

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

Научные консультанты:

доктор фармацевтических наук,
профессор

Раменская Галина Владиславовна

академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Кукес Владимир Григорьевич

Официальные оппоненты:

Каленикова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор, ФГАОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, кафедра фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела, заведующая кафедрой

Батищева Галина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н.Бурденко» Минздрава России, кафедра клинической фармакологии, заведующая кафедрой

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет» Минобрнауки России

Защита состоится «24» февраля 2021г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.001.11 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д.8 стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан: «___» _____ 20 ___ г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор



Дроздов Владимир Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 невозможность 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 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 [Dong Y. Et al., 2015].

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 [Kim B. Et al., 2018; Lee J. Et al., 2017], 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 [Shin K.-H. Hetal., 2016].

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 J.H., Wilkinson G.R., McGraw J., Tanaka E., Shin K.-N., Bosilkovska M., Vodin 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 [Dumond J.B. et al., 2010].

Также в научных, научно-методических трудах и практических рекомендациях Кукуеса 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 или другие причины, не позволяющие использовать дейтерированные стандарты веществ;
- большое число методик оценки активности изоферментов системы СYP450, 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.

Цель исследования: научная разработка, с использованием современных методов анализа и методологии фенотипирования, комплексного подхода оценки активности изоферментов системы цитохрома P450 для изучения фармакокинетики лекарственных средств на различных этапах их исследования *in vivo* и персонализации фармакотерапии при их применении.

Задачи исследования:

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 CYP450 с помощью различных субстратов.
5. Оценить возможность использования разработанных методик для выявления индуцирующего или ингибирующего воздействия ЛС на систему CYP450 на этапе доклинических исследований, на примере препарата Афобазол.
6. Изучить связь генотипирования и фенотипирования пациентов по активности CYP450 при фармакотерапии антикоагулянтами.
7. Провести сопоставление активности CYP450 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, маркеров, 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 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 явля-

ется 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 также 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 клинко-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 персонализации фармакотерапии.

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

Положения выносимые на защиту

1. Разработанные методики количественного определения кортизола, 6 β -гидрокортизола, холестерина, 4 β -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 CYP2C9.

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 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 (LinJ.H., WilkinsonG.R., McGrawJ., TanakaE., ShinK-N., BosilkovskaM., BodinK. 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 тандемным 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. Для работы использовали биообъекты, полученные в различных учреждениях города Москвы с 2011 по 2019 гг., таких как ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» Минздрава России (рук. д.м.н., проф.,

акад. РАН Голухова Елена Зеликовна), ГБУЗ «Московский научно-практический центр наркологии» ДЗ Москвы (рук. д.м.н., проф, Брюн Е.А.), ГБУЗ «Городская клиническая больница имени И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы» (гл. врач д.м.н., проф. Васильева Е.Ю.), ГКБ №1 им Н. И. Пирогова ДЗ Москвы (гл. врач к.м.н. Свет А.В.), СПб ГБУЗ «Больница им. П.П. Кащенко» Комитета по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга(гл. врач д.м.н. Лиманкин О. В.) и др. (все организации указаны в соответствующих главах и приведены в публикациях). Основными нормативными документами, регламентирующими процесс разработки и валидации биоаналитических методик, являлись действующие регуляторные документы НЦ ЭСМП Минздрава России, FDA, ЕМА.

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

Степень достоверности результатов 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 научной работы Основные положения диссертации были доложены и обсуждены на большом количестве научных конгрессов и конференций, в том числе на IV съезд фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (г. Казань, 2014г.), 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 «Фармобразование-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.), V съезде фармакологов России «Научные основы

поиска и создания новых лекарств» (г. Ярославль 2018), 4-м ежегодном Московском конгрессе "Вотчаловские чтения", посвященном вопросам клинической фармакологии с позиции основоположника академика Вотчала Б.Е. (г. Москва, 2018 г.), Всероссийском совещании и международной практической конференции «Актуальные вопросы клинической фармакологии и лекарственного обеспечения» (г. Ярославль 2018), EAACI Congress (г. Лиссабон, 2019 г.), Международной научно-практической конференции «Современные аспекты медицины и фармации: образование, наука и практика» (г. Шымкент, 2019 г.), 5-м 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.) и других конгрессах и конференциях. 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 персонализации фармакотерапии. Полученные результаты также отражены в учебно-методических пособиях «Инструменты персонализированной медицины и клинической фармакологии для проведения индивидуальной и безопасной фармакотерапии» (Под ред. В.Г. Кукеса, Москва 2017г.), «Метаболизм лекарственных средств с позиции персонализированной медицины» (Москва, 2016г.), «Клиническая фармакология жизненно необходимых и важнейших антибактериальных препаратов» (Москва, 2016г.) для врачей общей практики, ординаторов, аспирантов и студентов старших курсов медицинских и фармацевтических ВУЗов.

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, а так же кафедры клинической фармакологии и терапии терапевтического факультета ФГБОУ ДПО «Российской медицинской академии непрерывного образования» МЗ РФ. Полученные результаты внедрены в работу лаборатории клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России, в работу отдела клинической фармакокинетики Центра Клинической Фармакологии и ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, в работу лаборатории фармакокинетики ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова" РАН. Все внедрения подтверждены соответствующими актами.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исходя из подробного анализа литературы, был сделан выбор основных изоферментов. Для исследования были выбраны: СYP1A2, СYP2C9, СYP2C19, СYP2D6 и СYP3A4. Для определения активности этих основных изоферментов нами были выбраны пары субстрат/метаболит, которые приведены в таблице 1. В случае изоферментов СYP1A2, СYP2C9, СYP2C19 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 СYP3A4 были выбраны две пары эндогенных субстратов и метаболитов, в связи с тем, что оба из этих вариантов представляются эффективными и безопасными для пациентов и не требуют введения дополнительных ксенобиотиков. В качестве внутренних стандартов для всех веществ, кроме пинолина и его метаболита, были использованы дейтерированные производные определяемых веществ (Таблица 1). Для исследования пинолина и его метаболита не удалось найти дейтерированных стандартов. Для пинолина и его метаболита внутренний стандарт подбирали с учетом структурной формулы, молекулярной массы и значения рКа. В качестве внутреннего стандарта подобран галантамин (Таблица 1).

Таблица 1. Выбранные изоферменты CYP450 и пары субстрат/метаболит для оценки их активности, а также используемые внутренние стандарты

Эндогенные вещества		Внутренние стандарты
CYP3A4	кортизол/6 β -гидроксикортизол	Кортизол-D4
		6- β -гидроксикортизол-D4
CYP3A4	холестерин/4 β -гидроксихолестерин	Холестерин-D4
		D7-4- β -гидроксихолестерин
CYP2D6	пинолин/6-НО-ТНВС	Галантамин
Ксенобиотики		
CYP1A2	кофеин/параксантин	Кофеин-D3
		Параксантин-D3
CYP2C9	лозартан/EXP-3174	Лозартан-D4
		EXP-3174-D3
CYP2C19	омепразол/5-гидроксиомепразол	Омепразол-D3
		5-гидроксиомепразол- D3

Исходя из практических задач, поставленных перед нами, были выбраны соответствующие биообъекты для различных изоферментов.

Отбор проб проводился таким образом, чтобы гарантировать отсутствие изменений в составе образца, как с качественной, так и с количественной стороны.

CYP1A2. Определение активности изофермента CYP1A2 использовалось нами в доклинических исследованиях, в связи с этим объектом исследования была моча крыс. 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 50 мг/кг).

CYP 2C19. В качестве биообъекта была выбрана моча. Пациент принимал на ночь одну таблетку омепразола (40 мг) или по 1 таблетке (20 мг) утром и вечером. Отбирали мочу через 8 часов после последнего приема препарата, утром до приема пищи (и других ЛС).

CYP 2C9. В качестве объекта была выбрана моча добровольцев. Доброволец принимал 25 мг лозартана утром натощак, сбор мочи осуществлялся через 6 часов после приема (лозартан обладает легким мочегонным эффектом).

СУР 2D6. В качестве биообъекта была выбрана моча добровольцев. 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/6 β -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 6 β -гидрокортизол/кортизол подходит как моча, так и плазма крови. В нашем исследовании моча добровольцев отбиралась утренняя, до приема пищи и других ЛС. В это же время отбиралась плазма крови.

СУР3A4 (холестерин/4 β -гидроксихолестерин). Для анализа активности СУР3A4 по соотношению 4 β -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.

Условия пробоподготовки биообразцов приведены в таблице 2.

Таблица 2. Условия пробоподготовки.

Определяемые вещества	Био-жидкость	Условия пробоподготовки
6 β -гидрокортизол/кортизол	Плазма крови	В картридж для ТФЭ С18 на вакуумном экстракторе, вносили 2,0 мл MetOH, 1,0 мл деионизированной воды и 2,0 мл боратного буфера с pH 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.
	Моча	В картридж ТФЭ С18 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 методика повторяет методику для плазмы крови
4β-гидрокси-холестерин/холестерин	Плазма крови	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 С18 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. Для этого к элюату прибавляли 1,5 мг 4-диметиламинопиридина, 5,0 мг 2-метил-6-нитробензойногоангирида, 4,0 мг пиколиновой кислоты, 10 мкл триэтиламина и 75 мкл пиридина. Флакон 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.
6-НО-ТНВС/Пинолин	Моча	В картридж для ТФЭ С18, 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.
EXP-3174/Ло- зартан	Моча добро- вольцев	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.
	Моча крыс	В картридж для ТФЭ C18, 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.
5-гидроксио- мепра- зол/Омепразол	Моча	Процедуру ТФЭ проводили с использованием картриджей Sep-PakPlus 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°C . Конечный остаток повторно растворяли в 100 мкл смеси 50:50 метанол / вода (об./об.).
Параксантин/Ко- феин	Моча крыс	В пробирку помещали 500 мкл мочи испытуемых крыс. Пробирку инкубировали при температуре 37°C

		в течение 20 минут. Исследуемые вещества извлекали с помощью 0,5 мл ацетонитрила, прибавляя его в центрифужную пробирку. Содержимое пробирки перемешивали на вихревом миксере в течение 30 с. Полученный раствор центрифугировали в течение 20 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в выпарительную колбу и выпаривали досуха на роторном испарителе при 40 ⁰ С. Сухой остаток растворяли в ПФ и аликвоту вводили в хроматограф.
--	--	---

В качестве метода количественного определения был выбран метод обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс- детектором, как чувствительный и специфичный, а также самый частоиспользуемый для этой цели.

Для проведения хроматографического разделения использовались обращеннофазные колонки С18 и предколонки. С целью разделения исследуемых аналитов были разработаны методики как градиентного, так и изократического элюирования, если таковые выдерживали валидационные испытания. Общие хроматографические условия приведены в таблице 3.

Таблица 3. Общие хроматографические условия

Хроматограф	Agilent 1290 Infinity (или аналогичный)
Колонка	AgilentEclipseXDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм (или аналогичная)
Предколонка	Agilent ZorbaxEclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм Для холестерина и его метаболита: Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм
Параметры масс-детектирования	Ионизация: ESI Напряжение на капилляре: 3500 В Температура ионной трубки: 350 ⁰ С Температура ионизационной камеры: 400 ⁰ С Вспомогательный газ: 10 л/мин Газ периферийного слоя: 11 л/мин Сметающий газ: 3 л/мин Давление газа в ячейке соударений: 2,0 мТорр

Температура колонки в методике определения кортизола, холестерина, пинолина и их метаболитов – 50⁰С. Для остальных – 30⁰С. Скорость подвижной фазы для всех методик, кроме пинолина, лозартана и их метаболитов составила 1,0 мл/мин. Для пинолина и его метаболита – 0,4 мл/мин. Для лозартана и его метаболита – 0,3 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 5 мкл (для пинолина, лозартана и их метаболитов), 10 мкл (для кофеина и параксантина), 15 мкл (для омепразола и его метаболита) и 20 мкл (для холестерина, кортизола и их метаболитов).

Состав подвижных фаз и способ элюирования приведен в таблице 4.

Таблица 4. Состав подвижной фазы (ПФ) и режим элюирования.

Определяемые вещества	Состав ПФ	Режим элюирования
6 β -гидрооксикортизол/кортизол	Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в воде деионизированной Компонент В: ацетонитрил.	Градиентный
4 β -гидрокси-холестерин/холестерин	Компонент А: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в водном растворе ацетонитрила (40:60) Компонент В: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,1% растворе муравьиной кислоты в водном растворе ацетонитрила (10:90)	Градиентный
6-НО-ТНВС/Пинолин	Компонент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01 % муравьиной кислоты в воде Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле	Градиентный
EXP-3174/Лозартан	Ацетонитрил / 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде в соотношении 50:50	Изократический

5-гидроксиомепразол/Омепразол	Фосфатный буфер с рН 7,6 и ацетонитрил (76:24, v/v)	Изократический
Параксантин /Кофеин	Компонент А: раствор 5 мМаммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде. Компонент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.	Градиентный

MRM переходы для определяемых веществ указаны в таблице 5.

Таблица 5. MRM переходы определяемых веществ.

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
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
пинолин	+	203,2	174,0	15
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	+	189,2	160,0	15
галантамин	+	288,3	213,0	19
Лозартан	+	422,1	234,9	28
EXP-3174	-	435,7	282,4	28
Лозартан-d3	+	427,1	211,2	28
EXP-3174-d3	-	440,1	238,2	28
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
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

Результаты исследования

1. Валидация методик.

Валидация разработанных методик проводилась в соответствии с нормативными документами:

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.

Валидация проводилась по следующим параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы.

Для каждого параметра оценивались критерии приемлемости, на основании которых делался вывод о пригодности разработанной методики. В процессе валидации была доказана применимость методик для количественного определения выбранных веществ. В таблице 6 приведены результаты валидации.

Таблица 6. Результаты валидации

	корти- зол/6β-гид- роксикор- тизол	холесте- рин/4β-гид- роксихоле- стерин	пинолин/6- НО-ТНВС	лозар- тан/EXP- 3174	омепра- зол/5-гид- роксио- мепразол	кофеин/па- раксантин
Спец.	+	+	+	+	+	+
Линей- ность, R ²	0,9964	0,9963	0,9953	0,9968	0,9963	0,9961
	0,9982	0,9995	0,9939	0,9971	0,9963	0,9963

Эф.Мат., CV, %	11,03		10,16		11,09		7,65		7,15		6,78	
	9,84		10,04		12,22		10,12		14,18		11,09	
Точ.,RSD, %; Прец., RSD,%	QCA	6,13	QCA	6,89	QCA	8,95	QCA	7,28	QCA	8,19	QCA	9,21
	QCB	4,71	QCB	5,30	QCB	7,13	QCB	6,38	QCB	7,17	QCB	8,06
	QCC	5,02	QCC	5,64	QCC	4,67	QCC	5,00	QCC	5,62	QCC	6,32
	QCD	5,46	QCD	6,14	QCD	1,57	QCD	4,21	QCD	4,73	QCD	5,32
	QCA	4,67	QCA	5,25	QCA	6,84	QCA	7,70	QCA	8,66	QCA	9,74
	QCB	4,73	QCB	5,32	QCB	5,78	QCB	5,90	QCB	6,63	QCB	7,46
	QCC	5,73	QCC	6,44	QCC	4,12	QCC	4,93	QCC	5,54	QCC	6,23
	QCD	6,12	QCD	6,88	QCD	2,85	QCD	3,81	QCD	4,28	QCD	4,81
	QCA	6,69	QCA	7,52	QCA	9,01	QCA	7,84	QCA	8,82	QCA	9,92
	QCB	5,96	QCB	6,70	QCB	7,47	QCB	6,62	QCB	7,44	QCB	8,37
	QCC	4,40	QCC	4,95	QCC	4,81	QCC	6,75	QCC	7,59	QCC	8,53
	QCD	6,83	QCD	7,68	QCD	1,14	QCD	3,70	QCD	4,16	QCD	4,68
	QCA	5,47	QCA	6,15	QCA	9,12	QCA	8,86	QCA	9,96	QCA	11,20
	QCB	5,82	QCB	6,54	QCB	8,05	QCB	7,37	QCB	8,29	QCB	9,32
	QCC	6,48	QCC	7,29	QCC	5,61	QCC	7,64	QCC	8,59	QCC	9,66
	QCD	5,88	QCD	6,61	QCD	4,12	QCD	4,50	QCD	5,06	QCD	5,69
ПКО	10 нг/мл		10 нг/мл		0,25 нг/мл		10 нг/мл		10 нг/мл		10 нг/мл	
	10 нг/мл		10 нг/мл		0,25 нг/мл		10 нг/мл		10 нг/мл		10 нг/мл	
Пер./пр.	+		+		+		+		+		+	

Жирным шрифтом выделены значения для субстратов, без выделения – значения для соответствующих метаболитов.

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

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.

В данной работе разработана математическая методика количественного определения эндогенных веществ хроматографическим методом, представленная на рисунке 1.

Пробоподготовка и хроматографирование

Методика пробоподготовки и хроматографирования соответствует методике количественного определения кортизола и его метаболита при анализе активности СУРЗА4 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 биожидкости, экстрагируемых впоследствии в органический растворитель – имеем данные где C'_i (известные концентрации из серии стандартных разведений в органическом растворителе) соответствуют S'_i (площадям пиков на соответствующей хроматограмме), а $(x+C_i)z_j$ (неизвестные концентрации в нативной биожидкости вещества A , извлеченного в органический растворитель) соответствуют S_i .

Найдем среднее значение неизвестной концентрации \bar{x} вещества A 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

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



Рисунок 1. Алгоритм количественного определения эндогенных веществ в биологических объектах хроматографическим методом

$$x(S_1 - S_0) = C_1 S_0 - C_0 S_1 \Rightarrow x = \frac{C_1 S_0 - C_0 S_1}{S_1 - S_0}$$

Для i -го и $(i+1)$ -го измерения

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

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

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

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

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

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

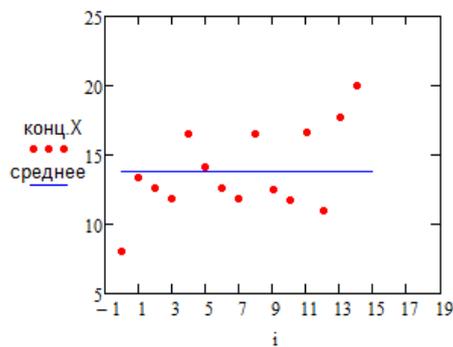


Рисунок 2. Пример генеральной совокупности неизвестных концентраций

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

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

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

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

Теперь, зная значение \bar{x} , можно найти среднее значение % экстракции \bar{z} . Для этого используем соотношения с известными концентрациями из серии стандартных разведений.

Получаем выборку случайной величины ξ_z объемом m , для которой можно посчитать среднее значение.

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

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

Выборку z_{ij} можно представить в виде матрицы $(n+1) \times m$. Таким образом, имеется выборка случайной величины ξ_z объемом $m(n+1)$.

Откуда выборочное среднее значение % экстракции определяется по формуле:

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

Также получаем выборочное СКО % экстракции:

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

Далее распределение полученных выборок необходимо проверить на нормальность.

Проверка на промахи

Для обнаружения грубых ошибок (выбросов) можно воспользоваться **критерием Граббса** в котором проверяются максимальные и минимальные значения выборки. Критическое значение критерия Граббса G_T является табулированным. 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

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

Аналогичную обработку и оценку проводят также и для % экстракции.

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.

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. Для статистической оценки полученных результатов определялась нормальность распределения по критерию Пирсона. Значимость для каждого набора данных составила $p < 0,05$, что говорит о ненормальном распределении значений. Оценка значимых различий между способами расчета значений кортизола определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона. Асимптотическая значимость $p = 0,029$, $p < 0,05$, что говорит о наличии статистически значимых различий между способами расчета значений кортизола. 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. Из этого можно сделать вывод, что определение метаболической активности можно проводить любым из двух методов – с дейтерированными внутренними стандартами и с помощью разработанного математического аппарата.

3. Сравнение методик оценки активности изофермента СYP3A4 с помощью отношения концентраций 6-β-гидрокортизол/кортизол и 4β-гидроксихолестерин/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 100 мг утром и на ночь). Прием продолжался 3 дня. Через день после последнего приема рифампицина утром у добровольцев отбирали биожидкости.

Для оценки разницы между способами определения активности СYP3A4 изучалось наличие статистически значимых различий между отношением метаболических индексов двух способов оценки до и после приёма препарата. Определялась нормальность распределения по критерию Шапиро-Уилка, значимость $p=0,010$ для кортизола и $p=0,021$ для холестерина, что говорит о ненормальности распределения значений отношения метаболических индексов. Оценка значимых различий между методами определения активности СYP3A4 определялась непараметрическим критерием знаковых рангов Вилкоксона. Асимптотическая значимость $p=0,140$, $p>0,05$, что говорит об отсутствии статистически значимых различий между методами определения активности СYP3A4 по кортизолу и холестерину. Полученные данные свидетельствуют, что оценку метаболической активности можно проводить как с помощью отношения концентраций 6-β-гидрокортизол/кортизол так и 4β-гидроксихолестерин/холестерин.

4. Использование разработанных методик в доклинических исследованиях лекарственных средств.

Комбинированное применение лекарственных средств 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. Поэтому влияние новых лекарств на изоформы цитохрома

P-450 необходимо оценивать уже на доклиническом этапе в экспериментальных исследованиях *in vitro* и *in vivo*.

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 оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом (лозартан) изофермента CYP2C9 и *in vivo* оценка метаболического отношения маркёров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов. Для исследования фармакокинетического взаимодействия афобазола с лозартаном 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 таковую. 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.

В результате исследования статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами метаболического отношения метаболита E-3174 к лозартану в плазме крови животных групп I и II. В то же время наибольшая величина отношения концентрации метаболита к лозартану получена после 4-дневного введения афобазола в дозе 25 мг/кг (группа III). Данный параметр достоверно отличается от контроля. Значение метаболического отношения 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.

Для исследования *in vivo* оценки метаболического отношения маркёров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов на той же базе анализировали 48 белых беспородных крыс-самцов (220 ± 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.

Режим дозирования индукторов и ингибиторов основывали на величинах периодов полувыведения. 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-маркера 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 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-маркера.

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-маркером.

Индущирующий или ингибирующий эффекты оценивали по абсолютным величинам метаболических отношений.

Проведенное исследование, с одной стороны, подтвердило отсутствие у афобазола в дозе, соответствующей терапевтической, способности вызывать сдвиги в активности изоферментов CYP450, участвующих в метаболизме ряда лекарств, что позволяет исключить зависимое от CYP2C9 и CYP1A2 фармакокинетическое взаимодействие. В то же время выявлено, что афобазол в дозе 25 мг/кг проявляет умеренный индуцирующий эффект на CYP2C9. С другой стороны, полученные результаты демонстрируют адекватность применения *in vivo* методологии для изучения влияния новых фармакологических средств на активность изоформ P-450 с использованием стандартных модификаторов и субстратов-маркёров.

5. Использование разработанных методик в клинических исследованиях лекарственных средств.

Совместно с член-корр. РАН Д.А. Сычевым и его сотрудниками был выполнен ряд работ по изучению в клинических условиях новых антикоагулянтов. Нами были представлены результаты оценки активности CYP3A4 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. 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. Ривароксабан метаболизируется в печени при помощи CYP3A4. Сопутствующая терапия ингибиторами CYP3A4 может привести к увеличению концентрации ривароксабана в сыворотке, вызывая побочные реакции, такие как кровотечение. Противоположный эффект наблюдается при назначении ривароксабана с CYP3A4-индуцирующими агентами, что приводит к снижению концентрации ривароксабана и, следовательно, снижению его антикоагулянтного эффекта. Также важно помнить, что ген CYP3A4 имеет однонуклеотидные полиморфизмы, которые влияют на активность CYP3A4 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 в возрасте

21–83 лет (18 мужчин и 13 женщин) с ТГВ был включен в это исследование. Все пациенты принимали ривароксабан 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. 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 СYP3A4 определяли по разработанной методике с использованием дейтерированного стандарта. Нормальность распределения образца оценивали с использованием критерия Шапиро – Уилкса. 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.

Средняя концентрация ривароксабана составила 59,0 - 89,3 нг/мл, минимальный уровень составлял 51,5 - 84,2 нг/мл. Соотношение 6- β -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 обнаружена прямая статистически достоверная корреляция между активностью СYP3A4 и максимальной концентрацией ривароксабана с $r = 0,695$ (0,443–0,845), $p < 0,0001$, а также между активностью СYP3A4 и средним уровнем ривароксабана с $r = 0,766$ (0,558–0,884), $p < 0,0001$ (рисунок 34). Корреляция была также найдена между начальной длиной сгустка и временем до полной реканализации с $r = 0,764$ (0,554–0,883), $p < 0,0001$.

Исходя из полученных данных был сделан вывод, что активность СYP3A4 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.

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 (НОАС) у пациентов с фибрилляцией предсердий (ФП).

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).

Основной целью исследования было определение взаимосвязи 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.

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 изучаемых препаратов менее вариабельна в группе с AG генотипом согласно CV%, но количество пациентов в этой группе составило всего 3 пациента. Что касается активности CYP3A, группа с AG генотипом показала широкий разброс SD, и это может быть связано с высокой активностью ферментов одного пациента. Межгрупповое сравнение показало, что соотношение 6β-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 (AUC, C_{max}) и метаболической активностью CYP3A4.

Так же 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 желудка.

Мы провели это исследование, чтобы выяснить применимость фенотипирования по метаболическому соотношению омепразола в моче для определения активности CYP2C19 у российских пациентов с язвенной болезнью с CYP2C19 генотипами.

В исследование 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). 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). 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 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. 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%. MM 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). Статистически значимая разница в метаболическом соотношении (U-критерий Манна-Уитни) была обнаружена между УМ и БМ ($p = 0,001$) и при множественном сравнении критериев Крускала – Уоллиса ($p = 0,005$);).

Частота аллелей CYP2C19*2, CYP2C19*3 и CYP2C19*17 у российских больных язвенной болезнью в нашем исследовании сопоставима с данными, описанными для европейцев. CYP2C19*3 встречается у <1% европейцев (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.

Еще одним вариантом использования разработанных методик в клинических исследованиях было изучение корреляции между метаболической активностью и возрастом. Клиническое исследование проводилось на базе терапевтического отделения Городской клинической больницы № 23 им. «Медсантруд» ДЗ г.Москвы (ныне ГБУЗ «Городская клиническая больница имени И.В. Давыдовского Департамента здравоохранения города Москвы»). 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. 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. Определение концентрации лозартана и E-3174 в моче проводилось с помощью разработанной методики. 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. Статистический анализ результатов проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20. 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 $3,28 \pm 0,77$. У пациентов молодого возраста отношение E-3174/ лозартан, концентрация E-3174 и концентрация лозартана оказались выше, чем у пациентов пожилого и старческого возраста. Разница в метаболических отношениях указывает на то, что подходы к дозированию у данных групп должны быть индивидуальными.

5. Использование разработанных методик в клинической практике

Совместно с к.м.н. Застрожиным М.С. был выполнен ряд исследований, направленный на изучение и разработку подходов к коррективке фармакотерапии у больных алкоголизмом. 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 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.

Еще одним исследованием была оценка влияния активности изоферментов подсемейства CYP3A на уровень равновесной концентрации Феназепам® у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью. В исследовании принимали участие 94 пациента мужского пола (средний возраст — $35,19 \pm 6,94$ года). Результаты корреляционного анализа между показателями концентрация/доза феназепам®

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®. 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.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании научного анализа данных литературы нами для последующего исследования были выбраны изоферменты: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4. Для определения активности указанных изоферментов также были подобраны пары субстрат/метаболит. В случае изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 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 CYP3A4 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 исключи-

тельно 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 СYP3A4 с помощью концентрационных соотношений его эндогенных субстратов: кортизола и холестерина и проведенная статистическая обработка данных по определению активности СYP3A4 с помощью двух разных эндогенных субстратов показала отсутствие статистических различий в полученных результатах. Оценка значимых различий между методами определения активности СYP3A4 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 СYP3A4.

5. Результаты определения индуцирующего и ингибирующего действия афобазола на изоферменты СYP1A2 и СYP2C9, 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 СYP2C9. Так же показано, что афобазол в дозе, соответствующей терапевтической, не влияет на активность СYP2C9 и СYP1A2. Кроме этого установлено, что афобазол в дозе 25 мг/кг проявляет умеренный индуцирующий эффект на СYP2C9.

6. При изучении взаимосвязи генотипирования и фенотипирования пациентов по активности СYP450 при фармакотерапии антикоагулянтами было выявлено, что метаболическая активность СYP3A определялась в каждой группе пациентов с разными генотипами СYP3A5 (rs776746). Различия в активности СYP3A в группах не достигли статистической значимости. Фармакокинетика является более устойчивой в группе AG согласно CV%, что касается активности СYP3A, группа AG показала широкий спектр SD, что может быть связано с высокой активностью ферментов одного пациента. Межгрупповое сравнение показало, что соотношение 6β -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 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.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Способ активации изофермента P450 (CYP) 3A4 у пациентов с хронической сердечной недостаточностью: патент на изобретение RUS 2554775 C1 МПК А61К 31/4415 А61Р 9/04 /Кукес В.Г., Прокофьев А.Б., Чеча О.А., Горошко О.А., Смирнов В.В., и др.; заявитель и патентообладатель: ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ – заявка №2014103352/15 дата заявки 2014.02.03; опубликовано: 2015.06.27, Патент - 2016
2. Оценка влияния активности изоферментов подсемейства CYP3A на уровень равновесной концентрации Феназепам® у пациентов с тревожными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью/ Застрожин М.С., Панов А.С., Петухов А.Е., **Смирнов В.В.**, Панкратенко Е.П., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Сорокин А.С., Савченко Л.Д., Брюн Е.А., Сычев Д.А. // **Наркология**. 2019. Т. 18. № 4. С. 34-43.
3. Влияние активности CYP3A на эффективность и безопасность карбамазепина у пациентов с аффективными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью/ Застрожин М.С., Панов А.С., Гришина Е.А., **Смирнов В.В.**, Рыжикова К.А., Шипицын В.В., Иванов А.В., Скрябин В.Ю., Сорокин А.С., Савченко Л.Д., Брюн Е.А., Сычев Д.А. // **Наркология**. 2019. Т. 18. № 2. С. 60-68.
4. Effects of CYP2D6 activity on the efficacy and safety of mirtazapine in patients with depressive disorders and comorbid alcohol use disorder / Zastrozhin M.S., Skryabin V.Yu., **Smirnov V.V.**, Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Chumakov E.M., Bryun E.A., Sychev D.A. // **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 2019. Т. 97. № 8. С. 781-785.
5. **Smirnov V.V.** Metabolic activity deviations in patients with hormone-dependent asthma / Egorenkov E., **Smirnov V.V.**, Miasnikova T., Tchervinskaya T., Kurbacheva O., Khaitov M. // **Allergy**. - 2019. - Т. 74, № S106. - С. 721.
6. Влияние активности CYP2D6 на эффективность и безопасность флувоксамина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью / 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., Копоров С.Г., Брюн Е.А., Сычев Д.А. // **Вестник Российской академии медицинских наук**. 2018. Т. 73. № 6. С. 411-419.
7. Оптимизация персонализированной терапии пациентов с Хсн /Кукес В., Ших Е., Жестовская А., Прокофьев А., Дроздов В., **Смирнов В.В.**, Павлова Л. // **Врач**. 2018. Т. 29. № 2. С. 69-70.
8. Влияние активности CYP2D6 на эффективность и безопасность миртазапина у пациентов с депрессивными расстройствами, коморбидными с алкогольной зависимостью /

Застрожин М.С., Антоненко А.П., Панкратенко Е.П., **Смирнов В.В.**, Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Иванов А.В., Бедина И.А., Бузик О.Ж., Шипицын В.В., Копоров С.Г., Брюн Е.А., Сычев Д.А. // **Наркология**. 2018. Т. 17. № 12. С. 60-68.

9. CYP3A activity and rivaroxaban serum concentrations in russian patients with deep vein thrombosis /Sychev D.A., Vardanyan A., Badanyan A., Denisenko N., Rozhkov A., Hachatryan E., **Smirnov V.**, Ananichuk A. // **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**. 2018. Т. 22. № 1. С. 51-54.

10. The influence of CYP3A5 polymorphisms on haloperidol treatment in patients with alcohol addiction /Zastrozhin M.S., Grishina E., Ryzhikova K.A., **Smirnov V.V.**, Savchenko L.M., Bryun E.A., Sychev D.A. // **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2018. Т. 11. С. 1-5.

11. CYP3A and CYP2C19 activity in urine in relation to cyp3a4, cyp3a5, and cyp2c19 polymorphisms in russian peptic ulcer patients taking omeprazole/ Denisenko N.P., Ryzhikova K.A., Sozaeva Z.A., Grishina E.A., Sychev D.A., Sizova Z.M., **Smirnov V.V.** // **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2018. Т. 11. С. 107-112.

12. Influence of ABCB1 and CYP3A5 gene polymorphisms on pharmacokinetics of apixaban in patients with atrial fibrillation and acute stroke/ Kryukov A.V., Sychev D.A., Andreev D.A., Ryzhikova K.A., Grishina E.A., Ryabova A.V., Loskutnikov M.A., **Smirnov V.V.**, Konova O.D., Matsneva I.A., Bochkov P.O.// **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2018. Т. 11. С. 43-49.

13. Which cytochrome p450 metabolizes Phenazepam? Step by step in silico, in vitro, and in vivo studies/ Ivashchenko D.V., Rudik A.V., Poloznikov A.A., Nikulin S.V., **Smirnov V.V.**, Tonevitsky A.G., Bryun E.A., Sychev D.A.// **Drug Metabolism and Personalized Therapy**. 2018. Т. 33. № 2. С. 65-73.

14. Ассоциация полиморфизма гена CYP3A4*22 с безопасностью феназепама у пациентов с синдромом отмены алкоголя/Иващенко Д.В., Терещенко О.В., **Смирнов В.В.**, Рыжикова К.А., Созаева Ж.А., Пименова Ю.А., Гришина Е.А., Застрожин М.С., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Сычев Д.А.//Фармакогенетика и фармакогеномика. 2018. № 2. С. 4-11.

15. Метаболическая активность CYP3A4 у больных гормонзависимой бронхиальной астмой/ Красных Л.М., **Смирнов В.В.**, Егоренков Е.А., Червинская Т.А., Курбачева О.М.// **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2017. Т. 80. № 11. С. 7-9.

16. Фармакогенетические аспекты профиля эффективности и безопасности антидепрессантов у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью/ 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.// **Наркология**. 2017. Т. 16. № 3 (183). С. 74-81.
17. Возможности применения антидепрессантов для лечения коморбидных больных с депрессивными расстройствами, страдающих алкогольной зависимостью/ Застрожин М.С., Сычев Д.А., Гришина Е.А., **Смирнов В.В.**, Савченко Л.М., Пахомов С.Р., Агузаров А.Д., Доворов Д.В., Рыбицкая М.В., Брюн Е.А.// **Наркология**. 2017. Т. 16. № 1 (181). С. 82-86.
18. Изучение влияния активности изоферментов подсемейства CYP3A на показатель уровня равновесной концентрации галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью/ Застрожин М.С., Сычев Д.А., Мирошниченко И.И., Баймеева Н.В., Нечаев М.О., Гришина Е.А., Созаева Ж.А., Иващенко Д.В., **Смирнов В.В.**, Дюжев Д.В., Савченко Л.М., Пахомов С.Р., Скрябин В.Ю., Брюн Е.А.// **Психическое здоровье**. 2017. Т. 15. № 3 (130). С. 42-48.
19. Сопоставление активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 у пациентов пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста/ Сычев Д.А., Бордовский С.П., Никулин В.Э., Польшина Н.И., Аникин Г.С., Данилина К.С., **Смирнов В.В.**// **Медицинский вестник Северного Кавказа**. 2017. Т. 12. № 3. С. 250-253.
20. Do CYP2C19 and ABCB1 gene polymorphisms and low CYP3A4 isoenzyme activity have an impact on stent implantation complications in acute coronary syndrome patients?/ Rytkin E., Mirzaev K.B., Grishina E.A., **Smirnov V.V.**, Ryzhikova K.A., SozaevaZh.A., GiliarovM.Iu., Andreev D.A., Sychev D.A.// **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2017. Т. 10. С. 243-245.
21. Urine metabolic ratio of omeprazole in relation to CYP2C19 polymorphisms in russian peptic ulcer patients/ Denisenko N., Sychev D., SizovaZh., **Smirnov V.**, Ryzhikova K., SozaevaZh., Grishina E.// **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2017. Т. 10. С. 253-259.
22. Genotyping and phenotyping of CYP2D6 and CYP3A isoenzymes in patients with alcohol use disorder: correlation with haloperidol plasma concentration/ Zastrozhin M.S., Bryun E.A., Skryabin V.Y., Sychev D.A., Grishina E.A., Ryzhikova K.A., Mirzaev K.B., Markov D.D.,

Snalina N.E., Savchenko L.M., Miroshnichenko I.I., Baymeeva N.V., **Smirnov V.V.**, Nosikova P.G.// **Drug Metabolism and Personalized Therapy**. 2017. Т. 32. № 3. С. 129-136.

23. Методики фенотипирования изофермента CYP3A4, применяемые для персонализации фармакотерапии/Егоренков Е.А., **Смирнов В.В.**, Кузина В.Н., Дементьев С.П., Раменская Г.В.//Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2017. Т. 7. № 1. С. 20-24.

24. Осложнения чрескожного коронарного вмешательства у пациентов с острым коронарным синдромом: связь с полиморфизмами генов CYP2C19, ABCB1, CYP3A5 и активностью изофермента CYP3A4/Рыткин Э.И., Мирзаев К.Б., **Смирнов В.В.**, Рыжикова К.А., Созаева Ж.А., Андреев Д.А., Сычѐв Д.А.//Фармакогенетика и фармакогеномика. 2017. № 2. С. 26.

25. Взаимосвязь между генетическими полиморфизмами по CYP3A5 и метаболическим отношением 6-гидрокортизол/кортизол в моче у пациентов, принимающих омепразол/Айсин Ф.Р., Денисенко Н.П., Сычѐв Д.А., Рыжикова К.А., **Смирнов В.В.**, Гришина Е.А., Созаева Ж.А.//Фармакогенетика и фармакогеномика. 2017. № 2. С. 5-6.

26. **Смирнов В.В.** Взаимосвязь между генетическими полиморфизмами по CYP2C19 и метаболическим отношением 5-гидроксиомепразол/омепразол в моче у пациентов с язвенной болезнью / Денисенко Н.П., Сычев Д.А., Сизова Ж.М., **Смирнов В.В.** , Гришина Е.А., Рыжикова К.А. // В сборнике: МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА 2017 сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - 2017. - С. 522-523.

27. Инструменты персонализированной медицины и клинической фармакологии для проведения индивидуальной и безопасной фармакотерапии/ Под ред. В.Г. Кукес, Е.К. Гинтер, А.А. Свистунов и др. – М.: Издательство АНО «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов», 2017. – 64 с.

28. Фармакогенетические аспекты профиля эффективности и безопасности галоперидола у пациентов с аддиктивными расстройствами/ Застрожин М.С., Лепяхин В.К., Сычев Д.А., Гришина Е.А., **Смирнов В.В.**, Савченко Л.М., Брюн Е.А., Сорокин А.С., Наумова А.Г., Иванюк А.В. // **Молекулярная медицина**. 2016. Т. 14. № 6. С. 27-34.

29. Влияние карбамазепина на активность изофермента цитохрома P450 3A4 у больных алкоголизмом/ Застрожин М.С., **Смирнов В.В.**, Сычев Д.А., Савченко Л.М., Брюн

Е.А., Гущина Ю.Ш., Матис О.А., Нечаев М.О., Наумова А.Г.// **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2016. Т. 79. № 10. С. 18-21.

30. Роль CYP3A4 P450 в метаболизме лекарственных препаратов при хронической сердечной недостаточности/ Жестовская А., **Смирнов В.В.**, Прокофьев А., Кукес В., Сычев Д.// **Врач**. 2016. № 9. С. 54-57.

31. Влияние полиморфизма гена CYP3A5 на профиль эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью/ Застрожин М.С., Сычев Д.А., Гришина Е.А., Рыжикова К.А., Калле Е.Г., Марков Д.Д., **Смирнов В.В.**, Рыбницкая М.В., Савченко Л.М., Брюн Е.А.// **Наркология**. 2016. Т. 15. № 12 (180). С. 42-46.

32. The correlation between CYP2D6 isoenzyme activity and haloperidol efficacy and safety profile in patients with alcohol addiction during the exacerbation of the addiction/ Sychev D.A., Zastrozhin M.S., Grishina E.A., Savchenko L.M., Bryun E.A., **Smirnov V.V.**// **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**. 2016. Т. 9. С. 89-95.

33. Изучение метаболической активности у пациентов с лекарственной аллергией "коктейльным" методом фенотипирования/ Егоренков Е.А., **Смирнов В.В.**, Мясникова Т.Н., Романова Т.С.// **Разработка и регистрация лекарственных средств**. 2016. № 3 (16). С. 170-172.

34. "Коктейльные" методы определения метаболической активности изоферментов цитохрома P-450 in vivo с помощью биоаналитических методик: обзор существующих методик и перспектива их использования в клинической практике/ Егоренков Е.А., **Смирнов В.В.**// **Разработка и регистрация лекарственных средств**. 2016. № 1 (14). С. 184-188.

35. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболина с целью определения активности изофермента CYP2D6/ Абдрашитов Р.Х., Петухов А.Е., **Смирнов В.В.**// **Разработка и регистрация лекарственных средств**. 2016. № 1 (14). С. 190-194.

36. Ассоциация активности цитохрома CYP3A4 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих алкогольной зависимостью, в период актуализации патологического влечения/Застрожин М.С., **Смирнов В.В.**, Сычев Д.А., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Есакова А.П., Сорокин А.С., Гущина Ю.Ш., Санникова Н.В.//**Психиатрия, психотерапия и клиническая психология**. 2016. № 1 (23). С. 91-97. (Беларусь)

37. Определение активности ферментов метаболизма лекарственных средств - перспектива использования в клинической практике/**Смирнов В.В.**, Егоренков Е.А., Красных Л.М., Василенко Г.Ф., Раменская Г.В.//Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2016. № 4. С. 28-32.
38. Перспективы использования "коктейльных" методов определения активности изоферментов цитохрома P450 in vivo с целью рационализации фармакотерапии/ Егоренков Е.А., **Смирнов В.В.**, Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Раменская Г.В.\\ Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016. № 1. С. 33-37.
39. Сопоставление активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 у пациентов пожилого и старческого возраста и у здоровых добровольцев первого периода зрелого возраста/Сычѳв Д.А., Бордовский С.П., Никулин В.Э., Польшина Н.И., Аникин Г.С., Данилина К.С., **Смирнов В.В.**, Отделенов В.А.//Фармакогенетика и фармакогеномика. 2016. № 2. С. 19-23.
40. Изучение активности изоферментов цитохрома P450 для прогнозирования межлекарственных взаимодействий лекарственных средств в условиях полипрагмазии/ Сычѳв Д.А., Отделенов В.А., Денисенко Н.П., **Смирнов В.В.**// Фармакогенетика и фармакогеномика. 2016. № 2. С. 4-11.
41. Метаболизм лекарственных средств с позиции персонализированной медицины/ Сост. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Архипов В.В. и др. – М.: Издательство АНО «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов», 2016 – 64с.
42. Клиническая фармакология жизненно необходимых и важнейших антибактериальных препаратов/ Сост.: Кукес В.Г., Свистунов А.А., Олифир Ю.В. и др. – М.: Издательство АНО «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов», 2016 - 344 с.
43. Оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента цитохрома P450 CYP2C9/ Грибакина О.Г., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., **Смирнов В.В.**, Шевченко Р.В., Жердев В.П.// **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2015. Т. 78. № 12. С. 18-22.
44. Ассоциация активности изофермента CYP2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю/ Сычев Д.А., Застрожин М.С., Смирнов В.В., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Гущина

Ю.Ш., Сорокин А.С., Агузаров А.Д. // **Вестник Российского государственного медицинского университета**. 2015. № 4. С. 36-39.

45. Активность цитохрома P450 (CYP2C9), оцененная по лозартановому тесту, как прогностический фактор подбора терапевтической дозы варфарина у пациентов в отдаленные сроки после протезирования клапанов сердца/ Арсланбекова С.М., Сычев Д.А., Мирзаев К.Б., Казаков Р.Е., **Смирнов В.В.**, Магомедова Н.М., Голухова Е.З.// **Российский кардиологический журнал**. 2015. Т. 20. № 10. С. 70-74.

46. Взаимосвязь активности изофермента цитохрома P-450 3A4 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю/ Застрожин М.С., **Смирнов В.В.**, Сычев Д.А., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Гущина Ю.Ш., Есакова А.П., Галактионова Т.Е.// **Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова**. 2015. Т. 23. № 4. С. 51-56.

47. Перспективы методики оценки активности CYP2D6 с применением пинолина/ Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., **Смирнов В.В.**// **Фармация**. 2015. № 5. С. 41-44.

48. Влияние метаболической активности изофермента CYP3A4 и полиморфных маркеров гена CYP2C19 на антиагрегантный эффект клопидогрела у больных с острым коронарным синдромом, перенесших чрескожное коронарное вмешательство/ Мирзаев К.Б., Казаков Р.Е., **Смирнов В.В.**, Андреев Д.А., Сычев Д.А.// **Рациональная фармакотерапия в кардиологии**. 2015. Т. 11. № 4. С. 344-354.

49. Синтез и метаболизм холестерина в организме человека/Дмитриев В.А., Горошко О.А., Кукес В.Г., **Смирнов В.В.**, Руднев С.Г.// **Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия**. 2015. № 2. С. 8-13.

50. Влияние изофермента CYP2D6 на метаболизм лекарственных препаратов и методы определения его активности/ **Смирнов В.В.**, Абдрашитов Р.Х., Егоренков Е.А., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., Пермяков Р.А.// **Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения**. 2015. № 3. С. 32-35.

51. Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров/Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., **Смирнов В.В.**// **Фармакокинетика и фармакодинамика**. 2015. № 1. С. 4-11.

52. CYP3A4 activity and haloperidol effects in alcohol addicts / Zastrozhin M.S., **Smirnov V.V.**, Sychev D.A., Savchenko L.M., Bryun E.A., Matis O.A. // International Journal of Risk and Safety in Medicine. - 2015. - Т. 27, № S1. - С. S23-S24.
53. Development of validated method for cyp2d6 phenotyping in studies of correlation between drug allergy and cytochrome p450 activity / Abdrashitov R.Kh., Egorenkov E.A., **Smirnov V.V.**, Ramenskaya G.V., Khaitov M.R. // **Allergy**. - 2015. - Т. 70, № S101. - С. 227.
54. Количественное определение пинолина для определения активности изофермента CYP2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS / Абдрашитов Р.Х., **Смирнов В.В.** // В сборнике: Фармакологическая наука - от теории к практике Всероссийская научная Интернет-конференция с международным участием. Сервис виртуальных конференций Рах Grid; ИП Синяев Дмитрий Николаевич. - 2014. - С. 5-6.
55. Количественное определение кортизола и его метаболита в моче крыс/ Емельянов М.И., Смирнов В.В., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Блынская Е.В., Кондаков С.Э.// **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия**. 2013. Т. 54. № 1. С. 61-64.
56. Взаимосвязь особенностей дозирования варфарина с активностью CYP2C9, оцененной по содержанию лозартана и его метаболита Е-3174 в моче у пациентов с механическими протезами клапанов сердца/ Арсланбекова С.М., Сычев Д.А., Казаков Р.Е., **Смирнов В.В.**, Кузнецова Е.В., Голухова Е.З.// **Кардиология**. 2013. Т. 53. № 12. С. 21-24.
57. In vivo оценка метаболического отношения маркёров CYP2C9 и CYP1A2 после введения афобазола в сравнении со стандартными индукторами и ингибиторами цитохромов/ Новицкая Я.Г., Грибакина О.Г., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П., **Смирнов В.В.**, Середенин С.Б.// **Экспериментальная и клиническая фармакология**. 2013. Т. 76. № 11. С. 36-39.
58. Влияние этилметилгидроксипиридина малата на активность CYP3A4: комплексный подход к оценке влияния на систему биотрансформации лекарственных средств/Отделёнов В.А., **Смирнов В.В.**, Дмитриев А.В., Поройков В.В., Шумянцева В.В., Красных Л.М., Сычев Д.А., Кукес В.Г.//**Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия**. 2013. № 3. С. 30-36.
59. Роль активности основного фермента метаболизма варфарина сур2с9 в режиме дозирования варфарина у пациентов после протезирования клапанов сердца / Голухова Е.З., Арсланбекова С.М., Сычев Д.А., **Смирнов В.В.**, Казаков Р.Е. // Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. Сердечно-сосудистые заболевания. 2013.Т. 14, № S3. - С. 110