ингибировании фермента (0,34 раза,  $p < 0,0001$ ), когда участники эксперимента получали кетоконазол в дозировке 400 мг один раз в день в течение 4 дней, в то время как МИ в моче 16 $\alpha$ -ОН-DHEA/DHEA не менялся [16].

МИ 16 $\alpha$ -ОН-DHEA/DHEA в моче был изучен позднее Lee и соавт. [13] у 98 здоровых корейцев. Они не выявили значительной корреляции между данным эндогенным маркером и клиренсом MDZ или метаболическим индексом при стандартных условиях. Кроме того, похоже, что полиморфизм CYP3A5\*3 не влияет на МИ 16 $\alpha$ -ОН-DHEA/DHEA в моче. Несмотря на то, что необходимо больше исследований, чтобы лучше понять механизмы, обуславливающие работу данных эндогенных маркеров, полученные результаты являются многообещающими и демонстрируют потенциал метаболомики к открытию новых механизмов и определению биомаркеров.

### **Дезоксихолеваая кислота/1 $\beta$ -гидрокси дезоксихолеваая кислота**

В 1980-х и 1990-х годах гидроксилированные метаболиты желчных кислот были обнаружены в моче пациентов и здоровых добровольцев, получавших рифампицин, индуктор ферментов CYP450, в сравнении с контрольной группой

или исходным уровнем [118], [119]. Те же наблюдения были сделаны, когда пациенты с холестазом принимали фенобарбитал, другой индуктор CYP450 [120]. Поскольку рифампицин и фенобарбитал представляют собой неспецифические индукторы, было неизвестно, какие именно ферменты, индуцированные этими препаратами, приводили к увеличению метаболизма желчных кислот.

В 2005 году Vodin и соавт. [121] использовали человеческий рекомбинантный фермент CYP3A4, экспрессируемый в клетках насекомых, для того, чтобы показать, что дезоксихолева кислота (DCA) метаболизируется в 1 $\beta$ -гидроксидезоксихолевою кислоту (1 $\beta$ -ОН-DCA) при участии этого фермента. Hayes и соавт. [122] проверили специфичность этой реакции путем инкубации DCA с 21 рекомбинантным человеческим ферментом CYP450. Больше всего 1 $\beta$ -ОН-DCA было образовано при участии CYP3A4 и CYP3A7. Более того, когда DCA инкубировали в МПЧ с кетоконазолом, ингибитором CYP3A, превращение в 1 $\beta$ -ОН-DCA сильно уменьшилось.

Как показано Vodin и соавт., средний уровень 1 $\beta$ -ОН-DCA в моче сильно возрос у пациентов, получавших карбамазепин (54 нг/мкмоль), по сравнению со здоровыми добровольцами (5 нг/мкмоль) [121]. Hayes и соавт. [122] первыми предложили, что МИ 1 $\beta$ -ОН-DCA/DCA в моче может стать эндогенным биомаркером активности CYP3A4. Они еще раз продемонстрировали, что МИ 1 $\beta$ -ОН-DCA/DCA увеличен в семь раз в образце мочи пациента, получавшего карбамазепин, по сравнению с контрольным образцом.

Хотя эти результаты должны быть подтверждены на большей когорте пациентов, новый маркер активности CYP3A4 является действительно многообещающим. Для валидации фенотипирования активности CYP3A4 с помощью МИ 1 $\beta$ -ОН-DCA/DCA в моче необходимы корреляция с существующим методом, а также оценка маркера при ингибировании CYP3A.

## **Витамин D<sub>3</sub>/ (4β, 25-дигидроксивитамин D<sub>3</sub> плюс 1,23R,25-тригидроксивитамин D<sub>3</sub>)**

Известно, что противосудорожные препараты, а также рифампицин вызывают остеопороз в течение нескольких лет [123], [124]. Нарушение минерализации костей считалось результатом повышенного катаболизма 25-гидроксивитамина D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>), предшественника 1,25-дигидроксивитамина D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>), который является активной формой гормона. Показано, что индукция гена *CYP24* через активацию ядерного рецептора PXR может быть одной из причин остеопороза, так как фермент CYP24A1 осуществляет превращение 25(OH)D<sub>3</sub> и 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> в неактивные метаболиты 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> и 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, соответственно [125]. Впоследствии было обнаружено, что, в дополнение к CYP24A1, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> также метаболизируется CYP3A4 в основном в 1,23R,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> (и в 1,24S,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>, но с незначительным участием). Хи и соавт. [126] провели скрининг 13 рекомбинантных человеческих ферментов CYP450. Только CYP3A4, CYP3A5 и CYP24A1 проявляли активность в отношении 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. CYP24A1 катализирует только 24-гидроксилирование, но с другой стереоспецифичностью (образование 1,24R,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> и 1,23S,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>).

Позднее Wang и соавт. [127] обнаружили, что 25(OH)D<sub>3</sub> также биотрансформируется с помощью CYP3A4 через 4-гидроксилирование в 4β,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (и в меньшей степени в 4α,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>). Эти результаты были получены в эксперименте с 13 рекомбинантно экспрессируемыми человеческими CYP450. Только CYP3A4 и CYP3A5 имели активность в отношении 25(OH)D<sub>3</sub>. Они также установили корреляцию между 4-гидроксилированием

25(OH)D<sub>3</sub> и гидроксилированием MDZ, а также содержание CYP3A4 в МПЧ, полученных от 42 доноров. Учитывая его сложность, на рис.3 суммирован метаболизм 25(OH)D<sub>3</sub> и 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ферментами CYP450. В литературе хорошо описано, что 25(OH)D<sub>3</sub> и 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> реабсорбируются через кишечник, что позволило бы одновременную характеристику кишечного и печеночного метаболизма [128].

На сегодняшний день результаты, полученные *in vitro*, никогда не были полностью подтверждены в клинике. Wang и соавт. [127] провели клиническое испытание с участием шести здоровых добровольцев, получавших 600 мг рифампицина в течение 7 дней. Они заметили, что соотношение  $4\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3/25(\text{OH})\text{D}_3$  в плазме значительно увеличилось (+ 120%,  $p = 0,007$ ) после приема рифампицина по сравнению с контролем. Похожее клиническое испытание было выполнено позже той же исследовательской группой. 23 здоровых добровольца принимали 300 мг рифампицина ежедневно в течение 6 дней, а также 1 мг MDZ для оценки его клиренса. Соотношение  $4\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3/25(\text{OH})\text{D}_3$  в плазме было снова значительно увеличено после приема рифампицина по сравнению с исходным уровнем ( $p < 0,05$ ). Кроме того, они наблюдали значительную корреляцию между соотношением  $4\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3/25(\text{OH})\text{D}_3$  в плазме и клиренсом перорально введенного MDZ с и без приема рифампицина ( $r = 0,36$ ,  $p < 0,01$ ) [129].

Для подтверждения соотношения  $4\beta,25(\text{OH})_2\text{D}_3/25(\text{OH})\text{D}_3$  в плазме как эндогенного маркера, необходимо использовать модуляцию ингибиторами и корреляцию с контрольным маркером в начале исследования. Было бы также интересно протестировать  $1,23\text{R},25(\text{OH})_3\text{D}_3/1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  в плазме.

### **$\omega$ - и ( $\omega - 1$ )-гидроксилированные среднецепочечные ацилкарнитины**

Kim и соавт. [10] выполнили метаболомный анализ мочи 36 здоровых добровольцев после ингибирования и индукции активности CYP3A. Для этого испытуемые принимали перорально 400 мг кетоконазола один раз в день в течение 4 дней для ингибирования фермента и 600 мг перорально рифампицин в течение 10 дней для индукции фермента. В то же время участникам также вводили внутривенно 1 мг MDZ в каждой серии экспериментов. Они определили, что  $\omega$ - и ( $\omega - 1$ )-гидроксилированные среднецепочечные ацилкарнитины могут служить потенциальными биомаркерами CYP3A: гидроксиоктеноилкарнитин I (Car C8:1-OH I), гидроксиоктеноилкарнитин II (Car C8:1-OH II), гидроксидекадиеноилкарнитин (Car C10:2-OH), гидроксиундекадиеноилкарнитин (Car C11:2-OH), гидроксиундеценилкарнитин (Car C11: 1-OH). Концентрация

четырёх из этих метаболитов была значительно уменьшена при ингибировании фермента (от 0,07 до 0,37 раз,  $p < 0,001$ ), а при индукции повышена (в 2,33–13,16 раза,  $p < 0,001$ ) по сравнению с контрольными сериями.

Возможно, что субстраты идентифицированных метаболитов были не коммерциализированными. Поэтому, чтобы проверить метаболизм *in vitro*, они использовали четыре разные короткоцепочечные жирные кислоты (октановую, 2-октеную, 3-октеную и 7-октеную кислоты), которые были инкубированы с суперсомами CYP3A4, CYP4A11 и CYP4F2. По-видимому, CYP3A4 специфически катализировал реакции  $\omega$ - и  $\omega$ -1-гидроксилирования 2- и 3-октеных кислот.

Результаты этого исследования доказывают, что метаболомика представляет собой очень многообещающий подход, позволяющий открыть новые биомаркеры активности CYP450. В настоящее время необходимо валидировать результаты *in vitro* исследований, в которых используют соответствующие субстраты вместо короткоцепочечных (C8) жирных кислот. Включение таких субстратов в число маркеров для фенотипирования вместо креатинина также позволит улучшить получаемые результаты.

Все эндогенные биомаркеры, которые были изучены в клинике суммированы в таблице 1, включая все основные критерии валидации фенотипических метрик. Все изоформы P450 (CYP450), описанные в литературе и изученные в клинике, а также их эндогенные субстраты и тестируемые показатели (в таблицу вошли основные критерии валидации фенотипа, включая эффекты генотипа, индукторов, ингибиторов и корреляция с эталоном на исходном уровне).

**Таблица 1.** Эндогенные биомаркеры, изученные на клиническом материале

Субстрат/метаболит	Показатель	Генетические факторы	Реакция на индукторы	Реакция на ингибиторы	Корреляция с эталоном на исходном уровне
<b>CYP1A2</b>					

МЕЛ/6-ОН- МЕЛ	МЕЛ -AUC	?	-	✓	-
	Выведение МЕЛ с мочой 0-14 ч	?	?	✓	?
	Выведение МЕЛ6S с мочой 0-9 ч	?	?	✓	?
<b>CYP2C19</b>					
AK/11,12-EETs	Уровни 11,12-DHET в плазме	✓	?	?	?
AK/14,15-EETs	Уровни 14,15-DHET в плазме	✓	?	?	?
<b>CYP2D6</b>					
COD/MOR	МИ COD/MOR в моче 0–24 ч	-	N/A	-	-
5-MT/5-HT	Уровень 5-HT в тромбоцитах	✓	N/A	-	?
PIN/6-НО-THBC	МИ 6-НО-THBC/PIN в моче	?	N/A	?	?
M1 (m/z 444.3102)/?	МИ Cr/M1 в моче 0–4 ч или 0–12 ч	✓	N/A	✓	?
<b>CYP3A</b>					
F/6β-ОН-F	КХО 6β-ОН-F МИ 6β-ОН-F/F в моче	✓ ±	✓ ✓	± ±	± ±
E/6β-ОН-E	КХО 6β-ОН-E МИ 6β-ОН-E/E в моче	✓ –	✓ +	± +	? +
CHOL/4β-ОН-CHOL	Соотношение 6β-ОН-CHOL/CHOL плазме Уровень 6β-ОН-CHOL в плазме	✓ ±	✓ ✓	± ±	± ±

DHEA/16 $\alpha$ -OH-DHEA	МИ 16 $\alpha$ -OH-DHEA/DHEA в моче 0–12 ч	-	✓	-	-
DHEA/7 $\alpha$ -OH-DHEA	МИ 7 $\alpha$ -OH-DHEA/DHEA в моче 0–12 ч	?	✓	✓	?
DCA/1 $\beta$ -OH-DCA	МИ 1 $\beta$ -OH-DCA/DCA в моче (разовое)	?	✓	?	?
25OHD <sub>3</sub> /4 $\beta$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	Соотношение 4 $\beta$ ,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> /25OHD <sub>3</sub> в плазме	?	✓	?	?
$\omega$ - и ( $\omega$ - 1)-гидроксилированные среднепочечные ацилкарнитины	Car C8:1-OH I	?	✓	-	?
	Car C8:1-OH II	?	✓	✓	?
	Car C10:2-OH	?	✓	✓*	?
	Car C11:2-OH	?	✓	✓	?
	Car C11:1-OH	?	✓	✓	?

В таблице: АК арахидоновая кислота, холестерин CHOL, Car C8:1-OH гидроксиоктеноил карнитин, Car C10:2-OH гидрокси декадиеноил карнитин, Car C11:1-OH гидрокси ундеценоил карнитин, Car C11:2-OH гидрокси ундекадиеноил карнитин, COD кодеин, Cr креатинин, DCA дезоксихолева кислота, DHEA дегидроэпиандростерон, DHET дигидроксиеткозатриеновая кислота, E кортизон, EET эпоксиеткозатриеновая кислота, F кортизол, ч часы, MEL-мелатонин, MEL6S 6-сульфатоксимелатонин, MOR морфин, N/A не применимо, PIN пинолин, 1 $\beta$ -OH-DCA 1 $\beta$ -гидрокси дезоксихолева кислота, 4 $\beta$ -OH-CHOL 4 $\beta$ -гидрокси холестерин, 4 $\beta$ -OH-CHOL 4 $\beta$ -гидрокси холестерин, 4 $\beta$ ,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 4 $\beta$ ,25-дигидрокси витамин D<sub>3</sub>, 5-HT серотонин, 5-MT 5-метокситриптамин, 6-HO-THBC 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболин, 6 $\beta$ -OH-E 6 $\beta$ -гидрокси кортизон, 6 $\beta$ -OH-F 6 $\beta$ -гидрокси кортизол, 6-OH-MEL 6-гидрокси мелатонин, 25OHD<sub>3</sub> 25-гидрокси витамин D<sub>3</sub>, ✓ критерии валидации выполнены, - критерии валидации не выполнены,  $\pm$  спорные данные, ? не проверялось в клинике, \* указывает, что выполняется только для женщин

Ни один эндогенный маркер не соответствует всей совокупности критериев для его валидации. Основными причинами тому являются отсутствие данных или отрицательные результаты. К эндогенным маркерам, отвечающим большинству критериев, относятся нормализованный или ненормализованный уровень 4 $\beta$ -

гидроксихолестерина в плазме, МИ  $6\beta$ -гидроксикортизол/кортизол и  $6\beta$ -гидроксикортизон/кортизон в моче, а также КХО  $6\beta$ -гидроксикортизола и  $6\beta$ -гидроксикортизона. Основным ограничением  $4\beta$ -гидроксихолестерина как маркера является его недостаточная способность реагировать на быстрые изменения активности СYP3A после ингибирования во время межлекарственных взаимодействий. Это может объясняться длительным периодом полураспада этого соединения (17 ч). Перспективными могут стать маркеры, в которые входят  $6\beta$ -гидроксикортизол или  $6\beta$ -гидроксикортизон. Однако различные параметры пары  $6\beta$ -гидроксикортизол/кортизол, могут вызвать противоречия (то есть корреляция с MDZ на исходном уровне). Что касается кортизона и его метаболита  $6\beta$ -гидроксикортизона, необходимы дополнительные эксперименты, поскольку некоторые выводы основаны только на одном исследовании.

#### **1.2.2.5. Комбинация эндогенных биомаркеров СYP450**

Вместо прогнозирования активности СYP3A с использованием одного параметра, более подходящим может быть создание многофакторной модели, включающей наиболее значимые ковариаты (то есть эндогенные биомаркеры и/или физиологические факторы) для улучшения прогноза. Kim и соавт., Shin и соавт., а также Lee и соавт. были первыми, кто составил пять различных многофакторных уравнений для прогнозирования клиренса внутривенно введенного MDZ. Различные модели описаны в таблице 2 (включает краткое описание клинического испытания и оценку корреляции с клиренсом внутривенно введенного мидазолама).

**Таблица 2.** Краткое изложение модели множественной линейной регрессии, разработанной Kim и соавт., Shin и соавт., а также Lee и соавт.

Число участников	Курсы лечения	Многофакторное уравнение	Корреляция с клиренсом в/в MDZ
26 здоровых участников (мужчин)	<p><b>Контроль:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза</p> <p><b>Ингибирование:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема KET (400 мг в течение 4 дней)</p> <p><b>Индукция:</b> 2,5 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема RIF (600 мг в течение 10 дней)</p>	$\ln(\text{клиренса MDZ}) = 2,1539 + 0,2724 \times I + 0,0101 \times \text{DHEA} + 0,0910 \times \text{соотношение } 7\alpha\text{-OH-DHEA/DHEA} + 0,6502 \times \text{соотношение } 6\beta\text{-OH-E/E}$ <p><i>(I - 1 для CYP3A5*1/*3 и 0 для CYP3A5*3/*3)</i></p>	$r^2 = 0,705$ (данные получены с контрольной фазы, фазы индукции CYP3A и фазы ингибирования CYP3A)
16 здоровых участников (женщин)	<p><b>Контроль:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза</p> <p><b>Ингибирование:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема KET (400 мг в течение 4 дней)</p> <p><b>Индукция:</b> 2,5 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема RIF (600 мг в течение 10 дней)</p>	$\ln(\text{клиренса MDZ}) = 0,1419 + 0,9443 \times \ln(6\beta\text{-OH-F/F}) - 0,469 \times \ln(6\beta\text{-OH-E/E})$	$r^2 = 0,881, p < 0,0001$ (данные получены с контрольной фазы, фазы индукции CYP3A и фазы ингибирования CYP3A)

<p>42 здоровых участника (26 мужчин и 16 женщин)</p>	<p><b>Контроль:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза</p> <p><b>Ингибирование:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема KET (400 мг в течение 4 дней)</p> <p><b>Индукция:</b> 2,5 мг в/в MDZ, однократная доза, через 1 час после последнего перорального приема RIF (600 мг в течение 10 дней)</p>	<p><math>\ln(\text{клиренса MDZ}) = 2,2303 - 0,6165 \times \text{пол} - \ln(6\beta\text{-OH-E}) + 0,666 \times \ln(6\beta\text{-OH-F/F}) + 0,00664 \times F</math></p> <p><i>(пол - 1 если женский и 0 если мужской)</i></p> <p><math>\ln(\text{клиренса MDZ}) = 1,4443 - 0,5559 \times \text{пол} + 0,1637 \times \ln(\text{Car C8:1-OH II/Cr} + 1) + 0,09661 \times \ln(\text{Car C10:2-OH/Cr} + 1) + 0,1261 \times \ln(\text{Car C11:1-OH/Cr} + 1) + 0,1191 \times \ln(6\beta\text{-OH-F/Cr} + 1)</math></p> <p><i>(пол - 1 если женский и 0 если мужской)</i></p>	<p><math>r^2 = 0,864, p &lt; 0,0001</math> (данные получены с контрольной фазы, фазы индукции CYP3A и фазы ингибирования CYP3A)</p> <p><math>r^2 = 0,894</math> (данные получены с контрольной фазы, фазы индукции CYP3A и фазы ингибирования CYP3A)</p>
<p>100 здоровых корейцев (50 мужчин и 50 женщин)</p>	<p><b>Контроль:</b> 1 мг в/в MDZ, однократная доза</p>	<p><math>\ln(\text{клиренса MDZ}) = 3,2181 - 0,1320 \times (1\text{-gender}) + 0,1090 \times \ln(6\beta\text{-OH-F/F}) + 0,1204 \times \ln(6\beta\text{-OH-E/E})</math></p> <p><i>(пол - 1 если женский и 0 если мужской)</i></p>	<p><math>r^2 = 0,261, p &lt; 0,001</math> (получены данные на момент включения в исследование)</p>
<p>Аббревиатуры: <i>в/в</i> – внутривенно введенный, <i>Car C8:1-OH</i> – гидроксиктеноилкарнитин, <i>Car C10:2-OH</i> – гидроксидекадиеноилкарнитин, <i>Car C11:1-OH</i> – гидроксинундеценоилкарнитин, <i>Cr</i> – креатинин, <i>CYP</i> – цитохром P450, <i>DHEA</i> – дегидроэпиандростерон, <i>E</i> – кортизон, <i>F</i> – кортизол, <i>KET</i> – кетоконазол, <i>MDZ</i> – мидазолам, <i>RIF</i> – рифампицин, <i>6β-OH-E</i> – 6β-гидроксикортизон, <i>6β-OH-F</i> – 6β-гидроксикортизол</p>			

Обнаруживаются значительные корреляции при одновременном использовании данных контроля, ингибирования и индукции ( $r^2 \geq 0,705$ ) Следовательно, разные уравнения могут предсказать активность СУР3А, когда она меняется под влиянием межлекарственных взаимодействий. Тем не менее, они не оценивали пригодность многофакторных моделей для прогноза конститутивной активности СУР3А. Только последнее уравнение может прогнозировать исходную активность СУР3А, но с меньшей точностью ( $r^2 = 0,261$ ). Эти результаты призывают к дальнейшим исследованиям в этом направлении путем изучения другие ковариат и применения многофакторных моделей для остальных ферментов СУР450.

Peng и соавт. использовали комбинацию двух эндогенных показателей для оценки активности СУР3А: КХО 6 $\beta$ -гидрокортизола и 6 $\beta$ -гидрокортизона. Хотя это обеспечивает почти аналогичные результаты в сравнении с двумя отдельно измеренными показателями, комбинация дает более точную картину, поскольку учитывает обратимое взаимопревращение кортизола и 6 $\beta$ -гидрокортизола в кортизон и 6 $\beta$ -гидрокортизон, соответственно, с участием 11- $\beta$ -ОН-стероиддегидрогеназы. Кроме того, Luo и соавт. показали, что комбинированный показатель клиренса лучше предсказывает общий клиренс циклоспорина, чем КХО отдельно измеренных 6 $\beta$ -гидрокортизола и 6 $\beta$ -гидрокортизона или чем МИ в моче пар 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол и 6 $\beta$ -гидрокортизон/кортизон. В любом случае, интеграция разных эндогенных маркеров и параметров (например, пола или генетики) представляется очень многообещающим подходом для прогнозирования активности СУР3А, особенно после метаболомного анализа. Данный подход может быть применен в отношении других ферментов СУР450.

### **1.3. Применение оценки активности изоферментов CYP450 на различных стадиях жизненного цикла ЛС**

#### **1.3.1. Доклинические исследования**

В настоящее время фенотипирование в основном используется для изучения потенциальных лекарственных взаимодействий у новых биомолекул на стадии доклинических и клинических испытаний [18]. В качестве примера, Gibbons с коллегами [19] изучали энзалутамид, мощный оральный ингибитор андрогенного рецептора, используемый для лечения метастатического кастрационно-резистентного рака предстательной железы. Используя клеточную линию гепатоцитов человека, они показали, что энзалутамид усиливает активность CYP3A4 *in vitro*. Для дальнейшего изучения возможных лекарственных взаимодействий с энзалутамидом и подтверждения результатов, полученных *in vitro*, 14 здоровых мужчин-добровольцев одновременно перорально получали 10 мг варфарина (CYP2C9), 20 мг омепразола (CYP2C19) и 2 мг мидазолама (CYP3A) без или в комбинации с энзалутамидом. Энзалутамид значительно усиливал метаболизм субстратов CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4. Согласно руководству Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) [20], данный препарат классифицируется как умеренный индуктор CYP2C9 и CYP2C19 и сильный индуктор CYP3A4. Таким образом, предпочтительно избегать одновременного введения субстратов CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 с этим препаратом, особенно если они имеют узкий терапевтический индекс.

#### **1.3.2. Клинические исследования**

В клинической практике фенотипирование может использоваться главным образом для двух целей: проспективно - для выявления пациентов с риском возникновения лекарственных взаимодействий или ретроспективно - для объяснения побочных эффектов или неэффективности лечения [21]. Например,

"Женевский коктейль", который включает 100 мг кофеина (CYP1A2), 25 мг бупропиона (CYP2B6), 25 мг флурбипрофена (CYP2C9), 5 мг омепразола (CYP2C19), 10 мг декстрометорфана (DEM) (CYP2D6) и 1 мг мидазолама (MDZ) (CYP3A), был использован для объяснения сильной невропатической боли, развившейся у 21-летнего пациента во время терапии винкристином [22,23]. Действительно, снижение активности CYP3A, наблюдаемое в тесте на фенотипирование, указывает на снижение метаболизма винкристина. Следовательно, повышенное воздействие данного агента может быть причиной периферической невропатии.

### 1.3.3. Клиническая практика

Регуляция активности ферментов CYP450 с помощью индукторов или ингибиторов является еще одним подходом, который можно использовать для идентификации эндогенных биомаркеров CYP450 с использованием метаболомного анализа. Эта область широко исследована во многих работах [10][13], целью которых было выявление эндогенных маркеров CYP3A4. Был исследован эффект рифампицина (индуктор CYP3A) и кетоконазола (ингибитор CYP3A) на метаболизм различных стероидов с применением стратегий целенаправленного профилирования [14][15][16][17].

Что касается фенотипирования CYP450 у человека, то в основном используются одномерные подходы:

- эффект генетического полиморфизма: независимый критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, в зависимости от ситуации;
- действие индукторов или ингибиторов CYP450: парный t-критерий или критерий Вилкоксона, в зависимости от ситуации.

А также:

- корреляция с экзогенным эталонным пробным лекарственным средством: ранговая корреляция Пирсона или Спирмена, в зависимости от ситуации.

## ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Существует большое количество клинических данных, касающихся пар кортизол/6 $\beta$ -гидроксикортизол и холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин, которые в настоящее время являются наиболее описанными эндогенными маркерами для CYP3A. Чтобы обнаружить быстрые изменения в активности CYP3A, необходимо использовать КХО 6 $\beta$ -гидроксикортизола вместе с КХО 6 $\beta$ -гидроксикортизона. Метаболический индекс 4 $\beta$ -гидроксихолестерин/холестерин в плазме также подходит для длительных исследований и обладает низкой внутрииндивидуальной вариабельностью. Тем не менее, использование этих двух показателей в качестве индикаторов ингибирования CYP3A вызывает сомнения. Существуют данные, выступающие в пользу использования некоторых других биомаркеров (например, дезоксихолевой кислоты, витамина D3) для фенотипирования CYP3A, но все же этой информации недостаточно. Что касается других ферментов CYP450, нет таких эндогенных биомаркеров, которые можно уверенно применять на основании имеющихся данных. Мелатонин, AA и пинолин являются очень перспективными эндогенными маркерами для фенотипирования CYP1A2, CYP2C19 и CYP2D6, соответственно, но требуют дополнительных клинических исследований. Также очень важно определить строение метаболита CYP2D6 M1 с m/z 444, обнаруженного Tay-Sontheimer и соавт. [11].

2. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы полностью реализовать применение эндогенных биомаркеров для фенотипирования активности ферментов CYP450 в клинической практике. Трансляция некоторых доступных данных исследований *in vitro* в клиническую практику может быть обеспечена посредством наиболее подходящих эндогенных субстратов CYP450, описанных в литературе. Например, анандамид, эндоканнабиноид, подвергается биотрансформации в гидроксильированные и эпоксидированные продукты в основном при участии CYP2D6. Несмотря на сложный метаболизм, возможно, стоит проверить применимость этого маркера для количественной оценки активности CYP2D6 в плазме.

3. Применение метаболомного анализа также очень перспективно и привело к приобретению важных результатов. Чаще всего он был использован по отношению к CYP3A и в некоторой степени к CYP2D6. Тем не менее, методология, описанная в этом обзоре, может также применяться по отношению к другим изоферментам CYP. Использование лишь одного эндогенного показателя для фенотипирования конкретного изофермента CYP может дать противоречивые результаты, и, возможно, стоит заменить этот подход применением многофакторных моделей, способных повысить прогноз.

4. Исходя из подробного анализа литературы, нами был сделан выбор основных изоферментов. Для дальнейшего исследования были выбраны: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4.

5. Для определения активности этих основных изоферментов нами были выбраны пары субстрат/метаболит, которые приведены в таблице 3. В случае изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 не удалось выбрать подходящего эндогенного субстрата, в связи с чем, в качестве маркера, были выбраны наиболее часто используемые ксенобиотики. Кроме того, были использованы наиболее безопасные методики из описанных в литературе, где в качестве субстрата применяются наиболее изученные ЛС. В то же время для оценки активности изофермента CYP3A4 были выбраны две пары эндогенных субстратов и метаболитов. В связи с тем, что оба из этих варианта представляются эффективными и безопасными для пациентов и не требуют введения дополнительных ксенобиотиков.

**Таблица 3.** Выбранные изоферменты CYP450 и пары субстрат/метаболит для оценки их активности

Эндогенные вещества	
CYP3A4	кортизол/6 $\beta$ -гидрокортизол
CYP3A4	холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин
CYP2D6	пинолин/6-НО-ТНВС
Ксенобиотики	
CYP1A2	кофеин/параксантин
CYP2C9	лозартан/ EXP-3174
CYP2C19	омепразол/5-гидроксиомепразол

6. В качестве биологического объекта для проведения фенотипирования активности CYP450 нами была выбрана моча, как наиболее часто применяемая биоматрица, что определяется информативностью, более простой работой с объектом при анализе и неинвазивностью отбора.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Исследуемые вещества

В качестве общего требования для использования фенотипирования в доклинических и клинических испытаниях, а также при принятии терапевтического решения, важна, стабильность методики оценки активности изофермента. Хорошо известно, что практически для любого ЛС внутрииндивидуальная вариабельность явно ниже межиндивидуальной изменчивости. В ретроспективе, при сравнение меж- и внутрииндивидуальной изменчивости активности CYP3A4 у 161 субъекта, вклад индивидуальной изменчивости в общую превысил 89% (точечная оценка) [40]. Этот пример показывает, что индивидуальная активность фермента действительно довольно стабильна, даже для фермента без основных генетических полиморфизмов, то есть без генетически фиксированных детерминант активности. Хотя не существует систематизированных данных по ферментам и транспортерам, исследования с повторным введением препаратов предполагают, что индивидуальная стабильность активности фермента в целом высокая.

Существует несколько потенциальных применений для фенотипирования, большинство из которых еще предстоит установить. Фенотипирование может использоваться для оценки активности основного фермента в отсутствие влияющих факторов или для оценки фактического фермента в присутствии таких факторов. В качестве прогностического фактора для корректировки лекарственной терапии и в качестве информации, которая будет использоваться для персонализации фармакотерапии.

Кроме описанных ранее случаев, фенотипирование может также использоваться в качестве критерия отбора участников клинических испытаний, например, если надо исключить медленных метаболизаторов.

Многие свойства методики, которые частично противоречат друг другу, важны для оптимальной процедуры фенотипирования.

Наиболее важным требованием является то, чтобы методика фенотипирования давала точную оценку активности, но в реальной жизни мы должны учитывать большое количество сопутствующих факторов.

Критерии принятия методики фенотипирования:

1. изменения в показаниях при лечении пациентов ингибиторами / индукторами фермента;
2. различия между здоровыми субъектами и пациентами с заболеваниями печени (если фермент экспрессируется преимущественно в печени);
3. корреляция образования метаболитов с активностью и содержанием фермента в субклеточных фракциях (например, микросомы печени) и / или клеточные системы;
4. доказанная *in vitro* специфичность метаболической стадии;
5. высокий вклад метаболической стадии в общий метаболизм препарата;
6. соотношение показаний с частичным клиренсом для соответствующей метаболической стадии;
7. воспроизводимость (низкий коэффициент вариации для повторных испытаний);
8. корреляция показаний с AUC субстрата;
9. корреляция показаний с другими проверенными методиками;
10. метрика отражает известный генетический полиморфизм;
11. метрика не зависит от других факторов, не связанных с ферментативной активностью (рН мочи, мочеиспускание, почечная функция).

Дополнительными факторами при выборе методик фенотипирования можно назвать следующие:

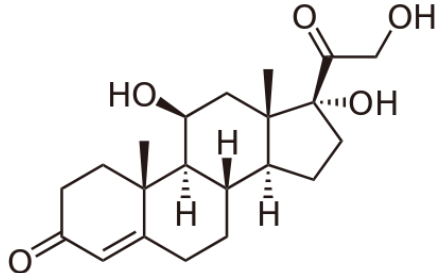
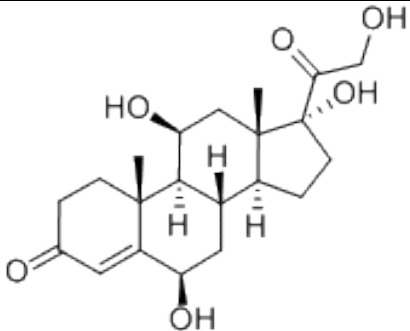
1. хорошая доступность препарата (препарат зарегистрирован для медицинского применения на территории России);
2. хорошая доступность информации о препарате, включая доклинические данные;

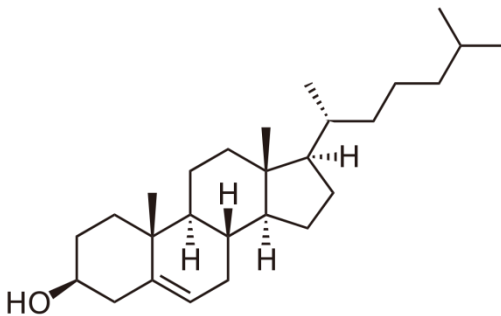
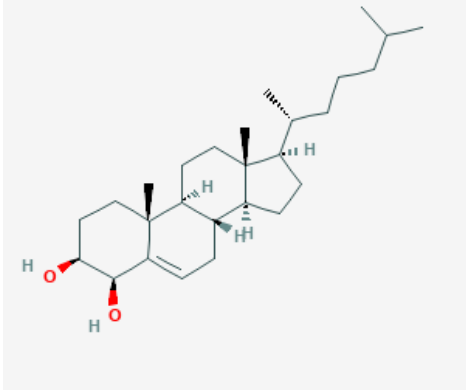
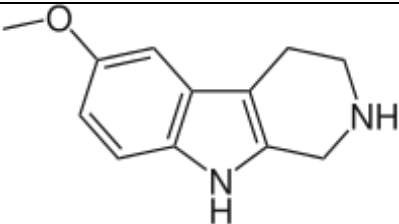
3. низкая инвазивность метода (низкий риск развития побочных эффектов, не требуется отбора крови);
4. простота процедуры для субъектов и исследователя;
5. низкий риск ошибок во время отбора проб (например, оценка метаболического отношения в одном образце лучше сбора мочи через определенные промежутки времени).

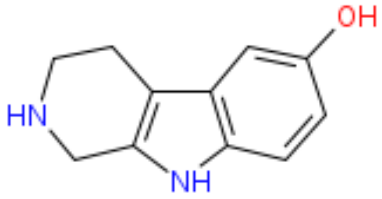
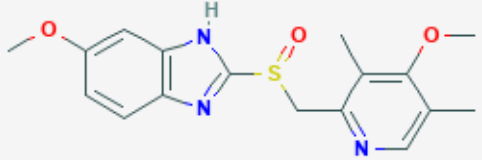
Исходя из выше приведенных факторов, нами были выбраны методики фенотипирования и маркеры, приведенные в таблице 3.

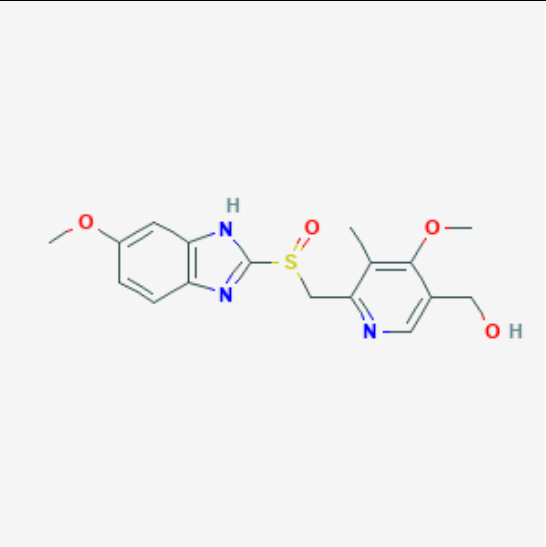
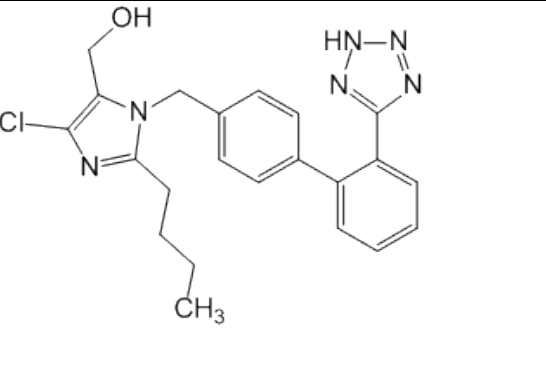
Информация об исследуемых веществах и их свойства приведены в сводной таблице 4.

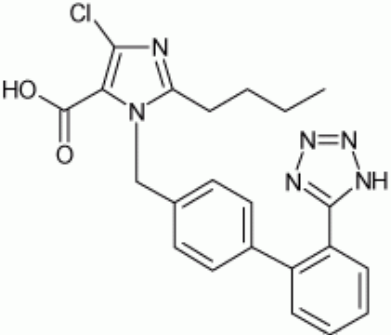
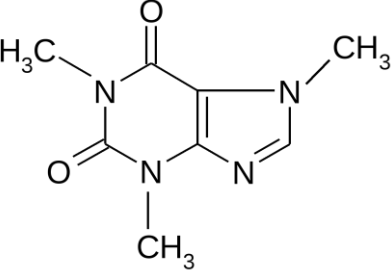
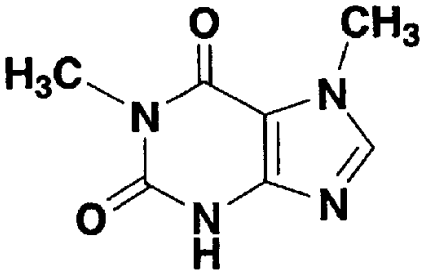
**Таблица 4. Исследуемые вещества**

Изофермент	Тип вещества	Название	Формула	Мол. Масса, г/моль	Cas№	Катал. №
СУР3А4	Эндогенный субстрат	Кортизол (Cortisol)	 <p>The image shows the chemical structure of Cortisol, a steroid hormone. It features a four-ring steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond between C4 and C5, and hydroxyl groups at C11, C14, and C17. At C17, there is a side chain consisting of a hydroxyl group and a hydroxymethyl group.</p>	362,46	50-23-7	Sigma-Aldrich кат. № 897238
	Эндогенный метаболит	6-β-гидрокортизол (6-β-hydroxycortisol)	 <p>The image shows the chemical structure of 6-β-hydroxycortisol, a metabolite of cortisol. It has the same steroid nucleus as cortisol, but with an additional hydroxyl group at the C6 position.</p>	378,46	3078-34-0	Sigma-Aldrich кат. № 387541

	Эндогенный субстрат	Холестерин		386,65	57-88-5	Sigma-Aldrich кат. № C2155000
	Эндогенный метаболит	4-β-гидроксихолестерин		402,70	17310-20-4	Sigma-Aldrich кат. № 700036P
CYP2D6	Эндогенный субстрат	Пинолин		202,26	20315-68-8	Sigma-Aldrich кат. №291552

	Эндогенный метаболит	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин		202,26	20315-68-8	Aurora Fine Chemicals кат. № A06.795.158
CYP2C19	Экзогенный субстрат	Омепразол		345,40	73590-58-6	Sigma-Aldrich кат. № BP765

	Экзогенный метаболит	5-гидроксиомепразол	 <p>The image shows the chemical structure of 5-hydroxyomeprazole. It consists of a benzimidazole ring system connected via a methylene-sulfonamide bridge to a pyridine ring. The pyridine ring has a methoxy group and a hydroxymethyl group at the 5-position.</p>	361,40	92340-57-3	Sigma-Aldrich кат. №43999
CYP2C9	Экзогенный субстрат	Лозартан	 <p>The image shows the chemical structure of Losartan. It features a benzimidazole ring with a chlorine atom and a hydroxymethyl group. The nitrogen atom of the benzimidazole is connected via a methylene group to a para-substituted benzene ring, which is further connected to a tetrazole ring and a phenyl ring. A propyl chain is attached to the benzimidazole ring.</p>	422,91	124750-99-8	Sigma-Aldrich кат. № 61188

	Экзогенный метаболит	EXP-3174		436,89	124750-92-1	AlsaChim кат.№ C2467
CYP1A2	Экзогенный субстрат	Кофеин		194,19	58-08-2	Sigma-Aldrich кат. №766
	Экзогенный метаболит	Параксантин		180,16	611-59-6	Sigma-Aldrich кат. № D5385

## 2.2. Выбор внутреннего стандарта

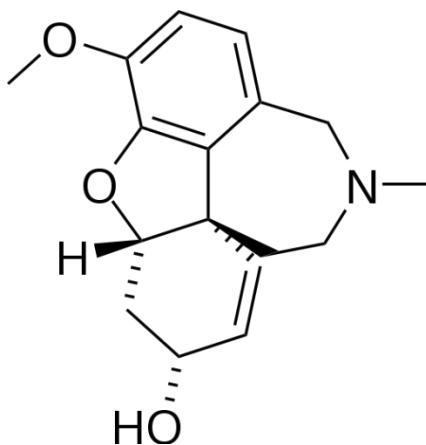
Для выбора внутреннего стандарта применяются следующие принципы:

- внутренний стандарт должен быть инертен к используемым растворителям (при этом хорошо в них растворяется), компонентам биологической матрицы а так же к подвижной и неподвижной фазам;
- пик внутреннего стандарта на хроматограмме должен иметь схожее время удерживание с исследуемыми веществами, однако он не должен при этом иметь с ними разрешение менее 1,5;
- не должен содержать сопутствующие вещества, мешающие определению анализируемых веществ.

В качестве внутренних стандартов для всех веществ, кроме пинолина и его метаболита, были использованы дейтерированные производные определяемых веществ. Для исследования пинолина и его метаболита не удалось найти дейтерированных стандартов.

Для пинолина и его метаболита IS подбирали с учетом строения, молярной массы и значения константы кислотности. В качестве IS выбрали галантамин. Структурная формула галантамина представлена на рисунке 1.

Информация по внутренним стандартам приведена в таблице 5.



**Рисунок 1.** Внутренний стандарт галантамин

**Таблица 5. Внутренние стандарты**

Название	CAS номер	Каталожник	М.м.
Кортизол-D4	73565-87-4	Supelco кат. №С-113	366,48
6-β- гидрокортизол-D4	1261254-51-6	IsoScience кат. № ISO-5101.1	382,48
Холестерин-D4	956029-28-0	Alsa Chemistry кат. № ACM956029280	390,68
D7-4-β- гидроксихолестерин	1246302-80-6	SigmaAldrich кат. №700042P	409,70
Пинолин	1953-04-4	Sigma-Aldrich кат. № Y0001279	368,27
6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β- карболин			
Омепразол-d3	922731-01-9	Alsa Chemistry кат. №C1232	348,44
5-гидроксиомепразол- D3	1189882-58-3	ClearSynth кат. №CS-T-56217	364,43
Лозартан-D4	1030937-27-9	ClearSynth кат. №CS-O-02637	426,94
EXP-3174-d3	1189729-40-5	ClearSynth кат. № CS-T-57301	470,00
Кофеин-D3	72238-85-8	ClearSynth кат. № CS-O-02851	197,21
Параксантин-D3	188297-90-7	ClearSynth кат. № CS-T-60154	183,18

## 2.3. Реактивы и оборудование

### 2.3.1. Реактивы

- спирт метиловый (extra pure, Scharlau, Испания);
- 2-метил-6-нитробензойный ангидрид (extra pure, Scharlau, Испания);
- этилацетат (extra pure, Scharlau, Испания);
- триэтиламин (reagent grade, Scharlau, Испания);

- натрия хлорид для инфузий 0,9%, флакон 200 мл;
- муравьиная кислота (for LC-MS, Merck Millipore, США);
- этиловый спирт (extra pure, Scharlau, Испания);
- 4-диметиламинопиридин (extra pure, Scharlau, Испания);
- 2-пиколиновая кислота (extra pure, Scharlau, Испания);
- пиридин (extra pure, Scharlau, Испания);
- аммония формиат (for LC-MS, Merck Millipore, США);
- ацетонитрил (supergradient, Scharlau, Испания);
- гексан (for LC-MS, Merck Millipore, США);
- калия дигидроксид (reagent grade, Scharlau, Испания);
- борная кислота (extra pure, Scharlau, Испания);
- деионизированная вода, электрическое сопротивление 18,2 Мом\*см, Millipore simplicity UV (Merck-Millipore, США);
- натрия гидроксид (reagent grade, Scharlau, Испания).

### 2.3.2. Оборудование

- жидкостной хроматограф Agilent 1290 Infinity оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, трехквadrupольным масс-селективным детектором Agilent 6460, США;
- предколонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936);
- колонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм (кат. № 959758-902K);
- жидкостной хроматограф Shimadzu UFLC с масс-селективным детектором Shimadzu LCMS-8040;
- предколонка Acquity CSH 1.7 мкм;
- колонка Agilent Eclipse XDB-C18 2,1 x 50 мм, 1.8 мкм;

- колонка Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18 150 x 4,6 мм, 5 мкм;
- предколонка Shim-Pack G-ODS (10' 4,0 мм i.d., 5 мкм);
- колонка Shim-Pack RP-18e (150' 4,6 мм i.d., 5 мкм);
- картридж Chromabond® C18 для ТФЭ, США;
- картридж Sep-Pak Plus C18 для ТФЭ, Waters (Milford, MA);
- весы аналитические ES 225 SMDR, Швейцария;
- рН-метр Seven Multi, Mettler Toledo, Швейцария;
- центрифуга Eppendorf 5415D, Германия;
- встряхиватель типа вортекс ELMi, Латвия;
- концентратор Eppendorf Concentrator plus, Германия;
- система для твердофазной экстракции Biotage VacMaster-20, Швеция;
- дозаторы переменного объема Eppendorf 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл, Германия;
- холодильник Indesit, SD 125, Россия;
- морозильник для плазмы Sanyo, Япония;
- система водоподготовки Micropure, ThermoScientific, США.

## **2.4. Методика отбора проб**

В качестве биологических объектов в методиках фенотипирования используется плазма крови или моча. Исходя из практических задач, поставленных перед нами, нами были выбраны различные биообъекты для различных изоферментов. Однако, это не делает методику менее универсальной, а продиктовано лишь поставленными задачами.

### **CYP1A2**

Определение активности изофермента CYP1A2 использовалось нами в доклинических исследованиях, в связи с этим объектом исследования была моча крыс. Мочу отбирали по следующей схеме. После введения субстрата крыс помещали в индивидуальные клетки с свободным доступом к воде. У каждой крысы отбирали суточную мочу. Отчет времени начинался после введения препарата-маркера (кофеин).

В литературе описаны способы отбора проб у пациентов. После естественного опорожнения ранним вечером, пациенты принимали 100 мг кофеина перорально в виде двух чашек растворимого кофе. Мочу собирали до утра, включая утреннюю мочу, не менее 8 ч [1]. Принимали таблетку кофеина 200 мг, собирая общую мочу в течение 6 ч [2]. Таблетка кофеина 100 мг, моча – до приёма и через 4, 6, 8 и 12 ч после приёма [3].

### **CYP 2C19**

В качестве биообъекта была выбрана моча. Пациент принимал перед сном одну таблетку омепразола. У пациента отбирали мочу через 8 часов после приема, утром до приема пищи (и других ЛС).

В литературе описан и другой способ, который нами не проверялся. Исследовались пациенты на терапии омепразолом, которые принимали омепразол по 20 мг 2 раза в день. Мочу собирали у пациентов, принимающих омепразол минимум 3 дня. Мочу собирали с 6 до 9 утра до приёма пищи и лекарств [5].

### **CYP 2C9**

В качестве объекта была выбрана моча. Пациент принимал 25 мг лозартана утром натощак, сбор мочи осуществлялся через 6 часов (так как лозартан обладает

легким мочегонным эффектом). Отбор проб у крыс зависел от условий эксперимента и приведен в соответствующей главе.

В Литературе описано несколько способов сбора образцов. Таблетка лозартана 25 мг, моча – до приёма и через 4, 6, 8 и 12 ч после приёма [3]. Или таблетка лозартана 12,5 мг. Моча – до приёма, через 1, 2, 4 и 6 часов после [4].

### **СУР 2D6**

В качестве биообъекта была выбрана моча. При параллельности колебаний уровней субстрата и метаболита в течение 24 часов, можно использовать точечный сбор мочи. Пинолин относится как раз к такому варианту эндогенного субстрата. В связи с этим отбор мочи производился в момент естественного опорожнения мочевого пузыря и не привязан ни ко времени суток (или периодов сон/бодрствование), ни к приему пищи.

### **СУР3A4 (кортизол/6β-гидрокортизол)**

Кортизол так же, как и пинолин относится к эндогенным субстратам, однако кортизол имеет циркадные ритмы экспрессии. Являясь гормоном стресса, он активно выделяется с утра, а в течение дня его концентрация падает. Для изучения активности СУР3A4 по соотношению 6β-гидрокортизол/кортизол подходит как моча, так и плазма крови. При этом моча отбиралась утренняя, до приема пищи и других ЛС. В свою очередь плазма крови отбирается в это же время и центрифугируется 20 минут при 3000 об/мин, для отделения плазмы от форменных элементов.

### **СУР3A4 (холестерин/4β-гидроксихолестерин)**

Для анализа активности СУР3A4 по соотношению 4β-гидроксихолестерин/холестерин была выбрана плазма крови. Концентрация холестерина, в отличие от кортизола, не зависит от циркадных ритмов. Однако, она очень сильно зависит от поступления эндогенного холестерина в организм. В связи с этим отбор плазмы крови производился исключительно натощак. В случае, когда пациент находился в стационаре, за день до анализа ему назначался 9 стол.

## **2.5. Методики определения субстратов и их метаболитов в биологических жидкостях**

### **2.5.1. 6β-гидрокортизол/кортизол**

Для изучения активности СYP3A4 по соотношению 6β-гидрокортизол/кортизол подходит как плазма крови, так и моча. Отличие в методике будет только в пробоподготовке.

#### **Пробоподготовка плазмы крови**

Перед внесением образца в птрон для ТФЭ С18 проводили активацию твердой фазы. В картридж на вакуумном экстракторе, вносили 2,0 мл MetOH, 1,0 мл деионизированной воды и 2,0 мл боратного буфера с рН 9,6.

Затем в активированный картридж вносили 400 мкл образца с 400 мкл физиологического раствора, далее последовательно добавляли 1,0 мл воды деионизированной, 1,0 мл смеси ацетонитрил:вода деионизированная (80:20), элюирование проводили 0,5 мл смеси 0,1 % метанольного раствора триэтиламина и этилацетата (70:30). Полученный элюат выпаривали досуха и растворяли 100 мкл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты.

#### **Пробоподготовка мочи**

Пробоподготовку проводили на образцах с известным содержанием аналитов и внутренних стандартов методом ТФЭ. Перед внесением образца в птрон для ТФЭ С18 проводили активацию твердой фазы. В картридж на вакуумном экстракторе, вносили 2,0 мл MetOH, 1,0 мл деионизированной воды и 2,0 мл боратного буфера с рН 9,6. Затем в активированный картридж вносили 2000 мкл образца, далее последовательно добавляли 1,0 мл воды деионизированной, 1,0 мл смеси ацетонитрил:вода деионизированная (80:20), элюирование проводили 0,5 мл смеси 0,1 % метанольного раствора триэтиламина и этилацетата (70:30). Полученный элюат выпаривали досуха и растворяли 100 мкл 0,1 % водного раствора муравьиной кислоты.

## Хроматографические условия

Хроматографические условия не отличались друг от друга в случае различных биологических объектов.

В качестве метода определения был выбран метод ВЭЖХ-МС/МС, как самый частоиспользуемый для этой цели метод.

Для проведения хроматографического разделения использовалась колонка Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1\*50 мм, 1,8 мкм. С целью разделения исследуемых аналитов были разработаны методики как градиентного, так и изократического элюирования, если таковые выдерживали валидационные испытания.

В Таблице 6 указаны разработанные хроматографические условия.

**Таблица 6.** Хроматографические условия определения 6 $\beta$ -гидрокортизол/кортизол

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity		
Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм		
Температурный режим колонки	50 °C		
Подвижная фаза	Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в воде деионизированной Компонент В: ацетонитрил.		
Скорость ПФ	1,0 мл/мин		
Режим элюирования и состав ПФ	Градиентное		
	Время, мин	Компонент А, % (V/V)	Компонент В, % (V/V)
	0	50	50
	1,5	90	10
	2	80	20
	8,5	30	70
	12	95	5
	14	50	50

Объем пробы, вводимой в инжектор	20 мкл				
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	Кортизол (и его дейтерированный стандарт) – около 4,9; 6-β-гидрокортизол (и его дейтерированный стандарт) – около 4,3				
Время анализа	14 мин				
Параметры масс-детектирования	Ionisation - ESI Capillary voltage - 3500 В Ion tub temperature - 350°C Температура ионизационной камеры: 400°C Auxiliary gas - 10 л/мин Peripheral layer gas - 11 л/мин Sweeping gas - 3 л/мин CE pressure - 2,0 мТорр				
Параметры MRM-переходов	Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	Кортизол	-	362,46	331,0	-26
	6-β-гидрокортизол	-	378,46	347,0	-26
	Кортизол-D4	-	366,48	333,0	-26
	6-β-гидрокортизол-D4	-	382,48	125,0	-26

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- N кортизола и 6-β-гидрокортизола составила 21754;
- R кортизола и 6-β-гидрокортизола был больше 1,5;
- As кортизола составил 1,43; As 6-β-гидрокортизола составил 1,16.

## 2.5.2. 4β-гидроксихолестерин/холестерин

### Пробоподготовка плазмы

100 мкл плазмы смешивали с 1,05 мл этанола (70%) содержащего внутренние стандарты. Раствор центрифугировали. Надосадочную жидкость (1,5 мл 70% этанола) пропускали, через картридж C18 для ТФЭ, подключенный к вакуумному экстрактору, и предварительно промытый 4 мл 70% этанола. Затем картридж промывали 1,5 мл 70% этанола. Так как холестерин плохо фрагментируется в электроспрее для него проводили процедуру дериватизации, а именно, получение пиколиновых эфиров. Для этого к элюату прибавляли 1,5 мг 4-диметиламинопиридина, 5,0 мг 2-метил-6-нитрбензойного ангидрида, 4,0 мг 2-рпиколиновой кислоты, 10 мкл триэтиламина и 75 мкл пиридина. Виалу помещали на встряхиватель, и встряхивали в течение 30 минут при комнатной температуре. Прибавляли 1 мл гексана и центрифугировали 10 минут при скорости 13000 об/мин. Органический слой отделяли и выпаривали досуха. Осадок растворяли в 100 мкл ацетонитрила.

### Хроматографические условия

Для проведения хроматографического разделения использовалась колонка Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1\*50 мм, 1,8 мкм.

В Таблице 7 приведены хроматографические условия разработанной методики.

**Таблица 7.** Хроматографические условия определения 4β-гидроксихолестерин/холестерин

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity
Предколонка	Acquity CSH 1.7 μM
Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм
Температурный режим колонки	50 °C

Подвижная фаза	<p>Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в водном растворе ацетонитрила (40:60)</p> <p>Компонент В: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в водном растворе ацетонитрила (10:90)</p>																		
Скорость ПФ	1,0 мл/мин																		
Режим элюирования и состав ПФ	<p>Градиентное</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Время, мин</th> <th>Компонент А, % (V/V)</th> <th>Компонент В, % (V/V)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>80</td> <td>20</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>70</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>60</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>16</td> <td>90</td> <td>10</td> </tr> </tbody> </table>	Время, мин	Компонент А, % (V/V)	Компонент В, % (V/V)	0	90	10	4	80	20	6	70	30	14	60	40	16	90	10
Время, мин	Компонент А, % (V/V)	Компонент В, % (V/V)																	
0	90	10																	
4	80	20																	
6	70	30																	
14	60	40																	
16	90	10																	
Объем пробы, вводимой в инжектор	20 мкл																		
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	<p>Холестерин (и его дейтерированный стандарт) – около 13,5;</p> <p>4-β-гидроксихолестерин (и его дейтерированный стандарт) – около 10,2</p>																		
Время анализа	16 мин																		
Параметры масс-детектирования	<p>Ionisation - ESI</p> <p>Capillary voltage - 5500 В</p> <p>Ion tub temperature - 400°C</p> <p>Температура ионизационной камеры: 400°C</p> <p>Auxiliary gas - 10 л/мин</p> <p>Peripheral layer gas - 11 л/мин</p>																		

		Sweeping gas - 3 л/мин				
		CE pressure - 2,0 мТорр				
Параметры MRM-переходов	Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В	
	Холестерин	+	492,5	369,6	35	
	4-β-гидроксихолестерин	+	613,6	490,5	35	
	Холестерин-D4	+	499,5	376,5	35	
	D7-4-β-гидроксихолестерин	+	620,6	497,5	35	

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- N холестерина и 4-β-гидроксихолестерина составила 23623;
- R холестерина и 4-β-гидроксихолестерина был больше 1,5;
- As холестерина составил 1,59;
- As 4-β-гидроксихолестерина составил 1,47.

### 2.5.3. 6-НО-ТНВС/Пинолин

Образцы чистой и исследуемой мочи хранили в морозильнике для плазмы при температуре от – 75 °С до – 80 °С. Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре 2 – 8 °С.

Пробоподготовку проводили на сериях подготовленных проб с известным содержанием исследуемых веществ и внутреннего стандарта методом твердофазной экстракции. Перед внесением пробы (таблица 9) в картридж С18 для ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному насосу, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера рН 9,6. В активированный картридж вносили 2000 мкл пробы, затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл смеси ацетонитрил:вода (10:90, об), элюирование проводили 0,5 мл 0,1 % раствором триэтиламина в метаноле. Полученный элюат

выпаривали до сухого остатка и растворяли 100 мкл 1 % муравьиной кислоты в воде.

### Хроматографические условия

Для хроматографирования полученных проб применяли колонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм с предколонкой Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм.

Ниже в Таблице 8 приведены хроматографические условия разработанной методики.

**Таблица 8.** Хроматографические условия разделения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity		
Предколонка	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936)		
Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм		
Температурный режим колонки	50 °С		
Подвижная фаза	Компонент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01 % муравьиной кислоты в воде Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле		
Скорость ПФ	0,4 мл/мин		
Режим элюирования и состав ПФ	Градиентное Стабилизируют систему ВЭЖХ в условиях начального градиента (компонент А : компонент В = 95 % : 5 %) в течение 15 мин.		
	Время, мин	Компонент А, % (об/об)	Компонент В, % (об/об)
	0	95	5
	1,5	95	5

	2	70	30		
	8,5	40	60		
	12	95	5		
	14	95	5		
Объем пробы, вводимой в инжектор	5 мкл				
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин; пинолин – около 5,0 мин; галантамин – около 2,4 мин				
Время анализа:	14 мин				
Параметры масс- детектирования	Ionisation - ESI Capillary voltage - 5500 В Ion tub temperature - 400°C Температура ионизационной камеры: 400°C Auxiliary gas - 10 л/мин Peripheral layer gas - 11 л/мин Sweeping gas - 3 л/мин CE pressure - 2,0 мТорр				
Параметры MRM- переходов	Аналит	Полярность	Ион- прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	пинолин	+	203,2	174,0	15
	-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β- карболин	+	189,2	160,0	15
	галантамин	+	288,3	213,0	19

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина составила 25123;
- R пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболином был больше 1,5;
- As пинолина составил 1,37;
- As 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина составил 1,24.

#### **2.5.4. EXP-3174/Лозартан**

Данная методика использовалась как в клинической практике, так и в доклинической. В клинической практике, в связи с высокими концентрациями исследуемых веществ можно применять метод ЖЖЭ. В то время, в экспериментах на животных имеет смысл использовать ТФЭ, в связи с малыми объемами.

##### **Пробоподготовка мочи пациентов**

К 0,5 мл мочи добавляли 1 мл метилового спирта, встряхивали на вихревой мешалке vortex 5 минут и центрифугировали при 3000 об/мин 10 минут. Разделяли фазы: сливали слой этилового спирта. Спиртовой слой упаривали на вакуумном роторном испарителе при  $t^{\circ} = 45^{\circ} \text{C}$ , сухой остаток растворяли в 1000 мкл подвижной фазы, встряхивали на vortex.

##### **Пробоподготовка мочи крыс**

Перед внесением пробы в картридж C18 для ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному экстрактору, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера pH 9,6. В активированный картридж вносили 100 мкл мочи крыс, затем последовательно добавляли 500 мкл воды деионизированной, 500 мкл ацетонитрила, элюирование проводили 0,5 мл метанола. Полученный элюат выпаривали до сухого остатка и растворяли в 100 мкл 0,1 % муравьиной кислоты в воде деионизированной.

##### **Хроматографические условия**

Ниже в Таблице 9 приведены хроматографические условия разработанной методики.

**Таблица 9.** Хроматографические условия разделения EXP-3174 и лозартан

Хроматограф	Shimadzu UFLC с тандемным масс спектрометром Simadzu LCMS-8040
Колонка	Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 мкм (150×4,6 мм); фирмы Agilent (США).
Температурный режим колонки	30 °С
Подвижная фаза	Ацетонитрил / 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде в соотношении 50:50
Скорость ПФ	0,3 мл/мин
Режим элюирования и состав ПФ	Изократический режим
Объем пробы, вводимой в инжектор	5 мкл
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	Лозартан (и его дейтерированный стандарт) – около 2,0 мин. Лозартановая кислота (и её дейтерированный стандарт) – около 2,25 мин.
Время анализа	3 мин
Параметры масс-детектирования	Ionisation - ESI Capillary voltage - 3500 В Ion tub temperature - 350°С Температура ионизационной камеры: 400°С Auxiliary gas - 10 л/мин Peripheral layer gas - 11 л/мин Sweeping gas - 3 л/мин CE pressure - 2,0 мТорр

Параметры MRM-переходов	Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	Лозартан	+	422,1	234,9	28
	EXP-3174	-	435,7	282,4	28
	Лозартан	+	427,1	211,2	28
	EXP-3174-d3	-	440,1	238,2	28

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику лозартана и EXP-3174 составила 20473;
- R лозартана и EXP-3174 был больше 1,5;
- As лозартана составил 1,77;
- As EXP-3174 составил 1,72.

#### 2.5.5. 5-гидроксиомепразол/Омепразол

В качестве метода пробоподготовки был выбран метод ТФЭ, как наиболее воспроизводимый. Образцы свежей мочи были собраны, смешаны с карбонатным буфером при pH 8,0 и хранились при -20 ° C до анализа.

#### Пробоподготовка мочи

Процедуру ТФЭ проводили с использованием картриджей Sep-Pak Plus C18 с обращенной фазой 500 мг от Waters (Milford, MA). Предварительно сорбент активировали 5 мл метанола и 5 мл 10 мМ фосфатного буфера при pH 7,0. Затем 9,0 мл образца мочи медленно загружали в картридж и затем промывали 2 мл 100 мМ фосфатного буфера при pH 7,0. Затем пропускали через картридж 7,5 мл смеси 20:80 метанол / вода (об. / об.). Наконец, целевые аналиты элюировали 4 мл

ацетонитрила и элюаты упаривали досуха при 40 ° С. Конечный остаток повторно растворяли в 100 мкл смеси 50:50 метанол / вода (об./об.).

### Хроматографические условия

Ниже в Таблице 10 приведены хроматографические условия разработанной методики.

**Таблица 10.** Хроматографические условия разделения 5-гидроксиомепразола и омепразола

Хроматограф	Shimadzu UFLC с тандемным масс спектрометром Simadzu LCMS-8040
Предколонка	Shim-Pack G-ODS (10 ´ 4.0 mm i.d., 5 µm)
Колонка	Shim-Pack RP-18e (150 ´ 4.6 mm i.d., 5 µm)
Температурный режим колонки	30 °С
Подвижная фаза	Фосфатный буфер с рН 7,6 и ацетонитрил (76:24, v/v)
Скорость ПФ	1,0 мл/мин
Режим элюирования и состав ПФ	Изократический режим
Объем пробы, вводимой в инжектор	15 мкл
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	Омепразол (и его дейтерированный стандарт) – около 3,0 мин. 5-гидроксиомепразол (и его дейтерированный стандарт) – около 1,0 мин.
Время анализа	5 мин

Параметры масс-детектирования	Ionisation - ESI Capillary voltage - 3500 В Ion tub temperature - 350°C Температура ионизационной камеры: 400°C Auxiliary gas - 10 л/мин Peripheral layer gas - 11 л/мин Sweeping gas - 3 л/мин CE pressure - 2,0 мТорр				
Параметры MRM-переходов	Аналит	Полярность	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	Омепразол	+	346,0	198,0	19
	5-гидроксиомепразол	+	349,0	198,0	19
	Омепразол-d3	+	362,0	214,0	19
	5-гидроксиомепразол-D3	+	365,1	213,9	19

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику 5-гидроксиомепразола и омепразола 27534;
- R 5-гидроксиомепразола и омепразола 1,5;
- As омепразола составил 1,09;
- As 5-гидроксиомепразола составил 0,97.

### 2.5.6. Параксантин /Кофеин

Исследования активности CYP1A2 с помощью субстратного маркера кофеина, которые мы приводим в этой работе относятся только к области доклинических исследований. Поэтому в качестве биобъекта нами приводится моча крыс. Однако, очевидно, что данная методика применима и к биобъектам, полученным от человека (с минимальными изменениями).

### Пробоподготовка мочи крыс

В пробирку помещали 500 мкл мочи испытуемых крыс. 20 минут выдерживали при комнатной температуре. Пробоподготовку проводили осаждением белков. Пробирку встряхивали в течение 30 с. Полученный раствор центрифугировали в течение 20 мин при 13000 об/мин. Супернатант переносили в выпарительную колбу и выпаривали досуха на роторном испарителе при 40<sup>0</sup>С. Сухой остаток растворяли в 150 мкл ПФ и аликвоту вводили в хроматограф.

### Хроматографические условия

В Таблице 11 приведены хроматографические условия разработанной методики.

**Таблица 11.** Хроматографические условия разделения параксантина и кофеина

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity		
Колонка	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм		
Температурный режим колонки	30 °С		
Подвижная фаза	Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде. Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.		
Скорость ПФ	1,0 мл/мин		
Режим элюирования и состав ПФ	Градиентное		
	Время, мин	Компонент А, % (V/V)	Компонент В, % (V/V)
	0	80	20
	1,5	70	30
	2	60	40

	8,5	40	60		
	12	95	5		
	14	90	10		
Объем пробы, вводимой в инжектор	10 мкл				
Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин	кофеин – около 4,1; параксантин – около 3,0;				
Время анализа	14 мин				
Параметры масс- детектирования	<p>Ionisation - ESI</p> <p>Capillary voltage - 3500 В</p> <p>Ion tub temperature - 350°C</p> <p>Температура ионизационной камеры: 400°C</p> <p>Auxiliary gas - 10 л/мин</p> <p>Peripheral layer gas - 11 л/мин</p> <p>Sweeping gas - 3 л/мин</p> <p>CE pressure - 2,0 мТорр</p>				
Параметры MRM- переходов	Аналит	Полярность	Ион- прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Энергия соударения, В
	Кофеин	+	195,0	138,3	30
	Параксантин	+	181,0	124,4	30
	Кофеин-D3	+	204,2	140,0	30
	Параксантин-D3	+	184,1	124,2	30

### Пригодность хроматографической системы

Эффективность колонки:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику параксантина и кофеина 29642;
- R параксантина и кофеина 1,5;
- As кофеина составил 1,13;
- As параксантина составил 0,78.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Валидация разработанных методик количественного определения аналитов в биологических объектах

Валидация разработанных методик основывалась на:

1. Руководство по экспертизе лекарственных средств / Под. ред. проф. А.Н. Миронова. Том I. – М.: Гриф и К, 2013. 328 с.
2. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation (draft guidance). U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018.
3. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011.

В процессе валидации была доказана применимость методик для количественного определения выбранных веществ.

Для каждого параметра оценивались критерии приемлимости, на основании которых делался вывод о пригодности разработанной методики. Ниже приведены критерии приемлимости.

*Стабильность* -

Отсутствие хроматографических пиков со временами удерживания, характерными для аналитов, со значениями площадей не превышают 20% от значения площади пика стандарта НКПО (нижнего предела количественного определения) аналитов.

*Линейность* -

расчётное значение концентрации определяемых веществ на уровне

НПКО отличается от теоретической концентрации не более, чем на 20%; отличие концентраций на остальных калибровочных точках, должно быть не более 15% от значения соответствующей теоретической концентрации.

*Эффект матрицы*

значение коэффициента вариации нормализованного по внутреннему стандарту фактора матрицы не более 15%; степень извлечения анализируемого вещества не должна превышать 100% (без учёта погрешности); коэффициент вариации значений степени извлечения исследуемых веществ должен составлять не более 15%.

*Точность -*

Значение внутрисерийного и межсерийного коэффициента вариации должно быть в пределах 15% (для НПКО – в пределах 20%).

*Прецизионность -*

Среднее значение концентраций для образцов контроля должно быть в пределах 15% от соответствующего теоретического значения (для НПКО – в пределах 20%).

*Предел количественного обнаружения.*

Определяют ПКО как минимальную концентрацию аналита в

биологической матрице, для которой возможно обнаружение веществ со значениями относительного стандартного отклонения не более 20 % в диапазоне линейной зависимости.

*Перенос пробы -*

Для определения наличия или отсутствия эффекта переноса пробы в хроматографической системе вводят образец контроля качества QCD в инжектор хроматографа, хроматографируют образец, а затем вводят холостой образец биожидкости. Не последнем не должно быть хроматографических пиков, соответствующих определяемым веществам и внутренним стандартам.

*Стабильность -*

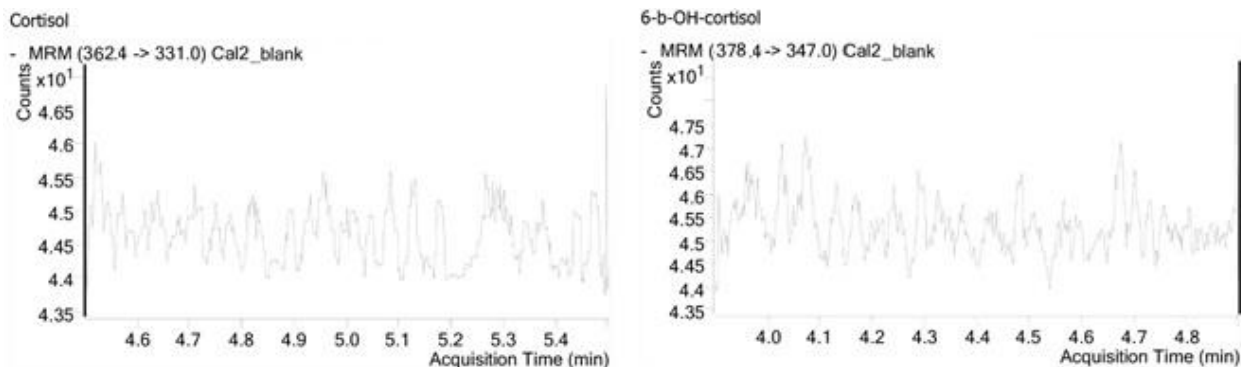
Методика считается валидированной по этому показателю, если модуль разницы не превышает 15%

### **3.1.1. Валидация методики количественного определением 6 $\beta$ -гидрокортизола и кортизола в плазме крови.**

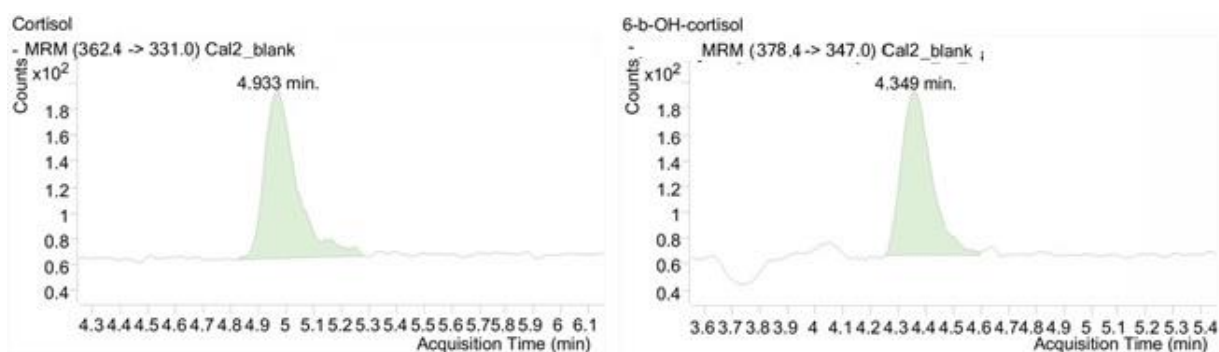
*Селективность.*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали плазму крови, очищенную от мешающих эндогенных аналитов. Анализировали сначала чистую плазму, а затем плазму после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и

внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 2 и 3.



**Рисунок 2.** Хроматограмма плазмы крови без определяемых аналитов (кортизол/6-β-гидрокортизол)



**Рисунок 3.** Хроматограмма плазмы крови с добавлением стандартов определяемых аналитов (6-β-гидрокортизол/кортизол) на уровне нПКО

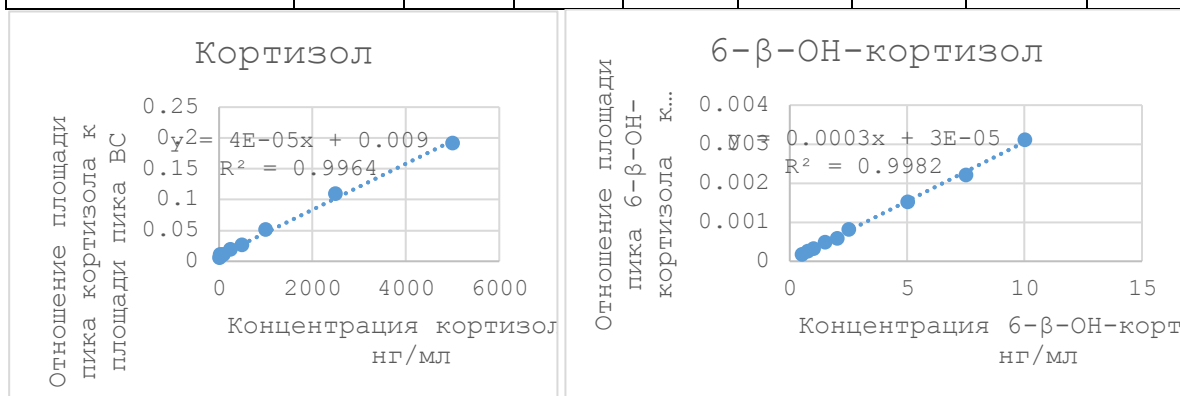
### *Линейность*

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 12. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 4), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 12.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кортизол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
6-β-гидрокортизол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
Кортизол-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6-β-гидрокортизол-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 4.** Калибровочные кривые

### *Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения эффекта матрицы использовали соответствующие образцы контроля качества QCB и QCD (приведены в Таблице 13).

**Таблица 13.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (плазма крови)

Образец контроля качества	QCA	QCB	QCC	QCD
Кортизол	10	30	2500	3750

Концентрация аналита, нг/мл	6-β-ОН- кортизол	10	30	2500	3750
--------------------------------	---------------------	----	----	------	------

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях.

Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 14.

**Таблица 14.** Результаты оценки эффекта матрицы (плазма крови)

Аналит	Кортизол	6-β-ОН- кортизол
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	11,03	9,84
	10,2	9,33

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 15.

**Таблица 15.** Степень извлечения

	Аналит	Кортизол	6-β-ОН- кортизол
<i>Степень извлечения,</i> %	QCB	84,86	88,27
	QCD	85,67	84,55
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	8,53	8,64
	QCD	6,97	9,11

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Значения концентрация определяемых веществ в образцах рассчитывались по соответствующим калибровочным кривым. Полученные результаты приведены в Таблице 16.

**Таблица 16.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Кортизол	QCA	6,13	11,52	6,69	9,44
	QCB	4,71	7,85	5,96	6,11
	QCC	5,02	8,15	4,40	4,58
	QCD	5,46	9,71	6,83	8,90
6-β-ОН-кортизол	QCA	4,67	7,21	5,47	5,25
	QCB	4,73	8,51	5,82	5,96
	QCC	5,73	9,60	6,48	8,20
	QCD	6,12	11,21	5,88	8,31

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Значения концентрации определяемых веществ в образцах рассчитывались по соответствующим калибровочным кривым. Полученные результаты приведены в Таблице 16 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для кортизола – 10 нг/мл

Для 6-β-ОН-кортизола – 10 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

*Стабильность*

Результаты исследования стабильности соответствовали критериям приемлемости. Результаты приведены в Таблице 17.

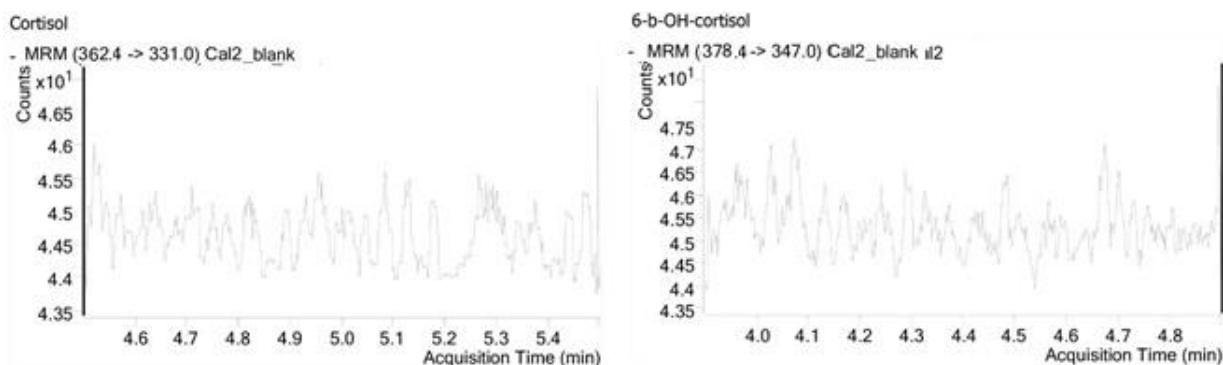
**Таблица 17.** Результаты оценки стабильности (плазма крови)

		Аналит	Кортизол	6-β-ОН-кортизол
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	12,37	10,34
		QCD	8,01	8,78
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	10,19	9,56
		QCD	9,10	9,17
	заморозка/разморозка	QCB	10,58	10,34
		QCD	8,79	8,78
	после пробоподготовке, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	10,43	8,94
		QCD	11,87	10,31
	месяц при заморозке	QCB	10,14	9,63
		QCD	11,01	9,97

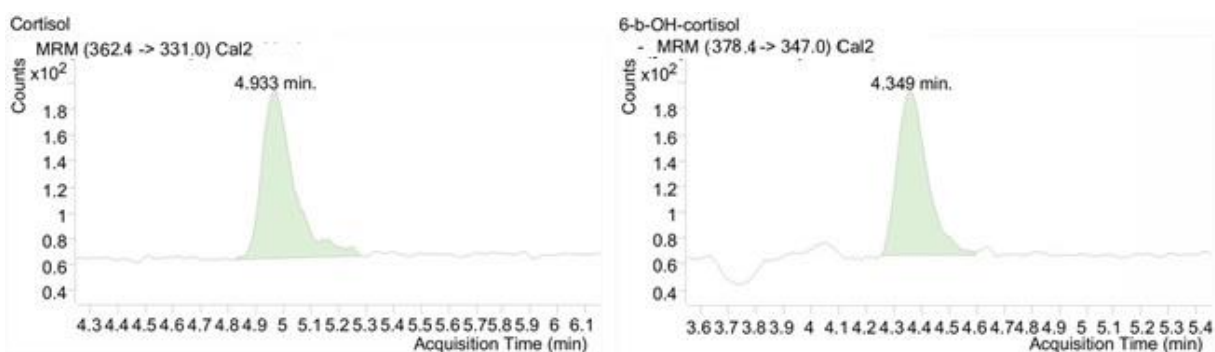
### 3.1.2. Валидация методики количественного определения $\beta$ -гидрокортизола и кортизола в моче

#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали мочу, очищенную от мешающих эндогенных аналитов. Анализировали сначала чистую мочу, а затем мочу после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 5 и 6.



**Рисунок 5.** Хроматограмма мочи без определяемых аналитов (кортизол/ $\beta$ -гидрокортизол)



**Рисунок 6.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (кортизол/ $\beta$ -гидрокортизол) на уровне нПКО

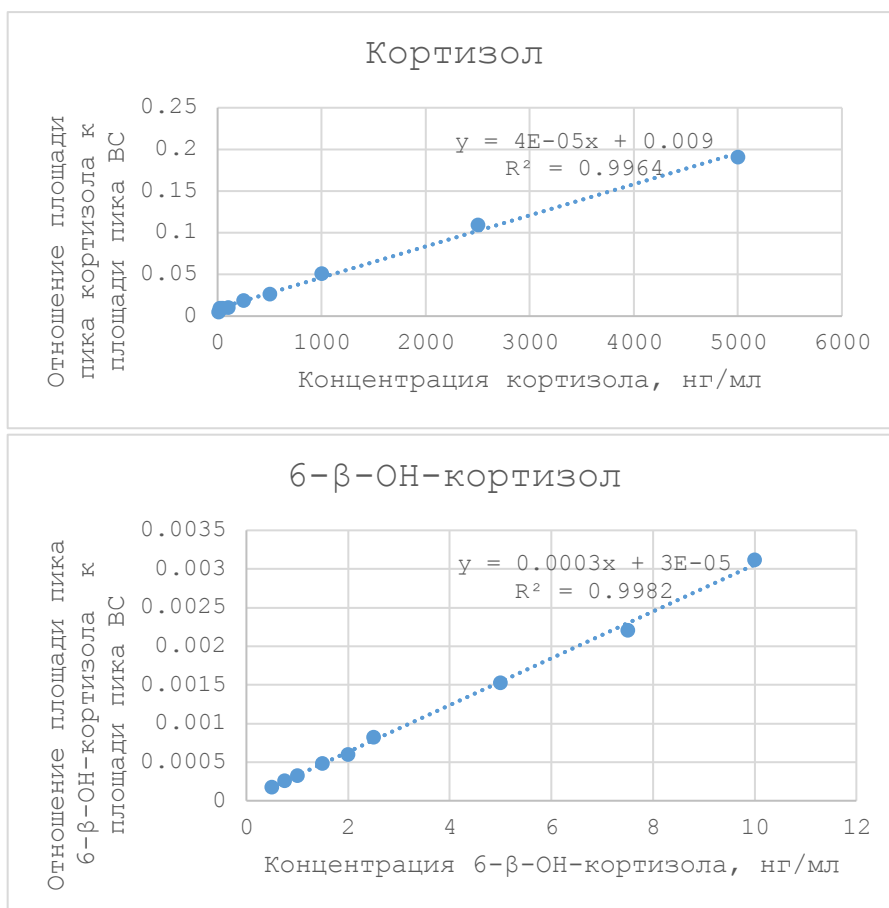
#### *Линейность*

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 18. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 7), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 18.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Кортизол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
6-β- гидрокортизол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
Кортизол-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6-β- гидрокортизол- D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 7.** Калибровочные кривые

*Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения фактора матрицы используют образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCV и QCD (приведены в Таблице 19).

**Таблица 19.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (моча)

	Образец контроля качества	QCA	QCV	QCC	QCD
Концентрация аналита, нг/мл	Кортизол	10	30	2500	3750
	6-β-ОН-кортизол	10	30	2500	3750

Анализ проводится в 6 сериях для каждого значения концентрации. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 20.

**Таблица 20.** Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит	Кортизол	6-β-ОН-кортизол
--------	----------	-----------------

Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	2,76	6,87
	4,75	12,15

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 21.

**Таблица 21.** Степень извлечения

	Аналит	Кортизол	6-β-ОН-кортизол
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	86,47	84,82
	QCD	82,85	84,80
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	8,47	11,18
	QCD	12,85	8,48

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 22.

**Таблица 22.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Кортизол	QCA	7,06	11,70	7,33	11,27

	QCB	6,61	13,07	6,25	9,75
	QCC	5,03	8,19	6,30	7,09
	QCD	4,41	6,96	3,29	2,30
<b>6-β-ОН-кортизол</b>	QCA	5,65	9,96	7,13	9,14
	QCB	4,40	7,51	5,62	5,13
	QCC	5,64	9,35	5,51	6,87
	QCD	7,15	12,47	7,55	11,36

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Значения концентрация определяемых веществ в образцах рассчитывались по соответствующим калибровочным кривым. Полученные результаты приведены в Таблице 23 и удовлетворяют критериям приемлемости.

#### *Предел количественного определения*

Для кортизола – 10 нг/мл

Для 6-β-ОН-кортизола – 10 нг/мл

#### *Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

#### *Стабильность*

Результаты исследования стабильности соответствовали критериям приемлемости. Результаты приведены в таблице 24.

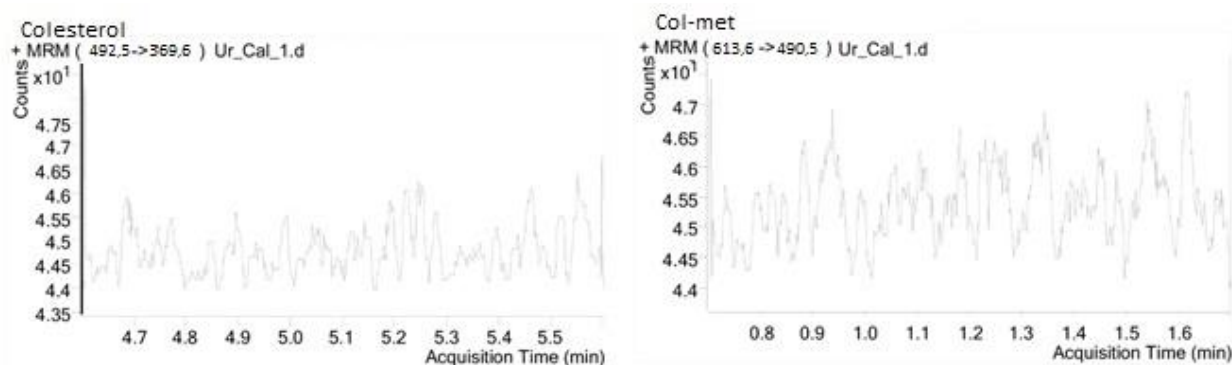
**Таблица 24.** Результаты оценки стабильности (моча)

		Аналит	Кортизол	6-β-ОН-кортизол
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	7,31	9,39
		QCD	4,85	7,91
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	6,08	8,65
		QCD	5,47	8,28
	заморозка/разморозка	QCB	7,74	8,73
		QCD	7,9	9,22
	после пробоподготовки, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	13,55	12,81
		QCD	9,55	12,14
	месяц при заморозке	QCB	8,71	9,12
		QCD	9,13	10,63

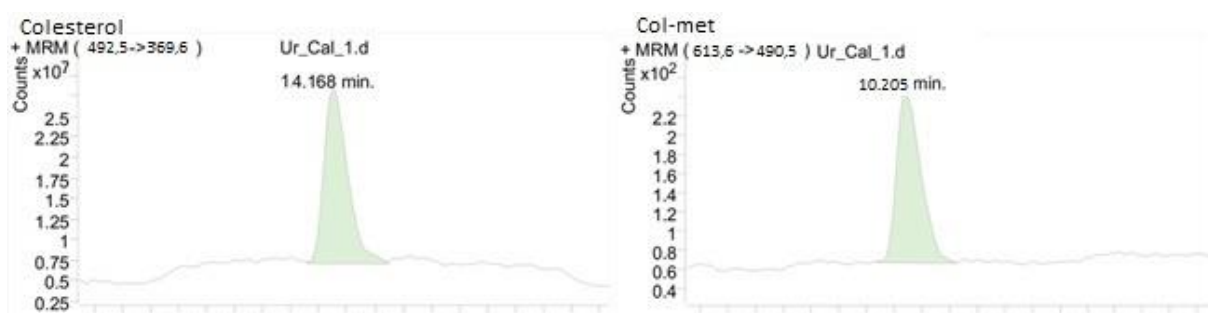
### 3.1.3. Валидация методики количественного определением 4 $\beta$ -гидроксихолестерина и холестерина в плазме крови

#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали плазму крови, очищенную от мешающих эндогенных аналитов. Анализировали сначала чистую плазму, а затем плазму после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 8 и 9.



**Рисунок 8.** Хроматограмма плазмы крови без определяемых аналитов (холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин)



**Рисунок 9.** Хроматограмма плазмы крови с добавлением стандартов определяемых аналитов (холестерин/4 $\beta$ -гидроксихолестерин) на уровне нПКО

#### *Линейность*

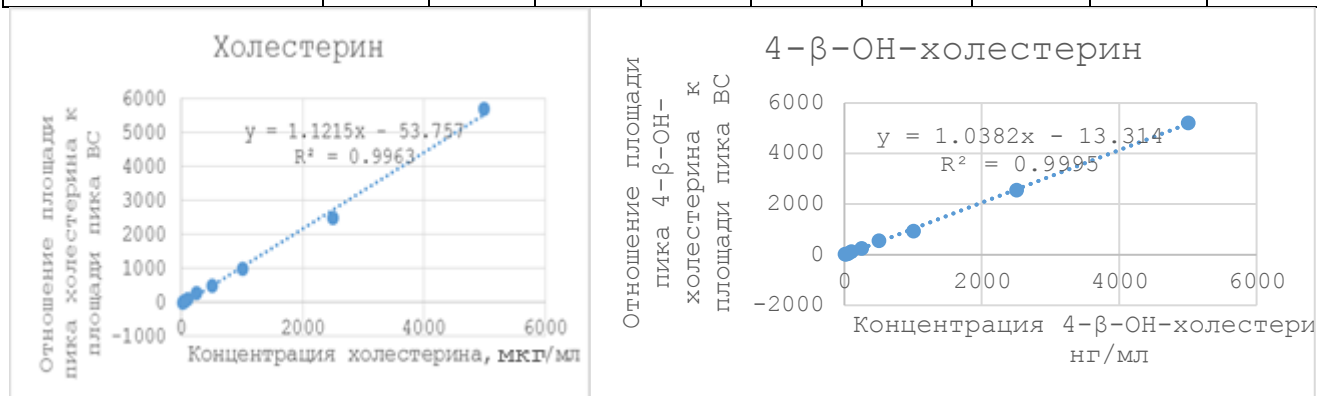
Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в

Таблице 25. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 10), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 25.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Холестерин мкг/мл	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
4β- гидроксихолестерин нг/мл	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
Холестерин-D4 мкг/мл	100	100	100	100	100	100	100	100	100
4β- гидроксихолестерин- D4 нг/мл	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 10.** Калибровочные кривые

### *Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения эффекта матрицы использовали соответствующие образцы контроля качества QCB и QCD (приведены в Таблице 26).

**Таблица 26.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (плазма крови)

	Образец контроля качества	QCA	QCB	QCC	QCD
Концентрация аналита,	Холестерин мкг/мл	10	30	2500	3750
	4-β-ОН- холестерин нг/мл	10	30	2500	3750

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 27.

**Таблица 27.** Результаты оценки эффекта матрицы (плазма крови)

Аналит	Холестерин	4-β-ОН- холестерин
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	10,16	10,04
	9,88	9,15

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 28.

**Таблица 28.** Степень извлечения

	Аналит	Холестерин	4-β-ОН- холестерин
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	82,16	87,11
	QCD	81,53	81,17
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	9,13	9,24
	QCD	6,97	9,11

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля

проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 29.

**Таблица 29.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Холестерин	QCA	6,89	12,95	7,52	10,62
	QCB	5,30	8,83	6,70	6,87
	QCC	5,64	9,16	4,95	5,15
	QCD	6,14	10,92	7,68	10,01
6-β-ОН-холестерин	QCA	5,25	8,11	6,15	5,90
	QCB	5,32	9,57	6,54	6,70
	QCC	6,44	10,80	7,29	9,22
	QCD	6,88	12,61	6,61	9,34

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 29 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для холестерина – 10 мкг/мл

Для 4-β-ОН-холестерина – 10 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

#### *Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в таблице 30.

**Таблица 30.** Результаты оценки стабильности (плазма крови)

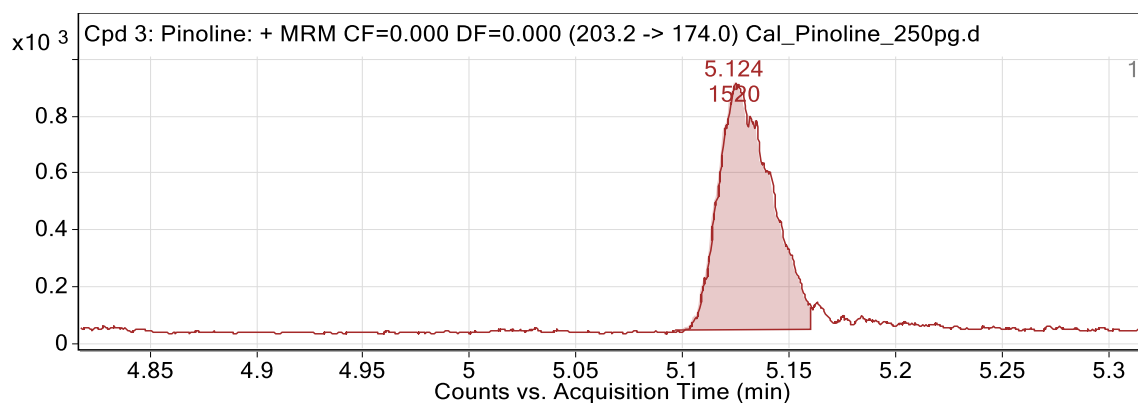
		Аналит	Холестерин	4-β-ОН-холестерин
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	15,40	12,87
		QCD	9,97	10,93
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	12,69	11,90
		QCD	11,33	11,42
	заморозка/разморозка	QCB	13,17	12,87
		QCD	10,94	10,93
	после пробоподготовки, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	12,99	11,13
		QCD	14,78	12,84
	месяц при заморозке	QCB	12,62	11,99
		QCD	13,71	12,41

### **3.1.4. Валидация методики количественного определением 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина и пинолина в моче**

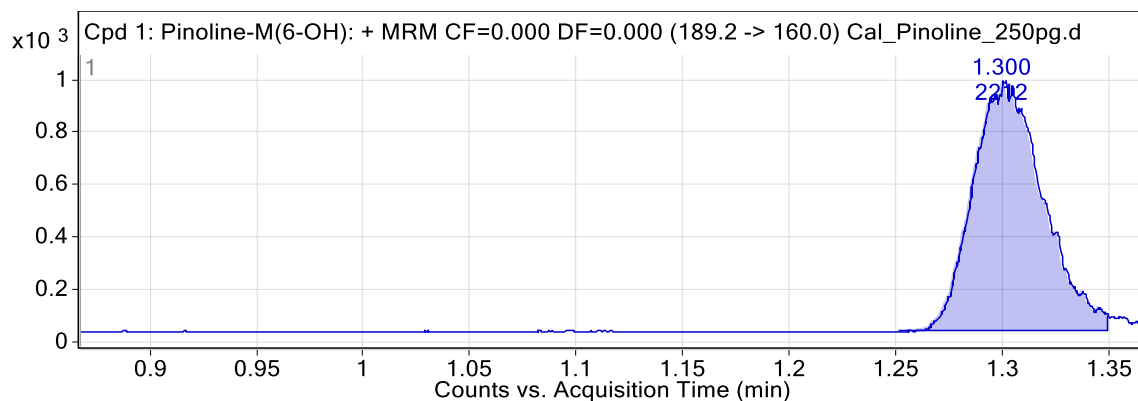
#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали мочу, очищенную от мешающих эндогенных аналитов. Анализировали сначала чистую мочу, а затем мочу после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов.

Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 11 и 12.



**Рисунок 11.** Хроматограмма образца мочи содержащей определяемые вещества (пинолин) на уровне нПКО



**Рисунок 12.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин) на уровне нПКО

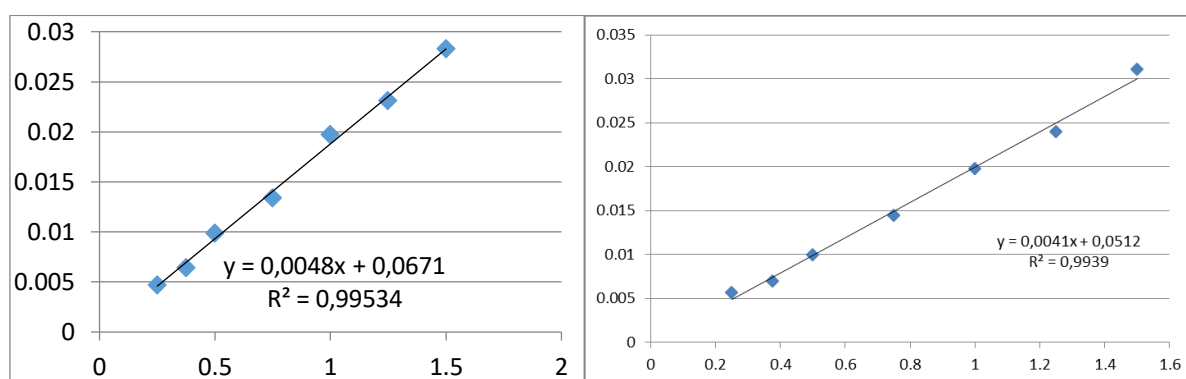
### *Линейность*

Для определения линейности готовили 7 образцов интактной биологической матрицы с добавлением рабочих растворов исследуемых аналитов, как указано в Таблице 31. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 13), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 31.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация, в нг/мл						
	1	2	3	4	5	6	7
Пинолин	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
Галантамин	20	20	20	20	20	20	20



А

Б

**Рисунок 13.** Калибровочные кривые (А – пинолин, Б – 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин)

*Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения фактора матрицы использовали образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCV и QCD (приведены в Таблице 32).

**Таблица 32.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (моча)

	Образец контроля качества	QCA	QCV	QCC	QCD
Концентрация аналита, нг/мл	Пинолин	250	375	750	1500
	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	250	375	750	1500

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 33.

**Таблица 33.** Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит	Пинолин	6-β-ОН-пинолин
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	11,09	12,22
	10,07	8,89

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 34.

**Таблица 34.** Степень извлечения

	Аналит	Пинолин	6-β-ОН-пинолин
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	84,67	86,28
	QCD	80,31	81,72
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	11,09	12,22
	QCD	10,07	8,89

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 34.

**Таблица 34.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Пинолин	QCA	8,95	11,24	9,01	12,48
	QCB	7,13	7,65	7,47	8,12
	QCC	4,67	5,12	4,81	5,87
	QCD	1,57	3,12	1,14	3,31
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	QCA	6,84	7,35	9,12	11,64
	QCB	5,78	6,01	8,05	9,18
	QCC	4,12	4,41	5,61	6,12
	QCD	2,85	2,90	4,12	4,48

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводится в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 34 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для пинолина – 0,25 нг/мл

Для метаболита – 0,25 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

#### *Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в таблице 35.

**Таблица 35.** Результаты оценки стабильности (моча)

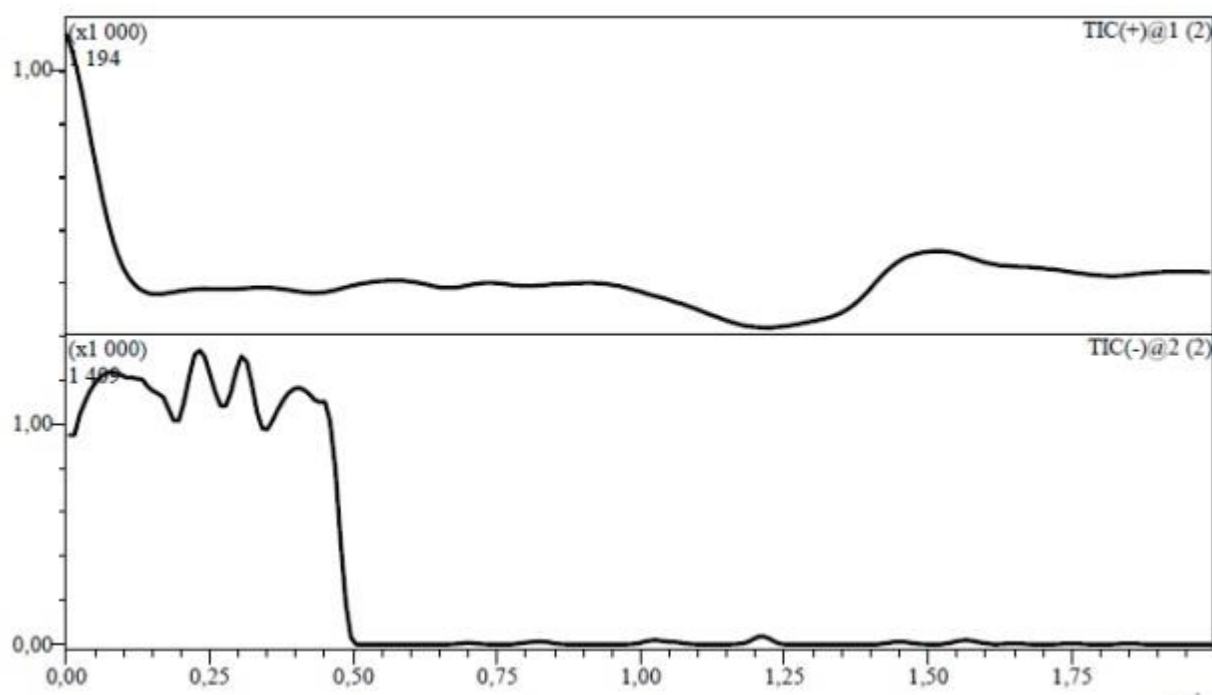
		Аналит	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	7,24	9,30
		QCD	4,80	7,83
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	6,02	8,56
		QCD	5,42	8,20
	заморозка/разморозка	QCB	7,66	8,64
		QCD	7,82	9,13
	после пробоподготовке, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	13,41	12,68
		QCD	9,45	12,02
	месяц при заморозке	QCB	8,62	9,03
		QCD	9,04	10,52

### **3.1.5. Валидация методики количественного определением EXP-3174 и лозартана в моче**

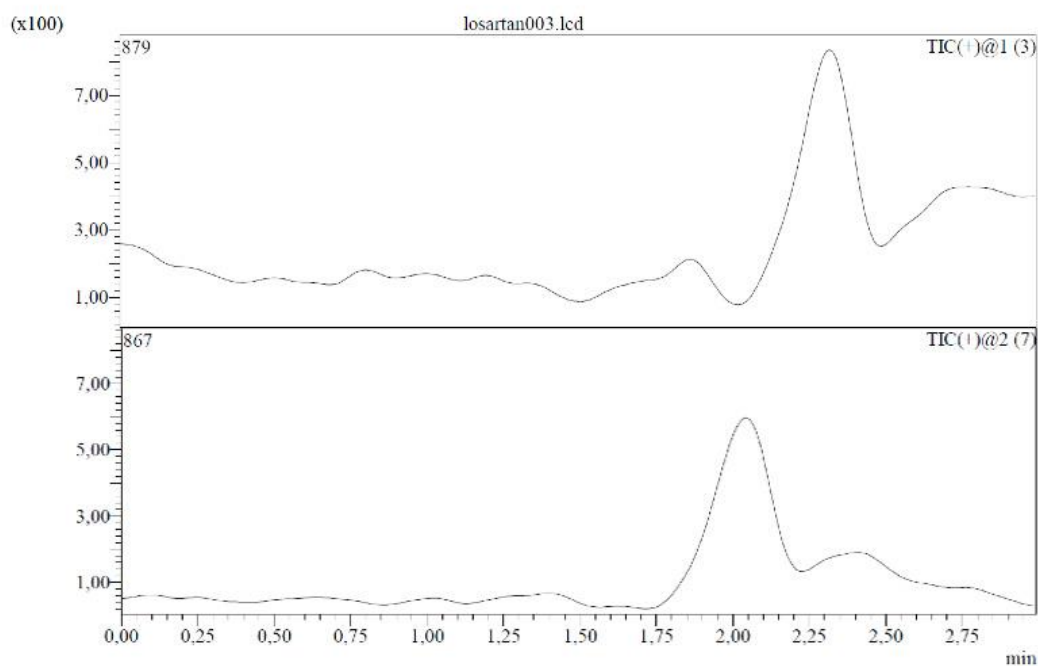
#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали интактную мочу. Анализировали сначала чистую мочу, а затем мочу после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих

пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 13 и 14.



**Рисунок 13.** Хроматограмма мочи без определяемых аналитов (лозартан/ЕХР-3174)



**Рисунок 14.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (лозартан/ЕХР-3174) на уровне нПКО

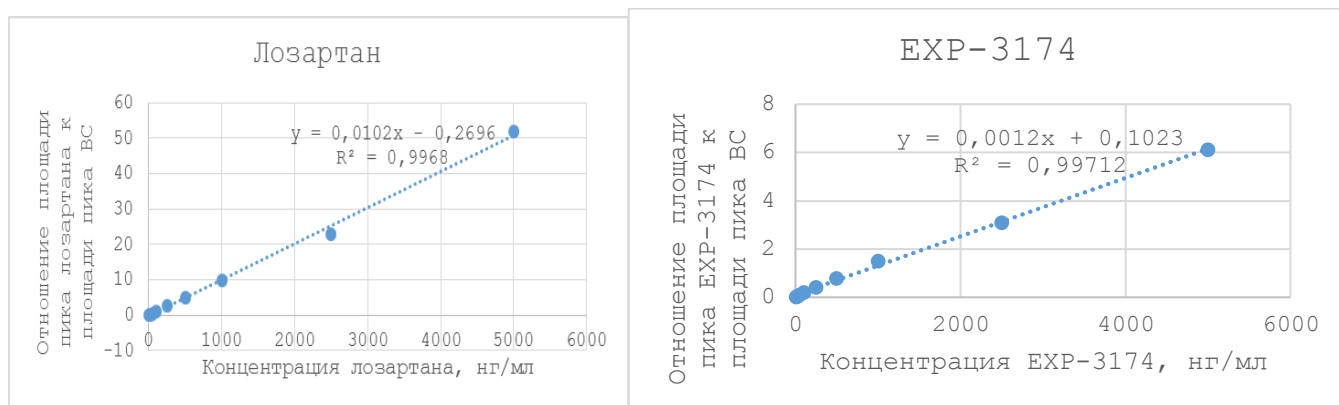
### Линейность

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 36. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 15), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 36.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Лозартан	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
EXP-3174	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
Лозартан-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
EXP-3174-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 15.** Калибровочные кривые

### Эффект матрицы и степень извлечения

Для определения фактора матрицы использовали образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCV и QCD (приведены в Таблице 37).

**Таблица 37.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (моча)

	Образец контроля качества	QCA	QCB	QCC	QCD
Концентрация аналита, нг/мл	Лозартан	10	30	2500	3750
	EXP-3174	10	30	2500	3750

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 38.

**Таблица 38.** Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит	Лозартан	EXP-3174
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	7,65	10,12
	11,87	11,23

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 39.

**Таблица 39.** Степень извлечения

	Аналит	Лозартан	EXP-3174
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	87,57	87,55
	QCD	83,77	90,25
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	11,74	8,89
	QCD	8,38	9,03

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого

значения концентрации. Значения концентрация определяемых веществ в образцах рассчитывались по соответствующим калибровочным кривым. Полученные результаты приведены в Таблице 40.

**Таблица 40.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Лозартан	QCA	7,28	14,42	7,84	11,84
	QCB	6,38	12,46	6,62	10,07
	QCC	5,00	7,95	6,75	7,47
	QCD	4,21	7,00	3,70	2,46
EXP-3174	QCA	7,70	11,87	8,86	12,98
	QCB	5,90	11,24	7,37	10,72
	QCC	4,93	7,46	7,64	8,21
	QCD	3,81	7,07	4,50	2,79

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 40 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для лозартана – 10 нг/мл

Для EXP-3174 – 10 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

#### *Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в Таблице 41.

**Таблица 41.** Результаты оценки стабильности (моча)

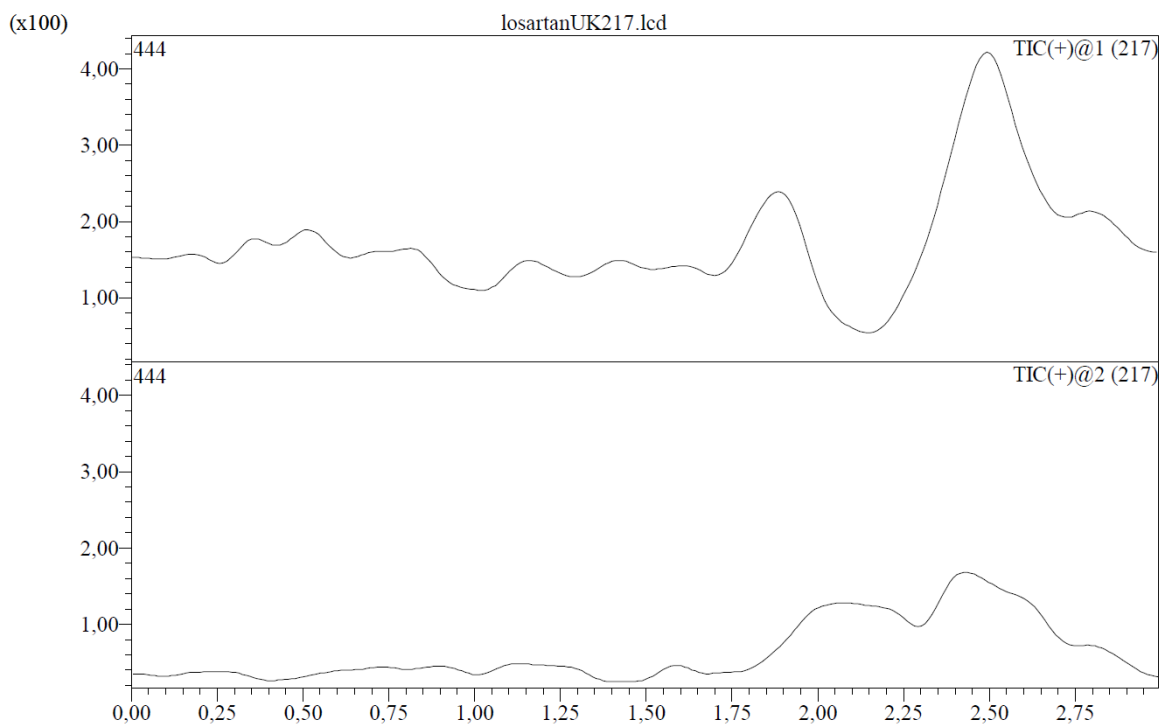
		Аналит	Лозартан	EXP-3174
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	3,86	9,34
		QCD	8,04	6,39
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	5,95	7,87
		QCD	7,00	7,13
	заморозка/разморозка	QCB	5,03	7,37
		QCD	7,33	7,04
	после пробоподготовки, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	8,90	9,87
		QCD	10,23	8,01
	месяц при заморозке	QCB	9,88	9,54
		QCD	10,06	8,78

### **3.1.6. Валидация методики количественного определением EXP-3174 и лозартана в плазме крови крыс**

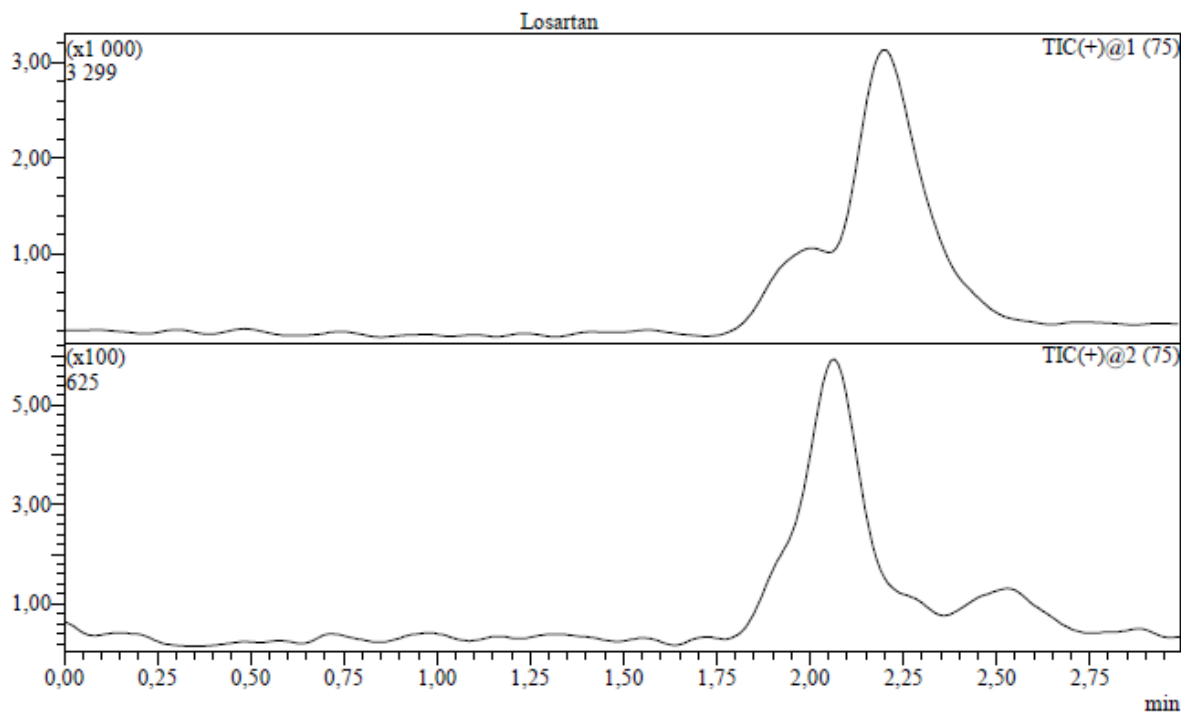
#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали мочу интактных крыс. Анализировали сначала чистую мочу, а затем мочу после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих

пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 16 и 17.



**Рисунок 17.** Хроматограмма мочи без определяемых аналитов (лозартан/ЕХР-3174)



**Рисунок 17.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (лозартан/ЕХР-3174) на уровне нПКО

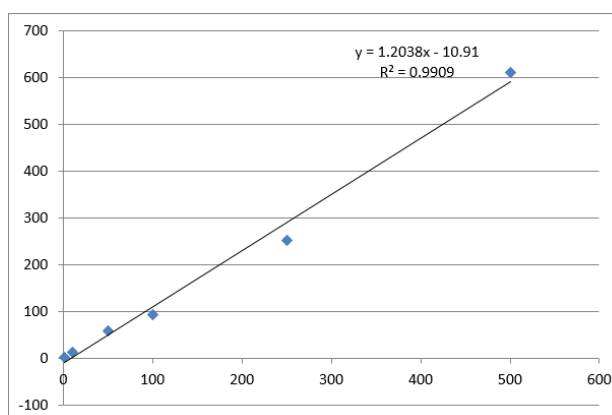
*Линейность*

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 42. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 18), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

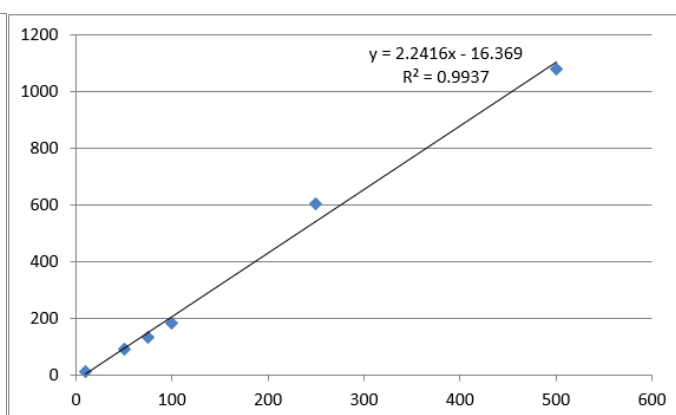
В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 42.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Лозартан	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
ЕХР-3174	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
Лозартан-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ЕХР-3174-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



А



Б

**Рисунок 18.** Калибровочные кривые (А – лозартан, Б – ЕХР3174)

*Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения фактора матрицы использовали образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCB и QCD (приведены в Таблице 43).

**Таблица 43.** Концентрация аналита в образцах контроля качества

	Образец контроля качества	QCA	QCB	QCC	QCD
Концентрация аналита, нг/мл	Лозартан	10	30	2500	3750
	EXP-3174	10	30	2500	3750

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 44.

**Таблица 44.** Результаты оценки эффекта матрицы

Аналит	Лозартан	EXP-3174
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	8,21	7,26
	10,11	9,15

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 45.

**Таблица 45.** Степень извлечения

	Аналит	Лозартан	EXP-3174
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	85,38	85,36
	QCD	81,68	87,99
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	11,45	8,67
	QCD	8,17	8,80

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 46.

**Таблица 46.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Лозартан	QCA	6,94	13,74	7,47	11,28
	QCB	6,08	11,87	6,31	9,59
	QCC	4,76	7,57	6,43	7,12
	QCD	4,01	6,67	3,53	2,34
EXP-3174	QCA	7,34	11,31	8,44	12,37
	QCB	5,62	10,71	7,02	10,21
	QCC	4,70	7,11	7,28	7,82
	QCD	3,63	6,74	4,29	2,66

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 46 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для лозартана – 10 нг/мл

Для EXP-3174 – 10 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

*Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в таблице 47.

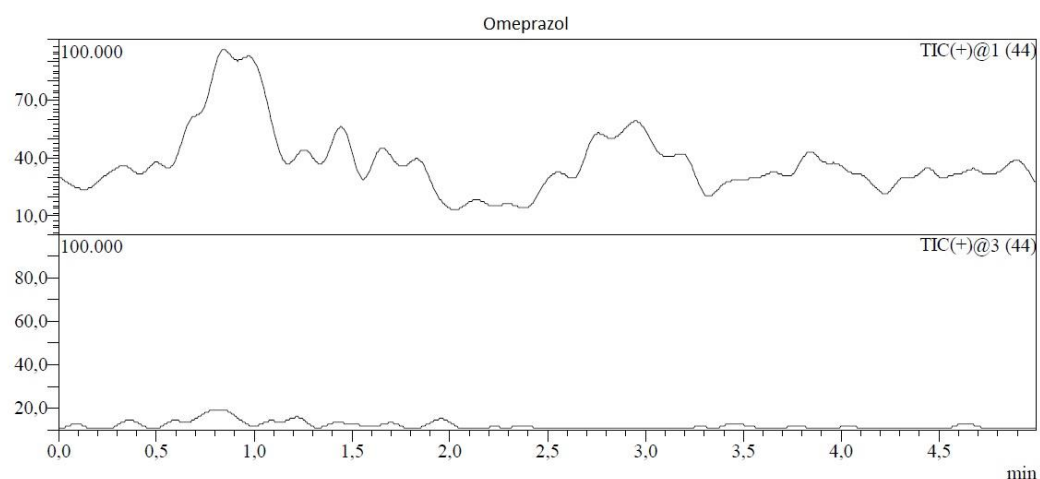
**Таблица 47.** Результаты оценки стабильности (моча)

		Аналит	Лозартан	EXP-3174
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	3,82	9,25
		QCD	7,96	6,33
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	5,89	7,79
		QCD	6,93	7,06
	заморозка/разморозка	QCB	4,98	7,30
		QCD	7,26	6,97
	после пробоподготовки, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	8,81	9,77
		QCD	10,13	7,93
	месяц при заморозке	QCB	9,78	9,44
		QCD	9,96	8,69

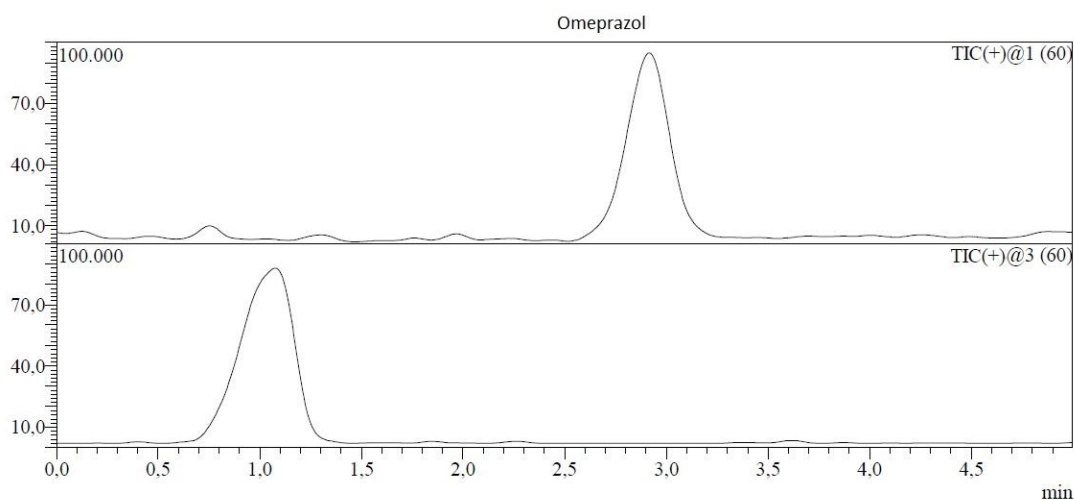
### 3.1.7. Валидация методики количественного определением 5-гидроксиомепразол и омепразола в моче

#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали интактную мочу. Анализировали сначала чистую мочу, а затем мочу после добавления к ней стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 19 и 20.



**Рисунок 19.** Хроматограмма мочи без определяемых аналитов (омепразол/5-гидроксиомепразол)



**Рисунок 20.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (омепразол/5-гидроксиомепразол) на уровне нПКО

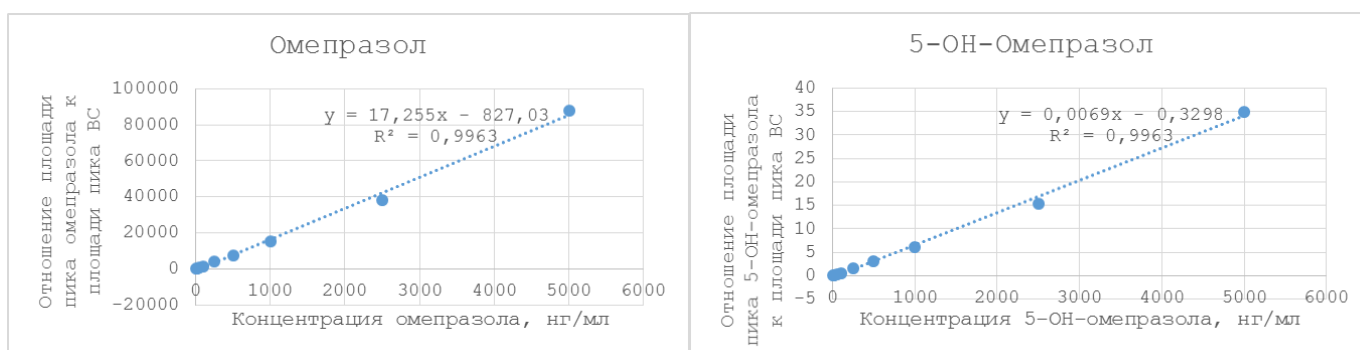
### *Линейность*

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 48. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 21), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках.

В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 48.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
омепразол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
5-гидроксиомепразол	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
омепразол-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
5-гидроксиомепразол-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 21.** Калибровочные кривые

### *Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения фактора матрицы использовали образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCB и QCD (приведены в Таблице 49).

**Таблица 49.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (моча)

	Образец контроля качества	QCA	QCB	QCC	QCD
Концентрация аналита, нг/мл	омепразол	10	30	2500	3750
	5-гидроксиомепразол	10	30	2500	3750

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях.

Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 50.

**Таблица 50.** Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит	омепразол	5-гидроксиомепразол
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	7,15	14,18
	10,21	13,32

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 51.

**Таблица 51.** Степень извлечения

	Аналит	омепразол	5-гидроксиомепразол
Степень извлечения, %	QCB	85,38	85,36
	QCD	81,68	87,99
Коэффициент вариации, %	QCB	11,45	8,67
	QCD	8,17	8,80

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 52.

**Таблица 52.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
омепразол	QCA	8,19	16,22	8,82	13,31
	QCB	7,17	14,01	7,44	11,32
	QCC	5,62	8,94	7,59	8,40
	QCD	4,73	7,87	4,16	2,77
5- гидроксиомепразол	QCA	8,66	13,35	9,96	14,60
	QCB	6,63	12,64	8,29	12,05
	QCC	5,54	8,39	8,59	9,23
	QCD	4,28	7,95	5,06	3,14

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля качества осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 52 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для омепразола – 10 нг/мл

Для 5-гидроксиомепразол – 10 нг/мл

### *Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

### *Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в таблице 53.

**Таблица 53.** Результаты оценки стабильности (моча)

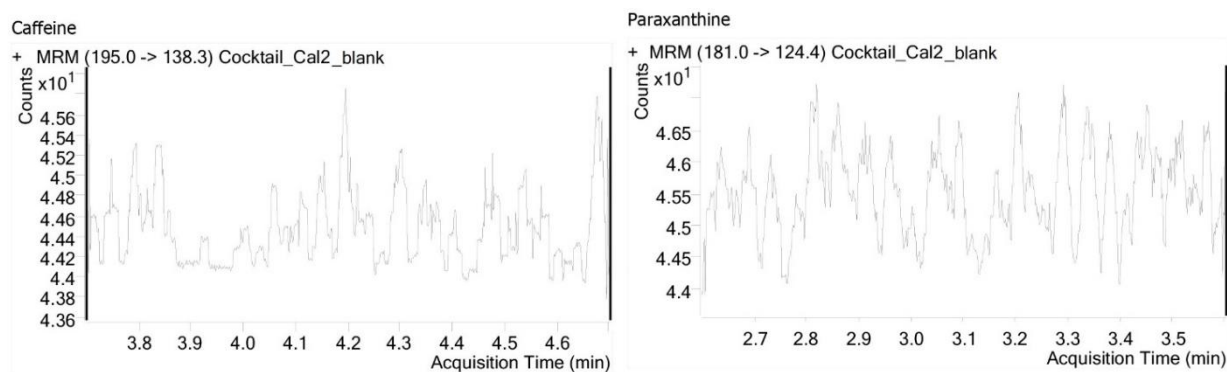
		Аналит	омепразол	5- гидроксиомепразол
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	4,36	10,54
		QCD	9,08	7,21
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	6,72	8,89
		QCD	7,90	8,05
	заморозка/разморозка	QCB	5,68	8,32
		QCD	8,28	7,95
	после пробоподготовке, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	10,05	11,14
		QCD	11,55	9,04
	месяц при заморозке	QCB	11,15	10,77
		QCD	11,36	9,91

### **3.1.8. Валидация методики количественного определением параксантина и кофеина в моче**

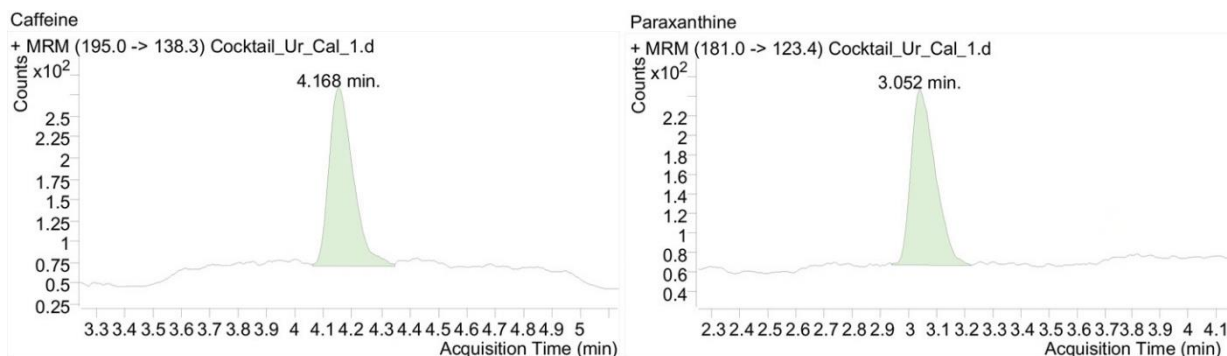
#### *Селективность*

Анализ проводили на 6 образцах. Использовали чистую мочу крыс. Анализировали сначала чистую мочу крыс, а затем мочу после добавления к ней

стандартных растворов определяемых веществ и внутренних стандартов. На хроматограммах образцов чистой биожидкости не было пиков, соответствующих пикам определяемых веществ и внутренних стандартов. Хроматограммы, подтверждающие селективность методики, приведены на Рисунках 22 и 23.



**Рисунок 22.** Хроматограмма мочи без определяемых аналитов (кофеин/параксантин)



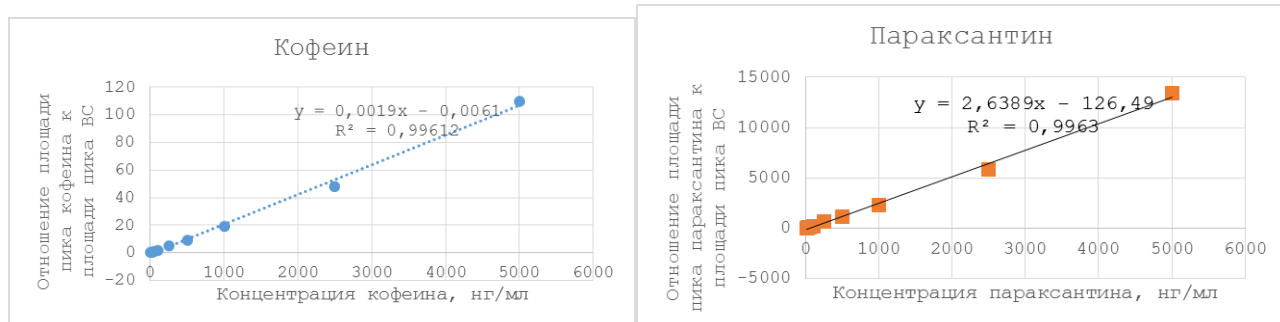
**Рисунок 23.** Хроматограмма мочи с добавлением стандартных растворов определяемых аналитов (кофеин/параксантин) на уровне нПКО

### *Линейность*

Линейность определяли путем хроматографирования 9 образцов интактной биожидкости, к которой прибавляли растворы определяемых веществ, как указано в Таблице 54. В результате были получены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 24), уравнения калибровочных кривых приведены на соответствующих рисунках. В соответствии с полученными калибровочными кривыми был проведен расчет практических концентраций стандартных веществ. Полученные данные были статистически обработаны.

**Таблица 54.** Теоретическое содержание стандартов в калибровочных образцах

	Концентрация (нг/мл)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
кофеин	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
параксантин	10	25	50	100	250	500	1000	2500	5000
кофеин-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100
параксантин-D4	100	100	100	100	100	100	100	100	100



**Рисунок 25.** Калибровочные кривые

*Эффект матрицы и степень извлечения*

Для определения фактора матрицы использовали образцы контроля с концентрациями аналита на уровне QCV и QCD (приведены в Таблице 55).

**Таблица 55.** Концентрация аналита в образцах контроля качества (моча)

Концентрация аналита, нг/мл	Образец контроля качества	QCA	QCV	QCC	QCD
		кофеин	10	30	2500
параксантин		10	30	2500	3750

Каждый из образцов контроля качества анализировали в 6 сериях. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 56.

**Таблица 56.** Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит	кофеин	параксантин
--------	--------	-------------

Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	6,78	11,09
	9,16	10,23

Показатели эффективности экстракции аналитов из биологической матрицы рассчитываются по соотношению площадей хроматографических пиков образцов QCB и QCD и площадей хроматографических пиков растворов с соответствующими концентрациями без проведения экстракции. Величины степени извлечения представлены в Таблице 57.

**Таблица 57.** Степень извлечения

	Аналит	кофеин	параксантин
<i>Степень извлечения, %</i>	QCB	83,25	83,23
	QCD	79,64	85,79
<i>Коэффициент вариации, %</i>	QCB	11,16	8,45
	QCD	7,97	8,58

*Точность и прецизионность*

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Концентрации определяемых веществ в образцах контроля проводили по соответствующей калибровочной кривой в каждом аналитическом цикле. Полученные результаты приведены в Таблице 58.

**Таблица 58.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
кофеин	QCA	9,21	18,24	9,92	14,97
	QCB	8,06	15,75	8,37	12,73
	QCC	6,32	10,05	8,53	9,45

	QCD	5,32	8,85	4,68	3,11
<b>параксанти н</b>	QCA	9,74	15,01	11,20	16,42
	QCB	7,46	14,21	9,32	13,55
	QCC	6,23	9,43	9,66	10,38
	QCD	4,81	8,94	5,69	3,53

Точность и прецизионность разработанной методики между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводился в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществляли по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 59 и удовлетворяют критериям приемлемости.

*Предел количественного определения*

Для кофеина – 10 нг/мл

Для параксантина – 10 нг/мл

*Перенос пробы*

Анализ проб чистых растворителей и интактных биожидкостей не выявил эффекта переноса пробы, что было подтверждено отсутствием соответствующих пиков на хроматограммах на уровне НПКО).

*Стабильность*

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в 60.

**Таблица 60.** Результаты оценки стабильности (моча)

		Аналит	кофеин	параксантин
Нормализованный модуль разницы, %	комнатная температура, без пробоподготовки, 24 часа	QCB	4,92	11,90
		QCD	10,25	8,14
	комнатная температура, с пробоподготовкой, 24 часа	QCB	7,59	10,04
		QCD	8,92	9,09
	заморозка/разморозка	QCB	6,41	9,39
		QCD	9,35	8,98
	после пробоподготовке, при 4 градусах С, 24 часа	QCB	11,35	12,58
		QCD	13,04	10,21
	месяц при заморозке	QCB	12,59	12,16
		QCD	12,83	11,19

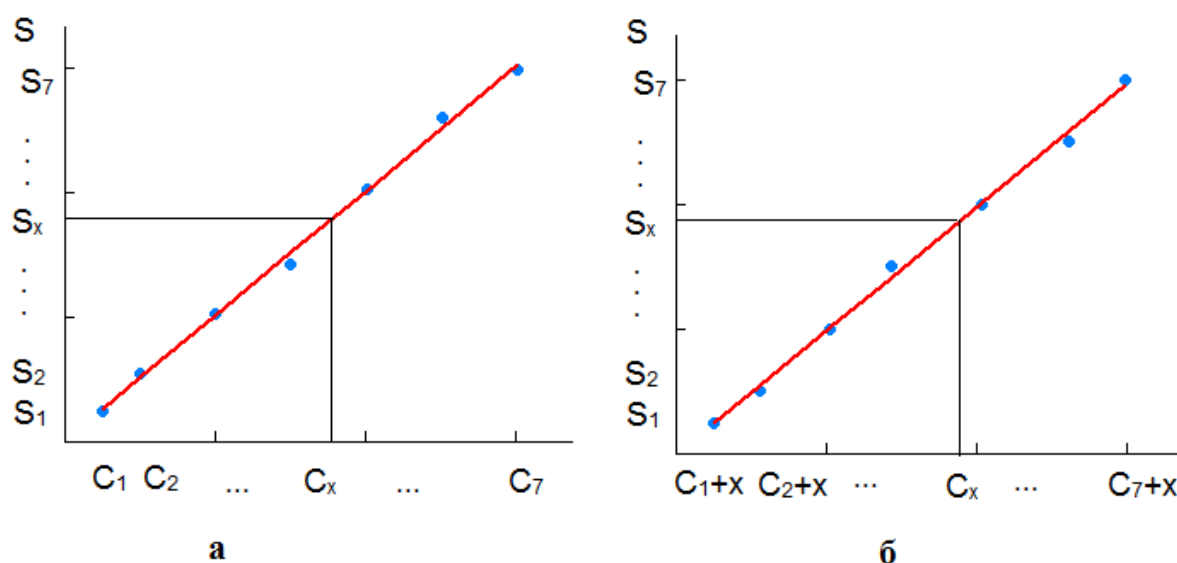
### **3.2. Сравнение разработанных методик количественного определения эндогенных субстратов и методик оценки метаболической активности на их основе**

#### **3.2.1. Сравнение методик количественного определения эндогенных субстратов (с использованием и без использования дейтерированных внутренних стандартов)**

Количественное определение эндогенных веществ является актуальной задачей в диагностике заболеваний, определении метаболической активности, определении маркеров патологических состояний. В данной работе количественное определение наиболее актуально для определения активности изофермента цитохрома P450 методом фенотипирования с использованием эндогенных субстратов, таких как кортизол, пинолин, холестерин и их метаболитов.

Для количественного определения с помощью инструментального физико-химического хроматографического метода преимущественно используется два подхода к обработке данных, а именно: метод абсолютной градуировки (калибровки) и метод внутреннего стандарта. Причем и тот, и другой метод предполагает построение калибровочной кривой и эталонные растворы которых необходимо хроматографировать в строго идентичных условиях, что и анализируемый образец. К таким условиям относятся температура, давление, параметры прибора и колонки, подвижная и неподвижная фазы, растворитель, методика пробоподготовки и прочее.

Сложность определения концентрации эндогенного соединения в биообъекте с использованием хроматографического метода заключается в невозможности получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых (Рисунок 26).



**Рисунок 26.** Калибровочная кривая для экзо- (а) и эндогенного (б) вещества

В случае работы с экзогенными соединениями, как правило, сначала разрабатывается методика количественного определения вещества в водном или спиртовом растворе (но не в биожидкости). Далее разрабатывается методика количественного определения экзогенного вещества непосредственно в биожидкости, например, в плазме крови, на так называемой «чистой» плазме.

Такая методика состоит из двух частей. Во-первых, разрабатывается методика пробоподготовки, основной целью которой является получение максимального количества определяемого вещества в подходящем растворителе, то есть подбираются операции и материалы для достижения оптимального % экстракции вещества, который в надлежащих практиках, как правило, составляет 70 - 80 % и более. Во-вторых, разрабатывается методика хроматографирования, целью которой является непосредственное количественное определение: выбор метода обработки результатов, выбор внутреннего стандарта (если используется метод внутреннего стандарта), выбор рабочих растворов и калибровочных стандартов, подбор параметров хроматографирования и прочее.

В случае работы с эндогенными соединениями возникают определенные сложности. Сложность определения концентрации эндогенного соединения в биообъекте с использованием хроматографического метода заключается в невозможности получения такой же биоматрицы без эндогенного соединения для использования в качестве эталонных растворов при построении калибровочных кривых. Отсутствует «чистая» плазма, то есть такая же плазма без соединения. Эту проблему в основном решают получением «чистых» или модельных биожидкостей путем разного рода очисток, в процессе которых происходит очистка не только от интересующего эндогенного соединения, но и от других веществ, влияющих на общий уровень базовой линии при хроматографировании, на неидентичность условий пробоподготовки модельных и анализируемых образцов.

Существование различных методов обусловлено различными научно-производственными задачами, имеющими дело с разными объектами, требующими разной точности определения и, вообще говоря, отличающихся по самой постановке задачи.

*Метод добавок (стандартной добавки)* предполагает сначала измерение величины аналитического сигнала (площади или высоты пика)  $S_x$  для пробы с неизвестной концентрацией  $c_x$  вещества. Затем к данной пробе добавляют некоторое количество  $c_{ст}$  определяемого вещества (стандарта) и снова измеряют

величину аналитического сигнала  $S_{x+ст}$ . Концентрацию определяемого компонента в анализируемой пробе рассчитывают по формуле (2):

$$c_x = \frac{S_x}{S_{x+ст}}(c_x + c_{ст}) \quad (2)$$

*Метод абсолютной градуировки (калибровки)* предполагает построение градуировочного графика (при ручной обработке) либо определение уравнения прямой (при обработке на ЭВМ) по стандартным смесям. Готовят серию эталонных растворов с точно известными концентрациями  $c_i$  определяемого вещества. Записывают хроматограммы каждого раствора в одинаковых условиях и измеряют площади  $S_i$  пиков определяемого вещества на каждой хроматограмме. По полученным данным вычисляется уравнение прямой (кривой) в координатах  $S_i - c_i$ . Затем строго в тех же условиях хроматографируют пробу анализируемого раствора с неизвестной концентрацией  $c_x$  и измеряют площадь  $S_x$  пика определяемого вещества. По уравнению прямой находят концентрацию  $c_x$  определяемого вещества в анализируемом растворе.

*Метод внешнего стандарта* используется при проверке известного количества известного вещества, что актуально, в том числе, в фармацевтическом анализе. Сначала записывается хроматограмма с анализируемого раствора, затем готовится другой раствор (стандартный) с известной концентрацией, равной той, что проверяется, который тоже хроматографируют. Далее сравнивают две хроматограммы и делают заключение о качественном и количественном содержании.

*Метод внутренней нормализации* основан на предположении, что пики всех возможных компонентов смеси зафиксированы на хроматограмме и сумма их площадей равна 100%. Тогда содержание каждого компонента рассчитывается по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_i K_i}{\sum_{i=1}^n S_i K_i} 100\% \quad (3)$$

где  $K_i$  – поправочные коэффициенты для каждого  $i$ -го компонента для учета чувствительности детектора к разным компонентам (в простейшем случае все  $K_i=1$ );

$n$  – число компонентов смеси.

Метод внутренней нормализации широко распространен в анализе смеси углеводородов в нефтехимической промышленности. Пики всех разделяемых компонентов получаются на одной и той же хроматограмме, в идентичных условиях. Однако необходима полная уверенность, что элюируются и детектируются все без исключения компоненты. Поэтому данный метод не применим к биообразцам, т.к. мы не можем с уверенностью сказать, что элюируются и детектируются все без исключения компоненты.

*Метод внутреннего стандарта* предполагает вычисление поправочного коэффициента. Готовят несколько (порядка 5-ти) эталонных смесей, каждая из которых включает точно известную массу  $m_i$  определяемого компонента и массу  $m_{std}$  стандарта. В строго одинаковых условиях хроматографируют каждую смесь и на полученных хроматограммах измеряют площади  $S_i$  пиков определяемого вещества и площадь  $S_{std}$  стандарта. Площадь пика на хроматограмме прямо пропорциональна массе данного вещества:

$$\begin{cases} S_i = k_1 m_i = k'_1 C_i \\ S_{std} = k_2 m_{std} = k'_2 C_{std} \end{cases} \quad (4)$$

Поэтому

$$\frac{S_i}{S_{std}} = \frac{k_1}{k_2} \cdot \frac{m_i}{m_{std}} = k \frac{m_i}{m_{std}} = \frac{k'_1}{k'_2} \cdot \frac{C_i}{C_{std}} = k \frac{C_i}{C_{std}} \quad (5)$$

где величина  $1/k = k_2/k_1 = k'_2/k'_1$  называется поправочным коэффициентом (поправочным множителем). Затем в анализируемый образец вводится известное количество эталонного соединения (внутреннего стандарта). Хроматографируют полученный раствор в тех же условиях, что и эталонные растворы, после чего измеряют площади  $S_x$  и  $S_{std}$  обоих пиков. По полученным данным вычисляют отношение  $S_x/S_{std}$ . Окончательную обработку результатов можно проводить либо

методом градуировочного графика, либо расчетным путем. В первом случае определяют градуировочную кривую в координатах  $S_x/S_{std} - m_x/m_{std}$  ( $S_x/S_{std} - C_x/C_{std}$ ) и затем, зная измеренную величину  $S_x/S_{std}$ , находят по уравнению прямой отношение  $m_x/m_{std}$  ( $C_x/C_{std}$ ) и массу  $m_x$  ( $C_x$ ) определяемого вещества. Во втором случае с использованием найденного поправочного коэффициента массу или концентрацию неизвестного вещества определяют по формуле:

$$\begin{cases} m_i = \frac{1}{k} \cdot \frac{S_i}{S_{std}} m_{std} \\ C_i = \frac{1}{k} \cdot \frac{S_i}{S_{std}} C_{std} \end{cases} \quad (6)$$

В качестве стандарта используют вещества, родственные определяемому. Чем меньше различаются пики  $S_x$  и  $S_{std}$ , тем меньше ошибка определения, поэтому анализ обычно проводят в таких условиях, когда площади  $S_x$  и  $S_{std}$  соизмеримы, то есть нам необходимо заранее знать приблизительную массу или концентрации анализируемого вещества в пробе. Пики стандарта и определяемого вещества не должны перекрываться.

Анализ существующего ПО

*Agilent ChemStation*

Программный комплекс ChemStation фирмы Agilent Technologies – одно из самых распространенных средств управления аналитической аппаратурой, реализующей широкий спектр методов разделения, например, ГХ, ЖХ, ЖХ/МС, КЭ и КЭ/МС. Основным назначением программного обеспечения Agilent ChemStation является удовлетворением требований ученых, приоритетным направлением которых выступают исследования и разработки, проводимые в специальных фармацевтических и химических лабораториях. Это ПО без особых усилий адаптируется для решения конкретных аналитических задач. ПО Agilent ChemStation довольно функциональное и призвано управлять всеми системами хроматографии. Это масштабируемый комплекс сбора и обработки данных, пригодный для применения на разных стадиях – от начала разработок продукции

до контроля качества на производстве. Значительная адаптабельность и настраиваемые параметры соответствия нормативам позволяют использовать данный комплекс для обеспечения разных рабочих процессов. Современные средства управления оборудованием и текущего контроля приборов, подключаемых к локальной сети, обеспечивают быстрый и адаптабельный сбор данных. Имеются развитые средства анализа данных и оформления отчетов, способствующие повышению производительности.

Пользовательский интерфейс ChemStation разработан в представлениях, группирующих функциональность ПО в соответствии с типовыми аналитическими задачами. Во всех версиях и конфигурациях ПО имеются следующие три стандартных представления:

- «Метод» и «Контроль выполнения» для контроля и сбора данных с прибора;
- «Анализ данных» для просмотра и оценки собранных данных;
- «Отчеты» для разработки специфических типов отчетов.

Представление «Анализ данных» расширяет стандартную панель инструментов до специфических режимов анализа данных, включающих интегрирование, калибровку, отчетность, аннотирование, сравнение сигналов и дополнительные специализированные режимы в зависимости от установленных аппаратных модулей.

Представление конструктора отчетов позволяет пользователю графически определять шаблон специфического стиля отчета.

Режим калибровки представления анализа данных позволяет одновременно отображать:

- калибруемый сигнал или сигналы с указанием времени удерживания для текущего компонента;
- калибровочная таблица, отображение которой может быть настроено с помощью большого выбора калибровочных параметров;
- калибровочная кривая для калибруемого компонента.

Все окна режимов калибровки связаны и изменения в одном из них автоматически отображаются во всех других.

Количественное определение основано на следующих способах расчета:

- по процентному содержанию %,
- по нормализованному процентному содержанию %;
- с использованием внешнего стандарта (ESTD – external standard),
- процентный % с использованием внешнего стандарта (ESTD%);
- с использованием внутреннего стандарта (ISTD – internal standard);
- процентный % с использованием внутреннего стандарта (ISTD%).

Каждая методика использует либо площадь, либо высоту пика. Калибровка может быть многоуровневой и включать множественный внутренний стандарт.

Используется 4 поправочных коэффициента:

- абсолютный коэффициент отклика – количество компонента, деленное на измеренную площадь или высоту пика компонента, при анализе калибровочной смеси;
- коэффициент умножения (M) – используется для умножения результата для каждого компонента, для преобразования единиц в количественных выражениях;
- коэффициент разбавления (D) – используется для изменения шкалы представления результатов или корректировки изменения в составе образца;
- количество образца – используется в анализах ESTD% и ISTD% для преобразования абсолютного количества проанализированных компонентов в относительные значения путем деления на указанное значение.

Эти коэффициенты используются в процессе калибровки для компенсирования изменений в отклике детектора на различные компоненты образца, концентрации, разбавления образца, количества образца.

Процентный способ расчета *по площади пика* сообщает площадь каждого пика в анализе как процент от общей площади всех пиков анализа. Процентный способ расчета *по высоте пика* сообщает высоту каждого пика в анализе как

процент от общей высоты всех пиков в анализе. Эти способы не требуют предварительной калибровки и не зависят от введенного количества образца. Также не используются коэффициенты отклика.

Для способов расчета по методу внешнего стандарта, по методу внутреннего стандарта и для нормализации необходимы коэффициенты отклика, поэтому используется таблица калибровки.

Метод внешнего стандарта является основным методом количественного анализа, при котором как калибровочные, так и исследуемые образцы анализируются при одинаковых условиях. Для подсчета количества в неизвестной пробе сравниваются результаты, полученные для исследуемого и калибровочного образцов (т.е. по калибровочной кривой). Используются абсолютные коэффициенты отклика. Для вычисления абсолютного количества компонента  $x$  применяется уравнение:

$$[\text{абс. кол} - \text{во } x] = [\text{отклик пика } x] \cdot [\text{коэф. отклика } x] \cdot M \cdot D \quad (7)$$

где

$$[\text{коэф. отклика } x] = \frac{[\text{кол} - \text{во стандарта } x]}{[\text{отклик пика стандарта } x]} \quad (8)$$

Необходимо следить, чтобы размер вводимой пробы воспроизводился от анализа к анализу, так как в образце нет стандарта, с помощью которого можно было бы скорректировать изменения введенной пробы или пробоподготовку.

Для вычисления относительного (процентного) количества компонента  $x$  применяется уравнение:

$$[\text{относ.(\%)} \text{ кол} - \text{во } x] = \frac{[\text{абс. кол} - \text{во } x] \cdot 100}{[\text{кол} - \text{во пробы}]} \quad (9)$$

В методе нормализации коэффициенты отклика соотносятся с площадью пиков (или высотами) для компенсации изменений, происходящих в чувствительности детектора для различных компонентов.

$$[\text{нормализ. \% содержание } x] = \frac{[\text{отклик пика } x] \cdot [\text{коэф. отклика } x] \cdot M \cdot D}{\sum_i [\text{отклик пика } i] \cdot [\text{коэф. отклика } i]} \quad (10)$$

Расчет по нормализованному процентному содержанию имеет те же недостатки, что и расчеты по проценту площади и высоты. Любые изменения, которые влияют на общую площадь пика, будут влиять на подсчет концентрации каждого пика.

Метод внутреннего стандарта устраняет недостатки метода внешнего стандарта путем добавления известного количества вещества, которое служит в качестве нормализующего фактора. Это вещество, внутренний стандарт, добавляется как в калибровочные, так и в исследуемые образцы. Используя концентрацию внутреннего стандарта и площадь пика (или высоту) из анализа, ПО вычисляет концентрации веществ.

Соединение, используемое в качестве внутреннего стандарта, должно быть похоже на калибруемое соединение как химически, так и по времени удерживания, но должно быть хроматографически различимо.

Преимущества метода внутреннего стандарта:

- (+) Изменение объема пробы не критично.
- (+) Дрейф показаний прибора компенсируется внутренним стандартом.
- (+) Влияние способов подготовки образца сведено к минимуму, если химические свойства стандарта и исследуемого вещества схожи.

Недостатки:

- (-) Внутренний стандарт должен добавляться к каждому образцу.

Коэффициент отклика вычисляется по калибровочным точкам по следующей формуле:

$$[\text{коэф. отклика } x] = \frac{[\text{отношение количеств}]}{[\text{отношение откликов}]} \quad (11)$$

где [отношение количеств] – это калибровочное количество соединения, деленное на количество внутреннего стандарта на этом уровне;

[отношение откликов] – это площадь хроматографического пика, деленная на площадь или высоту внутреннего стандарта на этом уровне.

Для расчета фактического количества вещества  $x$  в неизвестной пробе используется:

$$[\text{факт. кол. } x] = [\text{отнош. откл. } x] \cdot [\text{коэф. откл. } x] \cdot [\text{факт. кол. } ISTD] \cdot M \cdot D \quad (12)$$

где

$$[\text{отнош. откл. для } x] = \frac{[\text{отклик пика } x]}{[\text{отклик пика } ISTD]} \quad (13)$$

Если расчет идет по процентному методу с использованием внутреннего стандарта, то для расчета относительного количества  $x$  используется:

$$[\text{относ.(\%) кол. – во } x] = \frac{[\text{факт. кол. } x] \cdot 100}{[\text{кол. – во пробы}]} \quad (14)$$

### Shimadzu LabSolution

Поддерживаются все настройки и операции от пробоподготовки до обработки результатов измерений, и гарантируется высокая надежность полученных данных с помощью использования простых операций.

Браузер количественного определения позволяет быстро определять времена удерживания и величины площадей пиков стандартных образцов и текущих образцов в одно и то же время. Отображаются результаты статистического анализа, такие как среднее значение и относительное среднеквадратическое отклонение (%RSD). Эти функции делают верификацию результатов более простой и удобной, например, большие количества измеренных данных в течение ночного непрерывного анализа могут быть проверены сразу же на следующее утро.

Параметры обработки пика могут быть оценены и модифицированы во время просмотра хроматограммы и калибровочной кривой на одном экране. И, поскольку обработку пиков для всех файлов можно легко переделать в любое время, удобство это браузера является особенно очевидным, когда есть много анализируемых веществ. Поддерживаются дополнительные мощные функции обработки данных,

такие как мониторинг соотношений ионов для подтверждения идентификации пиков.

Помимо самых распространенных Agilent ChemStation и Shimadzu LabSolutions, существует и другое ПО, например, SCIEX Analyst Software и др.

### **Анализ существующих методик определения эндогенных веществ хроматографическими методами**

Ранее, мы в своей работе по определению активности изофермента СУР 3А4 [130] использовали в качестве метода количественного определения кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче метод абсолютной калибровки. В качестве калибровочных готовились 9 стандартных растворов (в том числе 1 с нулевой концентрацией) кортизола и 6-β-гидрокортизола (концентрация кортизола в растворе 10 мкг/мл, концентрация 6-β-гидрокортизола - 1 мкг/мл). Так как моча обычно содержит какое-либо количество эндогенных кортизола и 6-β-гидрокортизола, то использовали образцы мочи, очищенные от кортизола и 6-β-гидрокортизола методом жидко-жидкостной экстракции [131]. После проведения экстракции и хроматографирования строили две калибровочные кривые в системе координат зависимости концентрации от площади пика кортизола или 6-β-гидрокортизола.

Стоит отметить, что очистка биообразцов для построения калибровочной зависимости приводит к устранению в разной степени матричного эффекта биообъекта. Таким образом, пробоподготовка у объекта отличается от пробоподготовки у калибровочных стандартов, а отклик у очищенных образцов может быть существенно лучше, что приводит к неизбежной систематической погрешности измерений.

Кочнова Е.А. в своей работе по определению профиля эндогенных стероидов (андрогенов, эстрогенов и прогестинов) [132] применительно к антидопинговому контролю использовала метод ГХ-МС и методику количественного определения по градуировочному графику. Для построения градуировочной кривой ею проведено сравнение градуировочных коэффициентов для 6-ти матриц: (1)

контрольная моча (метод добавок), (2) «свободная моча» - моча из которой предварительно удалены неконъюгированные стероиды, (3) моча после твердофазной экстракции (ТФЭ), (4) детская моча, (5) вода и (6) метанольные растворы стандартов. Из них выбрана моча с предварительно удаленными неконъюгированными стероидами как наиболее пригодная матрица для построения градуировочных зависимостей. Строили градуировочный график, по оси у откладывая отношения площади пика исследуемого соединения к площади пика внутреннего стандарта, а по оси x отношения концентраций исследуемого соединения к внутреннему стандарту.

Согласно патенту ФГУП «Антидопинговый центр» Апполонова и др. [133] предлагают использовать ВЭЖХ-МС и метод внутреннего стандарта для количественного определения стероидов в плазме крови человека. Упор в данной методике сделан на специфической пробоподготовке исходной плазмы. В процессе пробоподготовки в образец исследуемой плазмы крови после экстрагирования добавляют внутренний стандарт, делят на две аликвоты, одну из которых химически модифицируют гидроксиламином в кислой среде и вторую ангидридным реагентом в виде раствора 4-диметиламинопиридина, триэтиламина и 2-метил-6-нитробензойного ангидрида в тетрагидрофуране, органические слои обоих модифицированных аликвот количественно отделяют, упаривают в токе азота, перерастворяют сухие остатки в мобильной фазе и далее вводят в систему ВЭЖХ-МС с электрораспылительной ионизацией в режиме регистрации положительных ионов.

Rauh и соавт. [134] для определения прогестерона, андростендиона и тестостерона в плазме используют ВЭЖХ-МС и метод абсолютной градуировки с добавлением внутреннего стандарта. Калибровочная кривая состоит из 7 точек калибровочного набора (определяемого стероида): 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56 и 0.156 мкг/л, а также нулевого калибровочного стандарта. Калибровочные растворы строятся на изотоническом солевом растворе. В растворы добавляется один из внутренних стандартов и после хроматографирования строится калибровочная кривая по методу наименьших квадратов в соответствии с уравнением прямой  $y =$

$a + bx$ , где  $y$  – отношение высоты пика вещества к высоте пика внутреннего стандарта,  $x$  – концентрация стандарта. Для максимальной точности при низких концентрациях используется весовой множитель  $1/x$ .

Reitzsch и соавт. [135] в своей работе по профилированию стероидов в плазме крови из вен надпочечников для исследования первичного гиперальдостеронизма используют калибровочную кривую на 10 уровнях концентраций (водно-метанольные растворы) с добавлением внутреннего стандарта. Неточность методики представляли коэффициентом вариации, который оценивался на 3-х контрольных образцах (образцы для контроля качества) с различными концентрациями стероида. Производилось 8-кратное хроматографирование внутри 1-го запуска (внутрианалитическая неточность – неточность последовательных определений) и 1-кратное хроматографирование внутри 8-ми запусков в 8 различных дней (межаналитическая неточность – неточность параллельных определений). Контрольные образцы готовились с добавлением водного раствора стероида в очищенную от эндогенных стероидов на активированном угле плазму.

Gao и соавт. [136] для определения стероидных гормонов в человеческих волосах используют калибровочную кривую с добавлением внутреннего стандарта. Калибровочные стандарты готовятся добавлением «чистых» волос и стандартных растворов исследуемого гормона. Калибровочная кривая состоит из 7 точек (включая нулевую концентрацию). Калибровочная кривая строится согласно уравнению  $y = Ax + B$ , где  $x$  – концентрация гормона,  $y$  – отношение площади пика гормона к площади пика внутреннего стандарта.

Magnisali и соавт. [137] в своей работе по определению 6 стероидных соединений (включая кортизол) в сыворотке новорожденных предлагают использовать ГХ-МС и метод калибровочной кривой с использованием внутреннего стандарта. Строились 2 калибровочные кривые – для высоких и низких концентраций. Для диапазона высоких концентраций (а именно, кортизола) готовились 7 уровней: 200, 100, 31.25, 20, 10, 5, 2.5 нг/мл. Для диапазона низких концентраций – 6 уровней: 3.125, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125. Калибровочные стандарты

готовились с использованием свободной от стероидов сыворотки, очищенной активированным углем по методике [138]. Относительный коэффициент извлечения определялся по формуле:

$$[\text{относ.коэф.извлечения}] = \frac{\left[ \begin{array}{l} \text{отношение площади пиков} \\ \text{экстрагированного} \\ \text{компонента (процедура 1)} \end{array} \right]}{\left[ \begin{array}{l} \text{отношение площади пиков} \\ \text{неэкстрагированного} \\ \text{компонента (процедура 2)} \end{array} \right]} \cdot 100 \quad (15)$$

где процедура 1 заключается в следующем: образцы свободной от стероидов сыворотки с добавленным стандартным количеством компонента до уровня 1.0 и 12.5 нг/мл, проходили процедуру экстракции, затем в сухой элюат добавляли 5 нг/мл внутренние стандарты. Процедура 2 заключается в следующем: образцы свободной от стероидов сыворотки проходили процедуру экстракции, затем в сухой элюат вносили стандартное количество компонента до уровня 1.0 и 12.5 нг/мл и внутренние стандарты до 5 нг/мл. Абсолютный коэффициент извлечения вычисляли как отношение площади пика с добавленным стандартом чистой сыворотки к площади пика, полученной из неэкстрагированных стандартных метанольных растворов. Прецизионность измерений оценивалась с помощью коэффициента вариации, а точность – с помощью средней относительной ошибки.

Konieczna и др. [139] в работе по изучению стероидных профилей в моче как возможных биомаркеров использовали калибровочную кривую с добавлением внутреннего стандарта. Калибровочная кривая строилась для 8 точек в диапазоне от 1.0 до 500 нг/мл с весовым коэффициентом 1/x. Использовалась очищенная активированным углем моча. Точность измерений оценивалась по контрольным образцам путем сравнения средних значений по измеренным концентрациям с теоретическими концентрациями контрольных образцов. Внутрианалитическая прецизионность выражалась как процент относительного стандартного отклонения и получалась вычислением процентного отношения между относительным

стандартным отклонением 5 повторений и их средним на каждой валидируемой концентрации. Межаналитическая прецизионность оценивалась как процент относительного стандартного отклонения 3 различных (в разные дни) анализов.

Проведенный анализ общей и специализированной литературы по вопросу количественного определения эндогенных соединений хроматографическим методом показал, что наиболее распространенным является использование ВЭЖХ-МС методом внутреннего стандарта.

Сводная информация по рассмотренным частным методикам представлена в таблица 61.

**Таблица 61.** Частные методики количественного определения эндогенных веществ

<b>Исследователь и (год, страна)</b>	<b>Биообъект</b>	<b>Эндогенные вещества</b>	<b>Построение калибровочной кривой</b>	<b>Методика определения</b>
Смирнов В.В. (2011, Россия)	моча	Кортизол 6-β-ОН-кортизол	Кривая S(C) по 9 стандартным растворам на моче, очищенной жидкостно-жидкостной экстракцией	ВЭЖХ-МС Метод абсолютной калибровки
Кочнова Е.А. (2012, Россия)	моча	Стероиды (андрогены, эстрогены, прогестины)	Кривая S/Sст(C/Cст) по растворам на моче с предварительно удаленными неконъюгированными стероидами	ГХ-МС Метод внутреннего стандарта
Rauh и др. (2006, Германия)	плазма крови	Прогестерон Андростендион Тестостерон	Кривая S/Sст(C/Cст) по 8 растворам на изотоническом солевом растворе	ВЭЖХ-МС Метод внутреннего стандарта
Peitzsch и др. (2014, Германия, Нидерланды)	плазма крови	Стероиды	Кривая S/Sст(C/Cст) по 10 водно-	ВЭЖХ-МС Метод внутреннего стандарта

			метанольным растворам	
Гао и др. (2013, Китай, Германия)	волосы	Стероиды	Кривая S/Sct(C) по 7 точкам с добавлением «чистых» волос	ВЭЖХ-МС Метод внутреннего стандарта
Magnisali и др. (2008, Греция)	сыворотка крови новорожде нных	Стероиды	2 калибровочные кривые S/Sct(C/Cст) по растворам на сыворотке, очищенной активированным углем: для высоких концентраций – по 7 точкам, для низких концентраций – по 6 точкам	ГХ-МС Метод внутреннего стандарта
Konieczna и др. (2013, Польша)	моча	Стероиды	Кривая S/Sct(C/Cст) по 8 растворам на очищенной активированным углем моче	ВЭЖХ-МС Метод внутреннего стандарта

### *Средства ПО*

Для реализации вычислительной части предложенного алгоритма используется программа инженерных расчетов Mathcad версии 15.0 от корпорации PTC (Parametric Technology Corporation), которая функционирует под управлением семейства операционных систем Windows (XP, 7, Vista, 8). Главными достоинствами Mathcad и его колоссальным преимуществом перед другими расчетными средствами являются легкость и наглядность программирования задачи, отображение сложных математических выражений в том виде, в каком они обычно записываются на листе бумаги, то есть отсутствие специального языка программирования, простота использования, возможность создания средствами Mathcad высококачественных технических отчетов с таблицами, графиками и текстом. [140], [141].

В нашей данной работе разработана математическая методика количественного определения эндогенных веществ хроматографическим методом, представленная на рисунке 27.



**Рисунок 27.** Алгоритм количественного определения эндогенных веществ в биообъектах хроматографическим методом

Рассмотрим различные блоки предлагаемого алгоритма более подробно.

*Пробоподготовка и хроматографирование*

Методика пробоподготовки и хроматографирования соответствует методике количественного определения кортизола и его метаболита при анализе активности СУР3А4 и описана ранее.

*Генерация выборочной совокупности концентраций*

Обозначим

$A$  – исследуемое эндогенное вещество;

$x$  – неизвестная концентрация исследуемого вещества  $A$  в нативной плазме;

$C$  – известная концентрация вещества  $A$ , добавляемая в ходе исследования;

$S$  – площадь пика на хроматограмме;

$z$  - % экстракции вещества  $A$  в органический растворитель.

После хроматографирования двух совокупностей проб – серии стандартных разведений в органическом растворителе и серии стандартных концентраций в нативной плазме, экстрагируемых впоследствии в органический растворитель – имеем данные, представленные в Таблицах 62 и 63.

**Таблица 62.** Измерения серии стандартных разведений

Известные концентрации из серии стандартных разведений в органическом растворителе $C$	Площадь пиков на хроматограмме $S'$
$C'_1$	$S'_1$
$C'_2$	$S'_2$
...	...
$C'_i$	$S'_i$
...	...
$C'_m$	$S'_m$

**Таблица 63.** Измерения серии стандартных концентраций в нативной плазме

Неизвестные концентрации в нативной плазме вещества А, извлеченного в органический растворитель С	Площадь пиков на хроматограмме S
$(x+C_0)z_0$	$S_0$
$(x+C_1)z_1$	$S_1$
$(x+C_2)z_2$	$S_2$
...	...
$(x+C_i)z_i$	$S_i$
...	...
$(x+C_n)z_n$	$S_n$

В Таблицах 62, 63 концентрации  $C'_i$  и  $C_i$  (при  $m=n$ ) могут быть одинаковыми, а концентрация  $C_0$ , как правило, равна нулю.

Найдем среднее значение неизвестной концентрации  $\bar{x}$  вещества А в нативной плазме и среднее значение % экстракции  $\bar{z}$ .

Предположим,  $z_0 = z_1 = \dots = z_i = \dots = z_n = z$ , тогда для 0-го и 1-го измерения

$$\frac{(x+C_0)z_0}{(x+C_1)z_1} = \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow \frac{(x+C_0)z}{(x+C_1)z} = \frac{S_0}{S_1} \Rightarrow (x+C_0)S_1 = (x+C_1)S_0 \Rightarrow$$

$$x(S_1 - S_0) = C_1S_0 - C_0S_1 \Rightarrow x = \frac{C_1S_0 - C_0S_1}{S_1 - S_0}$$

Обозначим  $x = x_{01}$ .

Для  $i$ -го и  $(i+1)$ -го измерения

$$\frac{(x+C_i)z_i}{(x+C_{i+1})z_{i+1}} = \frac{S_i}{S_{i+1}} \Rightarrow x = x_{i,i+1} = \frac{C_{i+1}S_i - C_iS_{i+1}}{S_{i+1} - S_i}$$

Вообще, для  $\forall i, j : i \in \{0, \dots, n-1\}, j \in \{1, \dots, n\}, i < j \Rightarrow$

$$\Rightarrow \frac{(x+C_i)z_i}{(x+C_j)z_j} = \frac{S_i}{S_j} \Rightarrow x_{ij} = \frac{C_jS_i - C_iS_j}{S_j - S_i}$$

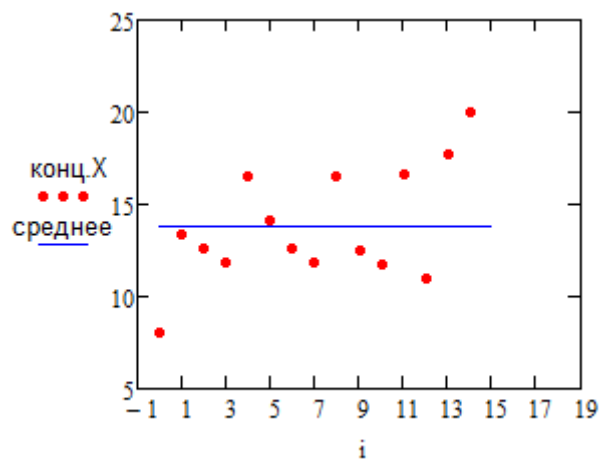
Условие  $i < j$  ограничивает дублирование данных, поскольку  $x_{ij} = x_{ji}$ .

Вычисленные значения неизвестных концентраций можно представить в виде матрицы  $(n+1) \times (n+1)$ :

$$\|x_{ij}\|_{(n+1) \times (n+1)} = \begin{pmatrix} 0 & x_{01} & x_{02} & \cdots & x_{0n} \\ 0 & 0 & x_{12} & \cdots & x_{1n} \\ & & \ddots & \ddots & \vdots \\ & & & \ddots & x_{n-1n} \\ & 0 & & & 0 \end{pmatrix}$$

Всего количество значащих  $x_{ij}$  равно  $N = \sum_{k=1}^n k = \frac{n(n+1)}{2}$ , то есть имеется

выборка случайной величины  $\xi_x$  объемом  $N = \frac{n(n+1)}{2}$ .



**Рисунок 28.** Пример генеральной совокупности неизвестных концентраций

На основе этой матрицы неизвестных концентраций получаем выборочное среднее значение по выборке:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} x_{ij} = \frac{2}{n(n+1)} \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} x_{ij}$$

Также получаем выборочное среднее квадратичное отклонение (СКО) по выборке:

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} (x_{ij} - \bar{x})^2} = \sqrt{\frac{2}{n(n+1)-2} \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Теперь, зная значение  $\bar{x}$ , можно найти среднее значение % экстракции  $\bar{z}$ .

Для этого используем соотношения с известными концентрациями из серии стандартных разведений.

Для 0-го и 1-го отсчетов

$$\frac{(\bar{x} + C_0)z_0}{C'_1} = \frac{S_0}{S'_1} \Rightarrow z_0 = z_{01} = \frac{S_0 C'_1}{(\bar{x} + C_0) S'_1}$$

...

Для 0-го и j-го отсчетов

$$\forall j \in \{1, \dots, m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x} + C_0)z_0}{C'_j} = \frac{S_0}{S'_j} \Rightarrow z_{0j} = \frac{S_0 C'_j}{(\bar{x} + C_0) S'_j}$$

Получаем выборку случайной величины  $\xi_z$  объемом  $m$ , для которой можно посчитать среднее значение.

$$z_{01}, z_{02}, \dots, z_{0j}, \dots, z_{0m} \Rightarrow \bar{z}_0 = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{0j}$$

$$\forall i, j : i \in \{0, \dots, n\}, j \in \{1, \dots, m\} \Rightarrow \frac{(\bar{x} + C_i)z_i}{C'_j} = \frac{S_i}{S'_j} \Rightarrow z_{ij} = \frac{S_i C'_j}{(\bar{x} + C_i) S'_j}$$

$$z_{i1}, z_{i2}, \dots, z_{ij}, \dots, z_{im} \Rightarrow \bar{z}_i = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{ij}$$

Выборку  $z_{ij}$  можно представить в виде матрицы  $(n+1) \times m$

$$\|z_{ij}\|_{(n+1) \times m} = \begin{vmatrix} z_{01} & z_{02} & \cdots & z_{0m} \\ z_{11} & z_{12} & \cdots & z_{1m} \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ z_{n1} & z_{n2} & \cdots & z_{nm} \end{vmatrix}$$

Таким образом, имеется выборка случайной величины  $\xi_z$  объемом  $m(n+1)$

Пусть также вектор средних по строчкам значений

$$\|\bar{z}_i\| = \begin{pmatrix} \bar{z}_0 \\ \bar{z}_1 \\ \vdots \\ \bar{z}_n \end{pmatrix}$$

Откуда выборочное среднее значение % экстракции определяется по формуле:

$$\bar{z} = \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n \bar{z}_i = \frac{1}{n+1} \sum_{i=0}^n \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m z_{ij} = \frac{1}{m(n+1)} \sum_{i=0}^n \sum_{j=1}^m z_{ij} \quad (16)$$

Также получаем выборочное СКО % экстракции:

$$s_z = \sqrt{\frac{1}{m(n+1)-1} \sum_i \sum_j (z_{ij} - \bar{z})^2} \quad (17)$$

#### *Проверка нормальности распределения*

Далее распределение полученных выборок необходимо проверить на нормальность. Для этого выдвигаются и проверяются основная ( $H_0$ ) и альтернативная ( $H_1$ ) гипотезы.

$H_0$ : Значения измерений концентрации эндогенного вещества подчиняются нормальному закону распределения;

$H_1$ : Значения измерений концентрации эндогенного вещества не подчиняются нормальному закону распределения.

Для выбора критерия проверки предлагается руководствоваться таким параметром, как объем выборки. Если объем выборки менее 40, то можно использовать непараметрический критерий Колмогорова, в противном случае (объем выборки от 40 и более) согласно рекомендации [142] используется параметрический критерий Пирсона.

### ***Критерий Колмогорова***

Непараметрический критерий Колмогорова строится на основании выборочной функции распределения  $F(x)$ , которая для вариационного ряда выборки  $x_1 \leq x_2 \leq \dots \leq x_i \leq \dots \leq x_N$  равна

$$F(x) = \begin{cases} 0, & x < x_1 \\ \frac{i}{N}, & x_i \leq x \leq x_{i+1}, i \in \overline{1, N-1} \\ 1, & x < x_N \end{cases} \quad (18)$$

Проверяется степень различия выборочной  $F(x)$  и гипотетической  $F_0(x)$  функций распределения. В качестве меры отклонения считается максимальная по модулю разница между этими функциями:

$$D = \max |F(x) - F_0(x)| \quad (19)$$

По теореме Колмогорова оценивается вероятность того, что расхождение между гипотетической и выборочной функцией распределения будет иметь полученное значение  $D$ . Теорема Колмогорова выглядит следующим образом:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\sqrt{N}D < \lambda) = k(\lambda) \quad (20)$$

где  $k(\lambda)$  – функция Колмогорова.

Таким образом, для проверки по критерию Колмогорова заданной выборки на нормальность, необходимо:

1. выбрать число интервалов для  $x$  и их границы;
2. определить для этих интервалов значения выборочной  $F(x)$  и гипотетической  $F_0(x)$  функций распределения;
3. определить максимальный модуль отклонения  $D$  этих функций по всем интервалам;
4. посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки

$$\lambda = D\sqrt{N} \quad (21)$$

5. задаться уровнем значимости  $\alpha$  для проверки гипотезы

6. посчитать критическое значение  $\lambda_\alpha$  из формулы:

$$\lim_{N \rightarrow \infty} P(\lambda < \lambda_\alpha) = k(\lambda_\alpha) = 1 - \alpha \quad (22)$$

7. сравнить значение критерия и критического значения.

Если  $\lambda < \lambda_\alpha$ , то гипотеза  $H_0$  принимается с уровнем значимости  $\alpha$ , то есть делается вывод о нормальности закона распределения. Если  $\lambda \geq \lambda_\alpha$ , то гипотеза  $H_0$  отвергается с уровнем значимости  $\alpha$ .

### ***Критерий Пирсона***

Параметрический критерий Пирсона строится на основании выборочной функции плотности вероятности.

Проверяется степень различия выборочной и гипотетической вероятностных функций. В качестве меры отклонения считается взвешенная сумма квадратов отклонений между выборочной и гипотетической вероятностными функциями:

$$Z = N \sum_{i=1}^r \frac{1}{p_i} \left( \frac{v_i}{N} - p_i \right)^2 \quad (23)$$

Распределение данной величины в случае нормального распределения выборки подчиняется закону хи-квадрат  $\chi^2$ . На этом и основан критерий Пирсона.

Таким образом, для проверки по критерию Пирсона заданной выборки на нормальность, необходимо:

1. выбрать число интервалов для  $x$  и их границы;
2. определить для этих интервалов значения выборочной  $\frac{v_i}{N}$  и гипотетической  $p_i$  вероятностных функций;
3. посчитать значение критерия для нашей конкретной выборки по формуле (32);
4. задаться уровнем значимости  $\alpha$  для проверки гипотезы;
5. определить критическое значение  $\chi^2_{\alpha, r-1}$  с  $r-1$  степенями свободы, где  $r$  – количество интервалов,  $1$  – количество параметров, которые оцениваются из выборки (для нормального распределения их  $2$  – среднее и СКО);
6. сравнить значение критерия и критического значения.

Если  $Z < \chi_{\alpha, r-l-1}^2$ , то гипотеза  $H_0$  принимается с уровнем значимости  $\alpha$ , то есть делается вывод о нормальности закона распределения. Если  $Z \geq \chi_{\alpha, r-l-1}^2$ , то гипотеза  $H_0$  отвергается с уровнем значимости  $\alpha$ .

#### *Проверка на промахи*

Для обнаружения грубых ошибок (выбросов) можно воспользоваться **критерием Граббса** в котором проверяются максимальные и минимальные значения выборки, для которых вычисляются следующие значения критерия:

$$G_1 = \frac{|\max_{i,j,i < j} (x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}} \quad (24)$$

$$G_2 = \frac{|\min_{i,j,i < j} (x_{ij}) - \bar{x}|}{S_{\bar{x}}} \quad (25)$$

Критическое значение критерия Граббса  $G_T$  является табулированным и его можно найти, например, в [30, 31].

Если  $G_1 > G_T$ , то значение  $\max(x_{ij})$  считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений. Если  $G_2 > G_T$ , то значение  $\min(x_{ij})$  считают промахом и исключают из выборки и дальнейшей обработки результатов измерений.

#### *Интервальная оценка*

Получим интервальную оценку математического ожидания (неизвестной концентрации  $x$ ) [143].

$$\mu_x = \mu_{\bar{x}} = \mu$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{N}}$$

$$\frac{\bar{x} - \mu}{s_{\bar{x}}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} \in t_{N-1}$$

где  $t_{N-1}$  – распределение Стьюдента с числом степеней свободы  $N-1$ .

Зададимся уровнем значимости  $\alpha=1-P$  или доверительной вероятностью  $P=1-\alpha$ .

Пусть необходимо найти интервал, в котором окажется значение  $\mu_x$  с вероятностью, например, 90%, т.е.  $P=0,9$  (или  $\alpha=0,1$ ).

Возьмем 2 квантиля распределения Стьюдента  $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}$  и  $t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$  ( $t_{N-1, 0.05}$  и  $t_{N-1, 0.95}$ ).

Вероятность того, что случайная величина  $\frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N}$  находится в интервале от  $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}$  до  $t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$  равна

$$T(t_{N-1, \frac{\alpha}{2}}) - T(t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}) = 1 - \frac{\alpha}{2} - \frac{\alpha}{2} = 1 - \alpha = P = 0,9$$

Так как распределение Стьюдента симметрично, то  $t_{N-1, \frac{\alpha}{2}} = -t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}$

$$P\left(t_{N-1, \frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} < t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1 - \alpha$$

$$P\left(-t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} < \frac{\bar{x} - \mu}{s_x} \sqrt{N} < t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}}\right) = 1 - \alpha$$

$$P\left(-\frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < \bar{x} - \mu < \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1 - \alpha$$

$$P\left(-\bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < -\mu < -\bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}}\right) = 1 - \alpha$$

$$P \left( \bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} < \mu < \bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} \right) = 1 - \alpha$$

Таким образом, доверительный интервал  $\left[ \bar{x} - \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} ; \bar{x} + \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} \right]$

$$\text{Абсолютная погрешность } \Delta_{\bar{x}} = \frac{t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} s_x}{\sqrt{N}} = t_{N-1, 1-\frac{\alpha}{2}} \frac{\alpha s_{\bar{x}}}{2}$$

Аналогичную обработку и оценку проводят также и для % экстракции.

Таким образом нами разработана и предложена математическая методика расчета концентрации эндогенных соединений в биообъектах, измеренных методом хроматографии, которая позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений. Особенностью данной методики является использование исключительно анализируемого биообъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых. Это позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при снятии хроматограммы. Также используется статистический аппарат для исключения возможных грубых ошибок.

Согласно описанной методике разработано программное обеспечение на базе системы инженерных расчетов Mathcad, что позволяет после ввода исходных данных практически мгновенно осуществлять обработку результатов измерений.

Для сравнения двух вариантов количественного определения в одном хроматографическом методе была проведена частичная валидация количественного определения без дейтерированного внутреннего стандарта. Для этого была оценена точность и прецизионность методики.

Точность и прецизионность метода определялась по образцам контроля качества QCA; QCB; QCC; QCD. Так же, как было указано выше.

**Таблица 64.** Результаты оценки точности и прецизионности

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD,%	E,%	RSD,%	E,%
Кортизол	QCA	6,88	9,89	6,40	11,24
	QCB	6,44	11,04	5,46	9,72
	QCC	4,90	6,92	5,50	7,07
	QCD	4,30	5,88	2,87	2,29
6-β-ОН-кортизол	QCA	5,50	8,42	6,22	9,11
	QCB	4,29	6,35	4,91	5,11
	QCC	5,49	7,90	4,81	6,85
	QCD	6,88	9,89	6,40	11,24

Как видно из представленных данных, методика удовлетворяет валидационным параметрам (точность и прецизионность). Оценка по остальным параметрам не является обязательной, так как затрагивает валидацию именно хроматографической системы.

Для оценки схожести методик были проанализированы пробы мочи от 40 добровольцев. Для этого мочу 40 добровольцев проанализировали разработанной методикой, а количественное определение проводили двумя способами. По методу внутреннего стандарта и с помощью разработанного математического аппарата. Полученные результаты представлены в Таблице 65.

**Таблица 65.** Концентрации кортизола и его метаболита в моче добровольцев, рассчитанные двумя разными методами

№	Концентрация кортизола, определенная по методу 1, нг/мл	Концентрация кортизола, определенная по методу 2, нг/мл	Концентрация 6 $\beta$ -ОН-кортизола, определенная по методу 1, нг/мл	Концентрация 6 $\beta$ -ОН-кортизола, определенная по методу 2, нг/мл
1	811	877,42	2583,76	2474,21
2	2106,38	2374,31	1302,93	1263,32
3	1574	1467,91	1362	1332,85
4	2457,89	2911,37	1012,61	933,73
5	823,39	847,68	4054,64	4824,62
6	513,35	558,32	1055,06	1256,05
7	1242,85	1288,96	2022,78	2279,67
8	457,39	450,85	3151,67	3609,61
9	1022,69	1170,78	1777,78	2061,51
10	2693,91	2591,27	2146,34	2064,78
11	1233,71	1411,61	3959,85	4596,59
12	1542,89	1678,36	1314,5	1211,97
13	1952,24	1913,20	2917,16	2794,93
14	1632,41	1466,88	1643,91	1506,81
15	665,08	782,47	956,13	1115,71
16	1935,04	2064,69	1894,12	2079,55
17	1089,15	1186,52	1557,11	1566,76
18	1526,31	1617,28	3952,61	3749,84
19	596,48	683,92	3184,44	3370,09
20	2033,58	1996,77	4187,05	4157,74
21	1604,88	1741,94	2535,06	2271,67
22	2662,96	2518,09	1639,24	1943,48
23	802,78	774,52	4101,88	4115,42
24	596,95	591,58	2531,9	2848,64
25	1286,85	1351,84	3617,69	3556,55
26	1458,67	1694,25	3698,9	3930,82
27	1471,19	1680,25	2391,67	2206,08
28	2299,02	2637,21	4180,79	4217,58
29	524,72	490,56	1080,7	1276,63
30	2311,51	2608,77	3384,32	3325,77
31	2685,07	3025,81	3517,19	3539,35
32	2050,58	1878,33	3381,8	3175,17
33	501,39	491,36	3496,08	3661,79
34	632,97	743,49	3518,84	3646,22

35	2548,23	2761,26	3954,78	3908,51
36	1833,66	1700,35	2297,45	2329,15
37	2552,96	2361,23	2039,29	1884,51
38	1012,11	1003,61	1989,51	2006,02
39	2023,08	1926,78	3691,5	3982,39
40	1504,69	1470,68	4078,02	3695,91

где, метод 1 – метод с дейтерированным внутренним стандартом, а метод 2 – метод без внутреннего стандарта.

Для статистической оценки полученных результатов определялась нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка (Таблица 66). Значимость для каждого набора данных составила  $p < 0,05$ , что говорит о ненормальном распределении значений.

**Таблица 66.** Критерии нормального распределения

Критерии нормального распределения	Шапиро-Уилка		
	Статистика	Ст.св.	Значимость
Корт 1	0,940	40	<b>0,034</b>
Корт 2	0,934	40	<b>0,018</b>
Метаб 1	0,919	40	<b>0,007</b>
Метаб 2	0,940	40	<b>0,035</b>

Оценка значимых различий между способами расчета значений кортизола определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона (Таблица 67). Асимптотическая значимость  $p = 0,029$ ,  $p < 0,05$ , что говорит о наличии статистически значимых различий между способами расчета значений кортизола.

**Таблица 67.** Статистические критерии

Статистические критерии	N	Средний ранг	Сумма рангов
Отрицательные ранги	17	14,59	248
Положительные ранги	23	24,87	572
Совпадающие наблюдения	0		

Всего	40		
<b>Z</b>	<b>-2,177</b>		
<b>Асимптотическая значимость (2-сторонняя)</b>	<b>0,029</b>		

Оценка значимых различий между способами расчета значений метаболического индекса определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона. Асимптотическая значимость  $p=0,211$ ,  $p>0,05$ , что говорит об отсутствии статистически значимых различий между способами расчета значений метаболического индекса. Статистические критерии указаны в Таблице 68.

**Таблица 68.** Статистические критерии

Статистические критерии	N	Средний ранг	Сумма рангов
Отрицательные ранги	18	17,61	317
Положительные ранги	22	22,86	503
Совпадающие наблюдения	0		
Всего	40		
<b>Z</b>	<b>-1,250</b>		
<b>Асимптотическая значимость (2-сторонняя)</b>	<b>0,211</b>		

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличиях между результатами, полученными двумя разными методами.

### **3.2.2. Сравнение методик оценки активности изофермента СУР3А4 с помощью отношения концентраций 6-β-гидрокортизол/кортизол и 4β-гидроксихолестерин/холестерин**

Как было описано в главе 1 существует несколько методик оценки активности СУР3А4. Для сравнения были выбраны методики с использованием эндогенных субстратов (кортизол и холестерин).

В исследовании принял участие 21 здоровый доброволец обоих полов. Для анализа у пациентов отбиралась моча и кровь, согласно разработанной методике. Всего было осуществлено 2 забора образцов. Первый забор производился в первый день исследования. Далее на следующий день каждый из добровольцев получали 200 мг рифампицина (по таблетке в 100 мг утром и на ночь). Прием продолжался 3 дня. Через день после последнего приема рифампицина утром у добровольцев отбирали биожидкости. В результате были получены следующие результаты, которые представлены в Таблицах 69, 70.

**Таблица 69.** Значения концентраций до приема рифампицина

№ пациента	Конц. кортизола нг/мл	Конц. 6-ОН-кортизола нг/мл	Метабол. отношение по кортизолу	Конц. холестерина мкг/мл	Конц. 4-ОН-холестерина нг/мл	Метабол. отношение по холестерину
1	2351,19	1328,78	0,56515211	1960,42	75,24	3,83795E-05
2	1887,81	1562,78	0,82782695	2076,37	108,6	5,23028E-05
3	1174,82	3627,29	3,0875283	1984,89	97,05	4,88944E-05
4	718,26	3569,81	4,97008047	2482,73	61,57	2,47993E-05
5	2769,45	2869,76	1,03622019	2053,71	101,78	4,95591E-05
6	587,32	2332,41	3,97127631	2428,93	84,34	3,47231E-05
7	598,91	2033,47	3,39528477	2453,34	90,64	3,69456E-05
8	2663,2	1381,69	0,5188082	1859,99	81,64	4,38927E-05
9	2589,55	2998,87	1,15806607	1844,26	37,02	2,00731E-05
10	1254,26	1415,73	1,12873726	2032,25	26,85	1,3212E-05
11	1633,66	2847,1	1,74277389	2433,14	70,7	2,90571E-05
12	1922,47	1779,87	0,92582459	2005,73	69,56	3,46806E-05
13	1177,29	1154,24	0,98042114	2254,93	24,13	1,0701E-05
14	740,23	3312,79	4,47535226	2058,74	23,43	1,13807E-05
15	689,42	2912,63	4,22475414	2370,32	31,47	1,32767E-05
16	573,21	3524,93	6,14945657	2060,04	99,57	4,8334E-05
17	2994,14	1349,67	0,45077051	1965,35	61,32	3,12005E-05
18	2430,3	2068,7	0,85121178	1833,34	93,32	5,09016E-05
19	2916,74	1355,37	0,4646866	1811,03	94,79	5,23404E-05
20	616,67	1772,41	2,87416284	2300,64	11,35	4,93341E-06
21	1915,22	1557,66	0,81330604	1902,71	38,53	2,02501E-05

**Таблица 70.** Значения концентраций после трехдневного приема рифампицина (200 мг/сут)

№ пациента	Конц. кортизола нг/мл	Конц. 6-ОН-кортизола нг/мл	Метабол. отношение по кортизолу	Конц. холестерина мкг/мл	Конц. 4-ОН-холестерина нг/мл	Метабол. отношение по холестерину
------------	-----------------------	----------------------------	---------------------------------	--------------------------	------------------------------	-----------------------------------

1	2013,12	3328,93	1,653617	1818,49	94,32	5,1867E-05
2	692,94	2392,59	3,45281	1357,95	108,9	8,0194E-05
3	890,4	3919,36	4,401797	1962,38	133,92	6,8244E-05
4	1273,41	3141,44	2,466951	1334,23	183,72	0,0001377
5	624,06	3060,16	4,903631	1380,65	110,16	7,9789E-05
6	2264,71	2481,67	1,0958	1918,31	201,29	0,00010493
7	2034,61	2209,45	1,085933	1303,65	178,54	0,00013695
8	1030,55	3567,12	3,461375	1307,76	105,49	8,0665E-05
9	2327,49	2382,57	1,023665	1648,98	78,98	4,7896E-05
10	1233,64	1602,84	1,299277	1796,67	62,88	3,4998E-05
11	631,32	3563,43	5,644412	1810,07	143,48	7,9268E-05
12	412,14	2718,82	6,596836	1688,66	159,93	9,4708E-05
13	1302,96	2662,51	2,043432	1873,47	61,3	3,272E-05
14	458,06	1535,62	3,352443	1745,04	176,43	0,0001011
15	1260,54	2623,35	2,081132	1351,2	196,62	0,00014552
16	2100,66	3866,64	1,840679	1418,04	151,41	0,00010677
17	476,37	2304,83	4,838319	1890,58	130,41	6,8979E-05
18	874,13	3300,04	3,775228	1986,56	136,71	6,8817E-05
19	2344,44	2779,96	1,185767	1503,44	69,05	4,5928E-05
20	2317,78	2552,62	1,101321	1668,2	191,29	0,00011467
21	1665,65	2493,78	1,497181	1868,12	133,05	7,1221E-05

Для оценки разницы между способами определения активности СУРЗА4 изучалось наличие статистически значимых различий между отношением метаболических индексов двух способов оценки до и после приёма препарата.

**Таблица 71.** Отношение метаболических индексов

№	Отношение метаболических индексов (после/до приёма препарата)	
	Метабол. отношение по кортизолу	Метабол. отношение по кортизолу
1	0,342	0,740
2	0,240	0,652
3	0,701	0,716
4	2,015	0,180
5	0,211	0,621
6	3,624	0,331
7	3,127	0,270
8	0,150	0,544
9	1,131	0,419
10	0,869	0,378
11	0,309	0,367
12	0,140	0,366
13	0,480	0,327
14	1,335	0,113
15	2,030	0,091

16	3,341	0,453
17	0,093	0,452
18	0,225	0,740
19	0,392	1,140
20	2,610	0,043
21	0,543	0,284

Определялась нормальность распределения по критерию Колмогорова (таблица 72), значимость  $p=0,010$  для кортизола и  $p=0,021$  для холестерина, что говорит о ненормальности распределения значений отношения метаболических индексов.

**Таблица 72.** Нормальность распределения

Критерии нормального распределения	Колмогорова		
	Критерий	Кр.значение	Значимость
Кортизол	0,219	0,165	<b>0,010</b>
Холестерол	0,146	0,018	<b>0,021</b>

Оценка значимых различий между методами определения активности СУРЗА4 определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона (Таблица 73). Асимптотическая значимость  $p=0,140$ ,  $p>0,05$ , что говорит об отсутствии статистически значимых различий между методами определения активности СУРЗА4 по кортизолу и холестерину.

**Таблица 73.** Статистические критерии

Статистические критерии	N	Средний ранг	Сумма рангов
Отрицательные ранги	11	14,36	158
Положительные ранги	10	7,30	73
Совпадающие наблюдения	0		
Всего	21		
<b>Z</b>		<b>-1,477</b>	
<b>Асимптотическая значимость (2-сторонняя)</b>		<b>0,140</b>	

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии статистически значимых отличиях между результатами, полученными двумя разными методами.

### 3.3. Использование разработанных методик в доклинических исследованиях лекарственных средств

Комбинированное применение лекарственных средств (ЛС) является основой современной клинической практики. В то же время одновременный прием препаратов может приводить к проявлению серьезных побочных эффектов, поэтому выявление межлекарственных взаимодействий на этапе экспериментальных и клинических исследований является важнейшим элементом обеспечения безопасной терапии. Основная задача исследований взаимодействия ЛС (на уровне изменений их биотрансформации) состоит в выявлении индуцирующего или ингибирующего эффектов изучаемого препарата на тот или иной изофермент цитохрома P450.

Различные химические соединения, в том числе лекарства, могут влиять на ферменты биотрансформации лекарственных средств (ЛС), как повышая (индукция), так и снижая (ингибирование) их активность. Индукция и ингибирование ферментов биотрансформации ЛС имеют безусловное значение для фармакотерапии, составляя основу фармакокинетического взаимодействия. По определению взаимодействие ЛС (межлекарственное взаимодействие) — это количественное или качественное изменение эффектов, вызываемых ЛС при одновременном или последовательном применении двух и более препаратов [144].

Поэтому влияние новых лекарств на изоформы цитохрома P-450 необходимо оценивать уже на доклиническом этапе в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на технологические преимущества в проведении *in vitro* исследований, интерпретация полученных параметров остается проблематичной из-за невозможности корректной экстраполяции данных на целый организм. Последнее определяет высокую вероятность ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Поэтому предпочтительным представляются опыты *in vivo* с использованием в качестве экспериментальной модели беспородных крыс. Установлено, что белки CYP1A1, 1A2, 2C8, 2C9, 2D6 и 3A4 человека и CYP 1A1, 1A2, 2C13, 2C11 2D1 и 3A1(23) крыс гомологичны на 78, 70,

68, 77, 71 и 73 %, соответственно. Имеются обоснованные данные о сходстве в субстратной специфичности этих изоформ цитохрома P-450 у человека и крыс [144].

В соответствии с рекомендациями регуляторных органов, действующими в Евросоюзе, России, США и Японии, разработчики ЛС представляют информацию о биотрансформации новых препаратов и их влиянии на участвующие в метаболизме лекарств изоформы цитохрома P-450. Для использования в качестве позитивного контроля приводятся стандартные индукторы и ингибиторы активности различных изоформ цитохрома P-450, набор которых ежегодно, с накоплением новой информации, обновляется и дополняется.

Совместно с лабораторией фармакокинетики ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В.Закусова" РАН (зав. лабораторией профессор Жердев В.П.) нами было проведено несколько экспериментов в рамках доклинических исследований препарата Афобазол. Были изучены *in vivo* оценка метаболического отношения маркёров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов и оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента цитохрома P450 CYP2C9. Для исследования фармакокинетического взаимодействия афобазола исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой (220 ± 20) г, полученных из питомника "Столбовая", Московская область. Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБНУ "НИИ фармакологии им. В. В. Закусова" РАН при 12-часовом световом режиме в индивидуальных клетках. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Работу с животными проводили в соответствии с "Правилами лабораторной практики" (приказ Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23 августа 2010 г).

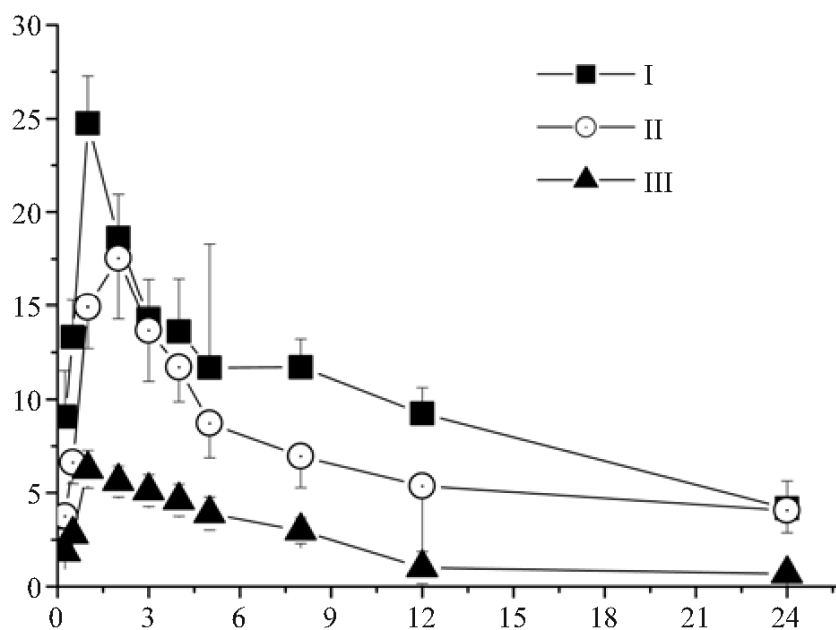
Для изучения влияния величины вводимой дозы на изучаемые процессы использовали эффективную, анксиолитическую дозу афобазола — 5 мг/кг и дозу, в 5 раз превышающую такую. Выбор доз афобазола и лозартана продиктован низкой токсичностью препаратов. Так LD50 афобазола для крыс составляет 1100 мг/кг.

Крыс разделили на 3 подгруппы. Крысам перорально вводили лозартан в дозе 30 мг/кг без афобазола (контроль; группа I) и лозартан на фоне субхронического введения афобазола в течение 4 дней, трехкратно через каждые 3 ч в дозе 5 мг/кг (группа II) и в дозе 25 мг/кг (группа III). Режим дозирования афобазола основывался на величине периода полувыведения исследуемого ЛВ.

Пробы крови отбирали в дискретные интервалы времени: 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 4; 5; 8; 12 и 24 ч после введения препарата-маркёра. Поскольку на каждую временную точку использовали по 8 животных, результирующие фармакокинетические кривые представлены в виде средней арифметической и соответствующего ей стандартного отклонения средней арифметической ( $\bar{x} \pm S_x$ ).

Методом статистических моментов рассчитывали следующие фармакокинетические параметры лозартана и его метаболита:  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ ,  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $C_{max}/AUC_{0-t}$ ,  $CL/F$ ,  $kel$ ,  $t_{1/2el}$ ,  $Vd/F$ .

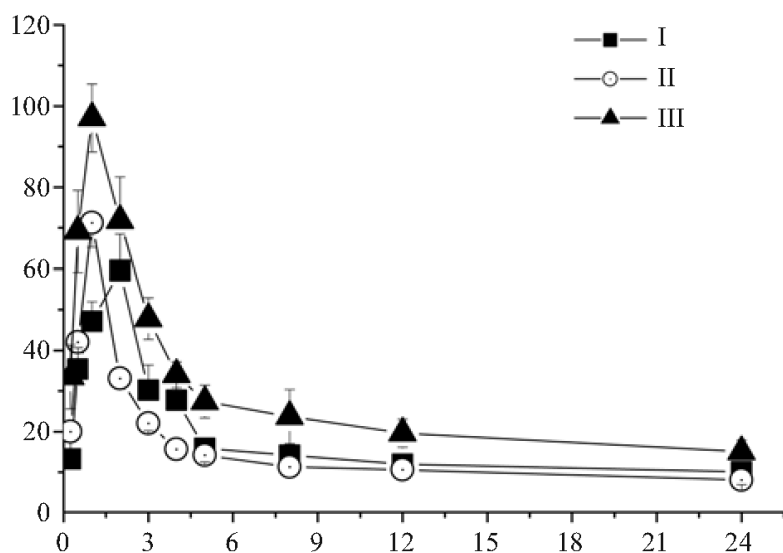
Учитывая значительный вклад экстраполированной части фармакокинетической кривой от момента последнего отбора проб до бесконечности для лозартана и его метаболита (в некоторых случаях более 20 %), сравнительная оценка изменений данного параметра проводилась от нуля до момента последнего отбора пробы, то есть  $AUC_{0-t}$ . Достоверность различий между величинами  $AUC_{0-t}$  лозартана и его метаболита в группах I, II и III оценивали по концентрациям соответствующих веществ в дискретные временные точки фармакокинетической кривой. Для этого использовали парный t-критерий Стьюдента. На рисунке 28 представлены фармакокинетические кривые лозартана, а на рисунке 29 — его метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.



**Рисунок 28.** Усредненные фармакокинетические кривые лозартана в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах

По оси абсцисс — время (ч), по оси ординат — концентрация лозартана (нг/мл).

I — контроль (лозартан без афобазола), II — 4-дневное введение афобазола в дозе 5 мг/кг, III — 4-дневное введение афобазола в дозе 25 мг/кг.



**Рисунок 29.** Усредненные фармакокинетические кривые метаболита лозартана E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах

По оси абсцисс — время (ч), по оси ординат — концентрация E3174 (нг/мл).

I — контроль (лозартан без афобазола), II — 4-дневное введение афобазола в дозе 5 мг/кг, III — 4-дневное введение афобазола в дозе 25 мг/кг.

После перорального введения крысам лозартан подвергается интенсивной биотрансформации и уже в первые минуты в плазме крови крыс регистрируется его метаболит E-3174. Исходное соединение и его метаболит определяются в плазме крови животных в течение 24 ч. Снижение концентраций лозартана носит однофазный характер.

В таблице 74 представлены фармакокинетические параметры лозартана, а в таблице 75 — его метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах.

Сравнительный анализ основных фармакокинетических параметров лозартана в плазме крови крыс после введения маркера животным контрольной группы (I) и на фоне субхронического введения афобазола в различных дозах (группы II и III) (Таблица 74) показал, что изучаемое соединение всасывается из желудочно-кишечного тракта примерно с одинаковой скоростью (величины  $St_{max}/AUC_{0.1}$ , составили 0,105 - 0,121 ч<sup>-1</sup>). Причем этот параметр в группах I и II был одинаковым и равнялся 0,105 ч<sup>-1</sup>, то есть скорость всасывания лозартана на фоне субхронического введения афобазола в дозе 5 мг/кг не отличалась от аналогичного параметра в контрольной группе.

Как видно из таблицы 74, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) лозартана в плазме крови крыс групп I и III составило 1 ч, в группе II — 2 ч. Максимальная концентрации ( $St_{max}$ ) лозартана в плазме крови в контрольной группе составила 24,74 нг/мл, во II группе — 17,53, а в группе III — была значительно ниже и составила 6,26 нг/мл.

Анализ фармакокинетических параметров позволяет заключить, что лозартан медленно выводится из организма, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови ( $K_{el}$ ), которые составили (0,061 - 0,105ч<sup>-1</sup>). Однако следует отметить, что маркер быстрее выводится из организма крыс группы III в сравнении с контролем (в 1,7 раз). В то же время значение данного параметра в группе II было близко к аналогичному параметру контрольной группы. Медленное исчезновение лозартана из организма животных также характеризуется следующими фармакокинетическими параметрами: среднее время удерживания

препарата в организме (MRT) для крыс групп II — 16,86 ч и III — 9,38 ч, соответственно. Величина MRT в контрольной группе составила 14,98 ч. Период полувыведения препарата из организма для крыс II группы составил 11,39 ч и 6,6 ч для животных группы III (Таблица 74). Последние результаты говорят о более быстром выведении лозартана из организма крыс группы III вследствие индукции активности изоформы CYP2C9, обусловленной субхроническим введением афобазола в дозе 25 мг/кг. Учитывая большие абсолютные величины периодов полуэлиминации лозартана, препарат можно отнести к группе “долгоживущих” ЛВ. В то же время быстрое снижение концентраций неизмененного лозартана в плазме крови крыс II и особенно III групп обуславливает небольшие величины площадей под фармакокинетическими кривыми ( $AUC_{0-t} = 166,64$  и  $51,85$  нг/мл • ч (соответственно), по сравнению с контролем ( $AUC_{0-t} = 235,58$  нг/мл • ч).

Значение общего клиренса (CL/F) лозартана в группе крыс III было значительно выше аналогичного параметра контрольной группы (в 5,2 раза). В то же время данный параметр для животных групп I и II составил 0,101 и 0,135 л/ч/кг, соответственно (Таблица 74).

Параметром, характеризующим степень проникновения ЛВ в ткани, является кажущийся объем распределения (Vd/F). Его величина для лозартана в контрольной группе составила 1,522 л/кг, в группах II и III — 2,226 и 5,026 л/кг, соответственно. Данный фармакокинетический параметр обычно неэквивалентен анатомическому объему, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови, Vd/F будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения Vd/F над реальным. В нашем случае величина Vd/F указывает, что лозартан распределяется во всех жидких средах организма животных и накапливается в тканях.

Необходимо отметить, что величины кажущихся объемов распределения у животных групп II и III выше аналогичного параметра контрольной группы (в 1,5 и 3,3 раза соответственно, Таблица 74).

Уменьшение величин AUC<sub>0-t</sub> лозартана и увеличение значений его CL/F и Vd/F на фоне 4-дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг (III группа) в сравнении с контрольной и II группами объясняется возрастанием интенсивности биотрансформации исходного соединения.

Таким образом, введение афобазола в дозе 25 мг/кг в течение 4 дней вызывает умеренный индуцирующий эффект на активность изоформы CYP2C9.

Фармакокинетика основного метаболита лозартана E-3174 существенно отличается от кинетики исходного соединения (форма фармакокинетической кривой носит двухфазный характер), прежде всего, более высокими концентрациями (рисунок 29) и, как следствие, значениями AUC<sub>0-t</sub>. Как видно из Таблицы 74, время достижения C<sub>max</sub> E-3174 в плазме крови крыс группы I составило 2 ч, во II и III группах — 1ч. Сокращение значения T<sub>max</sub> в плазме крови животных групп II и III, по сравнению с контрольной, можно объяснить возрастанием скорости образования метаболита E-3174, вызванное субхроническим введением афобазола (Таблица 75).

**Таблица 74.** Фармакокинетические параметры лозартана в плазме крови крыс после введения афобазола в разных дозах

Группа	AUC <sub>0-t</sub> нг/мл • ч	AUC <sub>0-∞</sub> нг/мл	Вклад AUC <sub>0-∞</sub> • ∞ %	T ч	C макс, макс нг/млч	C <sub>max</sub> / AUC <sub>0-t</sub>	CL/F, Kel, ч л/ч/кг <sup>1</sup>	T1/2 el, ч	MRT, ч	Vd/F, л/кг
I контроль	235,5 8	295,63	20,31	1,0	24,74	0,105	0,101 0,067	10,39	14,98	1,522
II	166,6 4	221,47	24,75	2,0	17,53	0,105	0,135 0,061	11,39	16,86	2,226
III	51,85	56,82	8,76	1,0	6,26	0,121	0,528 0,105	6,60	9,38	5,026

**Таблица 75.** Фармакокинетические параметры метаболита E-3174 в плазме крови крыс после введения афобазола в различных дозах

Группа	AUC <sub>0-t</sub> нг/мл • ч	AUC <sub>0-∞</sub> нг/мл • ч	Вклад AUC <sub>0-∞</sub> • %	T ч	C макс нг/мл	C <sub>max</sub> / AUC <sub>0-t</sub> ч	CL/F, л/ч/кг	Kel, ч <sup>1</sup>
--------	------------------------------------	------------------------------------	------------------------------------	--------	--------------------	---	-----------------	---------------------

I								
контроль								
ь	406,75	528,59	23,05	2,0	59,55	0,062	11,14	15,89
II	345,69	427,17	19,08	1,0	71,21	0,070	9,97	14,08
III	645,11	803,28	19,69	1,0	97,06	0,069	9,99	14,40

Из данных Таблицы 75 видно, что метаболит выводится из организма крыс всех 3 групп примерно с одинаковой скоростью, на что указывают значения констант скорости элиминации из плазмы крови, которые составили для животных группы I — 0,062, группы II — 0,070 и группы III — 0,069 ч<sup>-1</sup>, соответственно. Оценка параметров, характеризующих продолжительность выведения метаболита лозартана из организма животных, показала, что величины периодов полуэлиминации у крыс всех 3 групп примерно равны между собой (11,14, 9,97 и 9,99 ч, соответственно).

Медленное выведение E-3174 характеризуется также величиной MRT, которая составила для крыс III группы 14,4 ч. В контрольной группе этот параметр равнялся 15,89 ч (Таблица 75).

Более медленное снижение концентраций E-3174 в плазме крови крыс группы III обуславливает увеличение величины площади под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-t} = 645,11$  нг/мл • ч), по сравнению с контролем ( $AUC_{0-t} = 406,75$  нг/мл • ч). Таким образом, с увеличением дозы афобазола с 5 до 25 мг/кг, вводимого в течение 4 дней, интенсивность образования метаболита E-3174 возросла в 1,6 раза, по сравнению с группой животных, которым вводили лозартан без афобазола. Полученные данные можно объяснить индукцией афобазолом изоформы CYP2C9.

Следует подчеркнуть, что все фармакокинетические параметры субстратного препарата и его основного метаболита на фоне субхронического введения афобазола крысам в эффективной, анксиолитической дозе 5 мг/кг достоверно не отличались от аналогичных параметров, рассчитанных для контрольной группы животных. Таким образом, афобазол в эффективной дозе не вызывает индукцию изофермента CYP2C9.

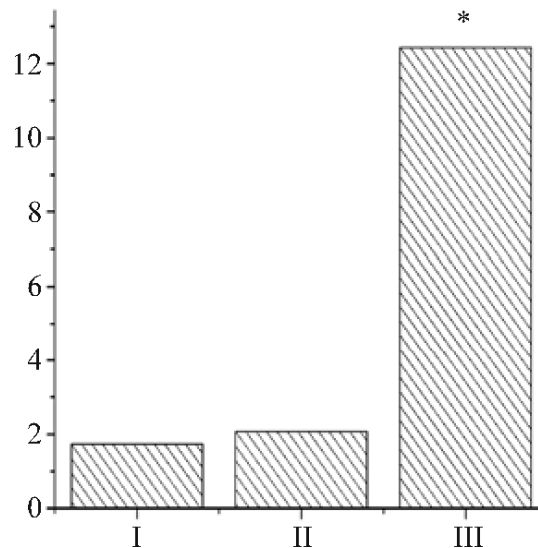
Индущирующий эффект афобазола оценивали по абсолютным значениям метаболических отношений (МО). В настоящей работе под “МО” принимали отношение площади под фармакокинетической кривой метаболита лозартана E-3174 в плазме крови к аналогичному параметру неизмененного вещества.

Оценивали МО после введения лозартана без афобазола (контроль) в сравнении с введением лозартана на фоне 4-дневного введения афобазола, трехкратно через каждые 3 ч в дозах 5 и 25 мг/кг.

Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий как между величинами AUC<sub>0-t</sub> лозартана, так и метаболита E-3174 в плазме крови крыс групп I и II. Статистическую обработку проводили по величинам концентраций лозартана и его метаболита в плазме крови в различные дискретные интервалы времени. В то же время выявлены достоверно значимые различия как между величинами AUC<sub>0-t</sub> лозартана, так и метаболита E-3174 в плазме крови крыс контрольной группы и группы III.

Результаты исследования по изучению влияния эффективной, анксиолитической дозы афобазола на активность изоформы CYP2C9 представлены на рисунке 30. Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами МО метаболита E-3174 к лозартану в плазме крови животных групп I и II.

В то же время наибольшая величина МО метаболита к лозартану получена после 4-дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг. Данный параметр достоверно отличается от контроля (рис. 3.29).



**Рисунок 30.** Метаболические отношения метаболита лозартана E-3174 после введения лозартана без афобазола (I) и на фоне 4-дневного введения афобазола в дозах 5 мг/кг (II) и 25 мг/кг (III)

(значок “\*” означает статистически значимые различия при  $p < 0,05$  в сравнении с контролем). По оси ординат — метаболическое отношение

Значение МО на фоне 4-дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле в 7,2 раза, в то время как МО на фоне введения анксиолитика в дозе 5 мг/кг превышает аналогичную величину в контроле всего лишь в 1,2 раза. Таким образом, после многократного введения афобазола в дозе, превышающей эффективную анксиолитическую дозу в 5 раз, наблюдается его индуцирующий эффект на изофермент CYP2C9.

Известно, что ведущая роль в метаболизме бензимидазолов принадлежит изоферментам цитохрома P450 CYP3A4, CYP2C19, CYP2D6 и CYP2C9. Производные бензимидазола могут быть как индукторами, так и ингибиторами, вышеперечисленных изоформ.

Афобазол может применяться одновременно с другими лекарственными препаратами, метаболизируемыми изоформой цитохрома P450 CYP2C9, например, со многими нестероидными противовоспалительными средствами (диклофенак, флурбипрофен, ибупрофен, индометацин, мелоксикам), пероральными гипогликемическими препаратами (производные сульфонилмочевины),

непрямыми антикоагулянтами (варфарин, аценокумарол), флуконазолом, рифампицином и другими, что требует выяснения возможных межлекарственных взаимодействий. Из литературы известно, что широко применяемое другое производное бензимидазола омепразол является умеренным конкурентным ингибитором CYP2C9, пантопразол обладает наибольшей ингибирующей активностью среди замещенных бензимидазолов на данную изоформу *in vitro*.

Афобазол, в отличие от вышеназванных производных бензимидазола, в эффективной анксиолитической дозе (5 мг/кг) не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего действия на активность изоформы CYP2C9. При увеличении дозы анксиолитика до 25 мг/кг выявлен умеренный индуцирующий эффект.

Учитывая высокую степень гомологичности изоформы CYP2C9 у крыс и человека, можно предположить, что афобазол в терапевтической дозе 10 мг у человека также не будет влиять на изменение активности данной изоформы.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить отсутствие лекарственного взаимодействия афобазола в эффективной анксиолитической дозе с другими лекарственными средствами, метаболизируемыми изоформой CYP2C9. Аналогичный вывод был сделан после проведения экспериментального исследования по выведению лозартана с мочой на фоне субхронического введения афобазола в такой же дозе.

Так же на той же базе была проведена *in vivo* оценка метаболического отношения маркёров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов. Для этого исследование проводили на 48 белых беспородных крысах-самцах ( $220 \pm 20$  г), полученных из питомника “Столбовая” Московской области. Животных содержали в стандартных условиях вивария ФГБУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” РАН при 12-часовом световом режиме в индивидуальных клетках. За 12 ч до эксперимента животных лишали корма. Изменение активности CYP2C9 под влиянием афобазола, индуктора или ингибитора проводили на выборке из 24 животных. Крыс разделили на 3 подгруппы по 8 особей в каждой. Такое же количество животных использовали

для изучения влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP1A2.

В качестве индуктора изоформы CYP2C9 использовали рифампицин (Рн). Для изоформы CYP1A2 — фенитоин (Фн). Оба препарата относятся к группе умеренных индукторов. В качестве ингибитора изоформы CYP2C9 использовали флуконазол (Фк). Для изоформы CYP1A2 — ципрофлоксацин (Цф). Фк относится к группе умеренных ингибиторов, Цф — к сильным ингибиторам. Выбранные индукторы и ингибиторы рекомендованы для оценки активности соответствующих изоформ у человека.

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

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

Для изоформы CYP2C9 препарат-маркёр лозартан, вводили внутрь, однократно в дозе 30 мг/кг без и на фоне субхронического введения афобазола, Рн и Фл. При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP2C9 крысам каждой подгруппы сначала вводили лозартан без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении трех суток этим же животным вводили афобазол (индуктор или ингибитор) в течение 4 сут (субхроническое введение). После последнего введения афобазола (индуктора или ингибитора) через 0,5 ч вводили лозартан.

В качестве препарата-маркёра для изоформы CYP1A2 вводили животным внутрь кофеин однократно в дозе 50 мг/кг без и на фоне субхронического введения

афобазола, Фн и Цф. Помимо кофеина измеряли концентрации двух его метаболита.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP1A2 крысам каждой подгруппы сначала вводили кофеин без афобазола, индуктора или ингибитора (контроль), затем по истечении трех суток этим же животным вводили афобазол (индуктор или ингибитор) в течение 4 сут (субхроническое введение). Последнее введение афобазола (индуктора или ингибитора) производили вместе с кофеином.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности изоформы CYP2C9 сбор мочи проводили по следующей схеме:

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

*Субхроническое введение.* После последнего введения афобазола (индуктора или ингибитора) через 0,5 ч вводили лозартан, затем крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения препарата-маркера.

При изучении влияния афобазола, индуктора или ингибитора на изменение активности CYP1A2 сбор мочи крыс проводили по следующей схеме:

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

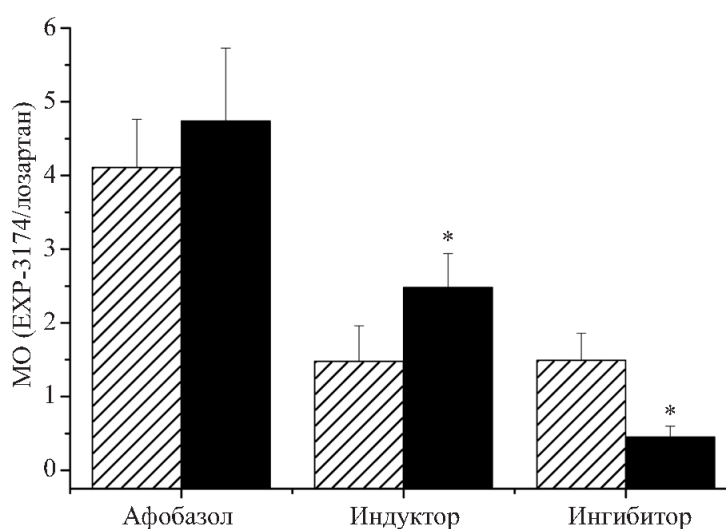
*Субхроническое введение.* После последнего введения афобазола (индуктора или ингибитора) совместно с кофеином крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Отсчет времени начинался после введения афобазола с препаратом-маркёром.

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

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

Достоверность различий между величинами МО препаратов-маркёров после их однократного введения и на фоне субхронического введения афобазола и соответствующих индукторов и ингибиторов оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

На рисунке 31 представлены результаты исследования влияния афобазола, индуктора — Рф и ингибитора — Фк на изменение активности изоформы СУР2С9, оцениваемое по МО субстратного маркёра — лозартана и его метаболита.



**Рисунок 31.** Метаболические отношения Exr-3174 к лозартану в моче крыс после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы СУР 2С9. По оси ординат — метаболическое отношение, по оси абсцисс — индуктор (рифампицин — Рн), ингибитор (флуконазол — Фк).

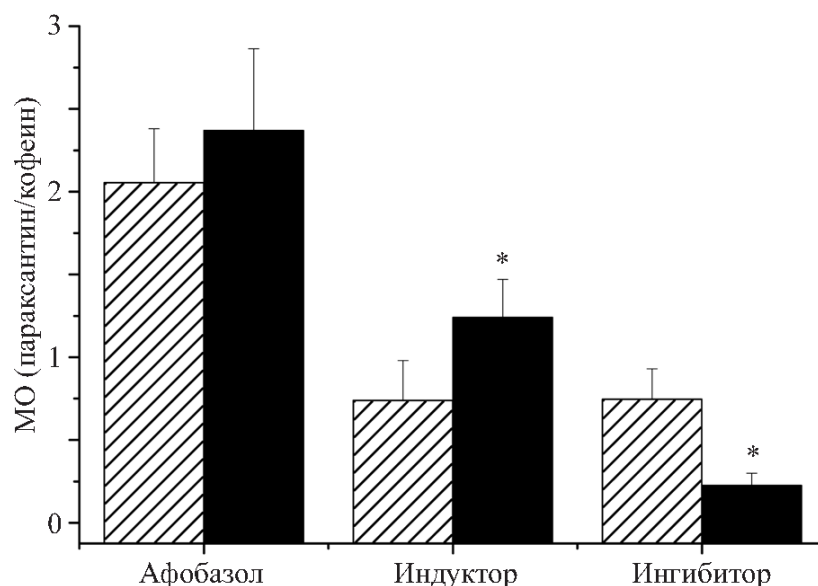
Заштрихованные столбики — введение лозартана без афобазола индуктора или ингибитора, темные — введение лозартана на фоне субхронического введения афобазола, индуктора или ингибитора. \* — статистически значимые различия при  $p < 0,05$  в сравнении с введением лозартана без афобазола.

После субхронического введения внутрь крысам афобазола в дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на CYP2C9 не был выявлен. Так, после введения лозартана без афобазола МО составило  $4,11 \pm 0,65$ , а после введения лозартана на фоне субхронического введения афобазола —  $4,74 \pm 0,99$ . В то же время, после субхронического введения внутрь индуктора Рф в эффективной дозе выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО после однократного введения лозартана без Рн составило  $1,48 \pm 0,48$ , а после субхронического введения маркёра —  $2,48 \pm 0,66$ . Таким образом, индукция изоформы CYP2C9, вызванная Рф, привела к увеличению МО, что свидетельствует о повышении интенсивности биотрансформации лозартана.

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

Несмотря на то, что используемые в настоящем исследовании Рф и Фк относятся к группе, так называемых, умеренных индукторов и ингибиторов, выраженность ингибирования CYP2C9 у крыс в 2 раза выше степени индукции (3,31 и 1,68, соответственно).

На рисунке 32 представлены результаты исследования влияния афобазола, а также индуктора — Фн и ингибитора — Цф (в эффективных дозах) на изменение активности изоформы CYP1A2, оцениваемое по МО параксантина субстратного маркёра — кофеина к неизмененному ЛВ.



**Рисунок 32.** Метаболические отношения парацетина к кофеину в моче крыс после введения афобазола, индуктора и ингибитора изоформы СYP1A2. По оси ординат — метаболическое отношение, по оси абсцисс — индуктор (фенитоин — Фн), ингибитор (ципрофлоксацин — Цф)

Заштрихованные столбики — введение кофеина без афобазола, индуктора или ингибитора, темные — введение кофеина после субхронического введения афобазола, индуктора или ингибитора. \* — статистически значимые различия при  $p < 0,05$  в сравнении с введением кофеина без афобазола.

Из рисунка 32 видно, что после субхронического введения крысам внутрь афобазола в дозе 5 мг/кг индуцирующий/ингибирующий эффект на СYP1A2 не выявлен. Так, после введения кофеина без афобазола МО, определяемое по отношению концентраций парацетина к кофеину, равнялось  $1,21 \pm 0,46$ , а после введения кофеина на фоне субхронического введения афобазола внутрь —  $1,30 \pm 0,31$ . В то же время после субхронического введения индуктора Фн в эффективной дозе выявлен статистически значимый индуцирующий эффект ( $p < 0,05$ ). МО после однократного введения кофеина без Фн составило  $1,17 \pm 0,15$ , а после субхронического введения маркера —  $1,87 \pm 0,20$ . Таким образом, индукция изоформы СYP1A2, вызванная Фн, привела к повышению интенсивности биотрансформации препарата-маркера и увеличению МО.

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

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

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

Из проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. афобазол в дозе, соответствующей терапевтической, не влияет на активность изоформ CYP2C9 и CYP1A2;
2. апробирована методология изучения *in vivo* влияния лекарственного средства на изоформы цитохрома Р-450 с использованием стандартных модификаторов и субстратов-маркёров;
3. установлено, что активность изоформы CYP1A2 у крыс можно оценивать по одному из метаболитов препарата-маркёра (параксантину или теобромину), а изоформы CYP2C9 - по метаболиту препарата-маркера лозарта-на (Ехр 3174);
4. афобазол после введения крысам в эффективной анксиолитической дозе 5 мг/кг 3 раза в день внутрь в течение 4 сут не вызывает изменения активности изоформы CYP2C9;

5. афобазол в дозе 25 мг/кг проявляет умеренный индуцирующий эффект на CYP2C9.

### **3.4. Использование разработанных методик в клинических исследованиях лекарственных средств**

Лекарственные препараты представляют собой мощное оружие в руках врачей, предназначенное для лечения всевозможных заболеваний. Однако, помимо непосредственно полезного для человека фармакологического эффекта, у многих людей вследствие приема препаратов проявляются различные побочные эффекты, которые в некоторых случаях могут не представлять особой важности и опасности, но в других могут серьезно повлиять на жизнь пациента и процесс лечения.

С момента становления фармакотерапии и клинической фармакологии, одной из наиболее больших и острых проблем является обеспечение максимальной безопасности при приеме лекарственных препаратов. Существует большое число разновидностей нежелательных лекарственных реакций, которые на практике проявляются у пациента различными неблагоприятными (вплоть до фатальных) явлениями как на уровне отдельного органа, так и на уровне систем органов и организма в целом.

В большинстве случаев возникновение нежелательных лекарственных реакций связано с изменением фармакокинетики лекарственных веществ.

Важнейшим этапом фармакокинетических исследований новых ЛС является изучение их элиминации из организма, позволяющее разрабатывать эффективные и безопасные схемы фармакотерапии. Элиминация происходит путем биотрансформации (чаще всего в печени) и/или экскреции. Система биотрансформации, основным компонентом которой считают изоферменты цитохрома P450, занимает центральное место в элиминации ЛС. Под действием ферментов биотрансформации происходит изменение фармакологической активности, снижение липофильности и повышение гидрофильности ЛС. При этом для большинства ЛС фармакологически активное вещество превращается в

фармакологически неактивное. Изоферменты цитохрома P450 проявляют субстратную специфичность, кроме того, у них имеются определенные регуляторы активности (ингибиторы и индукторы), что является основой межлекарственного взаимодействия, которое может приобретать клиническое значение при комбинированной фармакотерапии. Кроме того, активность цитохрома P450 может меняться (чаще всего снижаться) при различных заболеваниях, что может являться причиной развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) или неэффективности применяемых ЛС. Поэтому актуальным также является поиск модулирующих по отношению к данной системе свойств новых ЛС.

Изучение путей элиминации и биотрансформации новых ЛС важно для разработки безопасных схем применения ЛС, исключая возможные межлекарственные взаимодействия на уровне биотрансформации, и, как следствие, развитие нежелательных лекарственных реакций и/или снижение эффективности при совместном применении с другими ЛС. Проведение подобных исследований регламентировано в США и в России, однако в нашей стране данная норма имеет рекомендательный характер.

При разработке и пострегистрационном изучении нового ЛС фармкомпания проводят цикл фармакокинетических и фармакодинамических исследований *in vitro* и *in vivo*, позволяющих определить спектр биологической активности препарата, механизм действия, особенности его всасывания, распределения, метаболизма и экскреции.

При проведении фармакокинетических исследований новых ЛС необходимо изучать влияние на основные ферменты биотрансформации и транспортных систем (гликопротеин Р), однако перед исследователями стоит непростая задача выбора ферментов биотрансформации, в отношении которых следует изучать действие препарата в первую очередь. Для решения этой задачи может быть использован подход к проведению фармакокинетических исследований с применением методов *in silico*, *in vitro* и *in vivo* (Таблица 76).

**Таблица 76.** Фармакокинетические исследования нового ЛС

Этап	Описание	Ожидаемый результат
I	<i>In silico</i> Компьютерное прогнозирование спектра биологической активности	Выдвижение гипотезы о возможном влиянии на ферменты биотрансформации
II	<i>in vitro</i> Исследования <i>in vitro</i> , могут служить скрининговым механизмом для исключения ингибирующих/индуцирующих свойств ЛС по отношению к ферментам биотрансформации.	Подтверждение гипотезы о возможном влиянии изучаемого препарата <i>in vitro</i>
III	<i>in vivo</i> Клиническое исследование препарата в терапевтических дозах с использованием методов оценки активности изучаемых изоферментов в динамике.	1. Подтверждение гипотезы о возможном влиянии изучаемого препарата <i>in vivo</i> . 2. Разработка рекомендаций по совместному применению изучаемого препарата с ЛС-субстратами изучаемого фермента биотрансформации.

Важнейшим этапом оценки безопасности как новых, так и уже зарегистрированных ЛС, является всесторонняя оценка возможных межлекарственных взаимодействий (МВ). В связи с демографическим старением населения, увеличением количества как доступных, так и применяемых у пациента ЛС, увеличением применения безрецептурных препаратов увеличивается риск развития МВ. В США регламентировано проведение исследований, направленных на выявление потенциальных МВ между новым ЛС и зарегистрированными ЛС, а также на разработку мер по снижению риска таких МВ (коррекция дозы, дополнительный терапевтический мониторинг и др.). При этом обычно перед проведением исследований *in vivo* с целью скрининга проводятся исследования *in vitro*, позволяющие определить целесообразность проведения исследований *in vivo*.

FDA рекомендует включать в инструкции по медицинскому применению препаратов информацию о возможном ингибирующем и индуцирующем влиянии на ферменты биотрансформации в раздел инструкции с описанием фармакокинетики. В странах Европейского союза также регламентировано проведение фармакокинетических исследований ЛС, направленных на оценку влияния изучаемого препарата на другие ЛС, и наоборот, влияния существующих ЛС на эффекты изучаемого ЛС. Результаты исследований МВ могут быть использованы для прогнозирования взаимодействий с другими ЛС на основании выявленных механизмов взаимодействия. В Российской Федерации разработаны рекомендации для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортёров новых лекарственных средств, в которых проведение фармакокинетических исследований рекомендовано для ЛС, которые могут часто применяться в комбинации с другими препаратами.

Нашим коллективом был выполнен ряд исследований, касающийся клинических исследований ЛС.

Все исследования были одобрены соответствующими локальными этическими комитетами. Все пациенты или их законные представители подписали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Все процедуры выполнялись в соответствии с Национальным законодательством (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика»), Надлежащей клинической практикой (GCP) и международными этическими нормами (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации, последние изменения были внесены на 64-й Генеральной ассамблее WMA, Форталеза, Бразилия, октябрь 2013 г.).

### **3.4.1. Клинические исследования лекарственных средств, влияющих на сердечно-сосудистую систему**

Совместно с член-корр. РАН Д.А. Сычевым и его сотрудниками был выполнен ряд работ по изучению в клинических условиях новых антикоагулянтов. Так в статье [145] нами были представлены результаты оценки активности СУР3А4 у пациентов с глубоким тромбозом вен, которые принимали препарат ривароксабан. Ривароксабан является одним из новых пероральных антикоагулянтов, которые могут использоваться для предотвращения эмболии при тромбозе глубоких вен (ТГВ) при мерцательной аритмии. Его эффективность была первоначально доказана для профилактики тромбоэмболии в ортопедической хирургии (Muesk et al., 2008). На сегодняшний момент в клинических испытаниях было показано, что ривароксабан так же эффективен, как и традиционная терапия. Эффективность ривароксабана в качестве профилактики инсульта у пациентов с клапанной и не клапанной фибрилляцией предсердий сопоставима с варфарином (Patel et al., 2011). Один из обычно упоминаемых недостатков ривароксабана, который ограничивает его применение, возможные случаи передозировки. Все еще, при назначении ривароксабана жизненно важно принять во внимание определенные фармакокинетические проблемы. Биодоступность и почечный клиренс ривароксабана зависит от активности Р-гликопротеина, который переносит лекарство обратно в просвет кишечника и клетки проксимального канальца почек. Так же ривароксабан метаболизируется в печени при помощи СУР3А4. Сопутствующая терапия ингибиторами СУР3А4 может привести к увеличению концентрации ривароксабана в сыворотке, вызывая побочные реакции, такие как кровотечение. Противоположный эффект наблюдается при назначении ривароксабана с СУР3А4-индуцирующими агентами, что приводит к снижению концентрации ривароксабана и, следовательно, снижению его антикоагулянтного эффекта. Также важно помнить, что ген СУР3А4 имеет однонуклеотидные полиморфизмы, которые влияют на активность СУР3А4 и могут изменить безопасность и эффективность ривароксабана у некоторых

пациентов. Основной целью нашего исследования было изучение корреляции между активностью изоферментов семейства CYP3A и эффективностью антикоагулянтной терапии у пациентов с ТГВ. Тридцать один пациент с ТГВ был включен в это исследование, в возрасте 21–83 лет, 18 мужчин и 13 женщин. Все пациенты принимали ривароксабан (Xarelto) в течение 21 дня после постановки диагноза ТГВ в дозах 15 мг два раза в день (утром и на ночь), а затем они были переведены на 20 мг один раз в день утром. Критерии исключения были следующими: отсутствие показаний для приема антагониста витамина К; клиренс креатинина <30 мл в минуту; клинически значимые заболевания печени (например, острый или хронический гепатит, цирроз печени) или уровень аланинаминотрансферазы, который был в три раза выше верхнего предела нормального диапазона или выше; бактериальный эндокардит; активное кровотечение или высокий риск кровотечения, противопоказания к антикоагулянтному лечению; систолическое давление > 180 мм рт. ст. или диастолическое давление > 110 мм рт.ст.; беременность или кормление грудью; одновременное применение сильных ингибиторов цитохрома P-450 3A4 (ингибиторы вирусной протеазы или системный кетоконазол) или индукторов (например, рифампицин, карбамазепин или фенитоин); участие в очередной экспериментальной фармакотерапевтической программе в течение 30 дней до проверки; и ожидаемая продолжительность жизни <3 месяца (Agnelli et al., 2010).

Пациенты находились под наблюдением в течение 6 месяцев. Все пациенты прошли доплерографию ног, которая помогла установить размер сгустка при поступлении. В течение периода исследования доплерография проводилась еженедельно для оценки динамики изменения размера сгустка. Сывороточные концентрации ривароксабана были измерены у пациентов, которые принимали 20 мг препарата ежедневно не менее 2 недель. Концентрации измерялись с использованием ВЭЖХ-МС/МС. Активность CYP3A4 определяли по разработанной методике с использованием дейтерированного стандарта. Нормальность распределения образца оценивали с использованием критерия Шапиро – Вилкса. Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для

определения соотношения между количественными характеристиками, был рассчитан коэффициент корреляции Спирмена. Значения коэффициента корреляции ( $r$ ) от 0,3 до 0,7 ( $p < 0,05$ ) указывает на значимую, но умеренную положительную корреляцию между характеристиками, тогда как  $r > 0,7$  ( $p < 0,05$ ) указывает на сильную и значимую корреляцию. Все результаты имеют 95% доверительные интервалы. Все данные были оценены непараметрически. Статистический анализ был выполнен с использованием SPSS версии 22.0. для Windows (SPSS, Inc., Чикаго, Иллинойс).

Средняя концентрация ривароксабана составила 59,0 - 89,3 нг/мл, минимальный уровень составлял 51,5 - 84,2 нг/мл. Соотношение 6- $\beta$ -ОН-кортизол/кортизол составило 2,0-2,9. Средняя длина сгустка при поступлении составила 12,0-7,2 см. После 3 месяцев лечения, средняя длина сгустка уменьшилась 1,1-1,6 см ( $p < 0,05$ ). Среднее изменение длины было 10,9 - 6,0 см, что соответствует 94,6% - 6,9%. Полная реканализация была достигнута после 2,5 - 1,3 месяцев в среднем.

Была прямая статистически достоверная корреляция между активностью CYP3A4 и максимальной концентрацией ривароксабана с  $r = 0,695$  (0,443–0,845),  $p < 0,0001$  (рисунок 33), а также между активностью CYP3A4 и средним уровнем ривароксабана с  $r = 0,766$  (0,558–0,884),  $p < 0,0001$  (рисунок 34). Эти корреляции представлены графически на рисунках 33 и 34 соответственно. Корреляция была также найдена между начальной длиной сгустка и временем до полной реканализации с  $r = 0,764$  (0,554–0,883),  $p < 0,0001$ .

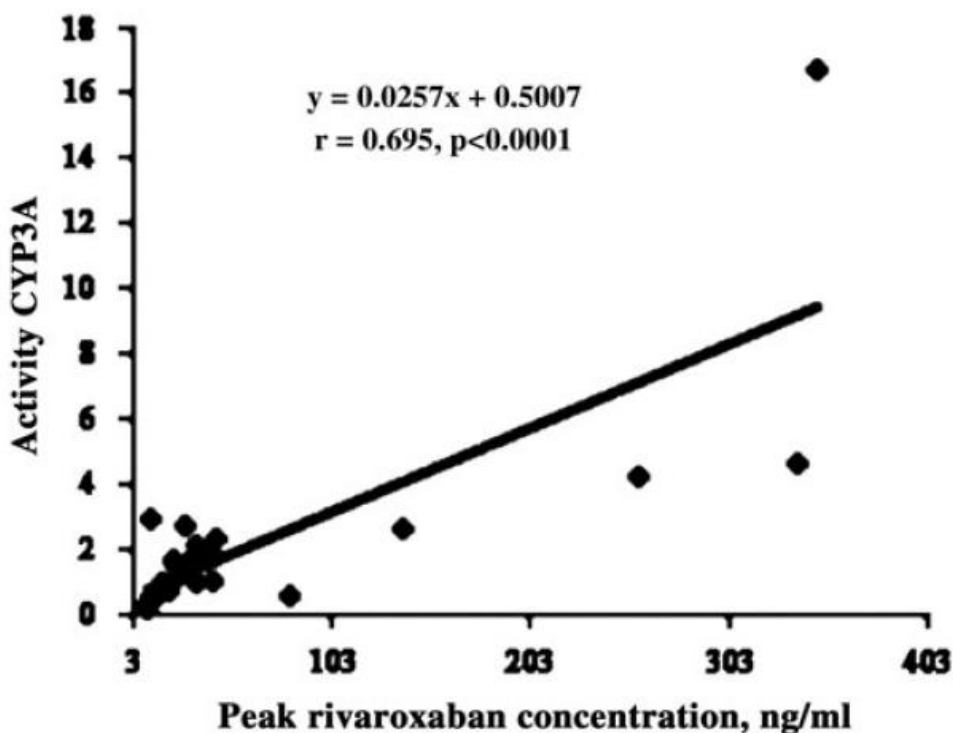


Рисунок 33. Отношение активности CYP3A4 и максимальной концентрации ривароксабана [145]

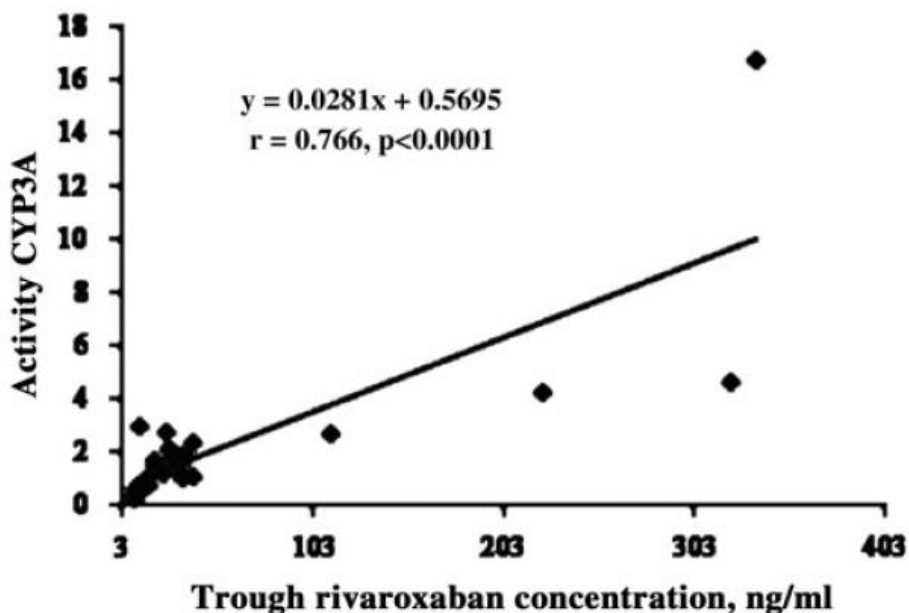


Рисунок 34. Отношение активности CYP3A4 и средней концентрации ривароксабана [145]

Исходя из полученных данных был сделан вывод, что активность CYP3A4 сильно влияет на концентрацию ривароксабана, однако не влияет на

эффективность лечения, так как не было найдено корреляции между ней и размером сгустка и временем полной реканализации.

Так же совместно с член-корр. РАН Д.А. Сычевым и его исследовательской группой было проведено исследование активности CYP3A4 и влияние полиморфизмов генов ABCB1 и CYP3A5 на фармакокинетику апиксабана у пациентов с мерцательной аритмией и острым инсультом [146]].

Апиксабан и эдоксабан представляют собой пероральные антикоагулянтные препараты, которые действуют как прямые ингибиторы фактора Ха. Профилактика инсульта является одним из наиболее важных показаний к применению антикоагулянтов без витамина К (NOAC) у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП). Использование антикоагулянтов и возобновление их применения после инсульта документированы в Руководстве Европейского общества кардиологов по лечению фибрилляции предсердий 2016 года.

Антикоагулянты вводят в зависимости от степени тяжести инсульта, которая оценивается по шкале инсульта Национального института здравоохранения США (NIHSS): для пациентов с оценкой <8 антикоагулянты назначают через 3 дня после инсульта, с оценкой 8–16 через 6 дней и балл > 16 через 12 дней при отсутствии противопоказаний.

Трудности в применении NOAC в остром периоде инсульта могут быть связаны с возможным изменением фармакокинетики этих препаратов, вызванным изменениями процессов абсорбции, биотрансформации, распределения и выведения у этой категории пациентов под воздействием различных факторов.

Таким образом, получение данных о фармакокинетики NOAC и факторах, влияющих на нее у пациентов с острым кардиоэмболическим инсультом, помогает разработать алгоритмы для персонализации выбора и дозировки этой группы препаратов.

Апиксабан метаболизируется преимущественно изоферментом CYP3A4/5 и в меньшей степени - изоферментами CYP1A2, 2C8, 2C9, 2C19 и 2J2. Кроме того,

апиксабан является субстратом для транспортных белков, Р-гликопротеина и белка устойчивости к раку молочной железы (BCRP).

В настоящее время растет количество литературы, показывающей важность генетических характеристик пациентов с точки зрения метаболизма и распределения NOACs.

Первой целью исследования было определение взаимосвязи между фармакокинетикой апиксабана и полиморфизмами гена ABCB1 (rs1045642, rs4148738), кодирующих полиморфизмы Р-гликопротеина и гена CYP3A5 (rs776746). Вторая цель исследования состояла в оценке связи между активностью CYP3A (6-β-гидрокортизол/кортизол) и генотипом CYP3A5. Гены-кандидаты были выбраны в соответствии с имеющимися данными о метаболизме апиксабана. Роль других ферментов для апиксабана не была подтверждена.

Клиническая часть исследований была проведена в Государственной клинической больнице им. Л.А.Ворохобова, Департамент здравоохранения, Москва. Анализ фармакокинетических параметров апиксабана проводился в Научно-исследовательском центре Российской медицинской академии последипломного образования Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Критерии включения были следующими: подтвержденные диагнозы острого ишемического инсульта и не клапанной ФП (отсутствие искусственных клапанов сердца и гемодинамически значимый митральный стеноз). Диагноз был поставлен лечащим врачом по клинической картине и результатам обследования (компьютерная томография [КТ] для инсульта и электрокардиограмма [ЭКГ] для мерцательной аритмии).

Критерии исключения были следующими: подтвержденный диагноз ФП клапанов (наличие искусственных клапанов сердца и гемодинамически значимый митральный стеноз), геморрагическая трансформация инфаркта головного мозга по данным КТ или магнитно-резонансной томографии (МРТ), нарушение глотания, клиренс креатинина <15 мл / мин, возраст ≥90 лет, одновременное использование NOAC и групп препаратов, таких как ингибиторы CYP3A4 и Р-гликопротеина

(кетоконазол, дронедарон, амиодарон, верапамил, дилтиазем, напроксен, хинидин, тикагрелор и кларитромицин) и CYP3A4 индукторы гликопротеина (рифампицин, карбамазепин, фенобарбитал, фенитоин и зверобой), пантопразол и атенолол. Пациенты также были исключены в случае противопоказаний к применению апиксабана. В исследование были включены 17 пациентов с кардиоэмболическим инсультом: 3 мужчины и 14 женщин, средний возраст  $76,6 \pm 9,5$  года. У пациентов был высокий риск повторного инсульта; средняя шкала риска развития тромбоемболических осложнений у пациентов с ФП (CHA2DS2-VASc) составила 5,5. Риск кровотечений при лечении антикоагулянтами также был высоким; средний балл HAS-BLED составил 3. Пациенты не принимали антикоагулянты до инсульта.

Мнения о минимальном количестве участников, включенных в фармакокинетическое исследование, различаются (Руководство FDA США по промышленности: Статистические подходы к установлению биоэквивалентности, 2001 г.; Руководств по оценке биоэквивалентности лекарственных средств, 2008 г.; и EMEA (Европа, Ближний Восток и Африка) Руководство по исследованию биоэквивалентности, 2010). Размер выборки определяется фармакокинетическим планом исследования, который традиционно включает небольшое количество участников. Также значительную роль играют тяжесть состояния пациентов, включенных в исследование, и их возраст, которые в совокупности создают технические трудности при получении образцов крови.

Почечная функция, измеренная с помощью модификации диеты при почечной недостаточности (MDRD), была снижена; Средняя скорость клубочковой фильтрации (СКФ) составила 55 мл/мин/1,72 м<sup>2</sup>, что соответствует II стадии хронического заболевания почек. Параметры гемостаза при госпитализации не отклонялись от референтных значений. Чтобы предотвратить вторичные тромбоемболические осложнения, все пациенты, в зависимости от тяжести инсульта, получали пероральный антикоагулянт апиксабан в дозе 5 мг два раза в день. В среднем апиксабан назначался через 8 дней после инсульта. Для

определения фармакокинетических параметров апиксабана отбирали образцы крови в первый день введения препарата.

Средний срок пребывания в стационаре составил 14,5 дней. В общей сложности 3 пациента, включенных в исследование, имели летальный исход.

Во всех случаях смерть наступила из-за последствий острого нарушения мозгового кровообращения.

Метаболическая активность CYP3A определялась в каждой группе пациентов с разными генотипами CYP3A5 (rs776746). Различия в активности CYP3A в группах не достигли статистической значимости. Фармакокинетика является более устойчивой в группе AG согласно CV%, но только 3 пациента были включены в эту группу. Что касается активности CYP3A, группа AG показала широкий спектр SD, и это может быть связано с высокой активностью ферментов одного пациента. Межгрупповое сравнение показало, что соотношение 6 $\beta$ -гидрокортизол / кортизол составило 2,94 для группы с генотипом GG и 8,87 для группы с генотипом AG, соответственно.

Корреляционный анализ не выявил статистически значимой связи между фармакокинетическими параметрами апиксабана и метаболической активностью CYP3A4.

В исследовании Dimatteo и др., где изучалось влияние SNC ABCB1 (ген, кодирующий P-гликопротеин) rs4148738 на метаболизм апиксабана, было показано, что пиковая равновесная концентрация апиксабана у пациентов с диким генотипом была значительно ниже. Тем не менее, у пациентов с полиморфизмом ABCB1 наблюдалось повышение пиковой равновесной концентрации апиксабана.

Ing Lorenzini и соавторы описали случай желудочно-кишечного кровотечения, связанного с ривароксабаном, у пациента-носителя аллельных вариантов обоих изученных полиморфизмов ABCB1 (rs2032582 и rs1045642). В этом примере были обнаружены высокие уровни анти-Ха активности и концентрации ривароксабана, несмотря на отмену препарата;  $t_{1/2}$  был в 2-3 раза выше, чем указано в руководстве. Gouin-Thibault и др. не выявили значительного влияния полиморфизмов ABCB1 rs2032582 и rs1045642 на фармакокинетику

ривароксабана: отношение AUC между носителями аллельных вариантов и диким генотипом составляло 1,20 (95% ДИ: 0,96–1,51).

В исследовании Vandell и др. было изучено влияние аллельных вариантов генов ABCB1 (rs1045642) и SLCO1B1 (rs4149056) (генов, кодирующих Р-гликопротеин и OATP1B1) на фармакокинетику эдоксабана. Эдоксабан является субстратом для этих транспортеров. Было обнаружено, что аллельные варианты генов ABCB1 и SLCO1B1 не влияют на фармакокинетику эдоксабана. Однако у носителей аллельных вариантов SLCO1B1 наблюдалось увеличение концентрации метаболита эдоксабана. Это не было клинически значимым, так как концентрация метаболита составляет 10% от концентрации основного вещества.

Полученные в этом исследовании данные об активности CYP3A коррелируют с литературными данными. В исследовании Chan и др., где фармакокинетика мидазолама была оценена у пациентов с различными генотипами CYP3A5 (rs776746), статистически значимых различий между группами обнаружено не было.

Однако в других исследованиях использование фенотипирования CYP3A4 (определение соотношения 6 $\beta$ -гидрокортизол / кортизол в утренней моче) показало значительные изменения в активности фермента в зависимости от характеристик пациента и присутствия ингибиторов CYP3A.

Ограничения исследования включают ограниченное количество включенных полиморфизмов, небольшой размер выборки и изменчивость фармакокинетических параметров. Наиболее вероятной причиной является разница в характеристиках пациента. Фармакокинетические параметры апиксабана были получены в реальной клинической практике. Особенности фармакокинетики обусловлены тяжестью основного заболевания, сопутствующей патологией и возрастом пациентов; все это отражается вариабельностью CV%.

Однако это отражает реальную клиническую практику и портрет среднего пациента с инсультом; практикующие врачи должны иметь дело с этим.

Концентрация в стационарном состоянии не изучалась, но она могла бы быть более актуальной для фармакогенетического исследования. Исследование

отражало в основном острую ситуацию со своими особенностями и проблемами. Регулярный мониторинг антикоагулянтного эффекта апиксабана у таких пациентов может быть значительным. В этом исследовании генетические характеристики пациентов с инсультом (АВСВ1 [ген, кодирующий Р-гликопротеин] rs1045642, rs4148738 и CYP3A5 [ген, кодирующий фермент, который метаболизирует апиксабан] rs776746) не влияли на фармакокинетику апиксабана.

Такие вопросы, как зависимость результатов генотипирования для дозирования апиксабана и применение экспресс-генотипирования в клинической практике, остаются открытыми для НОАК. Большие популяционные исследования необходимы для выяснения клинической значимости генотипирования для этой группы препаратов.

Кроме этих исследований был проведен ряд других, которые подробно описаны в опубликованных статьях [147–149].

### **3.4.2. Исследования противоязвенных препаратов**

Совместно с член-корр. РАН Д.А. Сычевым и его исследовательской группой было выполнено исследование по изучению связи метаболического соотношения омепразола в моче и полиморфизма CYP2C19 у популяции русских пациентов с язвой [150].

Изофермент цитохрома P450 2C19 (CYP2C19), как известно, является основным ферментом биотрансформации ингибиторов протонного насоса (ИПН), тогда как ген CYP2C19 является высоко полиморфным. Полиморфизмы CYP2C19\*2 и CYP2C19\*3, обнаруженные в 1994 г., и полиморфизм CYP2C19\*17, обнаруженный в 2006 г., оказывают влияние на эффективность лечения больных язвенной болезнью. Было доказано, что носители CYP2C19\*2 и CYP2C19\*3 имеют медленную биотрансформацию ИПН, тогда как предполагается, что носители CYP2C19\*17 имеют быстрый метаболизм ИПН, что может привести к недостаточности ответа на лекарственное средство. Голландская рабочая группа по

фармакогенетике Королевской Голландской ассоциации фармацевтов разработала руководства, которые переводят результаты фармакогенетических тестов в конкретные терапевтические рекомендации. Эти рекомендации основаны на систематическом обзоре литературы и предоставляют рекомендации по дозировкам для различных носителей полиморфизма. На основе руководства, носители полиморфизмов CYP2C19 делятся на быстрых метаболизаторов (БМ), промежуточных метаболизаторов (ПМ), медленных метаболизаторов (ММ) и ультрабыстрых метаболизаторы (УМ). Это предсказуемые фенотипы CYP2C19 на основе генотипа CYP2C19. CYP2C19 фенотипирование дополняет генотипирование.

Генотипирование и фенотипирование вместе предоставляют более надежные данные об активности CYP2C19 у пациента. S-мефенитоин был пробным препаратом для активности CYP2C19 в моче в прошлом, но из-за его потенциальных побочных эффектов, был предложен омепразол. Исследования показали, что индекс гидроксилирования омепразола в плазме коррелирует с метаболизмом S-мефенитоина в моче. Корреляция между генотипом CYP2C19 и метаболическим соотношением омепразола (5-гидроксиомепразол/ омепразол).

Мы провели это исследование, чтобы выяснить применимость метаболического соотношения омепразола мочи для CYP2C19 фенотипирования у российских пациентов с язвенной болезнью с CYP2C19 генотипами.

Были включены пациенты из четырех московских клиник, которым был поставлен диагноз язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки на основе эндоскопии и гистологии (обострения) или имели медицинские записи с документированными эндоскопически и гистологически доказанными язвами в прошлом (ремиссия) и, которые прошли гастроскопию и принимали омепразол (или для лечения язвы или сопутствующего эрозивного гастрита, дуоденита, гастроэзофагеальной рефлюксной болезни или для защиты желудка). Критериями включения были: диагностированная язвенная болезнь желудка (обострение или ремиссия) и омепразол 20 мг два раза в день, назначенный как минимум на 7 дней приема. Критериями исключения были: люди моложе 18 лет,

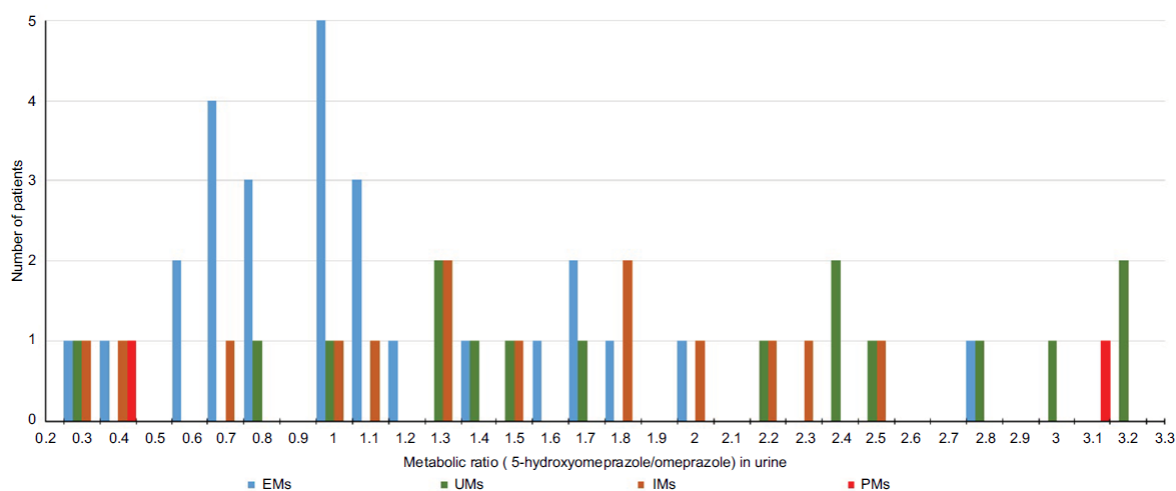
гиперчувствительность к омепразолу, другие выписанные препараты ИПН нежели омепразол, назначенные или измененные во время лечения, тяжелые сопутствующие заболевания (сердечно-сосудистые, церебральная, почечная, печеночная дисфункция), беременность и кормление грудью, и отказ от участия в любой части исследования. Всего было вовлечено 59 больных язвенной болезнью из Московской области (19 мужчин и 40 женщин) русских по национальности в возрасте 18–91 лет (средний возраст  $53,5 \pm 15,1$  года).

У всех пациентов были желудочно-кишечные жалобы: диспепсия, боль в животе и изжога. По результатам гастроскопии, 18 (30,5%) пациентов имели острую язвенную болезнь и 41 (69,5%) пациенту, которые имели эндоскопически и гистологически доказанную историю язвенной болезни, был диагностирован с эрозивный гастрит, эрозивный дуоденит, гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь, инфекция *Helicobacter pylori* (экспресс-тест на уреазу и гистологические или цитологические исследования, 10 пациентов) отдельно или в сочетании и ремиссия при язве при зачислении на исследование. Омепразол назначали всем пациентам лечащим врачом; режим дозирования составлял 20 мг два раза в день. Производители омепразола отличались: 27 (45,8%) пациентов принимали омепразол (ОАО «Синтез», Курган, Россия), 13 (22,0%) - омепразол (ООО Промед, Ростовская область, Аксай, Россия), 12 (20,3%) - Омез (Dr. Reddy's Laboratories Ltd., Бачупалли Вилладж, Штат Телангана, Индия) и 7 (11,9%) - омепразол-тева (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Петах-Тиква, Израиль). Ингибиторы или индукторы фермента CYP2C19 не были назначены пациентам.

Из 59 пациентов было 27 (45,8%) БМ (CYP2C19 \*1/\*1), 16 (27,1%) УМ (CYP2C19\*1/\*17, CYP2C19\*17/\*17), 14 (23,7%) ПМ (CYP2C19\*1/\*2, CYP2C19\*2/\*17, CYP2C19\*3/\*17) и 2 (3,4%) ММ (CYP2C19\*2/\*2).

Все генотипы были в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга ( $p > 0,05$ );). Частоты аллелей были следующими: CYP2C19\*2 - 14,4%, CYP2C19\*3 - 0,8% и CYP2C19\*17 - 17,8%. ММ и ПМ были объединены в одну группу для дальнейшего анализа.

Поскольку распределение метаболического соотношения не было нормальным (критерий Колмогорова – Смирнова,  $p = 0,038$ ), для сравнения использовали медиану и 25–75% перцентилей для описания данных и непараметрической статистики. Метаболическое соотношение омепразола было самым высоким у *CYP2C19\*1/\*17* пациентов (3,24) и самым низким у *CYP2C19\*1/\*1* пациентов (0,26). Распределение метаболического соотношения в моче у пациентов с разными генотипами *CYP2C19* показано на рисунке 35.



**Рисунок 35.** Распределение метаболического соотношения в моче у пациентов с разными генотипами *CYP2C19* [150]

Статистически значимая разница в метаболическом соотношении (U-критерий Манна-Уитни) был обнаружен между УМ и БМ ( $p = 0,001$ ) и при множественном сравнении критериев Крускала – Уоллиса ( $p = 0,005$ );).

Не было никакой связи между торговой маркой омепразола и метаболическим коэффициентом в моче (критерий Фишера,  $p > 0,05$ ). Не было никакой связи между днем взятия пробы мочи (четвертый или более поздний день) и метаболическим соотношением в моче (критерий Фишера,  $p > 0,05$ ).

Частота аллелей *CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*3* и *CYP2C19\*17* у российских больных язвенной болезнью в нашем исследовании сопоставимо с данными, описанными для европейцев. *CYP2C19\*3* встречается у  $<1\%$  кавказцев (0,8% в нашем исследовании) и чаще встречается у азиатов. *CYP2C19\*2* довольно

распространенный, и его частота составляет около 15% у европейского населения и 14,4% у наших пациентов. Клиническое значение *CYP2C19\*17* было установлено в 2006 г.; его частота ~ 20% в разных популяциях и все еще исследуется.

Мы обнаружили 17,8% частоты аллеля *CYP2C19\*17* в нашем исследовании. Был изучен плазменный индекс гидроксилирования омепразола (омепразол / 5-гидроксиомепразол) через 3 часа после употребления одной дозы омепразола 20 мг в иранском исследовании с 180 здоровыми добровольцами. Средний индекс гидроксилирования составил  $0,35 \pm 0,06$  для *CYP2C19\*17/\*17* носителей,  $0,75 \pm 0,28$  для носителей *CYP2C19\*1/\*17*,  $0,85 \pm 0,30$  для носителей *CYP2C19\*1/\*1*,  $2,02 \pm 0,84$  для носителей *CYP2C19\*2/\*17*,  $2,27 \pm 1,04$  для *CYP2C19\*1/\*2* носителей и  $13,59 \pm 3,13$  для *CYP2C19\*2/\*2* носителей. Таким образом, исследователи обнаружили связь между *CYP2C19* генотипом и фенотипом. Медианный индекс гидроксилирования статистически значимо различался в генотипе *CYP2C19\*17/\*17* по сравнению с другими генотипами *CYP2C19*. *CYP2C19\*2/\*2* медианный индекс гидроксилирования имел статистически значимую разницу по сравнению с другими генотипами *CYP2C19*.

Исследователи пришли к выводу, что фенотипирование помогло определить УМ *CYP2C19\*17/\*17* и ММ *CYP2C19\*2/\*2*. Индекс гидроксилирования омепразола обратен изученному метаболическому соотношению в нашей работе; если перевести, метаболические отношения для БМ и УМ сопоставимы с нашими данными.

Существует недостаток методов фенотипирования, описанных в предыдущей литературе. Многие исследования включают период 6–12 часовой сбор образцов крови и мочи для фармакокинетики и были относительно высокими в затратах и трудными для применения и поэтому было ограниченное введение в практику. Число участников таких исследований было довольно низким из-за сложного дизайна. В иранском исследовании с 30 здоровыми добровольцами после однократного приема 20 мг омепразола, были собраны образцы крови для 12 часов и были измерены концентрации омепразола и 5-гидроксиомепразола для фармакокинетики. Концентрации в моче не изучались. В некоторых других

исследованиях концентрацию омепразола в моче невозможно измерить из-за неподходящего буфера, который вызывает деградацию омепразола в образцах мочи. Тем не менее, в некоторых исследованиях успешно определяют омепразол и 5-гидроксиомепразол в моче. В финском исследовании, образцы крови и мочи были взяты в течение 6-часового периода от четырех добровольцев после перорального «коктейля» (мелатонин, никотин, бупропион, репаглинид, лозартан, омепразол, декстрометорфан, хлорзоксазон, мидазолам). Препараты и их метаболиты были измерены для фенотипирования CYP с использованием метода жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Образцы крови омепразола и 5-гидроксиомепразола были использованы для фенотипирования CYP2C19, тогда как образцы мочи со всеми временными точками были получены только от двух добровольцев. Добровольцы после однократного приема 10 мг омепразола имели следующую фармакокинетику омепразола и метаболита: площадь под кривой (AUC) 0–6 часов: 552,5 и 396,5 нг/мл·ч,  $C_{max}$  = 158,4 ± 113,2 нг/мл и 109,2 ± 62,9 нг/мл,  $T_{max}$  = 4 и 4 часа, накопленная экскреция с мочой 5,7–119,0 мкг и 38,3–4056,0 мкг и максимальная скорость выведения с мочой 26,3–51,1 мкг/ч и 649,0–1392,0 мкг/ч. Турецкие авторы изучали метаболическую активность CYP2C19 с использованием лансопразола к 5-гидроксилансопрозолу в плазме у здоровых детей с определенными полиморфизмами CYP2C19. Они обнаружили, что средняя концентрация лансопразола в плазме была на 70% ниже у CYP2C19\*17/\*17 УМ по сравнению с CYP2C19\*1/\*1 БМ ( $p < 0,05$ ). Средняя концентрация лансопразола в плазме была в 6,9 раз выше у CYP2C19\*2/\*2 ММ по сравнению с таковыми у CYP2C19\*1/\*1 БМ ( $p < 0,01$ ). У CYP2C19\*17/\*17 УМ соотношение лансопразол / 5-гидроксилансопразол было значительно ниже по сравнению с CYP2C19\*1/\*1 БМ ( $2,8 \pm 2,1$  против  $6,1 \pm 4,5$ ). CYP2C19\*2/\*2 ММ имели значительно более высокое метаболическое соотношение лансопразола по сравнению с CYP2C19\*1/\*1 БМ ( $63,5 \pm 12,2$  против  $6,1 \pm 4,5$ ). Авторы пришли к выводу, что CYP2C19\*2 и CYP2C19\*17 важны для прогнозирования клинических результатов, и лансопразол может использоваться в качестве модельного препарата для фенотипирования CYP2C19. В следующей работе были изучены одна

временная точка и оптимальная биоматрица для фенотипирования. Целью исследователей было найти оптимальный матрикс (плазма или моча) и одну временную точку для измерения препаратов и метаболитов из смеси (кофеин, лозартан, омепразол и декстрометорфан), отражающие активность CYPs. Образцы крови и мочи были взяты в течение 12 часов от 13 здоровых добровольцев для фенотипирования CYP2C19. Что касается метаболизма плазмы (омепразол AUC / 5-гидроксиомепразол AUC), оптимальное временная точка была через 3–12 часов после однократного приема 20 мг омепразола. Для метаболического соотношения мочи исследователи не смогли определить оптимальный момент времени, так как концентрация омепразола в моче не была определена для некоторых добровольцев. Индекс гидроксилирования (омепразол AUC / 5-гидроксиомепразол AUC), основанный на 3 часах после внутривенного введения омепразола или перорального введения был оптимальным для оценки активности CYP2C19 в японском исследовании. Мы предлагаем методы фенотипирования на основе одного забора крови или мочи, что больше подходит для клиницистов. Сбор образцов крови для фенотипирования является инвазивным и нуждается в оборудовании для последующего центрифугирования плазмы. Эти ограничения избегаются для образцов мочи как биоматрицы для фенотипирования, что делает метод более простым для клинической практики. Также очевидно, что концентрации лекарства и метаболита в моче менее точны, чем в плазме, в основном из-за частичной кишечной экскреции. Метаболическое отношение концентрации метаболита к концентрации лекарственного средства предполагает уменьшить это несовершенство. Не было найдено оптимального времени для сбора образцов мочи для фенотипирования CYP2C19 в литературе. Мы предложили метод фенотипирования на основе длительного приема омепразола с отбором проб мочи утром четвертого или более позднего дня приема омепразола. Основными ограничениями исследования являются небольшая выборка, отсутствие в плазме концентраций омепразола и 5-гидроксиомепразола. Другие изоферменты CYP, такие как CYP3A4, CYP3A5, CYP1A2 также могут влиять на результаты

исследования. В условиях пониженной активности CYP2C19, метаболизм ИПН может проходить через другие CYP.

Кроме этого нами был проведен еще ряд исследований, описанный в литературе, например [151,152].

### **3.4.3. Изучение корреляции между метаболической активностью и возрастом**

Важным вопросом клинического применения препаратов является возраст пациентов. Нами был проведен ряд исследований по изучению этого вопроса [153].

В настоящее время наблюдается тенденция увеличения доли удельного веса людей пожилого и старческого возраста в общей численности населения. По данным Росстата, за последние 10 лет численность населения России старшего трудоспособного возраста возросла на 4 млн человек. В возрастном составе населения России доля пожилых людей превышала 20% и, начиная с 1997 г. по настоящее время, сохраняется на уровне 20,7–20,8%. У лиц старше 60 лет частота осложнений от приёма лекарственных средств (ЛС) возрастает в 2 раза, у 70-летних — в 7 раз по сравнению с пациентами молодого возраста. Одной из основных проблем медикаментозной терапии людей пожилого и старческого возраста является возраст-опосредованные изменения фармакокинетики и фармакодинамики назначаемых ЛС. Возраст пациентов является одним из наиболее значимых факторов, так как он оказывает значительное влияние на функциональные возможности многих органов, в частности печени, где происходят основные реакции метаболизма ЛС. Таким образом, большое значение для безопасности проводимой терапии у пожилых имеют исследования изменений лекарственного метаболизма в печени у данной возрастной группы. Выявлено, что у лиц пожилого и старческого возраста наблюдается замедление биотрансформации ЛС вследствие атрофии паренхимы печени, уменьшения количества активных гепатоцитов, снижения активности микросомальных ферментов и извращения метаболизма. Экспрессия изоформ цитохрома P450

изменяется с возрастом. Печеночный кровоток уменьшается почти на 35–45%, по сравнению с лицами молодого и среднего возраста. Таким образом, возрастные изменения печени приводят к увеличению биодоступности ЛС и повышению их концентрации в плазме. С другой стороны, вследствие снижения печёночного клиренса изменяется период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) для препаратов как с быстрым, так и с медленным метаболизмом. Чтобы оценить лекарственный метаболизм *in vivo*, в настоящее время применяются различные методы, такие, как дыхательные тесты, расчёт метаболического коэффициента (MRs) и, наиболее часто, изучение клиренса (CL) с помощью тестовых препаратов. CYP2C9 – фермент, который вовлечен в метаболизм важнейших лекарств, таких как варфарин, некоторые антиконвульсанты и НПВС. На данный момент, данные по изменению активности CYP2C9 у людей пожилого и старческого возраста в сравнении с людьми первого периода зрелого возраста в литературе отсутствуют. Цель данного исследования — провести сравнительное сопоставление активности изофермента CYP2C9 у пациентов пожилого и старческого возраста и у людей первого периода зрелого возраста. Клиническое исследование проводилось на базе терапевтического отделения Городской клинической больницы № 23 им. «Медсантруд» ДЗ г.Москвы. Работа проведена в 2 этапа. На первом этапе проводилась оценка активности цитохрома CYP2C9 у пациентов пожилого и старческого возраста. В исследование были включены 18 пациентов пожилого и старческого возраста (10 женщин, 8 мужчин), средний возраст которых составил  $71,6 \pm 9,6$  лет, соответствующих следующим критериям.

Критерии включения в исследование: пациенты пожилого и старческого возраста; подписанное информированное согласие.

Критерии исключения из исследования: приём ингибиторов и/или индукторов CYP2C9; носители «медленных» аллельных вариантов CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 (определялись методом полимеразной цепной реакции, полиморфизмом длин рестрикционных фрагментов (ПЦР–ПДРФ) после выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови); острая печёночная (значительное повышение печёночных трансаминаз и отношение АСТ/АЛТ  $\geq 1$ ) и/или почечная

недостаточность (прогрессирующие повышение концентрации сывороточного креатинина более 1,5 норм (172 ммоль/л для мужчин, 145 ммоль/л для женщин) или прогрессирующие снижение диуреза – менее 0,5 мл/кг за 6 ч); повышенная чувствительность к препарату или его компонентам, а также непереносимость изучаемого препарата; любое хроническое заболевание, которое может помешать проведению исследования (злокачественные новообразования в течение последних пяти лет, алкоголизм, наркомания, неконтролируемый сахарный диабет, хроническая почечная недостаточность, выраженная обструкция дыхательных путей); психическое заболевание или недееспособность; отсутствие достаточной готовности к сотрудничеству.

На втором этапе оценивалась эффективность и безопасность пробы с лозартаном (в дозе 50 мг внутрь) у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста (18 человек). Контрольную группу составили 18 практически здоровых людей первого периода зрелого возраста (12 женщин, 6 мужчин) в возрасте  $26,3 \pm 3,5$  лет. Не включались лица с любыми хроническими заболеваниями, злоупотребляющие алкоголем, беременные, а также с наличием противопоказания к назначению лозартана или принимающие постоянно какие-либо препараты. Всем добровольцам проведено физикальное обследование, выполнены рутинные клинико-лабораторные тесты (ЭКГ, общий анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, исследования на ВИЧ, вирусы гепатита В и С, реакция Вассермана) по результатам которых все параметры были в пределах нормы. Критериями включения в контрольную группу были отсутствие в анамнезе аллергических, сердечно-сосудистых, ХНЗЛ и эндокринных заболеваний. Критерии исключения - острые респираторные вирусные инфекции менее чем за 1 месяц до исследования, приём любых ЛС и БАД менее чем за 1 месяц до исследования, любые хронические заболевания и вредные привычки, носители «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* (определялись методом ПЦР ПДРФ после выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови). Все добровольцы подписали информированное согласие. Всего в фармакокинетическое исследование лозартана было включено 12 мужчин

и 6 женщин, все из этнической группы русских. Определение концентрации лозартана и E-3174 (активного метаболита лозартана) в моче проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии со спектрофотометрическим детектированием (ПЦР-ПДРФ). Генотипирование пациентов по аллельным вариантам *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* проводили методом ПЦР-ПДРФ после предварительного выделения ДНК из лейкоцитов периферической крови. Выявление неблагоприятных побочных реакций (НПР) проводилось с помощью анкетирования (специально разработанная адресная анкета для участников исследования на основе НПР, перечисленных в типичной клинико-фармакологической статье препарата). Статистический анализ результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20. Для описания показателей, представленных в виде альтернативных переменных, приведены число наблюдений и доля пациентов (в процентах). Для описания показателей, представленных в виде количественных переменных, при предполагаемом нормальном распределении генеральной совокупности использовались параметрические методы описательной статистики: среднее выборочное значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $\bar{x} \pm V$ ). При статистической обработке данных использовался метод Манна–Уитни. Для определения статистической значимости в исследованиях пользовались одновыборочным парным t-критерием при удовлетворении требования нормального (гауссова) распределения. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ . Для определения взаимосвязи использовался коэффициент корреляции Спирмена. Согласно проведённому исследованию, отношение концентраций E-3174 к лозартану у пациентов пожилого и старческого возраста составило  $1,84 \pm 0,15$ . У здоровых добровольцев молодого возраста отношение E-3174/лозартан составило  $3,28 \pm 0,77$ . Концентрация лозартана у пациентов пожилого и старческого возраста составила  $517,41 \pm 76,68$  нг/мл. У здоровых добровольцев молодого возраста концентрация лозартана  $587,89 \pm 134,06$  нг/мл. Концентрация E-3174 у пациентов пожилого и старческого возраста составила  $829,98 \pm 88,11$  нг/мл. У здоровых добровольцев молодого возраста концентрация E-3174 составила  $1128,09 \pm 202,73$  нг/мл (таблица 77). У пациентов

молодого возраста отношение E-3174/ лозартан, концентрация E-3174 и концентрация лозартана оказались выше, чем у пациентов пожилого и старческого возраста.

**Таблица 77.** Средние значения концентраций E-3174, лозартана и их отношения в исследуемой выборке с учётом среднего квадратичного отклонения

Концентрация	Пациенты пожилого старческого возраста	и Здоровые добровольцы молодого возраста	p
Лозартан (нг/мл)	517,41 ± 76,68	587,8 ± 134,06	p < 0,0001
E-3174 (нг/мл)	829,98 ± 88,11	1128,09 ± 202,73	p < 0,0001
E-3174/Лозартан	1,84 ± 0,15	3,28 ± 0,77	0,0750

Также проводился корреляционный анализ между активностью CYP2C9 (метаболическим отношением) и количеством ЛС, которые получал пациент. По результатам корреляционного анализа между количеством лекарств и активностью CYP2C9 коэффициент корреляции Спирмена равен – 0,1204, P = 0,7330. Проводилась также оценка различий в активности CYP2C9 у пациентов, принимающих субстраты данного изофермента и у пациентов, не принимающих субстраты CYP2C9 по отношению E-3174/лозартан. Отношение концентраций E-3174 к лозартану у пациентов, принимающих субстраты CYP2C9, составило 1,93 ± 0,37. Выявлено, что у пациентов, не принимающих субстраты CYP2C9, отношение E-3174/лозартан больше (p = 0,94), чем у пациентов, принимающих субстраты CYP2C9, и составляет 1,96 ± 0,33. В исследовании *in vivo*, проведённом на 18 пациентах пожилого и старческого возраста и 18 здоровых добровольцах первого периода зрелого возраста, было продемонстрировано статистически значимое снижение метаболического отношения E-3174/лозартан у пациентов пожилого и старческого возраста, что свидетельствует о сниженной активности CYP2C9 в данной возрастной группе, по сравнению со здоровыми добровольцами первого

периода зрелого возраста. При сравнительном анализе активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 не было обнаружено статистически значимой разницы в активности изофермента у лиц, принимающих субстраты CYP2C9 по сравнению с теми, кто не принимал субстраты данного изофермента. При сравнительном анализе других исследований также была выявлена тенденция к снижению активности других изоферментов цитохрома P450, а именно: CYP2C19, CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9 [12]. В проведённом исследовании не было выявлено значимой взаимосвязи между активностью одного из основных изоферментов цитохрома P450 CYP2C9 с количеством ЛС, которое принимал пациент. Проведя сопоставительное сравнение активности изофермента P450 CYP2C9 у людей пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста, у первых была выявлена тенденцию к снижению активности данного изофермента. Подобные изменения оказывают влияние на элиминацию лекарственных средств метаболизируемых этим изоферментом, поэтому их назначение пациентам пожилого и старческого возраста, проводимое без учёта возрастного уменьшения активности изофермента CYP2C9, может являться причиной развития неблагоприятных побочных реакций, что, как правило, приводит к увеличению затрат на проводимое лечение, повышению частоты госпитализации и смертности пациентов данной возрастной группы. Правильный режим дозирования лекарственных препаратов поможет снизить затраты на проводимое лечение и повысить его эффективность.

### 3.5. Использование разработанных методик в клинической практике

Положение о том, что фармакотерапия должна быть индивидуализированной существовало давно, однако врач не был обеспечен методологией выбора лекарственных средств (ЛС) и их режимом дозирования. Необходимость индивидуализированного подхода к выбору ЛС обусловлена следующими фактами:

- эффективность фармакотерапии составляет не более 60% (по данным ВОЗ);
- растет частота нежелательных лекарственных реакций (НЛР) вплоть до смертельных исходов;
- в исследованиях ряда клиницистов было установлено, что при назначении в стандартной дозе многих ЛС у части больных их концентрация в крови была высокой – развивались НЛР, у других концентрация была низкой, и лечение оказывалось неэффективным.

С этих позиций, в ходе наших исследований мы попытались ответить на 3 вопроса:

- 1) Почему эффективность современной фармакотерапии, несмотря на внедрение методологии доказательной медицины, не превышает 60%?
- 2) Почему растёт число НЛР?
- 3) Почему при стандартной дозе концентрация некоторых ЛС колеблется у больных в широких пределах?

В цикле «движения» ЛС в организме пациента ключевыми факторами является активность ферментов - биотрансформации ЛС (главным образом изоферментов цитохрома Р-450) и транспортеров ЛС, которые обуславливают индивидуальную фармакокинетику ЛС.

В настоящее время уже хорошо известно:

- 40% ЛС метаболизируются с участием изоферментов цитохрома Р-450 (СYP450);
- 8% ЛС - пролекарства, а активными «лекарствами» являются их активные метаболиты;

- из всех изоферментов CYP450 90% ЛС метаболизируются 5 изоформами (CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19).

При этом основными факторами, влияющими на активность изоферментов цитохрома P-450 являются:

- генетический полиморфизм;
- совместно применяемые ЛС (индукция/ингибирование);
- тяжесть и характер основного или сопутствующих заболеваний;
- качественный состав пищи.

Генетический полиморфизм изоферментов цитохрома P-450 может определять индивидуальную активность того или иного изофермента, а в ряде случаев и риск развития НЛР. Нами были изучены частоты «медленных» аллелей различных изоферментов цитохрома P-450 в московской популяции (было генотипировано 800 москвичей), при этом выяснилось, что от 8 до 20% пациентов, принимающих субстраты изоферментов цитохрома P-450, имеют генетически детерминированный риск развития НЛР.

Подобные исследования позволили нам сделать вывод: в тех случаях, когда в популяции полиморфизм гена фермента, метаболизирующего выбранного ЛС, встречается более чем в 10% случаев, необходимо перед назначением ЛС проводить генотипирование пациентов. Если ЛС является пролекарством из которого под действием изофермента цитохрома P-450 образуется активный метаболит, то генетический полиморфизм может привести не к НЛР, а к неэффективности лечения. Пример: противоопухолевый препарат тамоксифен, из которого под действием CYP2D6 образуется его активный метаболит эндоксифен. У женщин с раком молочной железы - медленных метаболитаторов по CYP2D6 (носительство «медленного» аллеля *CYP2D6\*4*) образуется меньше эндоксифена, а значит сокращается период ремиссии заболевания.

Также классическими примерами влияния генетического полиморфизма на развития НЛР является феномен развития синдрома Стивенса-Джонсона при применении карбамазепина у пациентов - носителей HLA-B1502 и развитие

кровотечений при применении варфарина в стандартных дозах у пациентов-носителей «медленных» аллелей CYP2C9.

Итак, что же должен сделать врач, чтобы фармакотерапия была эффективной и безопасной? Он должен овладеть методологией персонализированной медицины. А что же такое персонализированная медицина? По определению Консорциума по персонализированной медицине (США), персонализированная медицина – это использование новых методов молекулярного анализа для улучшения оценки предрасположенности (прогнозирование) к болезням и их «управлением» (профилактика, лечение). Именно персонализированная медицина должна изменить разработку и использование профилактических и лечебных вмешательств. Эксперты считают, что инструментами персонализированной медицины являются технологии «omics»: геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика. Изучение активности изоферментов цитохрома P-450 относится именно к метаболомике. Для определения активности изоферментов в клинической практике мы предложили использовать общепринятый принцип:

- соотношение концентрации субстрата и его метаболита;
- если метаболита больше 50%, то активность изоферментов, участвующих в его метаболизме можно считать высокой, если меньше 30%- то она низкая.

Одним из ярких примеров эффективного использования генетической информации о полиморфизме изоферментов цитохрома P450 является применение алгоритма выбора индивидуальной дозы непрямого антикоагулянта варфарина. Например, пациент Н., мужчина, 62 года, с постоянной формой фибрилляции предсердий в течение последних 7 лет. Имеет высокий риск тромбоэмболических осложнений по шкале CHA2DS2VASc ввиду наличия в анамнезе перенесенного ишемического инсульта, ишемической болезни сердца с перенесенной операцией стентирования коронарных сосудов. Ранее, 3 года назад была попытка подбора дозы варфарина в стационаре (после перенесенного ОНМК), однако целевое МНО достигнуто не было (среднее МНО 1,2-1,5 на фоне приема 7,5 мг варфарина). После проведения генетического анализа выяснено, что пациент является носителем аллелей AA по гену VCOR1 и 1\*/1\* по гену CYP2C9, что соответствует

«быстрому» типу метаболизма. Расчетная доза варфарина для данного пациента составила 8,75 мг/сут. После назначения препарата в расчетной дозе, МНО достигло целевых значений (2,1) на 4й день приема. В настоящее время пациент принимает 8,75 мг/сут варфарина, поддерживая целевые значения МНО. Таким образом, мы видим, что отсутствие желаемого эффекта, а также опасения лечащего врача перед назначением высоких доз препарата послужило причиной неэффективной профилактики тромбозов у пациента с высоким риском 3 года назад. Этого можно было бы избежать, если бы при подборе индивидуальной дозы препарата использовались данные по аллельным вариантам генов CYP2C9 и VCOR1.

Наряду с оценкой активности изоферментов цитохрома P-450 в последние годы стали использоваться биомаркеры как одни из важнейших инструментов персонализированной медицины. Их внедрение в практическую работу призвано помочь, с одной стороны, в диагностике заболевания на молекулярном уровне, а с другой стороны оценить эффективность действия лекарственных средств. Маркер – это субстанция, образующаяся вследствие развития в организме патологического процесса. Величина маркера уточняет диагноз заболевания, помогает выбрать необходимые ЛС и режим его дозирования. В некоторых случаях динамика его концентрации характеризует эффект лечения. В других случаях может быть маркер как субстанция, образующееся при развитии патологического процесса. Так, например, при синдроме системного воспалительного ответа и сепсисе происходит фагоцитоз, в результате которого образуется гуморальный белок - пресепсин. Нередко маркеры могут отражать патогенез развития заболевания, так, например, полиморфизм генов ферментов, участвующих в биотрансформации липофильных ЛС. Является причиной ее замедления и кумуляции ЛС в организме больного, что клинически может проявляться НЛР. Это свидетельствует о полиморфизме геносинтезирующего белка гликопротеина P. Последнее, является причиной снижения активности транспортера, что клинически может проявляться у беременных – преждевременными родами. У кардиологических больных при применении варфарина полиморфизм гена фермента CYP2C9 способствует

снижению его активности, происходит его кумуляция, клинически развивается кровотечение.

Таким образом, во всех случаях, когда необходимо применять липофильные ЛС, перед их назначением необходимо исследовать полиморфизм генов, которые экспрессируют белки участвующие в биотрансформации выбранных ЛС. В данном случае, изучение состояния генов позволяет уточнить характер выбранного ЛС и режима его дозирования.

Использование в повседневной клинической практике высокотехнологичных, инновационных методов персонализированной медицины вместе с достижениями доказательной медицины позволит снизить частоту нежелательных лекарственных реакций, в том числе и смертельных исходов, повысить качество фармакотерапии. Более того, возможности персонализированной медицины следует учитывать в процессе совершенствования системы фармаконадзора, а именно, той ее части, которая касается разработки и внедрения методов, повышающих безопасность и эффективность применения ЛС.

### **3.5.1. Корреляция терапии у кардиологических пациентов**

Приведем пример использования нами методик определения активности изоферментов в клинике. Методика определения активности изофермента CYP2C9 была апробирована на пациентах, находящихся на стационарном лечении в кардиологическом отделении Центра сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАН. В исследовании участвовали 16 пациентов обоего пола в возрасте от 18 – 67 лет. Пациенты были разделены на 2 группы. Одна группа получала в сопутствующем лечении нифедипин и ловастатин. Вторая - только ловастатин.

Нифедипин – гипотензивный препарат, производное дигидропиридина, антагонист ионов кальция – является характерным ингибитором изофермента цитохрома CYP3A4. Связываясь с белками плазмы практически полностью (94-99%), он метаболизируется изоферментом CYP3A4 с появлением активных метаболитов. Данное лекарственное вещество очень часто используют в опытах,

связанных с изучением активности каких-либо изоферментов цитохрома P-450, если необходимо снизить активность CYP3A4.

Ловастатин – гиполипидемическое средство из группы статинов, ингибитор ГМГ-КоА-редуктазы. Является пролекарством, поскольку имеет в своей структуре закрытое лактоновое кольцо, которое после поступления в организм гидролизуется. Подвергается интенсивному метаболизму при «первичном прохождении» через печень, окисляясь до нескольких метаболитов, часть из которых фармакологически активны. Основным ферментом в этих протекающих реакциях является изофермент CYP2C9.

*Последовательность отбора образцов проб мочи у пациентов.* Первый отбор проб проводился в момент поступления в стационар до начала лечения. Вечером накануне исследования пациент принимал лозартан в дозе 50 мг. Таблетку запивали стаканом воды. Утром (не менее 8 ч после приема лозартана) проводился сбор утренней мочи. Отбиралась порция объемом 5 мл. До начала анализа допускалось замораживание и хранение при температуре -15 °С. Второй отбор проводился по той же методике, спустя 2 недели после начала лечения.

Концентрации лозартана и его метаболита и кортизола и его метаболита в моче определяли с помощью разработанных и описанных выше методик.

Пациенты получали сопутствующую терапию различными лекарственными средствами, что могло повлиять на результаты хроматографирования, но в связи с тем, что масс-спектрометрический анализ является селективным, то наличие других лекарственных веществ в моче не повлияло на эффективность хроматографического анализа.

В результате были получены данные о концентрациях, усредненные данные которых приведены в Таблице 78.

**Таблица 78.** Средние значения максимальной концентрации лозартана, E-3174, кортизола и 6-β-гидрокортизол гидрокортизола у первой и второй группы до и после лечения препаратами

	До лечения, концентрация нг/мл				После лечения, концентрация нг/мл			
	Лозарта н	E-3174	Кортизол	6-β- гидрокси- кортизол	Лозартан	E-3174	Кортизол	6-β- гидро- кси- кортизо- л
Группа 1	1967,58 ±265,81	3126,31±51 4,00	12,04±2,09	52,83±9,54	1015,33±210 ,66	1261,76±1 87,46	31,14±8,37	41,50 ±8,66
Группа 2	1582,64 ±288,20	3316,11±40 1,78	25,58±10,0 9	61,00±9,90	1083,79±352 ,06	1199,31±3 59,97	17,79±1,90	59,29 ±9,96

Основываясь на этих концентрациях, были рассчитаны метаболические индексы для каждого из пациентов; усредненные данные представлены в Таблице 79.

**Таблица 79.** Метаболический индекс E-3174/лозартан (MI-1) и 6-β-гидрокортизол/кортизол (MI-2) у первой и второй группы до и после лечения препаратами

	До лечения		После лечения	
	MI-1	MI-2	MI-1	MI-2
Группа 1	1,98±0,69	4,64±0,54	0,89±0,10	1,54±0,39
Группа 2	2,33±0,39	3,56±0,65	1,40±0,21	3,52±0,58

Как видно из полученных данных, у пациентов первой группы, принимавших нифедипин и ловастатин, упал метаболический индекс (отношение концентрации метаболита к концентрации вещества) как у кортизола, так и у лозартана, что говорит о падении активности обоих изоферментов CYP3A4 и CYP2C9.

У пациентов второй группы, принимавших только ловастатин, упал метаболический индекс лозартана без понижения значения данного индекса у кортизола, что говорит об ингибировании только CYP2C9. В это же время изофермент CYP3A4 обладал такой же активностью и мог с большой долей вероятности участвовать в метаболизме лозартана, что еще раз доказывает

необходимость одновременного изучения активности обоих изоферментов при исследовании активности изофермента CYP2C9 у конкретного пациента.

Основываясь на данной информации, была проведена корректировка дозирования лекарственных веществ с целью поддержания терапевтической концентрации и обеспечения продолжительного фармакологического эффекта используемых препаратов. Таким образом были обеспечены рациональность и безопасность проводимой лекарственной терапии.

Одну из важнейших ролей в рационализации фармакотерапии и обеспечении безопасности и эффективности назначаемой лекарственной терапии играет определение активности ферментов метаболизма, непосредственно влияющих на фармакокинетические параметры лекарственных веществ и риск нежелательных лекарственных реакций. С учетом актуальности данной проблемы, в последнее время разрабатывается большое число методик определения активности различных изоферментов CYP разными методами с применением современного оборудования. Разработанные авторами методики продемонстрировали, что с помощью фенотипического определения активности ферментов метаболизма с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором возможно точно, быстро и безопасно получать всю необходимую информацию об активности метаболизма у отдельного пациента, и на основе полученной информации врач сможет скорректировать дозировку назначаемого препарата. Это позволит сделать терапию более безопасной, рациональной, позволит снизить риск возникновения различных осложнений и сэкономить средства на ликвидацию последствий данных осложнений.

### **3.5.2. Рационализация фармакотерапии у больных, страдающих алкогольной зависимостью**

Актуальность лечения алкоголизма в РФ не требует дополнительного подтверждения. На сегодняшний момент, большое количество больных

алкоголизмом лечат с помощью фармакотерапии (в сочетании с другими методами лечения).

Совместно с к.м.н. Застрожиным М.С. был выполнен ряд исследований, направленный на изучение и разработку подходов к коррективке фармакотерапии галоперидолом у больных алкоголизмом [154–160] и др.

В качестве примера можно привести исследование Ассоциации активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю. В исследовании принимали участие 20 мужчин (средний возраст —  $39,5 \pm 9,5$  года), страдающих алкогольной зависимостью и находящихся на стационарном лечении в МНПЦ наркологии. В период актуализации патологического влечения пациенты получали галоперидол в таблетированной форме (ООО «Озон», Россия) в дозировке  $5,00 \pm 1,87$  мг/сут (9 пациентов, однократный прием) и в инъекционной форме (ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А», Россия) в дозировке  $5,86 \pm 2,39$  мг/сут (11 пациентов, однократный прием). Критерии включения в исследование: терапия, содержащая галоперидол длительностью 5 дней; пероральная и внутримышечная формы введения галоперидола; отсутствие в анамнезе сопутствующего психического заболевания. Критерии исключения: применение в терапии иных антипсихотических препаратов, помимо галоперидола; клиренс креатинина  $<50$  мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови  $\geq 1,5$  мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению галоперидола. Активность изофермента CYP2D6 оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ с МС/МС) по содержанию в моче эндогенного субстрата данного изофермента и его метаболита — отношение 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболина (6-НО-ТНВС) к пинолину. Для оценки эффективности галоперидола применяли международные психометрические шкалы: шкала патологического влечения (The Scale of Pathological Addiction — SoPA), шкала

тревоги Гамильтона (Hamilton Anxiety Rating Scale — HARS), шкала тревоги Бека (The Beck Anxiety Inventory — BARS), шкала тревоги Кови (Covy Anxiety Scale — CARS), шкала самооценки тревоги Цунга (The Zung Self-Rating Anxiety Scale — ZARS), шкала тревоги Шихана (Sheehan Clinical Anxiety Rating Scale — SARS), шкала депрессии Гамильтона (Hamilton Rating Scale for Depression — HDRS). Профиль безопасности исследовали с помощью шкал оценки побочного действия (UKU Side-Effect Rating Scale — UKU) и Симпсона–Ангуса для оценки экстрапирамидных побочных эффектов (Simpson–Angus Scale for Extrapiramidal Symptoms — SAS). Шкалы отражают клиническую картину патологического влечения, чем выше балл, тем влечение более выражено. Шкалирование у пациентов проводили за день до начала терапии, включающей галоперидол, и через 5 дней терапии. Большой разнице в баллах соответствовали более выраженные изменения в клинической картине и большая эффективность терапии. Статистический анализ результатов исследования производили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica v. 10.0. При выборе метода брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$  (при статистической мощности свыше 80 %). Для определения корреляционной связи между количественными характеристиками вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Значение коэффициента корреляции  $r_s$  в диапазоне от 0,3 до 0,7 при  $p < 0,05$  означало положительную умеренную, но достоверную корреляцию между признаками;  $r_s > 0,7$  при  $p < 0,05$  — сильную и достоверную связь; отрицательное значение  $r_s$  соответствовало обратной корреляции.

Медиана показателя активности изофермента, определяемой по отношению концентрации 6-НО-ТНВС к концентрации пинолина и рассчитанной на основании данных ВЭЖХ с МС/МС, и интерквартильный интервал (25 %; 75 %) составили 1,16 (0,64; 2,06). Расчет коэффициентов корреляции Спирмена показал наличие статистически значимой отрицательной умеренной связи между активностью CYP2D6 и изменением количества баллов по шкалам SoPA, HARS, BARS, CARS,

ZARS, SARS и положительной умеренной связи с изменением значений шкалы UKU. По шкалам HDRS и SAS статистически значимых корреляций обнаружено не было. В ходе исследования статистически показано, что профиль эффективности и безопасности галоперидола у больных, страдающих патологическим влечением к алкоголю, зависит от активности изофермента CYP2D6. Чем выше активность CYP2D6, тем ниже показатель эффективности терапии галоперидолом, что, вероятно, связано с ускорением биотрансформации галоперидола и элиминацией его из организма. Показатели профиля безопасности растут с увеличением активности CYP2D6, что также связано с ускорением элиминации галоперидола. Пациентам с высокой активностью CYP2D6 рекомендовано назначение препарата в средних терапевтических дозировках с осторожностью, поскольку высокая активность CYP2D6 будет препятствовать достижению терапевтической концентрации, что приведет к отсутствию лечебного эффекта. У пациентов с низкой активностью CYP2D6, получающих средние терапевтические дозировки галоперидола, возможна более высокая его концентрация в плазме, что будет ассоциировано с повышением частоты развития и выраженности нежелательных лекарственных реакций. У пациентов с очень высокой или очень низкой активностью CYP2D6 назначение галоперидола противопоказано, рекомендуется использовать другие антипсихотические препараты, в биотрансформации которых CYP2D6 не принимает участия.

Еще в качестве одного примера можно привести исследование Оценки влияния активности изоферментов подсемейства CYP3A на уровень равновесной концентрации Феназепам® у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью. Целью данного исследования было показать изменение эффективности и безопасности Феназепам® у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью, путем сопоставления активности изоферментов подсемейства CYP3A на показатель отношения уровня равновесной концентрации и дозы Феназепам® в плазме крови.

В исследовании принимали участие 94 пациента мужского пола (средний возраст —  $35,19 \pm 6,94$  года). Критерии включения в исследование: наличие двух

диагнозов – «Расстройство приспособительных реакций. Смешанная тревожная и депрессивная реакция (F43.22)» или «Расстройство приспособительных реакций с преобладанием нарушения других эмоций (F43.23)», а также наличие коморбидного диагноза и «Психические и поведенческие расстройства, вызванные употреблением алкоголя». Синдром зависимости средней стадии неосложненный. Воздержание в условиях, ограничивающих потребление алкоголя (F.10.212)»; наличие подписанного информированного согласия; терапия, содержащая феназепам, длительностью 5 дней. Критерии исключения: наличие других психических расстройств; наличие выраженных соматических расстройств (за исключением алкогольного гепатита и токсической энцефалопатии); применение в терапии иных психотропных препаратов; клиренс креатинина  $<50$  мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови  $\geq 1,5$  мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению феназепама. Пациенты с целью терапии тревожного расстройства (F43.22 или F43.23) в течение 5 дней получали бромдигидрохлорфенилбензодиазепин (Феназепам®) в таблетированной форме в дозировке  $4,0 \pm 2,0$  мг/сут. Для оценки эффективности феназепама применяли международные психометрические шкалы: Пенсильванская шкала патологического влечения (Pennsylvanian Alcohol Craving Scale, PACS), Визуальноаналоговая шкала оценки влечения к алкоголю (ВАШ), Шкала общего клинического впечатления (Clinical Global Impression, CGI), Госпитальная шкала тревоги и депрессии (HADS), Шкала тревоги Гамильтона (НАМА). Профиль безопасности исследовали с помощью шкал оценки побочного действия (UKU Side-Effect Rating Scale, UKU). Исследование пациентов проводили на 1-, 3- и 5-й дни терапии, включавшей феназепам. Оценку активности изоферментов подсемейства СУР3А проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масспектрометрией (ВЭЖХ с МС/МС) по содержанию в моче эндогенного субстрата данного изофермента и его метаболита — отношение 6-бетигидроксикортизол (6- $\beta$ -НС) / кортизол. По результатам данного исследования было доказано, что существует статистически значимая

разница в значениях показателя уровня равновесной концентрации феназепама® у пациентов с разными генотипами по полиморфному маркеру 6986A>G гена CYP3A5: у пациентов, являющихся носителями генотипа AG значение показателя уровня равновесной концентрации ниже, чем у пациентов с генотипом GG. Результаты корреляционного анализа между показателями концентрация/доза феназепама® и активностью CYP3A, оцененной по метаболическому отношению концентраций эндогенного субстрата и метаболита, демонстрирует наличие статистически значимой обратной зависимости между показателями: чем выше активность CYP3A, тем ниже значение показателя концентрации/доза, что, вероятно, связано с ускорением элиминации лекарства из организма. Это может приводить к снижению эффективности терапии, что необходимо учитывать при назначении Феназепама®. Таким образом, пациентам с высокой активностью CYP3A лучше назначать повышенные дозы феназепама® (но в пределах, регламентированных инструкцией по применению), с целью компенсации ускоренной активности CYP3A, что позволит с большей вероятностью достичь ожидаемого терапевтического эффекта. И, наоборот, у пациентов с замедленной активностью CYP3A рекомендуется снижать начальную дозу Феназепама® с целью снижения риска развития его нежелательных реакций. Эффективность использования результатов фармакогенетического тестирования для оптимизации режима дозирования Феназепама® с целью снижения риска развития нежелательных реакций и фармакорезистентности было показано в нашем проспективном исследовании на пациентах с синдромом отмены алкоголя. По итогам данного исследования было продемонстрировано влияние активности CYP3A, а также полиморфизма гена CYP3A5, на уровень равновесной концентрации Феназепама® в плазме крови, что в очередной раз подтверждает результаты наших предыдущих исследований по изучению влияния активности CYP3A и полиморфизма CYP3A5 на показатели эффективности и безопасности Феназепама®. Это позволяет оценить комплексное влияние как генетических факторов на клинические показатели терапии и результаты терапевтического

лекарственного мониторинга, так и влияние внешних факторов, оцененных при помощи метаболического отношения 6- $\beta$ -гидрокортизол/кортизол.

Проведенные исследования доказали наличие корреляционной зависимости между метаболической активностью цитохрома Р-450 (СYP3A4 и СYP2D6) с профилем эффективности и безопасности фармакотерапии у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю. В данных примерах были рассмотрены галоперидол и феназепам, однако, здесь важен именно подход к такого рода исследованиям. Если фармакотерапия проводится с помощью субстрата одного из целевых изоферментов СYP, то данный подход может быть использован для определения ее эффективности и безопасности, особенно в условиях полипрогмазии.

## ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании научного анализа данных литературы нами для последующего исследования были выбраны изоферменты: СУР1А2, СУР2С9, СУР2С19, СУР2D6 и СУР3А4. Для определения активности указанных изоферментов также были подобраны пары субстрат/метаболит. В случае изоферментов СУР1А2, СУР2С9, СУР2С19 не удалось найти подходящего эндогенного субстрата, в связи с чем, в качестве маркера, были выбраны наиболее часто используемые и безопасные ксенобиотики. В то же время для оценки активности изофермента СУР3А4 были выбраны две пары эндогенных субстратов и их метаболитов.

2. Разработаны высокочувствительные и селективные методы обнаружения субстратов и их метаболитов в различных биологических жидкостях с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Разработанные методики были валидированы по показателям селективность, линейность, эффект матрицы и степень извлечения, точность и прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность. Все разработанные методики количественного определения по валидационным показателям соответствовали критериям приемлемости.

3. Разработана математическая методика расчета концентрации эндогенных соединений, измеренных методом хроматографии в биообъектах. Данная методика позволяет получить статистически достоверную интервальную оценку концентрации эндогенных соединений, а также позволяет сохранить оригинальный биоматричный эффект при регистрации хроматограммы. Достоинством методики является использование исключительно анализируемого биообъекта для проведения количественного определения эндогенных веществ, без использования так называемых «чистых» биообъектов для калибровочных кривых, а также дейтерированных веществ, в качестве внутренних стандартов.

Разработанная методика позволяет исключить возможные грубые ошибки, благодаря использованию статистического аппарата.

4. Результаты сравнения альтернативных методик определения активности CYP3A4 с помощью концентрационных соотношений его эндогенных субстратов: кортизола и холестерина и проведенная статистическая обработка данных по определению активности CYP3A4 с помощью двух разных эндогенных субстратов показала отсутствие статистических различий в полученных результатах. Оценка значимых различий между методами определения активности CYP3A4 определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона. Асимптотическая значимость  $p=0,140$ ,  $p>0,05$ . Данные методики взаимозаменяемы и могут в равной мере использоваться для оценки активности CYP3A4.

5. Результаты определения индуцирующего и ингибирующего действия афобазола на изоферменты CYP1A2 и CYP2C9, оцененного на разработанной модели с использованием лабораторных животных (крыс) на этапе доклинических исследований показали отсутствие лекарственного взаимодействия афобазола в эффективной анксиолитической дозе и на фоне субхронического введения с другими лекарственными средствами, метаболизируемыми CYP2C9. Так же показано, что афобазол в дозе, соответствующей терапевтической, не влияет на активность CYP2C9 и CYP1A2. Кроме этого установлено, что афобазол в дозе 25 мг/кг проявляет умеренный индуцирующий эффект на CYP2C9.

6. При изучении взаимосвязи генотипирования и фенотипирования пациентов по активности CYP450 при фармакотерапии антикоагулянтами было выявлено, что метаболическая активность CYP3A определялась в каждой группе пациентов с разными генотипами CYP3A5 (rs776746). Различия в активности CYP3A в группах не достигли статистической значимости. Фармакокинетика является более устойчивой в группе AG согласно CV%, что касается активности CYP3A, группа AG показала широкий спектр SD, что может быть связано с высокой активностью ферментов одного пациента. Межгрупповое сравнение

показало, что соотношение  $6\beta$ -гидрокортизол / кортизол составило 2,94 для группы с генотипом GG и 8,87 для группы с генотипом AG, соответственно.

7. Сравнительное исследование активности изофермента P450 CYP2C9 у людей пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста выявило тенденцию к снижению активности данного изофермента с увеличением возраста. Подобные изменения оказывают влияние на элиминацию лекарственных средств метаболизируемых этим изоферментом, поэтому их назначение пациентам пожилого и старческого возраста, проводимое без учёта возрастного уменьшения активности изофермента CYP2C9, может являться причиной развития неблагоприятных побочных реакций. Правильный режим дозирования лекарственных препаратов поможет снизить затраты на проводимое лечение и повысить его эффективность.

8. Проведенные исследования доказали наличие корреляционной зависимости между метаболической активностью цитохрома P-450 (CYP3A4 и CYP2D6) с профилем эффективности и безопасности фармакотерапии у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю. Чем выше активность CYP2D6, тем ниже показатель эффективности терапии галоперидолом. Показатели профиля безопасности растут с увеличением активности CYP2D6. Пациентам с высокой активностью CYP2D6 рекомендовано назначение препарата в средних терапевтических дозировках с осторожностью, поскольку высокая активность CYP2D6 будет препятствовать достижению терапевтической концентрации. У пациентов с низкой активностью CYP2D6, получающих средние терапевтические дозировки галоперидола, возможна более высокая его концентрация в плазме, что будет ассоциировано с повышением частоты развития и выраженности нежелательных лекарственных реакций. У пациентов с очень высокой или очень низкой активностью CYP2D6 назначение галоперидола противопоказано, рекомендуется использовать другие антипсихотические препараты, в биотрансформации которых CYP2D6 не принимает участия. Также было показано, что пациентам с высокой активностью CYP3A лучше назначать повышенные дозы феназепам® (но в пределах, регламентированных инструкцией по применению),

с целью компенсации ускоренной активности СYP3A, что позволит с большей вероятностью достичь ожидаемого терапевтического эффекта. И, наоборот, у пациентов с замедленной активностью СYP3A рекомендуется снижать начальную дозу Феназепама® с целью снижения риска развития его нежелательных реакций.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЛС - лекарственное средство

СYP - цитохром P450

FDA - Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

DEM - декстрометорфан

MDZ - мидазолам

MO - метаболическое отношение

ТФЭ - твердофазная экстракция

5-MT - 5-метокситриптамиин

5-НТ - серотонин

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-УФ - высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

ВЭЖХ-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-селективным детектированием

КХО - клиренс, характеризующий образование

AUC - площадь под фармакокинетической кривой

АК - арахидоновая кислота

EETs - эпоксиэйкозатриеновые кислоты

HETEs - гидроксиэйкозатетраеновые кислоты

DHET - дигидроксиэйкозатриеновая кислота

EPHX2 - растворимая эпоксид гидролаза

DOR - дексметорфан

МПЧ - микросомы печени человека

6-НО-ТНВС - 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболин  
6-ОН-F - 6- $\beta$ -гидроокортизол  
DHEA - дегидроэпиандростенон  
НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат  
DCA - дезоксихолеваая кислота  
1 $\beta$ -ОН-DCA - 1- $\beta$ -гидрокси дезоксихолеваая кислота  
25(ОН)D3 - 25-гидроксивитамин Д3  
1,25(ОН)2-D3 - 1,25-дигидроксивитамин Д3  
Car C8:1-ОН I - гидроксиоктеноилкарнитин I  
Car C8:1-ОН II - гидроксиоктеноилкарнитин II  
Car C10:2-ОН - гидроксидекадиеноилкарнитин  
Car C11:2-ОН - гидроксиундекадиеноилкарнитин  
Car C11:1-ОН - гидроксиундеценоилкарнитин  
CHOL - холестерин  
COD - кодеин  
Cr - креатинин  
E - кортизон  
F - кортизол  
ч - час  
MEL - мелатонин  
MEL6S - 6-сульфатоксимелатонин  
MOR - морфин  
N/A - не определяется  
PIN - пинолин  
4 $\beta$ -ОН-CHOL - 4 $\beta$ -гидрокси холестерин

4b,25(OH)2D3 - 4β,25-дигидроксивитамин Д3

5-НТ - серотонин

5-МТ - 5-метокситриптамиин

6b-ОН-Е - 6β-гидроксикортизон

6-ОН-MEL - 6-гидроксимелатонин

в/в - внутривенное введение

KET - кетоконазол

RIF - рифампицин

LC-МС - жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

мМ - миллимоль

об. - объем

v/v - соотношение по объему

нПКО - нижний предел количественного определения

ПКО - предел количественного определения

QCB - образец контроля качества Б

QCD - образец контроля качества Г

QCA - образец контроля качества А

QCC - образец контроля качества В

Sx - величина аналитического сигнала

Cx - онцентрация неизвестного вещества

Cст - концентрация стандарта

ПО - программное обеспечение

ГХ - газовая хроматография

ЖХ - жидкостная хроматография

ЖХ-МС - жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

КЭ - капиллярный электрофорез  
КЭ/МС - капиллярный электрофорез с масс-селективным детектированием  
ESTD - внешний стандарт  
ISTD - внутренний стандарт  
М - коэффициент умножения  
D - коэффициент разбавления  
%RSD - относительное среднеквадратичное отклонение  
ГХ-МС - газовая хроматография с тандемной масс-спектрометрией  
СКО - среднеквадратичное отклонение  
Т<sub>max</sub> - время достижения максимальной концентрации  
С<sub>max</sub> - максимальная концентрация  
К<sub>el</sub> - константа скорости элиминации  
MRT - среднее время удержания препарата в организме  
CL/F - значение общего клиренса  
V<sub>d</sub>/F - кажущийся объем распределения  
Рн - рифампицин  
Фн - фенитоин  
Фк - флуконазол  
Цф - ципрофлоксацин  
ЛВ - лекарственное вещество  
МВ - межлекарственное взаимодействие  
GCP - надлежащая клиническая практика  
ТГВ - тромбоз глубоких вен  
r - коэффициент корреляции  
ФП - фибрилляция предсердий

NOAK - антикоагулянты без витамина К

NIHSS - национальный институт здравоохранения США

BCRP - белок устойчивости к раку молочных желез

КТ - компьютерная томография

ЭКГ - электрокардиография

МРТ - магнитно-резонансная томография

MDRD - модификация диеты при почечной недостаточности

СКФ - скорость клубочковой фильтрации

ИПН - ингибиторы протонного насоса

БМ - быстрые метаболиты

ПМ - промежуточные метаболиты

ММ - медленные метаболиты

УМ - ультрабыстрые метаболиты

ЖХ-МС/МС - жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией

T<sub>1/2</sub> - период полувыведения

MRs - метаболический коэффициент

CL - клиренс

НПВС - нестероидные противовоспалительные средства

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПДРФ - полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

АСТ - аспартатаминотрансфераза

АЛТ - аланинаминотрансфераза

ХНЗЛ - хроническое неспецифическое заболевание легких

БАД - биологически-активная добавка

НПР - неблагоприятные побочные реакции

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

РАН - Российская Академия наук

ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения

МНО - международное нормализованное отношение

Ад - артериальное давление

МКБ - ммеждународная классификация болезней

МЗ РФ - Министерство здравоохранения Российской Федерации

ЦНС - центральная нервная система

SoFA - Sepsis-related Organ Failure Scale

HADS - The hospital Anxiety and Depression Scale

BARS - Behaviorally Anchored Rating Scale

CARS - Childhood Autism Rating Scale

ZARS - Zung Anxiety Rating Scale

SARS - Severe Acute Respiratory Syndrome

HDRS - Hamilton psychiatric rating scale for depression

UKU - Side-Effect Rating Scale

SAS - Sitting assessment scale

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lin J.H. Pharmacokinetic and pharmacodynamic variability: A daunting challenge in drug therapy // *Curr. Drug Metab.* 2007. Vol. 8, № 2. P. 109–136.
2. Wilkinson G.R. Drug therapy: Drug metabolism and variability among patients in drug response // *N. Engl. J. Med.* 2005. Vol. 352, № 21. P. 2211-2221+2259.
3. Isin E.M., Guengerich F.P. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2007. Vol. 1770, № 3. P. 314–329.
4. Zanger U.M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // *Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 138, № 1. P. 103–141.
5. Ingelman-Sundberg M. et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects // *Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 116, № 3. P. 496–526.
6. McGraw J., Gerhardt A., Morris T.C. Opportunities and obstacles in genotypic prediction of cytochrome P450 phenotypes // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2018. Vol. 14, № 7. P. 659–661.
7. Faber M.S., Jetter A., Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: Why, how, and when? // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2005. Vol. 97, № 3. P. 125–134.
8. Hicks J.K., Swen J.J., Gaedigk A. Challenges in CYP2D6 phenotype assignment from genotype data: A critical assessment and call for standardization // *Curr. Drug Metab.* 2014. Vol. 15, № 2. P. 218–232.
9. Tanaka E., Kurata N., Yasuhara H. How useful is the “cocktail approach” for evaluating human hepatic drug metabolizing capacity using cytochrome P450 phenotyping probes in vivo? // *J. Clin. Pharm. Ther.* 2003. Vol. 28, № 3. P. 157–165.

10. Kim B. et al. Identification of  $\omega$ - or ( $\omega$ -1)-Hydroxylated Medium-Chain Acylcarnitines as Novel Urinary Biomarkers for CYP3A Activity // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2018. Vol. 103, № 5. P. 879–887.
11. Tay-Sontheimer J. et al. Detection of an endogenous urinary biomarker associated with CYP2D6 activity using global metabolomics // *Pharmacogenomics*. 2014. Vol. 15, № 16. P. 1947–1962.
12. Dong Y. et al. Analysis of genetic variations in CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 genes using oligonucleotide microarray // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. Vol. 8, № 10. P. 18917–18926.
13. Lee J. et al. Distribution of Exogenous and Endogenous CYP3A Markers and Related Factors in Healthy Males and Females // *AAPS J.* 2017. Vol. 19, № 4. P. 1196–1204.
14. Kim B. et al. Global metabolomics and targeted steroid profiling reveal that rifampin, a strong human PXR activator, alters endogenous urinary steroid markers // *J. Proteome Res.* 2013. Vol. 12, № 3. P. 1359–1368.
15. Shin K.-H. et al. Urinary 6 $\beta$ -Hydroxycortisol/Cortisol Ratio Most Highly Correlates With Midazolam Clearance Under Hepatic CYP3A Inhibition and Induction in Females: A Pharmacometabolomics Approach // *AAPS J.* 2016. Vol. 18, № 5. P. 1254–1261.
16. Shin K.-H. et al. Evaluation of endogenous metabolic markers of hepatic CYP3A activity using metabolic profiling and midazolam clearance // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2013. Vol. 94, № 5. P. 601–609.
17. Moon J.-Y. et al. GC-MS-based quantitative signatures of cytochrome P450-mediated steroid oxidation induced by rifampicin // *Ther. Drug Monit.* 2013. Vol. 35, № 4. P. 473–484.
18. Dumond J.B. et al. A phenotype-genotype approach to predicting CYP450 and P-glycoprotein drug interactions with the mixed inhibitor/inducer tipranavir/ritonavir

- // Clin. Pharmacol. Ther. 2010. Vol. 87, № 6. P. 735–742.
19. Gibbons J.A. et al. Pharmacokinetic Drug Interaction Studies with Enzalutamide // Clin. Pharmacokinet. 2015. Vol. 54, № 10. P. 1057–1069.
  20. Drug Development and Drug Interactions: Table of Substrates, Inhibitors and Inducers // Drug Dev. Drug Interact. Table Substrates, Inhib. Inducers.
  21. Samer C.F. et al. Applications of CYP450 testing in the clinical setting // Mol. Diagnosis Ther. 2013. Vol. 17, № 3. P. 165–184.
  22. Bosilkovska M. et al. Severe Vincristine-induced Neuropathic Pain in a CYP3A5 Nonexpressor with Reduced CYP3A4/5 Activity: Case Study // Clin. Ther. 2016. Vol. 38, № 1. P. 216–220.
  23. Bodin K. et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in humans. Evidence for involvement of cytochrome P450 3A4 // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 42. P. 38685–38689.
  24. Yu A.-M. et al. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6 // Pharmacogenetics. 2003. Vol. 13, № 3. P. 173–181.
  25. Thorn C.F. et al. PharmGKB summary: Very important pharmacogene information for CYP1A2 // Pharmacogenet. Genomics. 2012. Vol. 22, № 1. P. 73–77.
  26. Backman J.T., Granfors M.T., Neuvonen P.J. Rifampicin is only a weak inducer of CYP1A2-mediated presystemic and systemic metabolism: Studies with tizanidine and caffeine // Eur. J. Clin. Pharmacol. 2006. Vol. 62, № 6. P. 451–461.
  27. Perera V., Gross A.S., McLachlan A.J. Measurement of CYP1A2 activity: A focus on caffeine as a probe // Curr. Drug Metab. 2012. Vol. 13, № 5. P. 667–678.
  28. Bosilkovska M. et al. Simultaneous LC-MS/MS quantification of P-glycoprotein and cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in DBS and plasma // Bioanalysis. 2014. Vol. 6, № 2. P. 151–164.

29. Liu R. et al. Effects of Panax notoginseng saponins on the activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 in rats in vivo // *Phyther. Res.* 2012. Vol. 26, № 8. P. 1113–1118.
30. Zadoyan G. et al. Effect of Ginkgo biloba special extract EGb 761® on human cytochrome P450 activity: A cocktail interaction study in healthy volunteers // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2012. Vol. 68, № 5. P. 553–560.
31. Yubero-Lahoz S. et al. Changes in CYP1A2 activity in humans after 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, Ecstasy) administration using caffeine as a probe drug // *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012. Vol. 27, № 6. P. 605–613.
32. Jetter A. et al. Cytochrome P450 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2004.
33. Caraco Y., Muszkat M., Wood A.J.J. Phenytoin metabolic ratio: A putative marker of CYP2C9 activity in vivo // *Pharmacogenetics.* 2001. Vol. 11, № 7. P. 587–596.
34. George M. et al. Effect of anti-tuberculosis therapy on polymorphic drug metabolizing enzyme CYP2C9 using phenytoin as a probe drug // *Indian J. Pharmacol.* 2012.
35. De Morais S.M.F. et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S- mephenytoin metabolism in humans // *J. Biol. Chem.* 1994. Vol. 269, № 22. P. 15419–15422.
36. Yasar Ü. et al. Intra-individual variability in urinary losartan oxidation ratio, an in vivo marker of CYP2C9 activity // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2002. Vol. 54, № 2. P. 183–185.
37. Yasar Ü. et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2002.
38. Pratt V.M. et al. Recommendations for Clinical CYP2C19 Genotyping Allele Selection: A Report of the Association for Molecular Pathology // *J. Mol.*

- Diagnostics. 2018. Vol. 20, № 3. P. 269–276.
39. Pharmacogene Variation Consortium (database). [Электронный ресурс] - <https://www.pharmvar.org/> (Дата обращения 19.12.2019)
  40. Fuhr U., Jetter A., Kirchheiner J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the “cocktail” approach // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007. Vol. 81, № 2. P. 270–283.
  41. Frank D., Jaehde U., Fuhr U. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2007. Vol. 63, № 4. P. 321–333.
  42. Bapiro T.E. et al. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant: Potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations // *Biochem. Pharmacol.* 2002. Vol. 64, № 9. P. 1387–1398.
  43. Duricova J. et al. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol // *Bratislava Med. J.* 2013. Vol. 114, № 4. P. 206–212.
  44. Chen R. et al. Alternative methods for CYP2D6 phenotyping: Comparison of dextromethorphan metabolic ratios from AUC, single point plasma, and urine // *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2016. Vol. 54, № 5. P. 330–336.
  45. Antunes M. V et al. Development, validation and clinical application of a HPLC-FL method for CYP2D6 phenotyping in South Brazilian breast cancer patients // *Clin. Biochem.* 2014. Vol. 47, № 12. P. 1084–1090.
  46. De Kesel P.M.M., Lambert W.E., Stove C.P. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping // *Clin. Pharmacokinet.* 2016. Vol. 55, № 2. P. 169–184.

47. Elens L. et al. Impact of POR\*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin // *Pharmacogenet. Genomics*. 2013. Vol. 23, № 3. P. 148–155.
48. Link B. et al. Pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in plasma and saliva in humans: Usefulness of saliva as matrix for CYP3A phenotyping // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2008. Vol. 66, № 4. P. 473–484.
49. Furuta T. et al. Evidence for the validity of cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans // *Drug Metab. Dispos.* 2003. Vol. 31, № 11. P. 1283–1287.
50. Na Takuathung M. et al. Impact of CYP1A2 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of antipsychotic drugs: a systematic review and meta-analysis // *Acta Psychiatr. Scand.* 2019. Vol. 139, № 1. P. 15–25.
51. Perera V. et al. Considering CYP1A2 phenotype and genotype for optimizing the dose of olanzapine in the management of schizophrenia // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2013. Vol. 9, № 9. P. 1115–1137.
52. Claustrat B., Leston J. Melatonin: Physiological effects in humans // *Neurochirurgie*. 2015. Vol. 61, № 2–3. P. 77–84.
53. Yeleswaram K., Vachharajani N., Santone K. Involvement of cytochrome P-450 isozymes in melatonin metabolism and clinical implications // *J. Pineal Res.* 1999. Vol. 26, № 3. P. 190–191.
54. Ma X. et al. Metabolism of melatonin by human cytochromes P450 // *Drug Metab. Dispos.* 2005. Vol. 33, № 4. P. 489–494.
55. Demisch K. et al. The influence of acute and subchronic administration of various antidepressants on early morning melatonin plasma levels in healthy subjects: Increases following fluvoxamine // *J. Neural Transm.* 1987. Vol. 68, № 3–4. P. 257–270.

56. Skene D., Bojkowski C., Arendt J. Comparison of the effects of acute fluvoxamine and desipramine administration on melatonin and cortisol production in humans. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1994. Vol. 37, № 2. P. 181–186.
57. Von Bahr C. et al. Fluvoxamine but not citalopram increases serum melatonin in healthy subjects - An indication that cytochrome P450 CYP1A2 and CYP2C19 hydroxylate melatonin // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2000. Vol. 56, № 2. P. 123–127.
58. Ursing C. et al. Influence of cigarette smoking on melatonin levels in man // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2005. Vol. 61, № 3. P. 197–201.
59. Ursing C. et al. Does hepatic metabolism of melatonin affect the endogenous serum melatonin level in man? // *J. Endocrinol. Invest.* 2002. Vol. 25, № 5. P. 459–462.
60. Härtter S. et al. Orally given melatonin may serve as a probe drug for cytochrome P450 1A2 activity in vivo: A pilot study // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001. Vol. 70, № 1. P. 10–16.
61. Jackson P. et al. Polymorphic drug oxidation: pharmacokinetic basis and comparison of experimental indices. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1986. Vol. 22, № 5. P. 541–550.
62. Zeldin D.C. Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 39. P. 36059–36062.
63. Imig J.D. Epoxyeicosatrienoic Acids and 20-Hydroxyeicosatetraenoic Acid on Endothelial and Vascular Function // *Advances in Pharmacology.* 2016. Vol. 77. P. 105–141.
64. El-Sherbeni A.A., El-Kadi A.O.S. Repurposing Resveratrol and Fluconazole to Modulate Human Cytochrome P450-Mediated Arachidonic Acid Metabolism // *Mol. Pharm.* 2016. Vol. 13, № 4. P. 1278–1288.
65. Akasaka T. et al. CYP2C19 variants and epoxyeicosatrienoic acids in patients with microvascular angina // *IJC Hear. Vasc.* 2017. Vol. 15. P. 15–20.

66. Honkalammi J. et al. Mechanism-based inactivation of CYP2C8 by gemfibrozil occurs rapidly in humans // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011. Vol. 89, № 4. P. 579–586.
67. Modak A.S. et al. The effect of proton pump inhibitors on the CYP2C19 enzyme activity evaluated by the pantoprazole-13C breath test in GERD patients: Clinical relevance for personalized medicine // *J. Breath Res.* 2016. Vol. 10, № 4.
68. Rebsamen M.C. et al. The AmpliChip CYP450 test: Cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction // *Pharmacogenomics J.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 34–41.
69. Zanger U.M., Raimundo S., Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: Overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry // *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 2004. Vol. 369, № 1. P. 23–37.
70. Yu A., Haining R.L. Comparative contribution to dextromethorphan metabolism by cytochrome P450 isoforms in vitro: Can dextromethorphan be used as a dual probe for both CYP2D6 and CYP3A activities? // *Drug Metab. Dispos.* 2001. Vol. 29, № 11. P. 1514–1520.
71. Daali Y. et al. Development and validation of a chemical hydrolysis method for dextromethorphan and dextrophan determination in urine samples: Application to the assessment of CYP2D6 activity in fibromyalgia patients // *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008. Vol. 861, № 1. P. 56–63.
72. Bertilsson L. et al. Debrisoquine hydroxylation polymorphism and personality // *Lancet.* 1989. Vol. 333, № 8637. P. 555.
73. Llerena A. et al. Relationship between personality and debrisoquine hydroxylation capacity: Suggestion of an endogenous neuroactive substrate or product of the cytochrome P4502D6 // *Acta Psychiatr. Scand.* 1993. Vol. 87, № 1. P. 23–28.
74. Fonne-Pfister R., Bargetzi M.J., Meyer U.A. MPTP, the neurotoxin inducing parkinson's disease, is a potent competitive inhibitor of human and rat cytochrome P450 isozymes (P450bufI, P450db1) catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation //

- Biochem. Biophys. Res. Commun. 1987. Vol. 148, № 3. P. 1144–1150.
75. Tracy T.S. et al. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism // *Drug Metab. Dispos.* 2016. Vol. 44, № 3. P. 343–351.
  76. Crews K.R. et al. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 Update // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014. Vol. 95, № 4. P. 376–382.
  77. Cardinale G.J. et al. Morphine and codeine are endogenous components of human cerebrospinal fluid // *Life Sci.* 1987. Vol. 40, № 3. P. 301–306.
  78. Zhu W. et al. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation // *J. Immunol.* 2005. Vol. 175, № 11. P. 7357–7362.
  79. Mikus G. et al. Endogenous codeine and morphine in poor and extensive metabolisers of the CYP2D6 (debrisoquine/sparteine) polymorphism // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994. Vol. 268, № 2. P. 546–551.
  80. Beck O., Borg S., Lundman A. Concentration of 5-methoxyindoles in the human pineal gland // *J. Neural Transm.* 1982. Vol. 54, № 1–2. P. 111–116.
  81. Welford R.W.D. et al. Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6.
  82. Tang G.Y., Ip A.K., Siu A.W. Pinoline and N-acetylserotonin reduce glutamate-induced lipid peroxidation in retinal homogenates // *Neurosci. Lett.* 2007. Vol. 412, № 3. P. 191–194.
  83. Yu A.-M. et al. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase // *Pharmacogenetics.* 2003. Vol. 13, № 6. P. 307–319.
  84. Jiang X.-L., Shen H.-W., Yu A.-M. Pinoline may be used as a probe for CYP2D6 activity // *Drug Metab. Dispos.* 2009. Vol. 37, № 3. P. 443–446.

85. Sychev D.A. et al. The correlation between CYP2D6 isoenzyme activity and haloperidol efficacy and safety profile in patients with alcohol addiction during the exacerbation of the addiction // *Pharmgenomics. Pers. Med.* 2016. Vol. 9. P. 89–95.
86. Sychev D.A. et al. Genotyping and phenotyping of CYP2D6 and CYP3A isoenzymes in patients with alcohol use disorder: Correlation with haloperidol plasma concentration // *Drug Metab. Pers. Ther.* 2017. Vol. 32, № 3. P. 129–136.
87. Sager J.E. et al. Fluoxetine- and norfluoxetine-mediated complex drug-drug interactions: In vitro to in vivo correlation of effects on CYP2D6, CYP2C19, and CYP3A4 // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2014. Vol. 95, № 6. P. 653–662.
88. Liu Y.-T. et al. Drugs as CYP3A probes, inducers, and inhibitors // *Drug Metab. Rev.* 2007. Vol. 39, № 4. P. 699–721.
89. Wojnowski L., Kamdem L.K. Clinical implications of CYP3A polymorphisms // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2006. Vol. 2, № 2. P. 171–182.
90. Hohmann N., Haefeli W.E., Mikus G. CYP3A activity: Towards dose adaptation to the individual // *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2016. Vol. 12, № 5. P. 479–497.
91. Thelen K., Dressman J.B. Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall // *J. Pharm. Pharmacol.* 2009. Vol. 61, № 5. P. 541–558.
92. Galteau M.M., Shamsa F. Urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol: A validated test for evaluating drug induction or drug inhibition mediated through CYP3A in humans and in animals // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2003. Vol. 59, № 10. P. 713–733.
93. Mao J. et al. Perspective: 4 $\beta$ -hydroxycholesterol as an emerging endogenous biomarker of hepatic CYP3A // *Drug Metab. Rev.* 2017. Vol. 49, № 1. P. 18–34.
94. Ged C. et al. The increase in urinary excretion of 6 beta-hydroxycortisol as a marker of human hepatic cytochrome P450III $\alpha$  induction. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1989. Vol. 28, № 4. P. 373–387.

95. Abel S.M., Back D.J. Cortisol metabolism in vitro-III. Inhibition of microsomal 6 $\beta$ -hydroxylase and cytosolic 4-ene-reductase // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993. Vol. 46, № 6. P. 827–832.
96. Peng C.-C. et al. Evaluation of 6 $\beta$ -hydroxycortisol, 6 $\beta$ -hydroxycortisone, and a combination of the two as endogenous probes for inhibition of CYP3A4 in vivo // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2011. Vol. 89, № 6. P. 888–895.
97. Chen Y.-C. et al. Poor correlation between 6 $\beta$ -hydroxycortisol:cortisol molar ratios and midazolam clearance as measure of hepatic CYP3A activity // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2006. Vol. 62, № 2. P. 187–195.
98. Shibasaki H. et al. Intraindividual and interindividual variabilities in endogenous cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation clearance as an index for in vivo cyp3a phenotyping in humans // *Drug Metab. Dispos.* 2013. Vol. 41, № 2. P. 475–479.
99. Ohnishi A. et al. In vivo metabolic activity of CYP2C19 and CYP3A in relation to CYP2C19 genetic polymorphism in chronic liver disease // *J. Clin. Pharmacol.* 2005. Vol. 45, № 11. P. 1221–1229.
100. Hu Z.-Y. et al. Endogenous cortisol 6 $\beta$ -hydroxylation clearance is not an accurate probe for overall cytochrome P450 3A phenotyping in humans // *Clin. Chim. Acta.* 2009. Vol. 408, № 1–2. P. 92–97.
101. Luo X. et al. Evaluation of CYP3A activity in humans using three different parameters based on endogenous cortisol metabolism // *Acta Pharmacol. Sin.* 2009. Vol. 30, № 9. P. 1323–1329.
102. Woolsey S.J. et al. Relationships between Endogenous Plasma Biomarkers of Constitutive Cytochrome P450 3A Activity and Single-Time-Point Oral Midazolam Microdose Phenotype in Healthy Subjects // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2016. Vol. 118, № 4. P. 284–291.
103. Seidegård J., Dahlström K., Kullberg A. Effect of grapefruit juice on urinary 6 $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol excretion // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1998. Vol. 25,

- № 5. P. 379–381.
104. Abel S.M., Back D.J. Cortisol metabolism in vitro-III. Inhibition of microsomal 6 $\beta$ -hydroxylase and cytosolic 4-ene-reductase // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1993. Vol. 46, № 6. P. 827–832.
  105. Abel S.M. et al. Cortisol metabolism by human liver in vitro-I. Metabolite identification and inter-individual variability // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992. Vol. 43, № 7. P. 713–719.
  106. Kasichayanula S. et al. Validation of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol and evaluation of other endogenous biomarkers for the assessment of CYP3A activity in healthy subjects // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2014. Vol. 78, № 5. P. 1122–1134.
  107. Bodin K. et al. Antiepileptic drugs increase plasma levels of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in humans. Evidence for involvement of cytochrome P450 3A4 // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 42. P. 38685–38689.
  108. Gebeyehu E. et al. Sex and CYP3A5 genotype influence total CYP3A activity: High CYP3A activity and a unique distribution of CYP3A5 variant alleles in Ethiopians // *Pharmacogenomics J.* 2011. Vol. 11, № 2. P. 130–137.
  109. Hole K. et al. Impact of genetic and nongenetic factors on interindividual variability in 4 $\beta$ -hydroxycholesterol concentration // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2017. Vol. 73, № 3. P. 317–324.
  110. Lee J. et al. Distribution of Exogenous and Endogenous CYP3A Markers and Related Factors in Healthy Males and Females // *AAPS J.* 2017. Vol. 19, № 4. P. 1196–1204.
  111. Diczfalusy U. et al. 4 $\beta$ -Hydroxycholesterol as an endogenous marker for CYP3A4/5 activity. Stability and half-life of elimination after induction with rifampicin // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009. Vol. 67, № 1. P. 38–43.
  112. Björkhem-Bergman L. et al. Comparison of endogenous 4 $\beta$ -hydroxycholesterol

- with midazolam as markers for cyp3a4 induction by rifampicin // *Drug Metab. Dispos.* 2013. Vol. 41, № 8. P. 1488–1493.
113. Tomalik-Scharte D. et al. Plasma 4B-hydroxycholesterol: An endogenous CYP3A metric // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2009. Vol. 86, № 2. P. 147–153.
114. Slaunwhite WR, Karsay MA, Hollmer A S.A., K. N. Fetal liver as an endocrine tissue. // *Steroids.* 1965. Vol. 2. P. 211–221.
115. Cresteil T. et al. Drug-metabolizing enzymes in human foetal liver: Partial resolution of multiple cytochromes P 450 // *Pediatr. Pharmacol.* 1982. Vol. 2, № 3. P. 199–207.
116. Stevens J.C. et al. Developmental Expression of the Major Human Hepatic CYP3A Enzymes // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. Vol. 307, № 2. P. 573–582.
117. Miller K.K.M. et al. Stereo- and regioselectivity account for the diversity of dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolites produced by liver microsomal cytochromes P450 // *Drug Metab. Dispos.* 2004. Vol. 32, № 3. P. 305–313.
118. Nakashima T. et al. Unusual trihydroxy bile acids in the urine of patients treated with chenodeoxycholate, ursodeoxycholate or rifampicin and those with cirrhosis // *Hepatology.* 1990. Vol. 11, № 2. P. 255–260.
119. Wietholtz H. et al. Stimulation of bile acid 6 $\alpha$ -hydroxylation by rifampin // *J. Hepatol.* 1996. Vol. 24, № 6. P. 713–718.
120. Back P. Phenobarbital-induced alterations of bile acid metabolism in cases of intrahepatic cholestasis // *Klin. Wochenschr.* 1982. Vol. 60, № 11. P. 541–549.
121. Bodin K., Lindbom U., Diczfalusy U. Novel pathways of bile acid metabolism involving CYP3A4 // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids.* 2005. Vol. 1687, № 1–3. P. 84–93.
122. Hayes M.A. et al. CYP3A specifically catalyzes 1 $\beta$ -hydroxylation of deoxycholic acid: Characterization and enzymatic synthesis of a potential novel urinary

- biomarker for CYP3A activity // *Drug Metab. Dispos.* 2016. Vol. 44, № 9. P. 1480–1489.
123. Hahn T.J. et al. Serum 25-Hydroxycalciferol Levels and Bone Mass in Children on Chronic Anticonvulsant Therapy // *N. Engl. J. Med.* 1975. Vol. 292, № 11. P. 550–554.
124. Brodie M.J. et al. Rifampicin and vitamin D metabolism // *Clin. Pharmacol. Ther.* 1980. Vol. 27, № 6. P. 810–814.
125. Pascussi J.M. et al. Possible involvement of pregnane X receptor-enhanced CYP24 expression in drug-induced osteomalacia // *J. Clin. Invest.* 2005. Vol. 115, № 1. P. 177–186.
126. Xu Y. et al. Intestinal and hepatic CYP3A4 catalyze hydroxylation of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D: Implications for drug-induced osteomalacia // *Mol. Pharmacol.* 2006. Vol. 69, № 1. P. 56–65.
127. Wang Z. et al. An inducible cytochrome P450 3A4-dependent vitamin D catabolic pathway // *Mol. Pharmacol.* 2012. Vol. 81, № 4. P. 498–509.
128. Wang Z. et al. Interplay between vitamin D and the drug metabolizing enzyme CYP3A4 // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2013. Vol. 136, № 1. P. 54–58.
129. Wang Z. et al. Enhancement of hepatic 4-hydroxylation of 25-hydroxyvitamin D through CYP3A4 induction in vitro and in vivo: Implications for drug-induced osteomalacia // *J. Bone Miner. Res.* 2013. Vol. 28, № 5. P. 1101–1116.
130. Смирнов В. В. Разработка методики определения кортизола и 6- $\beta$ -гидрокортизола в моче с целью установления активности изофермента CYP 3A4. // Автореф. диссертации на степень канд. фарм. наук. 2011.
131. Смирнов В.В., Савченко А.Ю. Раменская Г.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6- $\beta$ -гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP

3А4. // Биомедицина. 2010. Т. 4. С. 56–60.

132. Кочанова Е.А. Определение профиля эндогенных стероидов методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии: дис. канд. х. наук: 02.00.02. - ФГУП «Антидопинговый центр», Москва, 2012 - 169 с.
133. Способ определения эндогенных стероидов в плазме крови человека. // Патент РФ №2451292. 2012. /Апполонова С.А., Баранов П.А. Родченков. Г.М.
134. Rauh M., Gröschl M., Rascher W. D.H.G. Automated, fast and sensitive quantification of 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. // Steroids. 2006. Vol. 71. P. 450–458.
135. Peitzsch M., Dekkers T., Haase M., Sweep F.C.G.J., Quack I., Antoch G., Siegert G., Lenders J.W.M., Deinum J., Willenberg H.S. E.G. An LC–MS/MS method for steroid profiling during adrenal venous sampling for investigation of primary aldosteronism. // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2014. Vol. 145. P. 75–84.
136. Gao W. et al. Quantitative analysis of steroid hormones in human hair using a column-switching LC-APCI-MS/MS assay // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2013. Vol. 928. P. 1–8.
137. Magnisali P. et al. Routine method for the simultaneous quantification of 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, cortisol, and pregnenolone in human serum of neonates using gas chromatography-mass spectrometry // J. Chromatogr. A. 2008. Vol. 1206, № 2. P. 166–177.
138. AbuRuz S. et al. Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges // J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci. 2003. Vol. 798, № 2. P. 193–201.
139. Konieczna L. et al. Steroid profiles as potential biomarkers in patients with urogenital tract cancer for diagnostic investigations analyzed by liquid

- chromatography coupled to mass spectrometry // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2013. Vol. 73. P. 108–115.
140. Макаров Е. Инженерные расчеты в Mathcad 15: Учебный курс. СПб.: Питер, 2011. 400 с.
  141. Кирьянов Д.В. Самоучитель Mathcad 11. СПб.: БХВ-Петербург, 2003. 560 с.
  142. ГОСТ Р 8.736 Измерения прямые многократные. Методы обработки результатов измерений. Основные положения. 2011.
  143. Bolton S. B.C. *Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications*, Fifth Edition. Volume 203. New York: New York: Informa Healthcare USA, 2010. 656 p.
  144. Жердев В.П. и др. In vivo оценка изменений активности изоформ цитохрома P450 под влиянием лекарственных средств в эксперименте и клинике (фармакокинетические исследования) // *Экспериментальная И Клиническая Фармакология*. 2018. Т. 81, № 5s. С. 82–82.
  145. Sychev D.A. et al. CYP3A Activity and Rivaroxaban Serum Concentrations in Russian Patients with Deep Vein Thrombosis // *Genet. Test. Mol. Biomarkers*. 2018. Vol. 22, № 1. P. 51–54.
  146. Kryukov, A. V., Sychev, D. A., Andreev, D. A., Ryzhikova, K. A., et.al. Influence of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms on pharmacokinetics of apixaban in patients with atrial fibrillation and acute stroke // *Pharmgenomics. Pers. Med.* 2018. Vol. 11. P. 43–49.
  147. Жестовская А и др. роль CYP3A4 P450 в метаболизме лекарственных препаратов при хронической сердечной недостаточности // *Врач*. 2016. № 9. С. 54–57.
  148. Сычѳв Д.А. и др. Изучение активности изоферментов цитохрома P450 для прогнозирования межлекарственных взаимодействий лекарственных средств

- в условиях полипрагмазии // Фармакогенетика и фармакогеномика. 2016. № 2. С. 4-11.
149. Арсланбекова С. М., Сычев Д. А., Мирзаев К. б., Казаков Р. Е., Смирнов В. В., Магомедова Н. М. Голухова. Е. З. Активность цитохрома Р450 (СYP2С9), оцененная по лозартановому тесту, как прогностический фактор подбора терапевтической дозы варфарина у пациентов в отдаленные сроки после протезирования клапанов сердца. 2015. Т. 10, № 126. С. 70–74.
150. Denisenko N.P. et al. Urine metabolic ratio of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphisms in Russian peptic ulcer patients // Pharmgenomics. Pers. Med. 2017. Vol. 10. P. 253–259.
151. Denisenko N.P. et al. CYP3A and CYP2C19 activity in urine in relation to CYP3A4, CYP3A5, and CYP2C19 polymorphisms in Russian peptic ulcer patients taking omeprazole // Pharmgenomics. Pers. Med. 2018. Vol. 11. P. 107–112.
152. Denisenko N.P. et al. Urine metabolic ratio of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphisms in Russian peptic ulcer patients // Pharmgenomics. Pers. Med. 2017. Vol. 10. P. 253–259.
153. Сычёв Д.А. и др. сопоставление активности изофермента цитохрома Р450 СYP2С9 у пациентов пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста // Фармакогенетика и фармакогеномика. 2016. № 2. С. 19–23.
154. Застрожин М.С., Сычев Д.А., Черников А.В., Гришина Е.А., Смирнов В.В., Савченко Л.М., Романов А.С., Галактионова Т.Е., Комаров С.Д., Рыбицкая М.В. Брюн.Е.А. Фармакогенетические аспекты профиля эффективности и безопасности антидепрессантов у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью // Наркология. 2017. Т. 16, № 3. С. 74–81.
155. Застрожин М.С. и др. Влияние Карбамазепина на активность изофермента цитохрома Р450 3а4 У Больных Алкоголизмом // Экспериментальная И

- Клиническая Фармакология. 2016. Т. 79, № 10. С. 18–21.
156. Застрожин М.С. и др. Оценка влияния активности изоферментов подсемейства CYP3A на уровень равновесной концентрации феназепам® у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью // Наркология. 2019. Т. 18, № 4. С. 34–43.
157. Застрожин М.С. и др. Влияние полиморфизма гена CYP3A5 на профиль эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью // Наркология. 2016. Т. 15, № 12. С. 42–46.
158. Sychev D.A. et al. The correlation between CYP2D6 isoenzyme activity and haloperidol efficacy and safety profile in patients with alcohol addiction during the exacerbation of the addiction // *Pharmgenomics. Pers. Med.* 2016. Vol. 9. P. 89–95.
159. Застрожин М.С., Смирнов В.В., Сорокин А.С., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Бедина И.А., Шипицын В.В., Савченко Л.М., Бузик О.Ж., Сычев Д.А. Влияние активности CYP2D6 на эффективность и безопасность флувоксамина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью // *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2018. Т. 73, № 6.
160. Застрожин М.С., Антоненко Е.П., Панкратенко Е.П., Смирнов В.В., Рыжикова К.А., Иванов А.В., Бедина И.А., Бузик О.Ж., Шипицын В.В., Копоров С.Г., Брюн Е.А. Сычев. Д.А. Влияние активности CYP2D6 на эффективность и безопасность миртазапина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью. // *Наркология.* 2019. № 2. С. 60-68.
161. Застрожин М. С. Фармакогенетический подход к назначению галоперидола у больных, страдающих алкогольной зависимостью, в период актуализации патологического влечения: дис. канд. м. наук: 14.03.06. - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, 2016 - 143 с.