

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
Первый Московский Государственный Медицинский Университет
имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет)

На правах рукописи

Егоренков
Евгений Андреевич

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СОВМЕСТНОГО КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ – СУБСТРАТОВ-МАРКЕРОВ
РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФЕРМЕНТОВ ЦИТОХРОМА P450 МЕТОДОМ LC-MS/MS

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Характеристика системы биотрансформации ксенобиотиков	10
1.2. Характеристика системы цитохрома Р-450	12
1.3. Основные методы изучения активности СУР	17
1.4. Методики фенотипирования отдельных изоферментов СУР	21
1.5. «Коктейльные» методы фенотипирования изоферментов СУР	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1. Физико-химические свойства исследуемых веществ.....	37
2.2. Оборудование	45
2.3. Реактивы	46
2.4. Статистическая обработка	48
ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	49
3.1. Выбор внутреннего стандарта	49
3.2. Разработка методики количественного определения аналитов в моче	50
3.2.1. <i>Отбор проб, пробоподготовка.</i>	50
3.2.2. <i>Подбор хроматографических условий.</i>	52
3.3. Разработка методики количественного определения аналитов в плазме крови	55
3.3.1. <i>Отбор проб, пробоподготовка.</i>	55
3.3.2. <i>Подбор хроматографических условий.</i>	56
3.4. Валидация разработанных методик количественного определения аналитов в плазме крови и моче	59
3.4.1. <i>Селективность</i>	59
3.4.2. <i>Линейность</i>	68
3.4.3. <i>Эффект матрицы и степень извлечения</i>	75
3.4.4. <i>Точность и прецизионность</i>	78
3.4.5. <i>Нижний предел количественного определения.</i>	81
3.4.6. <i>Перенос пробы</i>	81
3.4.7. <i>Стабильность</i>	81
3.5. Результаты определения активности системы изофермента цитохрома Р450 в различных исследованиях с помощью разработанной методики	85
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	105

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одной из проблем современной медицины является возникновение нежелательных лекарственных явлений при приёме лекарственных средств. К таким явлениям относятся как прогнозируемые нежелательные лекарственные реакции (передозировка, побочные эффекты, связанные со свойствами ЛС), так и непрогнозируемые (непереносимость, аллергические и псевдоаллергические реакции). Нередко фармакокинетические параметры одного и того же препарата варьируют у различных пациентов даже одной этнической группы. Зачастую наибольший вклад в риск возникновения данных явлений вносит измененная активность ферментов метаболизма. Одной из основных систем ферментов, отвечающих за метаболизм как эндогенных, так и экзогенных веществ, является система цитохрома P450 (СYP), участвующая в метаболизме практически всех лекарственных веществ. СYP включает в себя множество изоферментов, каждый из которых обладает собственной функцией в процессе метаболизма и катализирует определённые химические реакции превращения различных функциональных групп тех или иных ксенобиотиков и эндогенных веществ. На данный момент выделено более 1000 изоферментов СYP, объединенных в семейства и подсемейства. Несмотря на большое количество изоферментов, есть определенные изоферменты СYP, вносящие наибольший вклад в процессы биотрансформации по сравнению с другими изоферментами. Таковыми являются изоферменты СYP1A2, СYP2C9, СYP3A4 и СYP2D6. На их долю суммарно приходится около 80% известных лекарственных веществ. Помимо биотрансформации ксенобиотиков, данные изоферменты активно участвуют в метаболизме различных эндогенных соединений (глюкокортикоиды, холестерин). Существует несколько подходов к определению активности изоферментов СYP, одним из которых является метод фенотипирования, заключающийся в определении активности фермента по значению

«метаболического отношения» - отношения концентрации метаболита к концентрации субстрата в биожидкостях организма. На данный момент разработано большое количество методик определения активности индивидуальных изоферментов СУР. В последнее время, в связи с появлением таких высокочувствительных и селективных методов, как высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС), набирают популярность «коктейльные» методы фенотипирования, позволяющие определить активность нескольких изоферментов в одной пробе.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время в литературе описано несколько «коктейльных» методов определения активности различных изоферментов СУР, однако все они имеют ряд недостатков. Так, многие предложенные методы подразумевают использование лекарственных веществ-маркеров, являющихся сильнодействующими веществами, либо способными вызвать нежелательные лекарственные реакции (хлорзоксазон у Bing Zhu et al., декстраметорфан у Kyung-Suk Oh et al., варфарин у S. Chainuvati). Ни в одном из описанных «коктейльных» методов не используются эндогенные субстраты, в то время как их использование может уменьшить риск возникновения побочных эффектов, тем самым повысив универсальность и безопасность метода. Методики пробоподготовки зачастую включают в себя параллельную многократную жидкостную экстракцию как из плазмы крови, так и из мочи, что значительно снижает возможность использования таких методов в повседневной лабораторной практике для определения активности метаболизма. Более того, некоторые авторы предлагают использование нескольких видов детекторов для количественного определения субстратов-маркеров и их метаболитов в отдельных пробах, что также затрудняет введение подобных методов в практику фармакокинетических лабораторий.

Цель исследования

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методик количественного определения субстратов-маркеров основных изоферментов CYP и их метаболитов при совместном присутствии в биожидкостях организма (плазма крови и моча) методом ВЭЖХ-МС/МС для определения их активности, используя при этом в качестве субстратов лекарственные вещества с низким риском возникновения нежелательных лекарственных реакций, либо, где это возможно, эндогенные субстраты.

Задачи исследования:

1. Провести анализ описанных в литературе методик определения активности изоферментов цитохрома P450 методом фенотипирования *in vivo*, на основании изученных данных выбрать основные изоферменты для изучения и их субстраты-маркеры с соответствующими метаболитами для определения активности выбранных изоферментов.
2. Разработать методики пробоподготовки образцов исследуемых биожидкостей (плазмы крови и мочи) для совместного изолирования аналитов.
3. Оптимизировать хроматографические условия для совместного количественного определения исследуемых веществ (кофеин/параксантин, лозартан/Е-3174, кортизол/6-β-гидрокортизол, пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4,-тетрагидро-β-карболин) в плазме крови и моче.
4. Провести валидацию разработанных методик количественного определения исследуемых веществ в плазме крови и моче.
5. Оценить возможность использования разработанных методик определения активности основных изоферментов CYP (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6) в практике фармакокинетических лабораторий.

Научная новизна

Разработаны условия пробоподготовки биообъектов для дальнейшего совместного определения активности CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6 при совместном присутствии их специфических субстратов и метаболитов. В качестве субстратов для CYP1A2 и CYP2C9 подобраны широко распространённые лекарственные вещества с низким риском возникновения нежелательных лекарственных явлений в принимаемых дозировках (кофеин и лозартан, соответственно), в то время как для изоферментов CYP3A4 и CYP2D6 подобраны эндогенные субстраты (кортизол и пинолин, соответственно) с целью снижения инвазивности метода.

Разработаны и валидированы методики количественного определения при совместном присутствии в плазме крови и моче кофеина, параксантина, лозартана, E-3174, кортизола, 6- β -гидрокортизола, пинолина и 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,-тетрагидро- β -карболина методом ВЭЖХ-МС/МС с целью фенотипирования основных ферментов метаболизма.

Теоретическая и практическая значимость

Разработаны теоретические подходы к использованию методик совместного количественного определения экзогенных и эндогенных веществ с целью определения активности основных изоферментов CYP, участвующих в метаболизме лекарственных средств (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6).

Полученные результаты и условия пробоподготовки могут быть рекомендованы для решения задач, связанных с определением активности цитохрома P450 на примере других эндогенных и экзогенных субстратов его основных изоферментов в различных комбинациях.

Результаты диссертационного исследования представляют практическую значимость для специалистов фармакокинетических лабораторий и клинических фармакологов, осуществляющих подбор оптимальной фармакотерапии при использовании препаратов с узким терапевтическим диапазоном действия, а также при лечении пациентов с полипрагмазией либо заболеваниями, влияющими на активность системы метаболизма.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Разработанные методики проподготовки образцов биожидкости (плазмы крови и мочи), позволяющие изолировать исследуемые лекарственные вещества и эндогенные соединения (кофеин, параксантин, лозартан, E-3174, кортизол, 6-β-гидрокортизол, пинолин и 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,-тетрагидро-β-карболин) при совместном присутствии.
- Разработанные аналитические методики совместного количественного определения аналитов в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС.
- Результаты валидации разработанных аналитических методик совместного количественного определения аналитов в плазме крови и моче методом ВЭЖХ-МС/МС по основным параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, точность и прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.
- Результаты определения активности изоферментов CYP1A2, CYP3A4, CYP2C9, CYP2D6 в различных исследованиях с помощью разработанных методик пробоподготовки и количественного определения.

Методология и методы исследования

Методология исследования заключалась в изучении литературных данных по теме исследования, оценке актуальности темы и степени ее разработанности, постановке соответствующих целей и задач исследования по разработке методик совместного определения лекарственных веществ – субстратов-маркеров различных изоферментов цитохрома P450 методом LC-MS/MS, обработке полученных данных, формулировании выводов на основе результатов и определении практической значимости результатов работы. Валидация методик проводилась согласно «Руководства по экспертизе лекарственных средств. Том 1» под редакцией А.Н. Миронова, 2013 г., а также руководств FDA и ЕМА. Статистическая обработка полученных результатов измерения проводилась с использованием программ IBM SPSS Statistics 23.0.0.0 и Microsoft Excel 2016 методом описательной статистики и Т-критерия

для независимых выборок с целью выявления различий между средними значениями.

Достоверность научных положений и выводов

Первичные данные, полученные в результате проведенного исследования с использованием ВЭЖХ-МС/МС, являются достоверными. Разработанные методики удовлетворяют критериям приемлемости валидационных параметров. Использованное оборудование зарегистрировано в Реестре средств измерений и имеет соответствующие свидетельства о поверке.

Апробация результатов исследования

Основные положения работы и результаты исследования доложены на научном совете НИИ Фармации «Достижения и перспективы молодых ученых НИИ Фармации» (Москва, 2014), на Конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСІ) (Барселона, 2015). Апробация диссертации состоялась «31» августа 2016 г. на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева фармацевтического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация методик совместного количественного определения исследуемых аналитов методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическая обработка результатов исследования. 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.

Внедрение результатов исследования

Разработанные в результате проведенной работы методики внедрены в лабораторную практику для определения активности метаболизма в лаборатории клинической фармакологии ФГБУ «ГНЦ Институт

Иммунологии» ФМБА России и отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научных исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), комплексная тема: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного образования медицинского и фармацевтического образования». Номер государственной регистрации 01.2.011.68237.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 4 паспорта специальности «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 5 общих выводов и списка использованных источников. Диссертация включает 13 таблиц и 14 рисунков. Библиографический список содержит 122 источника, из них 112 на иностранных языках.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 3 – в изданиях из Перечня ВАК, 2 – в издании, включенном в базу Scopus и Web of Science.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика системы биотрансформации ксенобиотиков

Ежедневно человеческий организм подвергается воздействию чужеродных химических соединений, называемых ксенобиотиками. Они проникают в организм через желудочно-кишечный тракт, кожу, легкие в составе вдыхаемого воздуха, пищи, напитков и лекарственных средств. Организм реагирует на лекарственные вещества так же, как и на любой другой ксенобиотик. Некоторые гидрофильные лекарственные вещества выводятся почками в неизменном виде. Лекарственные вещества, обладающие большей липофильностью, вступают в реакцию с различными ферментами, трансформирующими их химическую структуру. Соответственно, метаболизм (биотрансформация) – широкое понятие, собирающее в себя химические превращения, происходящие с химическими веществами в организме [1]. Результатом процессов метаболизма лекарственных веществ является снижение липофильности вещества, повышение его гидрофильности, а также изменение фармакологической активности лекарственного вещества.

Метаболизм большинства лекарственных веществ осуществляется в печени, однако данный процесс может проходить и в других органах: желудочно-кишечный тракт, легкие, почки и т.д. В целом, все химические процессы биотрансформации химических веществ разделяют на две группы, известные как фазы метаболизма I и II:

- Реакции I фазы (несинтетические). В процессе этих реакций, лекарственные вещества образуют метаболиты с большей гидрофильностью, чем субстрат, за счет образования активных функциональных групп, что повышает способность молекулы к конъюгации. Одними из основных реакций I фазы являются реакции окисления, в частности – реакции присоединения гидроксильного радикала (-ОН). Основными катализаторами данных реакций являются ферменты, называемые оксидазами со смешанной функцией. Данные ферменты обладают низкой субстратной специфичностью, поэтому они окисляют различные лекарственные вещества. К реакциям I фазы метаболизма также относятся процессы восстановления и гидролиза [75].

- Реакция II фазы (синтетические реакции). В процессе данных реакций лекарственные вещества и его метаболиты связываются с различными эндогенными веществами, в результате чего образуются хорошо растворимые в воде конъюгаты, легко выводимые с мочой или с желчью. Условием вступления молекулы лекарственного вещества в реакцию II фазы является наличие химически активного радикала, к которому сможет присоединиться конъюгирующая молекула. Если активные радикалы имеются у молекулы лекарственного вещества изначально, то связывание с конъюгантом может осуществляться без предварительных реакций I фазы биотрансформации. В случае отсутствия активных радикалов, последние приобретаются молекулой в процессе реакций I фазы метаболизма [1,75].

Одним из основных ферментов метаболизма, отвечающих за биотрансформацию практически всех ксенобиотиков, в том числе и лекарственных веществ, является система цитохрома P450, катализирующая около 70% реакций I фазы метаболизма [76].

1.2. Характеристика системы цитохрома P-450

Цитохром P-450, в литературе обозначаемый CYP, представляет собой группу ферментов, осуществляющую не только биотрансформацию лекарственных веществ и других ксенобиотиков, но и участвующих в синтезе желчных кислот, стероидных гормонов, простаноидов (тромбоксана A₂, простаглицина I₂). Впервые цитохром P450 обнаружили Klingenberg и Garfincell в микросомах печени крысы в 1958 году [76,77].

Филогенетические исследования показали, что первые варианты данной системы ферментов в живых организмах образовались 3 миллиарда лет назад. Цитохром P450 является гемсодержащим белком. Своё название данная система получила за счёт образования характерного комплекса с оксидом углерода (II), обладающим максимумом поглощения при длине волны 450 нм. [1,76,77].

Цитохром P450 обнаружен во многих органах: почках, легких, кишечнике, головном мозге, коже, плаценте, легких, однако наибольшее его количество находится в клетках печени. Данная система изоферментов обладает способностью химически превращать подавляющее большинство химических соединений различной природы, при этом основной реакцией является гидроксирование. Цитохромы P450 являются монооксигеназами, поскольку в процессе окисления один из атомов кислорода помещается в молекулу субстрата, а второй – в воду, что отличает их от диоксигеназ, включающих оба атома кислорода в субстрат [1,75,78].

Цитохром P450 обладает большим количеством изоферментов, чье число на данный момент составляет более тысячи. Огромное число изоферментов данной системы разделяют на семейства и подсемейства в

зависимости от гомологичной последовательности нуклеотидов и аминокислот [78]. Изоферменты, обладающие аминокислотной идентичностью более, чем на 40%, группируются в семейства, число которых на настоящее время составляет 36, изоферменты которых идентичны по своему аминокислотному составу более чем на 40%, 12 из которых обнаружены в организме млекопитающих. Подсемейства образуют изоформы СУР с гомологичностью аминокислотного состава более, чем на 55% (Таблица №1). Семействам цитохромов Р450 присвоена римская нумерация, подсемейства же обозначаются римскими цифрами и латинской буквой. В основном обозначение изоферментов СУР представляет собой условный номер из арабской цифры, обозначающая семейство, следующей далее латинской буквы, обозначающая подсемейство, и арабской цифрой в конце, которая соответствует конкретному изоферменту [76,79]. К примеру, изофермент СУР2С9 соответствует изоферменту из семейства 2, подсемейства ПС. Изоферменты цитохрома Р-450 обладают различной субстратной специфичностью, а также ингибиторами и индукторами). Однако зачастую встречается перекрестная субстратная специфичность между изоферментами различных семейств. Например, противовирусное лекарственное средство ритонавир метаболизируется 7 изоферментами с образованием различных метаболитов [1,5,81].

В следующей таблице приведена краткая информация о функции семейств цитохрома, количестве подсемейств и количестве генов, кодирующие данные семейства [2].

Таблица 1 – Основные характеристики семейств цитохрома P450

Семейство	Функция	Количество подсемейств	Количество генов
CYP I	Метаболизм лекарственных средств и других ксенобиотиков, в том числе и полициклических ароматических углеводов	2	3 гена
CYP II	Метаболизм лекарственных средств, стероидов и др. экзогенных и эндогенных веществ	12	17 генов, 11 псевдогенов
CYP III	Метаболизм лекарственных средств, прочих ксенобиотиков и эндогенных веществ	1	4 гена, 2 псевдогена
CYP IV	Метаболизм арахидоновой кислоты и жирных кислот	5	11 генов, 7 псевдогенов
CYP V	Синтез тромбоксана A ₂	1	1 ген
CYPVIIA	7-альфа-гидроксилирование стероидного ядра	1	Нет данных
CYPVIIБ	7-альфа-1-гидроксилирование в гелевнем мозге	1	Нет данных
CYPVIIIA	Синтез простаглицлина I ₂	1	Нет данных
CYPVIIБ	Биосинтез желчных кислот	1	Нет данных
CYP XI	Биосинтез стероидов	2	3 гена
CYP XVII	Биосинтез стероидов. 17-альфа-гидроксилирование	1	1 ген
CYP XIX	Биосинтез стероидов, ароматизация эстрогенов	1	1 ген
CYP XXI	Биосинтез стероидов	1	1 ген, 1 псевдоген
CYPXXIV	Деградация витамина D	1	1 ген
CYPXXVIA	Гидроксилирование ретиноевой кислоты	1	Нет данных
CYPXXVIB	Гидроксилирование ретиноевой кислоты	1	Нет данных
CYPXXVIIA	Биосинтез желчных кислот	1	Нет данных
CYPXXVIIAB	1-альфа-гидроксилирование витамина D ₃	1	Нет данных
CYPXXVIIC	Функция неизвестна	1	Нет данных
CYPXXXIX	Функция неизвестна	1	Нет данных
CYP XXXVI	24-гидроксилирование холестерина	1	Нет данных
CYPXXXXXI	Биосинтез холестерина. 14-альфа-диметилирование ланостерола	1	1 ген, 2 псевдогена

На Рисунке 1 представлена диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение метаболизируемых ксенобиотиков основными изоферментами цитохрома P450 [3].

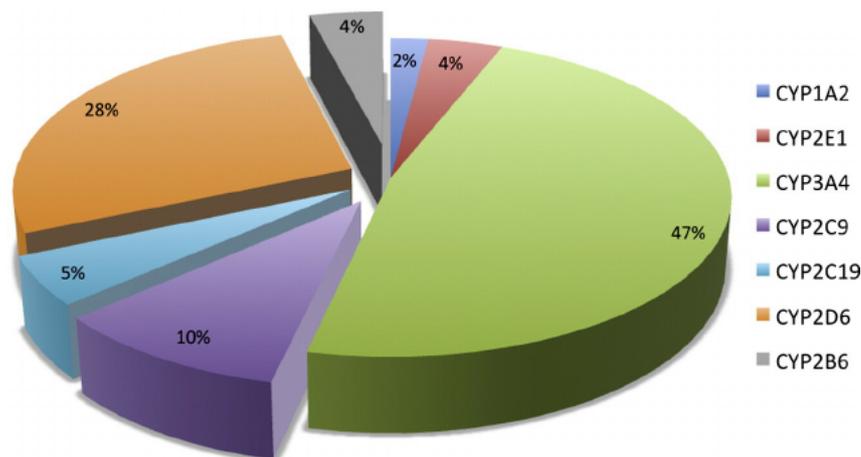


Рисунок 1 – Диаграмма, демонстрирующая процентное соотношение метаболизируемых ксенобиотиков основными изоферментами цитохрома P450 [3]

В результате анализа данных из различных литературных источников были выделены изоферменты CYP, представляющие наибольший интерес для изучения в данной работе.

CYP1A2 - метаболизирует порядка 2-8% известных лекарственных средств, эндогенный субстрат неизвестен [4]. В основном находится в печени и метаболически активирует проканцерогенные гетероциклические амины, формирующиеся при обработке продуктов питания с помощью температуры [4]. Основными субстратами *CYP1A2* являются производные ксантина (кофеин, теофиллин) [5], а также многие антидепрессанты (амитриптилин, хломипрамин, имипрамин), некоторые атипические антипсихотики (хлосапин, оланзапин, галоперидол) [6], некоторые ингибиторы тирозинкиназы (эрлотиниб), миорелаксанты (циклобензаприн), эстрадиол, парацетомол и др [7]. К сильным ингибиторам *CYP1A2* относятся многие фторхинолоны, верапамил и ципрофлоксацин. К индукторам данного фермента относятся, прежде всего, компоненты табачного дыма, брокколи, брюссельской капусты, эхинацеи, инсулин, а также некоторые лекарственные вещества (нафциллин, модафинил, омепразол) [8,9].

CYP2C9 - метаболизирует около 10-15% известных лекарственных средств, проходящих I фазу метаболизма [10,11]. Данный изофермент в основном

находится в печени, и уровень экспрессии CYP2C9 является одним из наибольших среди всех ферментов CYP, уступая лишь изоферменту CYP3A4 [12,13]. Основными субстратами CYP2C9 являются нестероидные противовоспалительные препараты (целекоксиб, диклофенак, ибупрофен), блокаторы ангиотензиновых рецепторов II типа (ирбесартан, лозартан), а также некоторых непрямым антикоагулянтов (варфарин) и пероральных гипогликемических средств [13,88]. К эндогенным субстратам данного изофермента относятся вещества триптаминового ряда (в частности, 5-гидрокситриптамиин) и ненасыщенные жирные кислоты [72]. Изофермент CYP2C9 обладает высоким полиморфизмом, и изменения в метаболической активности, вызванные вариацией изоформ CYP2C9, играют ключевую роль в патогенезе различных нежелательных лекарственных явлений. Пациенты с низкой активностью изофермента находятся в группе риска возникновения нежелательных лекарственных явлений при назначении таких лекарственных веществ – субстратов CYP2C9 с узким терапевтическим окном, как варфарин, фенитоин, глипизид и толбутамид [14].

CYP3A4 – отвечает за метаболизм многих веществ как эндогенного происхождения (стероидные гормоны, липиды, желчные кислоты), так и ксенобиотиков, включая лекарственные вещества, токсичные вещества окружающей среды и природные соединения, содержащиеся в продуктах питания [15,16]. Данный изофермент считается основным из всех изоферментов CYP, поскольку его доля в организме составляет около 80% из всего количества изоферментов CYP, при этом он обнаруживается не только в печени, но и простате, молочных железах, клетках эпителия тонкого и толстого кишечника, и даже в клетках головного мозга [17,18]. CYP3A4 метаболизирует более половины используемых на сегодняшний день лекарственных веществ [1], включая противоопухолевые препараты, иммунодепрессанты, противогрибковые препараты, макролиды, трициклические антидепрессанты и многие другие. Так как данный изофермент содержит большое количество субстратов, равно как ингибиторов и индукторов, зачастую происходит изменение активности CYP 3A4,

вызванное как межлекарственным взаимодействием, так и воздействием ксенобиотиков из окружающей среды и продуктов питания (например, природные соединения грейпфрутового сока подавляет активность CYP3A4) [19,20,69].

CYP2D6 – метаболизирует около 30% известных лекарственных средств, а также является дополнительным изоферментом метаболизма многих ксенобиотиков, включаясь в метаболические процессы при недостаточной активности прочих изоферментов [17,89]. В основном находится в печени, однако большое количество CYP2D6 обнаружено так же в ЦНС [18]. Является одним из изоферментов CYP, обладающих самым множественным полиморфизмом (известно более 100 изоформ CYP2D6). Субстратами являются трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина (флуоксетин, флувоксамин), опиоды (кодеин, трамадол, оксикодон), антипсихотики (галоперидол, рисперидон), бета-блокаторы и многие другие [1,21,101]. За метаболизм многих наркотических средств (MDMA, амфетамин и прочие производные фенилэтиламина, синтетические каннабиноиды) отвечает также CYP2D6 [22,23].

1.3. Основные методы изучения активности CYP

Межиндивидуальные различия в скорости метаболизма ЛС наиболее часто являются причиной межиндивидуальных различий в фармакокинетике, а, следовательно, в фармакологическом ответе. Скорость метаболизма ЛС зависит от активности того или иного фермента, которая, в свою очередь, зачастую является генетически детерминированной функцией. Однако на активность ферментов метаболизма могут влиять внешние факторы, значительно её изменяя (возраст, пищевой рацион, вредные привычки, сопутствующие заболевания,

сопутствующая лекарственная терапия и т.д.). Таким образом, можно выделить 2 подхода к изучению скорости метаболизма лекарственных веществ – генотипирование и фенотипирование.

Генотипирование является косвенным методом определения активности фермента метаболизма, в основе которого лежит изучение его гена методом полимеразной цепной реакции.

Фенотипирование заключается в определении активности фермента метаболизма по фармакокинетике маркерного субстрата и его метаболита [1,2].

Фармакогенетика. Фармакогеномика.

Различия в лекарственном ответе могут быть связаны с вариабельностью последовательности ДНК специфических генов, ответственных за синтез ферментов метаболизма лекарственных веществ. Например, известны различные варианты одиночного нуклеотидного полиморфизма у ферментов I фазы метаболизма (а именно, системы цитохрома P450), а также ферментов II фазы метаболизма и специфических белков-переносчиков [24,25]. Свойства и метаболическая эффективность различных минорных (т.е. не самых распространённых) вариантов ферментов биотрансформации описаны в литературе и объединены в общую базу данных [26].

Фармакогеномика – наука, изучающая зависимость фармакокинетического ответа организма на ЛВ от генетической вариабельности. Термин «фармакогенетика» часто соотносится с тем же предметом изучения, однако формально фармакогенетика изучает влияние лишь определенного гена на фармакокинетический ответ определенного лекарственного вещества, в то время как фармакогеномика подразумевает под собой более обширный подход и изучает влияния нескольких генов на фармакокинетический ответ на ЛВ [27].

Практически все изоферменты цитохрома P450, отвечающие за метаболизм лекарственных веществ, имеют большое число изоформ. Так, на Рисунке 2 продемонстрировано количество известных вариантов одиночного нуклеотидного полиморфизма у 9 основных изоферментов CYP, включая CYP2D6 (114

вариантов), CYP2A6 (68 вариантов) и CYP2B6 (57 вариантов). На Рисунке 2 представлена диаграмма, демонстрирующая количество известных вариантов одиночного нуклеотидного полиморфизма у основных изоферментов CYP [28].

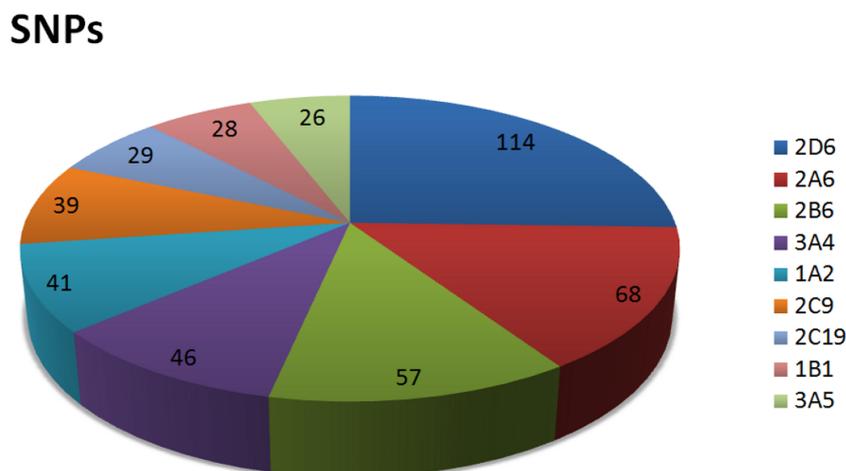


Рисунок 2 – Диаграмма, демонстрирующая количество известных вариантов одиночного нуклеотидного полиморфизма у основных изоферментов CYP [28].

Частота возникновения полиморфизма по различным аллелям в основном зависит от этнической принадлежности человека. У белых известно около 34 различных аллелей, встречающихся более, чем у 1% популяции, из-за чего активность метаболизма у разных людей может сильно варьировать. Изоферменты CYP2D6 и CYP2B6 вносят значительный вклад в вариабельность метаболической активности, обладая самым большим числом различных аллелей (11 и 6 соответственно) [24]. Максимальная доля одного аллеля от всех аллелей в популяции для CYP2D6 составляет от 20,7% до 32,4% [29]. Если говорить о всех 34 аллелях, то самой часто встречающейся аллелью является CYP3A5*3C, встречающаяся в 81,3% случаев (пониженная активность), за ней следует CYP1A2*1F, встречающаяся в 33,0% случаев (повышенная активность). Кроме того, основными аллелями, опосредующими повышенную активность метаболизма, являются CYP 2A6*1B (30,0 %), 3A4*1B (17,0%) и 2C9*17 (18,0 %) [24,30,31].

Учитывая вышесказанное, метод генотипирования позволяет выявить аллели у каждого конкретного пациента и таким образом установить врожденную активность системы метаболизма ксенобиотиков. При наличии данных

полученного «метаболического портрета», становится возможной корректировка доз назначаемых лекарственных препаратов с целью достижения желаемого фармакологического эффекта и минимизации риска развития нежелательных лекарственных явлений. Кроме этого, данное исследование позволяет быстрее подобрать необходимую дозу препарата, что позволяет сократить количество дней пребывания пациента в стационаре. Однако главным недостатком данного метода является то, что он не учитывает внешних факторов, которые также влияют на активность метаболизма. Таким образом, для получения актуальной информации о состоянии активности системы биотрансформации наиболее подходящим является метод фенотипирования.

Фенотипирование.

Субстратная специфичность (т.е. возможность фермента катализировать превращения лишь одного субстрата либо одной группы сходных субстратов) большинства изоферментов CYP позволила разработать методы их фенотипирования. Активность фермента метаболизма определяется путем вычисления «метаболического отношения», представляющего собой отношение значения концентрации специфического субстрата – маркера в биожидкости к значению концентрации его метаболита. В результате исследования могут быть получены следующие данные:

- значения концентрации субстрата превышают значения концентрации метаболита, в результате чего получают высокое значение «метаболического отношения», соответствующее пониженной активности метаболизирующего фермента;
- значения концентрации метаболита превышают значения концентрации субстрата, в результате чего получают низкое значение «метаболического отношения», соответствующее повышенной активности метаболизирующего фермента [1].

Описано множество клинических случаев, в которых фенотипирование продемонстрировало свою важность и актуальность. Например, был разработан метод оценки функции печени MEGX-тест, заключающийся в изучении

фармакокинетики метаболита лидокаина после внутривенного введения. Изучение фармакокинетики лекарственных веществ и их метаболитов позволяет определить, связано ли отклонение концентрации лекарственного вещества от средних значений в биожидкостях у людей с отклонёнными от нормы процессами всасывания и метаболизма лекарственных веществ. Определение концентрации метаболитов лекарственных веществ даёт возможность определить зависимость изменения функциональной активности организма, в том числе метаболической системы, от циркадных ритмов и времени суток приёма препарата [32,33].

1.4. Методики фенотипирования отдельных изоферментов CYP

В основе большинства современных методик количественного определения лежит метод ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. Встречаются также более старые методики ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС, однако на сегодняшний день с целью повышения точности, селективности и воспроизводимости анализа в основном используются методики ВЭЖХ-МС/МС.

CYP1A2

Изофермент CYP1A2, чья активность обладает большой внутрииндивидуальной вариабельностью, вовлечен в метаболизм многих сильнодействующих лекарственных препаратов, в том числе нетипичные нейрорептики клозапин и оланзапин. Как следствие, фармакокинетика данных лекарственных веществ будет напрямую зависеть от активности CYP1A2 [87]. Так как активность CYP1A2 зависит от генетических факторов, факторов окружающей среды и факторов организма, не зависящих от генетики, определение активности данного изофермента обычно проводится методом фенотипирования с определенным субстратом; методы генотипирования на

практике используются редко. В качестве специфического субстрата для определения активности изофермента CYP1A2 широко используется кофеин [94]. Это связано с тем, что кофеин при назначении в минимальных терапевтических дозировках легко определяется в биожидкостях, при этом не вызывая нежелательные лекарственные явления. К тому же, метаболический процесс N3-деметиляции с превращением кофеина в параксантин катализируется исключительно CYP1A2 [1,4,34,35].

В качестве метода количественного определения кофеина и его метаболита используется высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ- либо МС-детектированием. Методика определения активности CYP1A2 с использованием кофеина в качестве субстрата-маркера применялась для изучения активности ферментов метаболизма при заболевании малярийной гемоглобинурией (лихорадка черной воды), для изучения ингибиторной активности различных лекарственных растительных средств (например, масло лаванды, гинко и фрутинон А) [34,35,36,37].

В качестве биообъекта для определения концентрации кофеина и параксантина используются как моча, так и венозная кровь. В качестве метода пробоподготовки в основном используется жидкостная экстракция. Самое крупное на данный момент исследование определение активности CYP1A2 с использованием кофеина в качестве субстрата-маркера проводилось на 73 добровольцах [34,38].

CYP2C9

На сегодняшний день разработано несколько методик определения активности CYP 2C9, но у всех у них есть один общий недостаток – они не учитывают активности других изоферментов по отношению к используемому субстрату. К тому же, используемые дозировки лекарственных веществ близки к терапевтическим значениям, что может привести к развитию нежелательных лекарственных явлений.

Описана толбутамидовая проба для определения активности CYP2C9 путем введения препарата дозой 125 мг и отбором образцов плазмы крови в течение

суток после введения. В ряде исследований толбутамид и его основные метаболиты (4-гидрокситолбутамид и карбокситолбутамид) определялись в плазме крови и моче. Анализ биоматериала проводили с помощью метода ВЭЖХ/МС, метод пробоподготовки – жидкостная экстракция [39].

Недостатком описанных методик с использованием толбутамида является конкуренция изофермента CYP2C19 за тот же субстрат, что не учитывается при расчётах для определения активности CYP2C9.

Так же в литературе описана методика определения активности CYP2C9 путём введения 300 мг фенитоина [92]. Образцы биожидкости (плазмы) отбирались у пациентов в течение 3 часов после введения препарата. Для расчёта «метаболического индекса» (отношения концентрации метаболита к концентрации субстрата) определялись значения концентрации фенитоина и его специфического метаболита п-гидроксифенилгидантисона. В качестве инструментального метода применялась ВЭЖХ-МС, в качестве методики пробоподготовки – жидкостная экстракция [40].

В данной методике, как и в предыдущей, также не учитывается метаболическая активность других изоферментов, а именно CYP2C19 и CYP3A4, в отношении фенитоина, что в результате может привести к получению неточных данных [90].

Существующая проба с использованием лозартана как субстрата-маркера CYP2C9 заключается в разовом введении лекарственного вещества дозой 50 мг [95,96]. Образцы биоматериала (моча) отбирались в течение 8 часов после введения, после чего из полученного объема мочи отбирались 15 мл для последующей пробоподготовки и анализа. В течение 8 часов сбора мочи ежедневно производится контроль основных физиологических показателей для выявления отклонений от нормы. В качестве метода количественного определения используется метод ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС, метод пробоподготовки – жидкостная экстракция [41,42].

Лозартан также является субстратом для изофермента CYP3A4, что зачастую не принимается во внимание при расчёте соответствующего

«метаболического индекса» для CYP2C9, что может привести к получению искажённых результатов.

CYP2D6

Первым субстратом, применяемым в качестве субстрата для исследования активности изофермента CYP2D6, был антигипертензивный препарат дебризохин. Дебризохин и его метаболит – 4-гидроксибризохин – определяется в моче. В качестве метода количественного определения используется метод ВЭЖХ-МС, пробоподготовка – жидкостная экстракция и ТФЭ. Недостатком методик с использованием дебризохина является тот факт, что в метаболизме данного вещества помимо CYP2D6 участвует изофермент CYP1A1 [43, 44].

Также существуют методики с использованием бета-адреноблокаторов, в частности, с использованием метопролола.

Метопролол может применяться как субстрат-маркер только при использовании плазмы крови в качестве биообъекта, т.к. при определении в моче отношения метопролола к его метаболиту, α -гидроксиметопрололу, наблюдается влияние значения pH мочи на «метаболическое отношение». Таким образом, фенотипирование с применением метопролола затруднительно. К тому же, около 20% метаболизма метопролола опосредуются другими изоферментами (CYP1A2, CYP1A11) [43,45].

В литературе можно встретить множество методик, использующих в качестве субстрата CYP2D6 декстрометорфан. В качестве биожидкости используются как плазма, так и моча; в некоторых методиках используется слюна. Основными недостатками данных методик является возможная индивидуальная непереносимость субстрата. К тому же, зачастую в методиках используются дозы декстрометорфана, близкие к терапевтическим. Являясь сильнодействующим веществом, декстрометорфан может вызывать различные нежелательные лекарственные явления. Более того, около 15% вещества метаболизируется другими ферментами (CYP3A4, CYP3A5, CYP2C19) [46,47].

На сегодняшний день усиленно ведется поиск эндогенных субстратов, трансформирующихся исключительно CYP2D6. В одном из таких исследований

было установлено, что CYP2D6 обладает исключительной тропностью к таким эндогенным веществам, как 5-MDMT и пинолин. Для контроля проводилось добавление к исследуемым субстратам специфических моноклональных антител, в результате чего активность CYP2D6 падала, и O-деметилование 5-MDMT и пинолина не наблюдалось. Определено, что пинолин на 99% метаболизируется лишь изоферментами CYP2D6. Вполне возможно, что использование именно пинолина в качестве эндогенного субстрата-маркера CYP 2D6 позволит разработать точную и селективную методику определения активности данного изофермента [48,49,80].

CYP3A4

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

Данный тест использует дозу радиоактивно меченного эритромицина как субстрата для фермента CYP3A4. Субстрат вводят внутривенно. В печени изофермент метаболизирует эритромицин, превращая меченную метильную группу в формальдегид (реакция N-деметилирования), который затем метаболизируется в диоксид углерода. Меченный диоксид углерода выводится организмом через легкие, поэтому его можно определить спустя 20-30 минут после инъекции тестовой дозы эритромицина. Количество изотопа C-14, с помощью которого наносят радиоактивную метку, в выдыхаемом воздухе коррелирует с количеством эритромицина, подвергшегося метаболизму за единицу времени [50,51].

Несмотря на быстроту данного метода, он обладает рядом недостатков, важнейшим из которых является использование радиоактивно меченных молекул, что само по себе является сравнительно вредным для организма; к тому же, меченные препараты повышают стоимость методики [91].

На сегодняшний день широко распространены методики определения активности CYP3A4 с использованием эндогенных субстратов. Одним из них является кортизол, метаболизирующийся в 6-β-гидрокортизол [82]. В качестве метода количественного определения используется метод ВЭЖХ-МС или ВЭЖХ-

МС/МС [52,53,67,68]. Так же часто встречаются методики определения активности СУР 3А4 с использованием в качестве маркера холестерина и его метаболита 4 β -гидроксихолестерола. В частности, данная методика применяется для определения активности СУР 3А4 у онкологических больных для корректировки доз назначаемых препаратов [70,71].

Основные недостатки данных методик заключаются в риске возникновения нежелательных лекарственных явлений при приеме субстратов, что создает существенные трудности для внедрения данных методов в широкую лабораторную и клиническую практику. Внутривенное введение субстратов, а также использование плазмы крови в качестве биообъекта, делают методики пригодными только для использования в стационарах. К тому же, данные тесты не применимы для беременных женщин ввиду тератогенности некоторых субстратов.

1.5. «Коктейльные» методы фенотипирования изоферментов СУР

«Коктейльный» метод фенотипирования заключается в совместном определении активности нескольких изоферментов цитохрома Р450 путём совместного количественного определения нескольких соответствующих пар субстрат/метаболит в биообъекте. Для решения подобной задачи необходимо использовать точный, селективный и воспроизводимый метод инструментального анализа веществ в биообъектах, коим является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с различными видами детектирования. Одной из важнейших задач является разработка методики пробоподготовки, позволяющей

провести извлечение всех определяемых веществ в одну пробу. Помимо этого, необходимо подобрать соответствующие хроматографические условия и условия детектирования, которые позволят провести совместное количественное определение аналитов.

Bing Zhu и соавторы одними из первых опубликовали работу, в которой описан «коктейльный» метод фенотипирования [54]. Целью данной работы являлась разработка и валидация «коктейльного» метода для определения активности изоферментов CYP3A, CYP1A2, CYP2C19, CYP2E1 и CYP2D6.

В исследовании принимали участие 14 здоровых добровольцев, принявших перорально «коктейль», состоящий из 100 мг кофеина (CYP1A2, метаболит – параксантин), 200 мг хлорзоксазона (CYP2E1, метаболит – 6-гидроксихлорзоксазон), 100 мг мефенитоина (CYP2C19, метаболит – 4'-гидроксимефенитоин), 100 мг метопролола (CYP2D6, метаболит – α -гидроксиметопролол) и 7,5 мг мидазолама (CYP3A, метаболит – 1'-гидроксимидазолам). Используемые биообъекты – плазма крови и моча. Плазма крови использовалась для определения активности изоферментов CYP2E1, CYP3A и CYP1A2, моча – для изоферментов CYP2C19 и CYP2D6. Количественное определение проводилось методом обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографией с использованием УФ-детектора.

Пробоподготовка образцов заключалась в отдельном извлечении каждой пары субстрат/метаболит из биообъекта. Извлечение кофеина и параксантина проводилось с помощью жидкость-жидкостной экстракции смесью хлороформ-изопропанол (9:1). Экстракция 4'-гидроксимефенитоина из мочи проводилась диэтиловым эфиром после ферментной деконъюгации (внутренний стандарт – фенобарбитал). Хлорзоксазон и его метаболит изолировались путем экстракции диэтиловым эфиром с предшествующей деконъюгацией глюкуронидазой с добавлением фенаcetина в качестве внутреннего стандарта. Экстракция метопролола и α -гидроксиметопролола из мочи проводилась с помощью дихлорметана после подщелачивания биообъекта до pH=5,5 (внутренний стандарт – пропранолол). Извлечение мидазолама и гидроксимидазолама из плазмы

проводилось путем добавления к образцу аминокислотного буфера с последующей экстракцией диэтиловым эфиром. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ с УФ- и флуориметрическим детектированием, при этом хроматографическое разделение проводилось с использованием разных типов колонок и подвижными фазами разного состава.

Недостатком данной методики является невозможность ее использования в повседневной практике ввиду многоэтапной затрудненной пробоподготовкой и отдельным количественным определением изучаемых веществ. Кроме этого, используемый в качестве субстрата хлороксазон способен в указанной дозировке вызвать нежелательные лекарственные явления.

Со временем идея «коктейльного» метода фенотипирования набирала популярность в качестве метода определения активности изоферментов цитохрома P450 *in vivo*. В 2003 году M.Christensen и соавторы описали «коктейль» Karolinska, в состав которого входили кофеин 100 мг (CYP1A2, метаболит - параксантин), лозартан 25 мг (CYP2C9, метаболит – E-3174), омепразол 20 мг (CYP2C19, метаболит – 5-гидроксиомепразол), дебризохин 10 мг (CYP2D6, метаболит – 4-гидроксидебризохин) и хинин 250 мг (CYP3A4, метаболит – 3-гидроксихинин) [55]. Лозартан, дебризохин и их метаболиты определялись в моче, а кофеин, омепразол, хинин и их метаболиты – в плазме крови. В качестве пробоподготовки используется многоэтапная жидкостная экстракция, извлечение каждой пары субстрат/метаболит проводилось по отдельности. В качестве инструментального метода использовался метод ВЭЖХ-УФ.

В том же году S.Chainuvatı и соавторы описали «коктейль» Cooperstown 5+1, позволяющий определить активность изоферментов CYP1A2, CYP2C19, CYP3A4, CYP2D6, и CYP2C9 с помощью перорального введения кофеина, омепразола, мидазолама декстрометорфана, и S-варфарина соответственно [56]. В 2004 году Yin и соавторы предложили использовать «коктейль» из 40 мг омепразола (CYP2C19), 2 мг/кг кофеина (CYP1A2), 30 мг декстрометорфана (CYP2D6), 0,025 мг/кг мидазолама (CYP3A) и 10 мг варфарина (CYP2C9) с целью

определения активности соответствующих изоферментов *in vivo* [57]. Все ЛВ, за исключением мидазолама, вводились перорально; мидазолам - внутривенно. В качестве биообъекта использовалась как плазма, так и моча. В качестве пробоподготовки применялся многоэтапный метод жидкостной экстракции, каждая пара субстрат/метаболит извлекались по отдельности. Используемый метод количественного определения – ВЭЖХ-УФ.

В 2008 был описана одна из самых популярных методик фенотипирования с использованием «коктейля» Inje, заключающегося в пероральном приеме 93 мг кофеина (CYP1A2), 30 мг декстрометорфана (CYP2D6), 30 мг лозартана (CYP2C9), 20 мг омепразола (CYP2C19) и 2 мг мидазолама (CYP3A4) [59,63]. Все вещества с метаболитами, за исключением пары декстрометорфан/декстрорфан, определялись в плазме; указанная выше пара для CYP2D6 определялась в моче. В качестве методики пробоподготовки использовалась многоэтапная жидкостная экстракция, при этом пары кофеин/параксантин и омепразол/5-гидроксиомепразол извлекались совместно. Для количественного определения пар декстрометорфан/декстрорфан и лозартан/Е-3174 использовался метод ВЭЖХ с флуорометрическим детектором. Пары веществ мидазолам/1'-гидроксимидазолам, кофеин/параксантин и омепразол/5-гидроксиомепразол количественно определялись методом ВЭЖХ-МС/МС, причем последние две пары определялись совместно.

Общими недостатками этих методов являются затрудненная многоэтапная пробоподготовка с отдельным извлечением аналитов как из мочи, так и из плазмы крови. Кроме того, используемые лекарственные вещества-субстрата используются в достаточно высоких дозах (в некоторых случаях близких к терапевтическим), что не гарантирует безопасность метода ввиду риска возникновения нежелательных лекарственных явлений [85].

В 2012 году Kyung-Suk Oh и соавторы разработали «коктейль» для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A *in vivo*, в состав которого входят 10 мг кофеина, 2 мг лозартана, 200 мкг омепразола, 2 мг декстрометорфана и 100 мг мидазолама, принимаемые

перорально [74]. Биообъектом является плазма крови добровольцев. Пробоподготовка проводилась в два этапа: проводилась жидкость-жидкостная экстракция этилацетатом, органический слой отделяли, после чего к оставшемуся водному слою прибавляли уксусную кислоту для коррекции рН с последующей экстракцией этилацетатом. В качестве метода количественного определения использовался метод ВЭЖХ-МС/МС (внутренний стандарт – фенацетин). Использовалась колонка с неподвижной фазой C_{18} (100 мм × 2,1 мм; 3,5 мкм). Применялось градиентное элюирование с использованием в качестве компонентов подвижной фазы растворы муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле (0,1%) [60,64].

Данная методика имеет ряд преимуществ по сравнению с ранее описанными «коктейльными» методами фенотипирования. В частности, дозировки используемых лекарственных веществ – субстратов в десятки раз меньше соответствующих терапевтических доз. Методика пробоподготовки позволяет экстрагировать аналиты в одну пробу. Разработанная методика ВЭЖХ-МС/МС позволяет провести совместное количественное определение всех исследуемых веществ. Недостатками метода является использование плазмы крови в качестве биообъекта, что позволяет использовать данную методику только в стационаре, а также использование лекарственных веществ, способных вызвать нежелательные лекарственные явления (в частности, декстрометорфан).

Описанный выше состав «коктейля» встречается в более поздних работах, посвященных разработке новых «коктейльных» методов фенотипирования. Ghassabian и соавторы изучали активность ферментов метаболизма у больных шизофренией, используя «коктейль» аналогичного состава. Однако доза принимаемых субстратов отличалась, в частности, размер дозы составлял 100 мг для кофеина, 20 мг для омепразола, 25 мг для лозартана, 30 мг для декстрометорфана и 2 мг для мидазолама [61,65,84]. Используемый биообъект – плазма крови. Пробоподготовка образцов проводилась с помощью жидкость-жидкостной экстракции ацетонитрилом (внутренний стандарт – фенацетин). Количественное определение проводилось с использованием метода ВЭЖХ-

МС/МС, неподвижная фаза – C_{18} , подвижная фаза – растворы муравьиной кислоты в воде и ацетонитриле (0,1%); элюирование изократическое.

Недостатком метода является достаточно высокие дозы субстратов (в частности, доза мидазолама представляет собой 40% от средней дозы, оказывающей фармакологический эффект), а также использование плазмы крови в качестве биообъекта.

«Коктейль» аналогичного состава использовался Такака и соавторами для определения активности метаболизма у здоровых добровольцев [66]. Пробоподготовка образцов проводилась методом твердофазной экстракции, который позволяет максимально очистить исследуемый образец плазмы от белков, однако весьма трудоёмок и дорогостоящ (внутренний стандарт – нитразепам). Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Неподвижная фаза – C_{18} , подвижная фаза – 10мМ раствор аммония ацетата в воде/ацетонитрил; элюирование градиентное. Недостатком является неширокая распространенность пробоподготовки с использованием плэйти *Ostro*TM, использовавшегося в процессе пробоподготовки образцов.

В результате обзора литературы было решено разработать усовершенствованный «коктейльный» метод с использованием эндогенных субстратов и использованием мочи в качестве биожидкости для минимизации риска возникновения нежелательных лекарственных явлений и для уменьшения дискомфорта при отборе проб у пациента. Разрабатываемый метод позволит определить активность изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 с использованием следующих пар субстрат/метаболит: кофеин/параксантин (CYP1A2), лозартан/Е-3174 (CYP2C9), кортизол/6-β-гидрокортизол (CYP3A4) и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (CYP2D6). Учитывая периоды полувыведения исследуемых веществ и циркадные ритмы эндогенных соединений, наилучшим временем для отбора проб мочи является утренняя моча через 2 часа после перорального приёма 25 лозартана и 100 мг кофеина в момент пробуждения от сна.

В Таблице 2 приведены сводные данные по описанным в литературе «коктейльным» методам фенотипирования основных изоферментов цитохрома P450.

Таблица 2 – Описанные в литературе «коктейльные» методы фенотипирования основных изоферментов цитохрома P450

Авторы, год издания	Изоферменты	Субстраты, их дозировка и определяемый метаболит	Биожидкость (методика пробоподготовки)	Методика количественного анализа	Особенности метода
Bing Zhu, Dong-Sheng Ou-Yang, Xiao-Ping Chen et al., 2001.	CYP1A2	кофеин, 200 мг (параксантин)	Моча, плазма крови (жидкостная экстракция)	ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ с флуорометрическим детектированием	Многоэтапная жидкостная экстракция пар субстрат/метаболит по отдельности из различных биожидкостей (моча, плазма).
	CYP2E1	хлороксазон, 200 мг (6- гидроксихлороксазон)			
	CYP2C19	мефенитоин, 100 мг (4'гидроксимефенитоин)			
	CYP2D6	метопролол, 100 мг (α - гидрокси метопролол)			
	CYP3A	мидазолам, 7,5 мг (1'- гидрокси мидазолам)			
Magnus Christensen, Katarina Andersson, Per			Моча, плазма крови (жидкостная экстракция)	ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ с флуорометрическим детектированием	Многоэтапная жидкостная экстракция пар субстрат/метаболит по отдельности из различных

Продолжение Таблицы 2

Dalen et al., 2003.	CYP1A2	кофеин, 100 мг (параксантин)			биожидкостей (моча, плазма).
	CYP2C9	лозартан, 25 мг (Е-3174)			
	CYP2C19	омепразол, 20 мг (5- гидроксиомепразол)			
	CYP2D6	дебризохин. 10 мг (4- гидроксидебризохин)			
	CYP3A4	хинин, 250 мг (3- гидроксихинин)			
Siwarorn Chainuvati, Anne N. Nafziger, J. Steven Leeder et al., 2003.	CYP1A2	кофеин, 2 мг/кг (параксантин)	Моча, плазма крови (жидкостная экстракция)	ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ с флуорометрическим детектированием	Мидазолам вводится внутривенно; Многоэтапная жидкостная экстракция пар субстрат/метаболит по отдельности из различных биожидкостей (моча, плазма).
	CYP2D6	декстрометорфан, 30 мг (декстрорфан)			
	CYP2C19	омепразол, 40 мг (5- гидроксиомепразол)			
	CYP3A	мидазолам, 0,025 мг/кг (1'-гидроксимидазолам)			

Продолжение Таблицы 2

	CYP2C9	варфарин, 10 мг (6-гидроксиварфарин)			
Ophelia Q.P. Yin, Sherry S.L. Lam, Cindy M.Y. Lo et al., 2004.	CYP1A2	кофеин, (параксантин)	Моча, плазма крови (ТФЭ)	ВЭЖХ-МС/МС	Совместная методика ТФЭ определяемых веществ из биожидкости; совместная хроматографическая методика количественного определения
	CYP2C9	толбутамид (4-гидрокситолбутамид)			
	CYP2C19	омепразол (5-гидроксиомепразол)			
	CYP2D6	дебризохин (5-гидроксидебризохин)			
	CYP3A	мидазолам (1'-гидроксиизолам)			
JY Ryu, IS Song, YE Sunwoo et al., 2007.	CYP1A2	кофеин, 93 мг (параксантин)	Моча, плазма крови (жидкостная экстракция)	ВЭЖХ с флуорометрическим детектированием, ВЭЖХ-МС/МС	Многоэтапная жидкостная экстракция пар субстрат/метаболит по отдельности из различных биожидкостей (моча, плазма).
	CYP2C19	омепразол, 20 мг (5-гидроксиомепразол)			
	CYP2D6	декстрометорфан, 30 мг (декстрорфан)			

Продолжение Таблицы 2

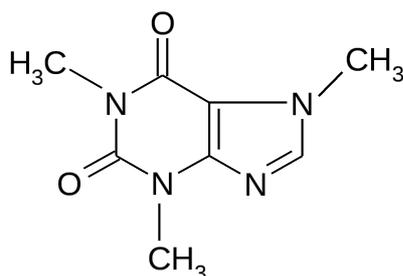
	CYP2C9	лозартан, 30 мг (E-3174)			
	CYP3A4	мидазолам, 2 мг (1'- гидроксизолам)			
Kyung-Suk Oh, Su-Jin Park, Dhananjay D. Shinde et al., 2012	CYP1A2	кофеин, 10 мг (параксантин)	Плазма (жидкостная экстракция)	ВЭЖХ-МС/МС	Совместное извлечение исследуемых веществ из плазмы крови; Совместная методика количественного определения исследуемых веществ в одной пробе
	CYP2C9	лозартан, 2 мг (E-3174)			
	CYP2C19	омепразол, 200 мг (5- гидроксиомепразол)			
	CYP2D6	декстрометорфан, 2 мг (декстрорфан)			
	CYP3A4	мидазолам, 100 мг (1'- гидроксизолам)			

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

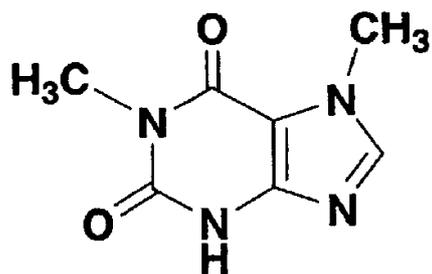
2.1. Физико-химические свойства исследуемых веществ

1. Кофеин



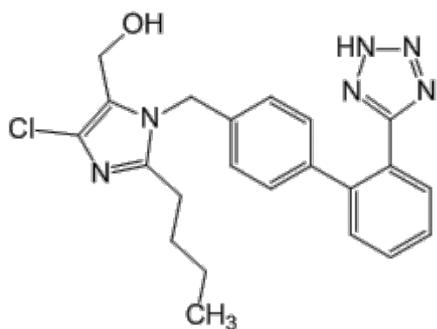
Химическое название:	1,3,7-триметил-1Н-пурин-2,6(3Н,7Н)-дион
Брутто-формула:	$C_8H_{10}N_4O_2$
Молярная масса, г/моль:	194,19
Номер CAS:	58-08-2
Описание:	Белый порошок или кристаллы без запаха
Растворимость:	Умеренно растворим в воде, этаноле, легко растворим в хлороформе
LogP (октанол/вода):	-0,07
Форма выпуска:	Растворы для подкожного введения (100; 200 мг/мл), таблетки (100 мг)

2. Параксантин



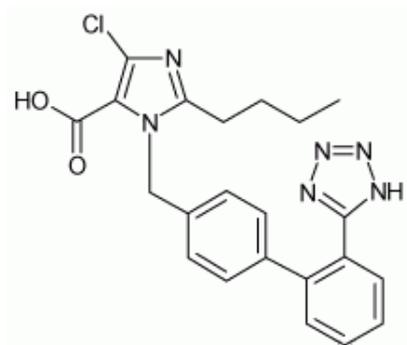
Химическое название:	1,7-диметил-1H-пурин-2,6(3H,7H)-дион
Брутто-формула:	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
Молярная масса, г/моль:	180,16
Номер CAS:	611-59-6
Описание:	Белый порошок или кристаллы без запаха
Растворимость:	Практически не растворим в этаноле, воде, умеренно растворим в 0,1 М NaOH, метаноле
LogP (октанол/вода):	-0,20

3. Лозартан



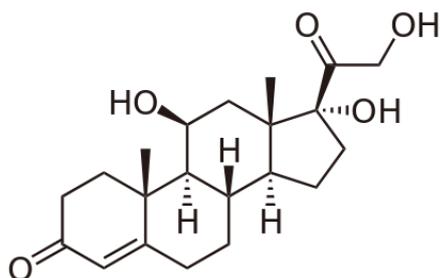
Химическое название:	(2-бутил-4-хлор-1-{[2'-(1H-тетразол-5-ил)дифенил-4-ил]метил}-1H-имидазол-5-ил)-метанол
Брутто-формула:	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O
Молярная масса, г/моль:	422,91
Номер CAS:	114798-26-4
Описание:	Желтоватый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Легко растворим в воде, метаноле
LogP (октанол/вода):	4,01
Форма выпуска:	Таблетки (25; 50; 100 мг)

4. E-3174



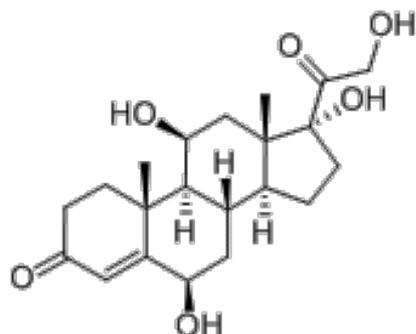
Химическое название:	(2-бутил-4-хлор-1- {[2'-(1H-тетразол-5-ил)дифенил-4-ил] метил} -1H-имидазол-5-ил)-4-карбоновая кислота
Брутто-формула:	C ₂₂ H ₂₁ ClN ₆ O ₂
Молярная масса, г/моль:	436,89
Номер CAS:	124750-92-1
Описание:	Белый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Легко растворим в воде, метаноле
LogP (октанол/вода):	4,19

5. Кортизол

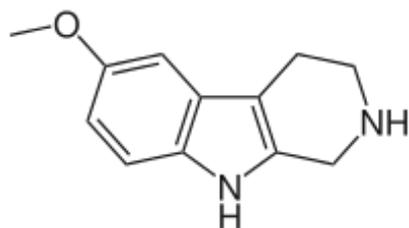


Химическое название:	4-прегнен-11 β ,17 α ,21-триол-3,20-дион
Брутто-формула:	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
Молярная масса, г/моль:	362,46
Номер CAS:	50-23-7
Описание:	Белый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Практически не растворим в воде, легко растворим в этаноле, ацетоне
LogP (октанол/вода):	1,61
Средняя концентрация в организме:	10-100 мкг в суточной моче; утром (6-8 ч) – максимальная концентрации, вечером (20-22 ч) – минимальная концентрация

6. 6-β-гидрокортизол

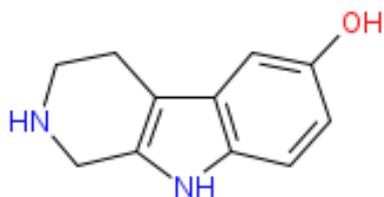


Химическое название:	4-прегнен-6,11β,17α,21-тетрол-3,20-дион
Брутто-формула:	C ₂₁ H ₃₀ O ₆
Молярная масса, г/моль:	378,46
Номер CAS:	3078-34-0
Описание:	Белый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Практически не растворим в воде, легко растворим в этаноле, ацетоне
LogP (октанол/вода):	1,12

7. *Пинолин*

Химическое название:	6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро-9Н-пиридо[3,4- β]индол
Брутто-формула:	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O
Молярная масса, г/моль:	202,26
Номер CAS:	20315-68-8
Описание:	Желтоватый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Практически не растворим в воде, легко растворим в этаноле, ацетоне
LogP (октанол/вода):	1,51
Средняя концентрация в организме:	2 нг/г – 21 мкг/г в различных органах

8. 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин



Химическое название:	6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро-9Н-пиридо[3,4-β]индол
Брутто-формула:	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O
Молярная масса, г/моль:	202,26
Номер CAS:	20315-68-8
Описание:	Желтоватый кристаллический порошок без запаха
Растворимость:	Практически не растворим в воде, легко растворим в этаноле, ацетоне
LogP (октанол/вода):	1,51

2.2. Оборудование

- высокоэффективный жидкостной хроматограф Agilent 1260 включающий в себя градиентный насос, дегазатор, автосамплер, фотодиодноматирчный детектор и тандемный масс-спектрометрический детектор Agilent 6460, США;
- колонка Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм
- центрифуга AllegraX-30R, с охлаждением, Beckman Coulter, Германия;
- вортекс ElmiV-3, Elmi, Латвия;
- морозильник низкотемпературный для хранения замороженной плазмы MDF-U74V, Sanyo, Корея;
- весы Ohaus PA214C, Ohaus, США;
- дозатор переменного объема одноканальный «Колор» 10-5000 мкл, Thermo Scientific, Россия;
- дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема «Техно» 100-1000, Thermo Scientific, Россия;
- холодильник фармацевтический, Liebherr, ЕС;
- морозильник микропроцессорный для хранения замороженной плазмы крови и других биологических материалов MM-180 «Позис», Позис, Россия.

2.3. Реактивы

Стандарты определяемых веществ

- кофеин (Merck, C1778-1VL);
- параксантин (Santa Cruz Biotechnology, sc-212526);
- лозартан (Merck, 61188-100MG);
- E-3174 (Clearsynth, CS-O-10324);
- кортизол (Merck, H4001-1G);
- 6- β -гидрокортизол (Merck, H6904-1MG);
- пинолин (Merck, 37858-100MG);
- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин (Auroga Fine Chemicals кат. № A06.795.158);
- карбамазепин (Merck, 94996-100MG)

Реактивы

- ацетонитрил (Merck, HPLC-grade);
- спирт метиловый (Merck, HPLC-grade);
- муравьиная кислота (Merck, HPLC-grade);
- аммония формиат (Merck, extrapure);
- этилацетат (х.ч.);
- диэтиловый эфир (х.ч.);
- изопропиловый спирт (х.ч.);
- деионизированная вода;
- натрия тетраборат (х.ч.);
- борная кислота (х.ч.);
- натрия гидроксид (х.ч.)

- триэтиламин (х.ч.)
- ацетон (х.ч.)

2.4. Статистическая обработка

Статистическая обработка данных производилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2016 и IBM SPSS v. 23.0.0.0.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Выбор внутреннего стандарта

В качестве внутреннего стандарта был выбран карбамазепин. Изучив описанные «коктейльные» методы, в качестве внутренних стандартов были опробованы следующие вещества: метопролол, пропранолол, парацетамол и карбамазепин, однако указанные лекарственные вещества часто применяются в клинической практике для коррекции различных патологических состояний, что может привести к наличию этих веществ в изначальных образцах мочи. Методика с использованием карбамазепина в качестве ВС удовлетворила всем валидационным критериям. К тому же, структура карбамазепина схожа со структурами молекул пинолина и его метаболита, что позволило снизить значение нижнего предела количественного определения данных веществ за счет оптимизации хроматографических параметров под определение внутреннего стандарта.

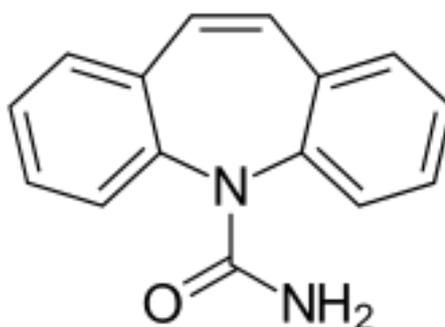


Рисунок 3 – Структурная формула карбамазепина

3.2. Разработка методики количественного определения аналитов в моче

3.2.1. Отбор проб, пробоподготовка.

Процесс отбора проб разрабатывается и проводится с максимальной воспроизводимостью в одинаковых условиях для минимизации изменения качественного и количественного состава образца.

Так как одной из задач при разработке методики являлась минимизация инвазивности метода и дискомфорта для пациента, то в качестве биообъекта была выбрана моча, собранная в течение 8 часов после приёма лекарственных веществ – маркеров. В течение этого времени метаболизируется и выводится достаточная часть используемых в исследовании лекарственных веществ, после чего возможно определить концентрации веществ и их метаболитов в моче.

Пробоподготовка мочи

Для выполнения задачи разработки методики совместного определения всех аналитов в одной пробе, необходимо разработать соответствующий метод пробоподготовки, позволяющий произвести изолирование всех аналитов. В качестве метода пробоподготовки был выбран метод жидкостной экстракции, позволяющий произвести экстрагирование всех аналитов в смесь органических растворителей с последующим упариванием органического слоя и концентрированием пробы путем перерастворения сухового остатка в меньшем объеме жидкости.

Была проведена работа по определению состава экстрагента, позволяющего в максимально полном объеме экстрагировать определяемые вещества. В результате был разработан метод двойной жидкостной экстракции веществ из анализируемой пробы. Для экстрагирования всех веществ, за исключением пинолина и его метаболита, наилучшим образом подходит смесь *этилацетат* :

гексан : *диэтиловый эфир* (50:35:15). Для экстракции пинолина и его метаболита из мочи следует корректировать pH образца боратным буфером, после чего провести экстракцию смесью *этилацетат* : *гексан* (50:50).

В ходе работы были опробованы следующие методики пробоподготовки:

Методика пробоподготовки №1: к 0,5 мл образца мочи, помещенному в микропробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, прибавляли 1 мл ацетонитрила, после чего пробирку встряхивали на вихревой мешалке в течение 10 секунд. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 13200 об/мин. Надосадочную жидкость переливали в чистую микропробирку и упаривали в вакуумно-роторном испарителе. Полученный сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола, затем полученный раствор переливали в вialу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Методика пробоподготовки №2: к 0,5 мл образца мочи, помещенному в микропробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, прибавляли 1 мл ацетонитрила, после чего пробирку встряхивали на вихревой мешалке в течение 10 секунд. Полученную смесь центрифугировали в течение 10 минут со скоростью 13200 об/мин. Надосадочную жидкость переливали в чистую микропробирку и упаривали в вакуумно-роторном испарителе. К сухому остатку прибавляли 1 мл смеси *хлороформ* : *изопропанол* (85:15), после чего проводили экстракцию на вихревой мешалке в течение 10 минут. Органический слой упаривали на вакуумно-роторном испарителе. Сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола, затем полученный раствор переливали в вialу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Методика пробоподготовки №3: к 1 мл образца мочи, помещенному в стеклянную пробирку для экстракции объемом 4 мл, прибавляли 2 мл смеси *этилацетат* : *гексан* (50:50), после чего пробирку помещали в вихревую мешалку и экстрагировали в течение 10 минут. После процедуры экстракции органический слой отделяли и помещали в чистую пробирку для экстракции объемом 4 мл. Экстракцию проводили дважды. Объединенный органический слой упаривали в вакуумно-роторном испарителе, после чего сухой остаток перерастворяли в 100

мкл метанола, затем полученный раствор переливали в виалу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Методика пробоподготовки №4: к 1 мл образца мочи, помещенному в стеклянную пробирку для экстракции объемом 4 мл, прибавляли 2 мл смеси *этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15)*, после чего пробирку помещали в вихревую мешалку и экстрагировали в течение 10 минут. После процедуры экстракции органический слой отделяли и помещали в чистую пробирку для экстракции объемом 4 мл. К оставшейся водной фазе добавляли 0,5 мл боратного буфера (рН=9,4), 2 мл смеси *этилацетат : гексан (50:50)*, после чего проводили процедуру экстракции на вихревой мешалке в течение 10 минут. После экстракции органический слой отделяли и объединяли с органическим слоем, полученным после первого этапа экстракции. Объединенный органический слой упаривали в вакуумно-роторном испарителе, после чего сухой остаток перерастворяли в 100 мкл метанола, затем полученный раствор переливали в виалу для хроматографирования и помещали в автосемплер хроматографа.

Для разработки методики пробоподготовки были использованы различные смеси органических растворителей. Необходимо было учитывать, что основной целью разработки данного метода совместного определения исследуемых веществ в моче является максимальная простота и точность с целью дальнейшего введения метода в клиническую практику. Из методов, описанных в предыдущем разделе, наибольшие показатели полноты экстракции и воспроизводимости продемонстрировал метод №4.

3.2.2. *Подбор хроматографических условий*

В качестве метода определения был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. В качестве детектора был выбран тандемный масс-спектрометр, который является наиболее чувствительным и специфичным, что позволяет совместное определение большого количества веществ.

Исследуемые вещества имеют различные химические свойства; по большей части молекулы неполярны, при этом ряд из них обладает кислотными свойствами, а ряд - основными. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм. Для лучшего разделения веществ был разработан метод градиентного элюирования, что позволило разделить аналиты надлежащим образом. Для этого экспериментально были проверены разные составы подвижных фаз (ацетонитрил:0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, метанол : фосфатный буфер (pH=5,4), 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде).

В Таблице 3 приведены хроматографические условия разработанной методики.

Таблица 3 – Хроматографические параметры и параметры детектора

Таблица 3.1. Параметры оборудования

Хроматограф:	Agilent 1290 Infinity
Колонка:	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм
Температура термостата	50 °C
Мобильная фаза:	Растворитель А: 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде Растворитель В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.
Скорость потока:	0,4 миллилитра в минуту
Объем ввода анализа:	10 мкл
Время хроматографирования:	14 мин

Таблица 3.1 – Режим градиентного элюирования

Время, мин	Растворитель А, % (об/об)	растворитель В, % (об/об)
0	90,0	10,0
1,5	90,0	10,0
2,0	80,0	40,0
8,5	30,0	70,0
12,0	95,0	5,0
14,0	90,0	10,0

Таблица 3.2 – Параметры MRM-переходов:

Параметр	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-гидроксикортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Полярность	+	+	+	+	-	-	+	+
Ион-прекурсор (m/z)	195,0	181,0	423,2	437,2	407,0	423	203,2	189,0
Дочерний ион (m/z)	138,3	123,4	207,1	235,1	331,0	347	147,0	117,0
Энергия соударения, В	30	30	34	34	-26	-26	35	30

Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин: кофеин – около 4,1; параксантин – около 3,0; лозартан - около 7,0; E-3174 – около 6,2; кортизол – около 4,9; 6-β-гидрокортизол – около 4,3; 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1; пинолин – около 5,0; карбамазепин – около 7,2.

3.3. Разработка методики количественного определения аналитов в плазме крови

3.3.1. Отбор проб, пробоподготовка.

Венозную кровь отбирали в вакуумные пробирки с ЭДТА, отделяли плазму с помощью центрифугирования 10 мин при 2000 об/мин и отбирали 1-2 мл плазмы в полипропиленовые пробирки типа эппендорф. Сыворотку замораживали и хранили в холодильнике при – 20°C. С учетом циркадности секреции эндогенных веществ, забор крови проводили не позднее 8:00 часов.

Пробоподготовка плазмы крови

Для выполнения задачи разработки методики совместного определения всех аналитов в одной пробе, необходимо разработать соответствующий метод пробоподготовки, позволяющий произвести их изолирование при совместном присутствии. В качестве метода пробоподготовки был выбран метод твердофазной экстракции, позволяющий произвести экстрагирование всех аналитов с последующим упариванием элюата и концентрирования пробы путем перерастворения сухого остатка в меньшем объеме жидкости.

Была проведена работа по определению состава элюента, а также растворов для промывки и активации картриджа, позволяющего в максимально полном объеме экстрагировать определяемые вещества. Разработанная методика приведена ниже:

Картридж Chromabond® C18 для ТФЭ активировали последовательно 1 мл метанола, 1 мл ацетона, 1 мл воды и 2 мл боратного буфера (pH=9,6). К 500 мкл плазмы добавляли внутренний стандарт и 20 мкл концентрированной ортофосфорной кислоты. Осторожно перемешивали, выдерживали 5 мин и вводили в картридж самотеком. Затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл 0,1 М раствора гидроксида натрия, 1 мл смеси ацетонитрил:вода (10:90) и высушивали под вакуумом в течение 2 мин. Элюировали 1 мл 0,1% раствором триэтиламина в метаноле в стеклянные флаконы и упаривали досуха при температуре 70 °С. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 50% водного метанола и 20 мкл вводили в хроматограф.

3.3.2. *Подбор хроматографических условий*

В качестве метода определения был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. В качестве детектора был выбран тандемный масс-спектрометр, который является наиболее чувствительным и специфичным, что позволяет совместное определение большого количества веществ.

Исследуемые вещества имеют различные химические свойства; по большей части молекулы неполярны, при этом ряд из них обладает кислотными свойствами, а ряд - основными. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм. Для лучшего разделения веществ был разработан метод градиентного элюирования, что позволило разделить аналиты надлежащим образом. Для этого экспериментально были проверены разные составы подвижных фаз (ацетонитрил: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, метанол : фосфатный буфер (pH=5,4), 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде, метанол : фосфатный буфер (pH=5,4), 0,1% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле: 0,1% раствор муравьиной кислоты в воде).

В Таблице 4 приведены хроматографические условия разработанной методики.

Таблица 4– Хроматографические параметры и параметры детектора

Таблица 4.1. Параметры оборудования

Хроматограф:	Agilent 1290 Infinity
Колонка:	Agilent Eclipse XDB-C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм
Температура термостата	50 °С
Мобильная фаза:	Растворитель А: 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде Растворитель В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.
Скорость потока:	0,4 миллилитра в минуту
Объем ввода анализа:	10 мкл
Время хроматографирования:	14 мин
Параметры масс-спектрометра:	Тип ионизации: Электроспрей (ESI) Напряжение на капилляре: 3500 В Температура ионной трубки: 350 °С Температура ионизационной камеры: 400 °С Вспомогательный газ: 10,00 литров в минуту Газ периферийного слоя: 11,00 литров в минуту Газ соударения: 3,00 литров в минуту Давление газа в коллизионной ячейке: 2,0 мТорр

Таблица 4.1 – Режим градиентного элюирования

Время, мин	Растворитель А, % (об/об)	растворитель В, % (об/об)
0	90,0	10,0
1,5	90,0	10,0
2,0	80,0	40,0
8,5	30,0	70,0
12,0	95,0	5,0
14,0	90,0	10,0

Таблица 4.2 – Параметры MRM-переходов:

Параметр	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-гидрокортизол	Пиолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	Параксантин
Полярность	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Ион-прекурсор (m/z)	195,0	181,0	423,2	437,2	407,0	423,0	203,2	189,0	237,1
Дочерний ион (m/z)	138,3	123,4	207,1	235,1	331,0	347,0	147,0	117,0	194,0
Энергия соударения, В	30	30	34	34	-26	-26	35	30	30

Приблизительные времена удерживания исследуемых веществ, мин: кофеин – около 4,1; параксантин – около 3,0; лозартан - около 7,0; Е-3174 – около 6,2; кортизол – около 4,9; 6-β-гидрокортизол – около 4,3; 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1; пиолин – около 5,0; карбамазепин – около 7,2.

3.4. Валидация разработанных методик количественного определения аналитов в плазме крови и моче

Валидация разработанных методик проводилась в соответствии со следующими 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, 2013.
3. Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011.
4. Методические указания «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств». Под ред. В.Г. Кукеса, В.П. Фисенко. М., МЗиСР России, 2008.

В результате валидации была доказана пригодность методик для использования в лабораторной практике. Ниже приведено описание валидации по основным параметрам.

3.4.1. Селективность

Для определения параметров селективности отбирали 6 образцов биологической матрицы (плазма крови или моча), очищенных от мешающих эндогенных веществ, к которым добавляли стандартные растворы определяемых аналитов.

Для приготовления бланковой мочи биообъект подвергали двухкратной жидкостной экстракции смесью этилацетат : гексан : диэтиловый эфир (50:35:15) с последующим добавлением к отделенной водной фазе боратного буфера (pH = 9,4) и смеси этилацетат : гексан (50:50).

Бланковую плазму крови, очищенную от эндогенных веществ, готовили путем жидкостной экстракции. К образцу плазмы крови добавляли 0,1 М раствор гидроксида натрия и смесь диэтиловый эфир : этилацетата (3:1). Проводили экстракцию, органический слой отбрасывали, оставляя водный слой в качестве бланка.

На хроматограммах образцов интактной биожидкости отсутствовали пики, характеристические для определяемых веществ. Хроматограммы, полученные при определении селективности методик, приведены на Рисунках 4 – 13 (моча) и 14 – 23 (плазма крови). Концентрация аналитов в образцах соответствует нижнему пределу количественного определения (нПКО) разработанных методик.

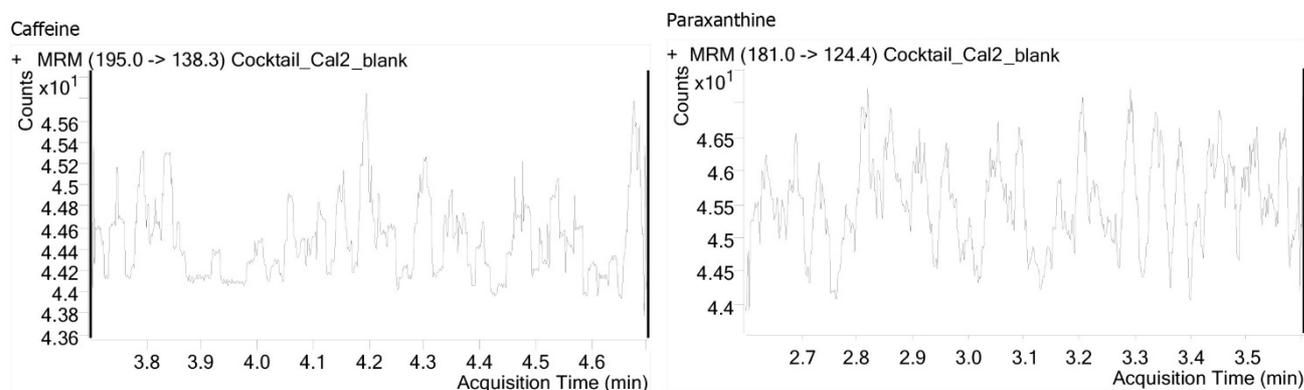


Рисунок 4 – Хроматограмма образца мочи без содержания определяемых веществ
(кофеин/параксантин)

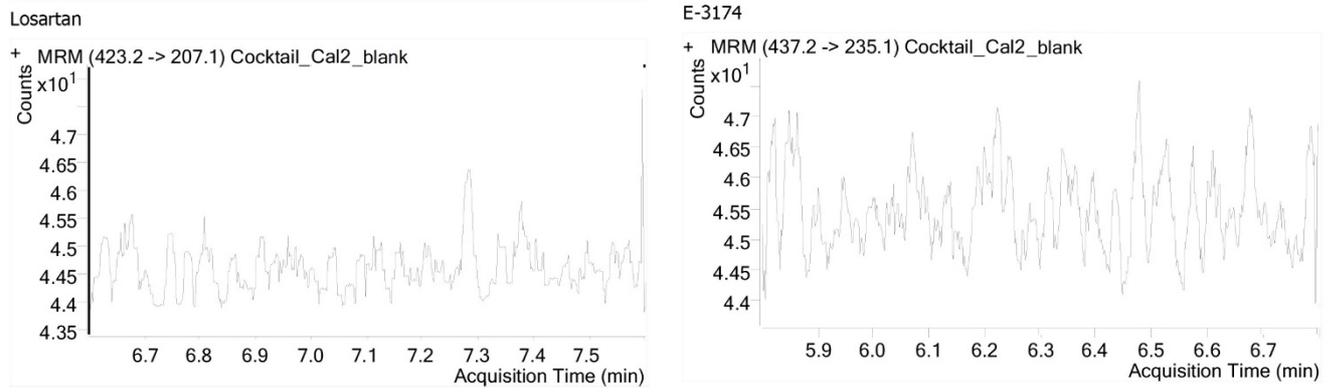


Рисунок 5 – Хроматограмма образца мочи без содержания определяемых веществ (лозартан/Е-3174)

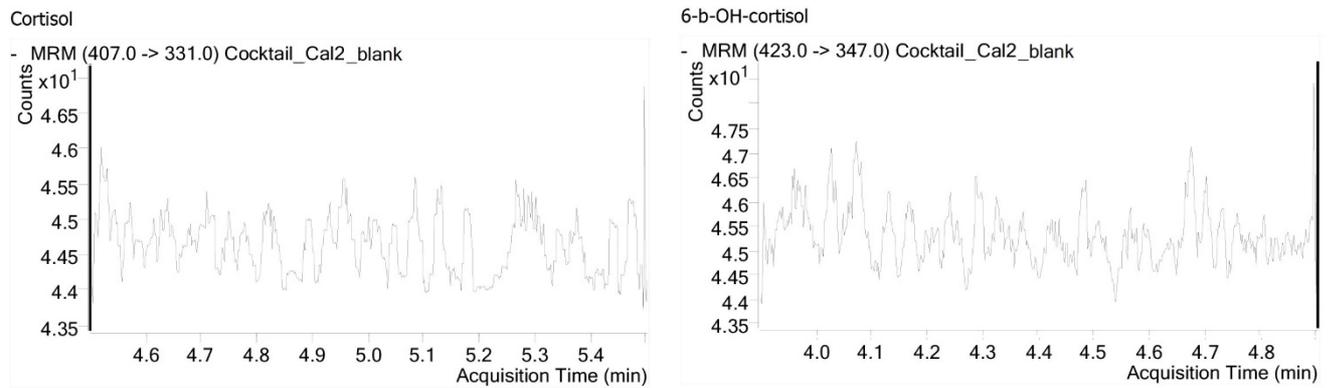


Рисунок 6 – Хроматограмма образца мочи без содержания определяемых веществ (кортизол/6-β-гидрокортизол)

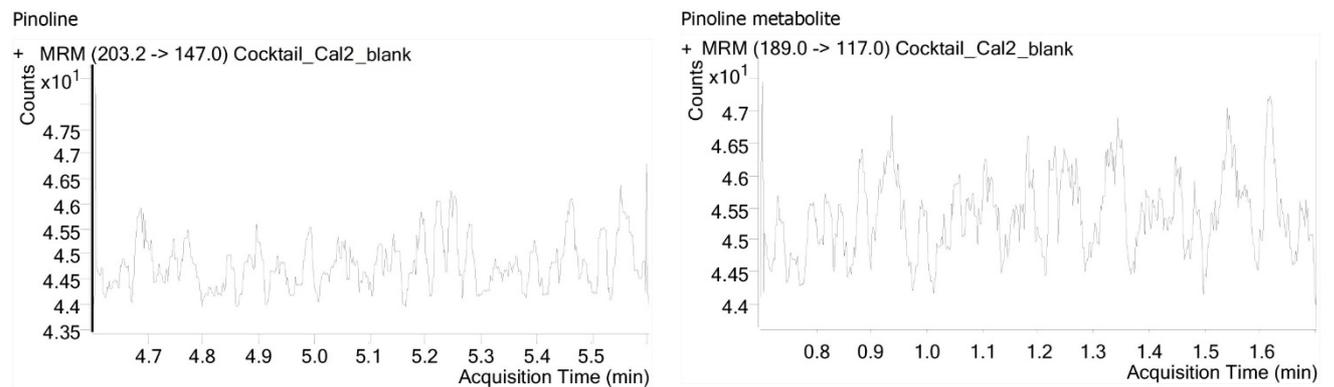


Рисунок 7 – Хроматограмма образца мочи без содержания определяемых веществ (пинолин/метаболит)

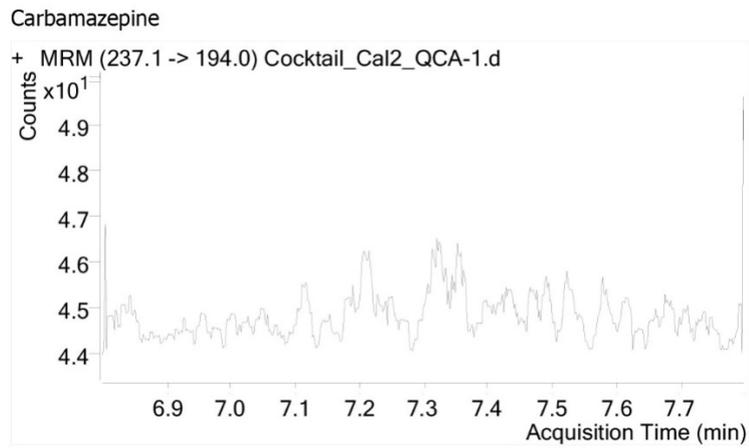


Рисунок 8 – Хроматограмма образца мочи без содержания определяемых веществ (ВС карбамазепин)

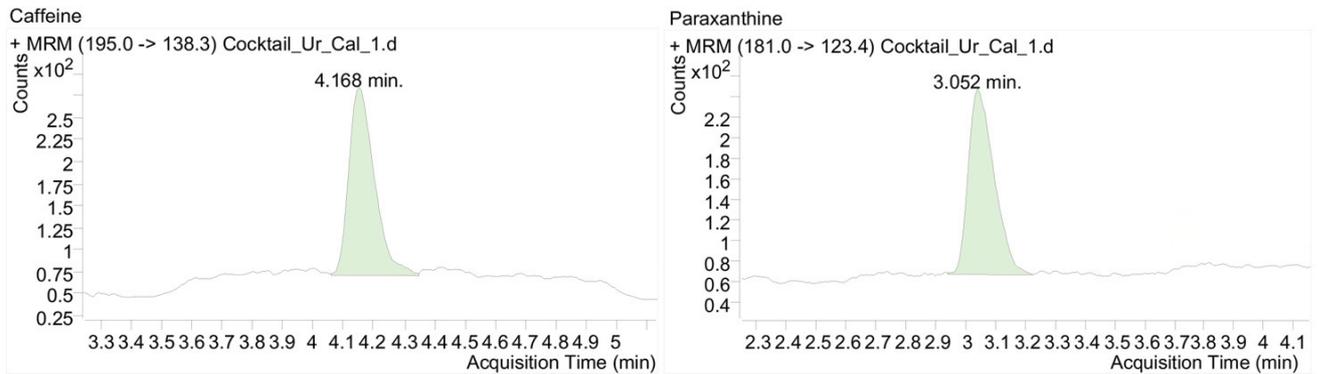


Рисунок 9 – Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (кофеин/параксантин) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

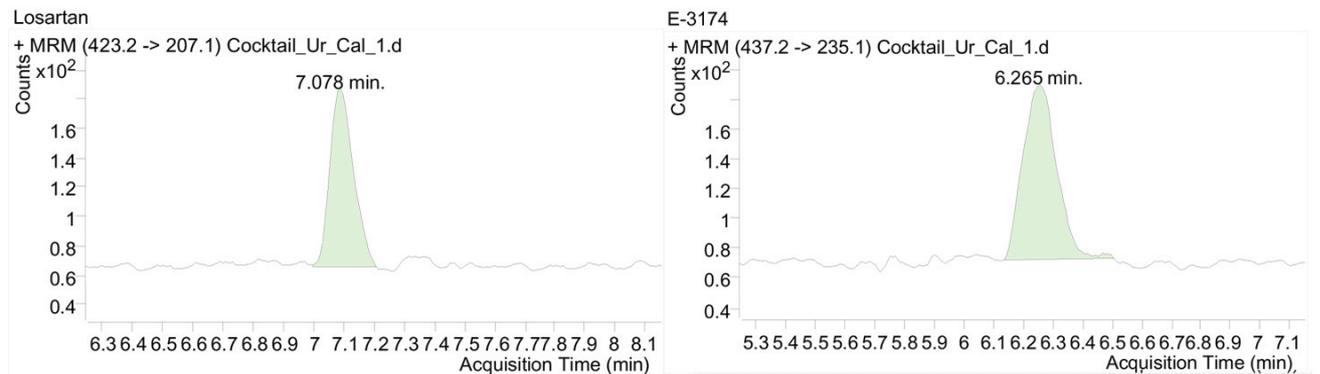


Рисунок 10 – Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (лозартан/Е-3174) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

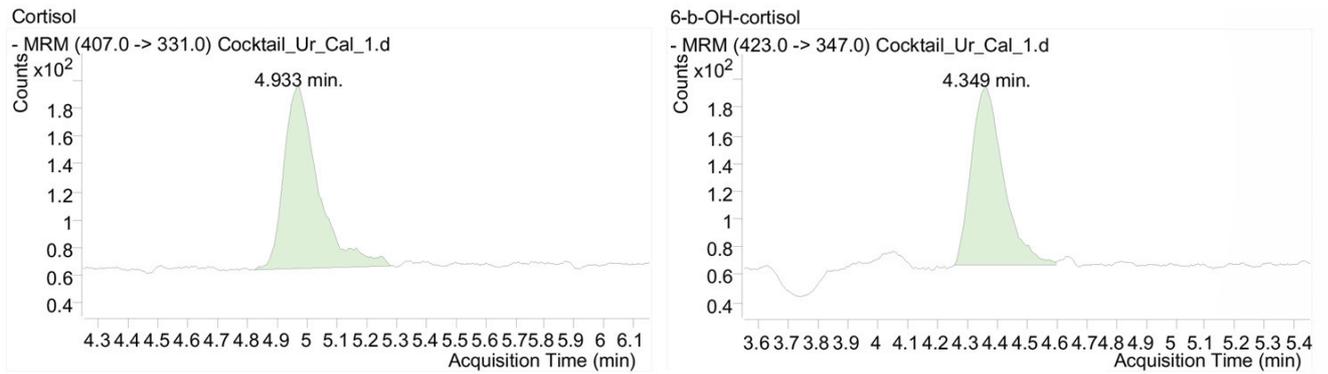


Рисунок 11 – Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (кортизол/6-β-гидрокортизол) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

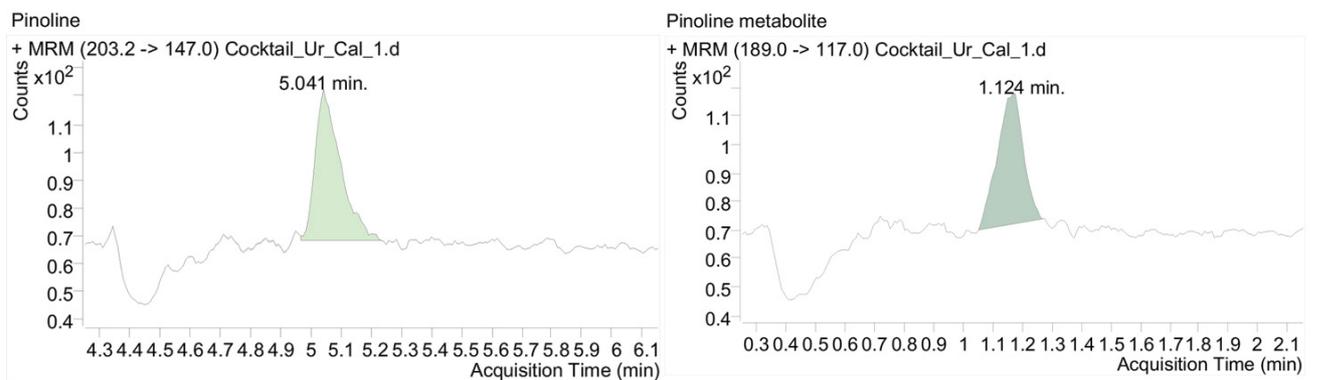


Рисунок 12 – Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (пинолин/метаболит) на уровне нПКО (0,5 нг/мл; 0,5 нг/мл)

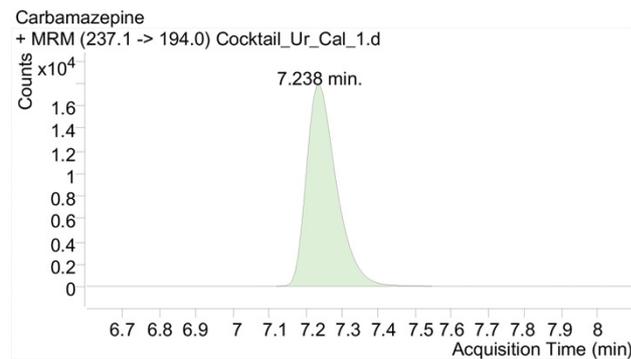


Рисунок 13 – Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (ВС карбамазепин)

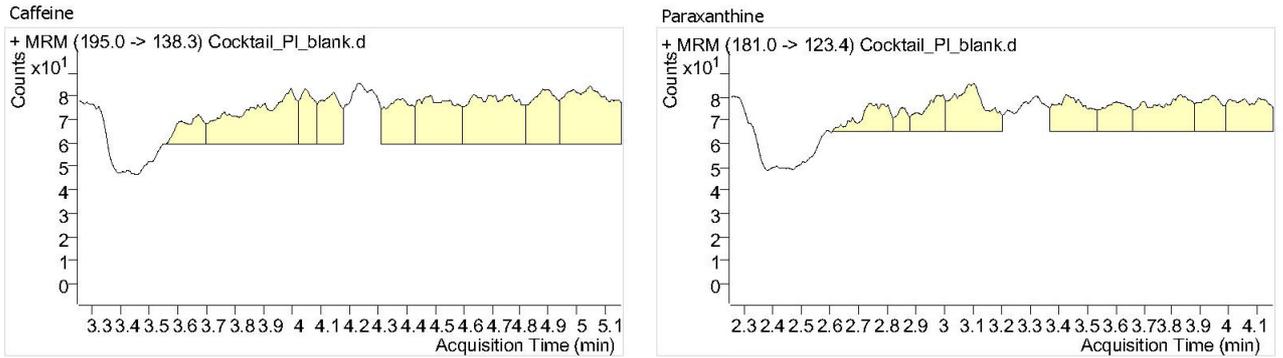


Рисунок 14 – Хроматограмма образца плазмы крови без содержания определяемых веществ (кофеин/параксантин)

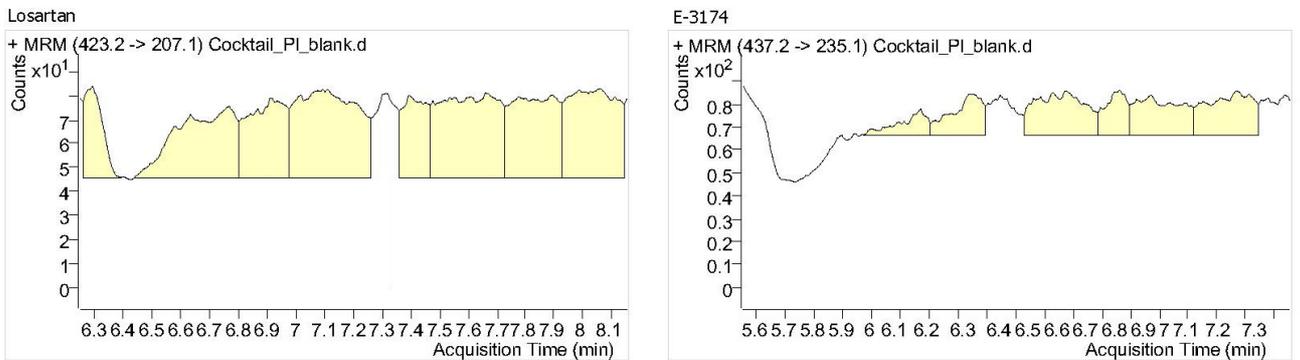


Рисунок 15 – Хроматограмма образца плазмы крови без содержания определяемых веществ (лозартан/Е-3174)

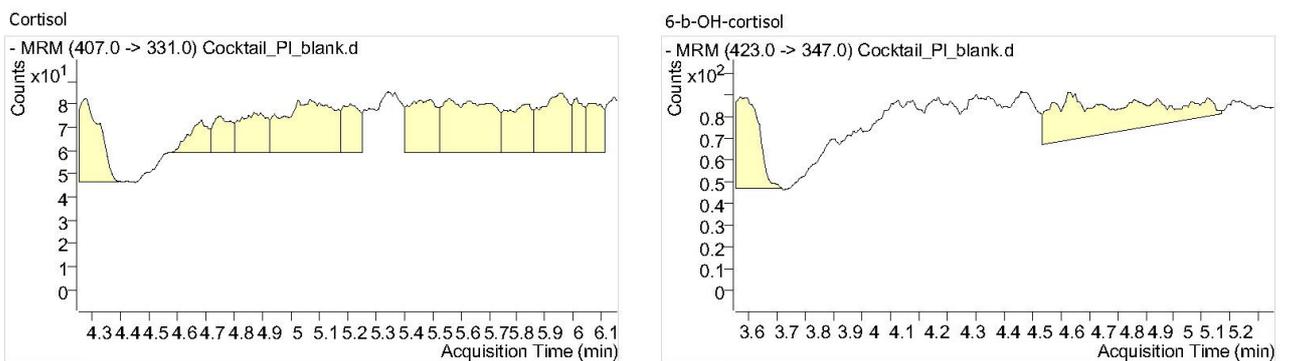


Рисунок 16 – Хроматограмма образца плазмы крови без содержания определяемых веществ (кортизол/6-β-гидрокортизол)

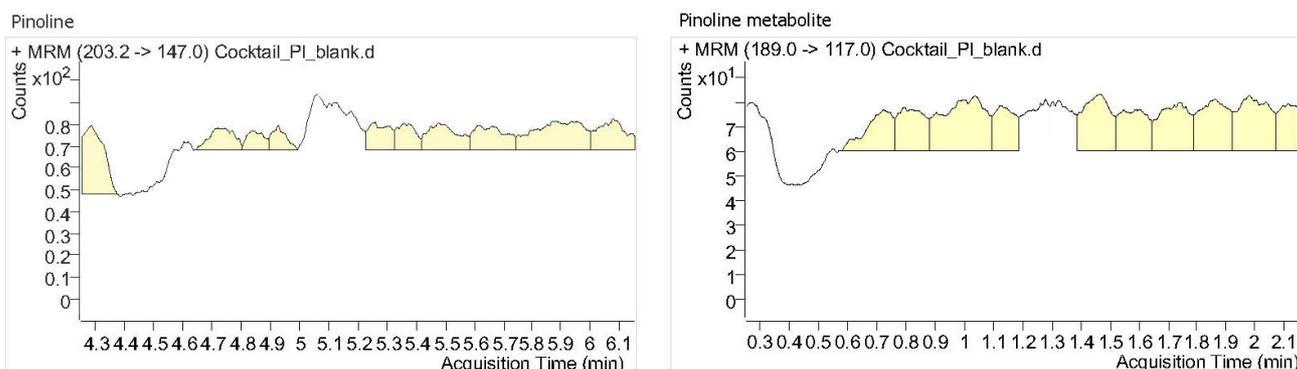


Рисунок 17 – Хроматограмма образца плазмы крови без содержания определяемых веществ (пинолин/метаболит)

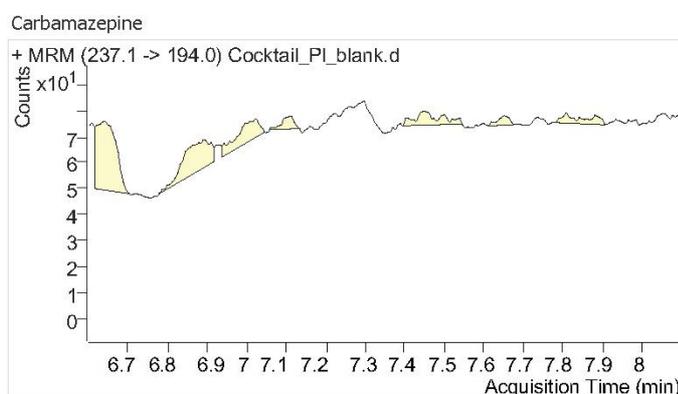


Рисунок 18 – Хроматограмма образца плазмы крови без содержания определяемых веществ (ВС карбамазепин)

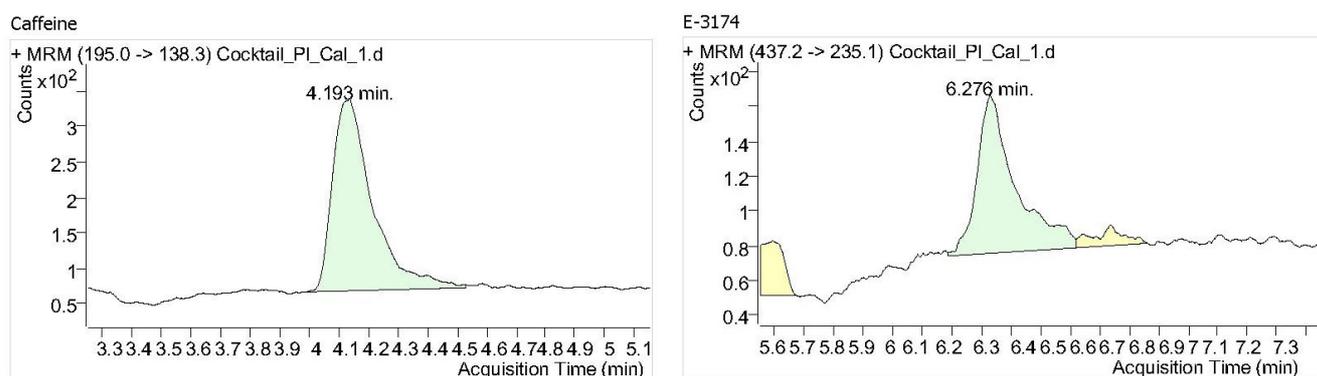


Рисунок 19 – Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (кофеин/параксантин) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

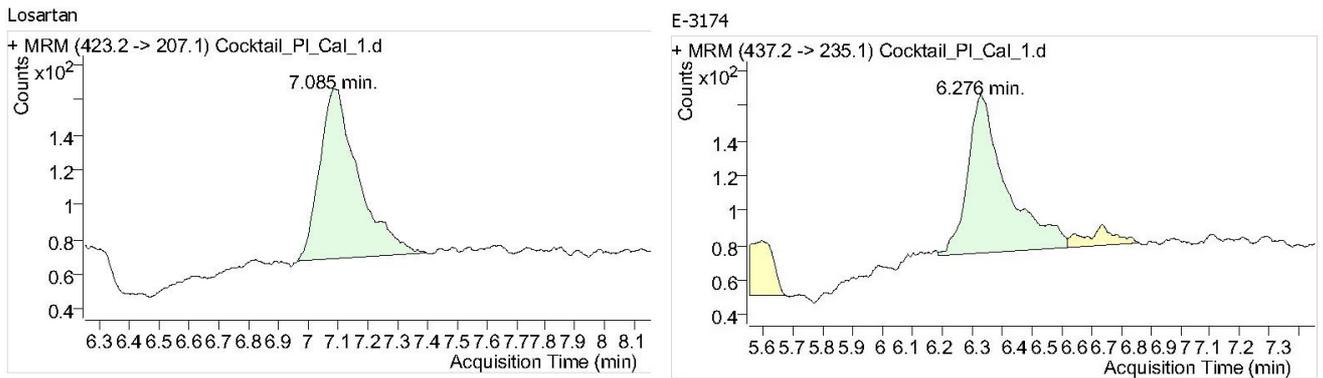


Рисунок 20 – Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (лозартан/Е-3174) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

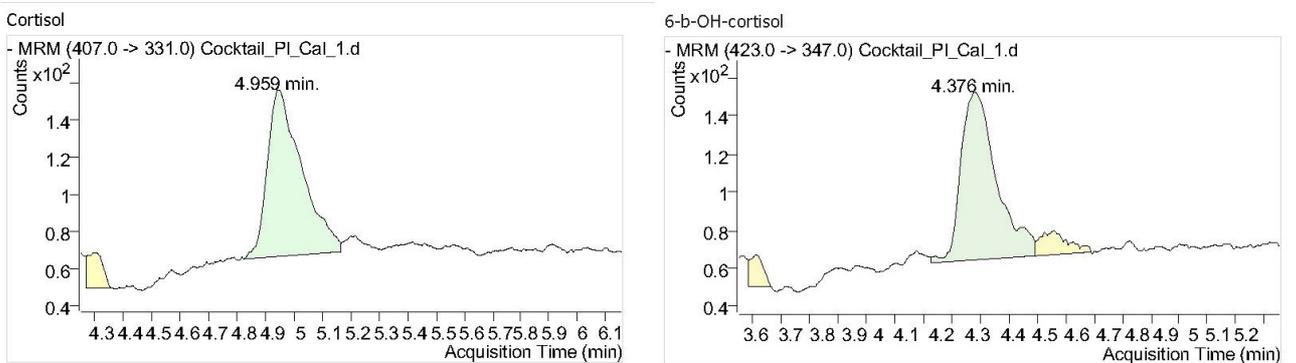


Рисунок 21 – Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (кортизол/6-β-гидрокортизол) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

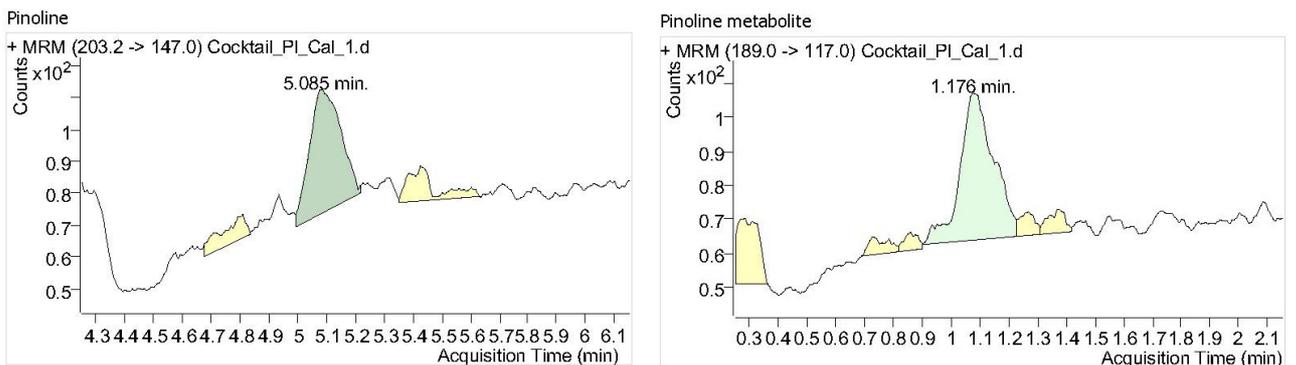


Рисунок 22 – Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (пинолин/метаболит) на уровне нПКО (0,25 нг/мл; 0,25 нг/мл)

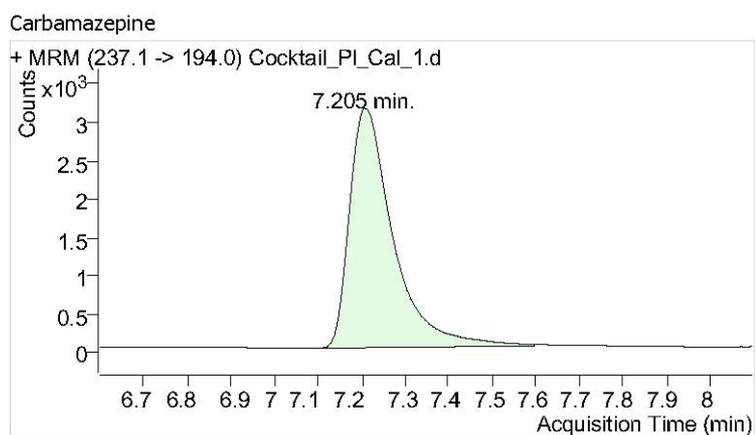


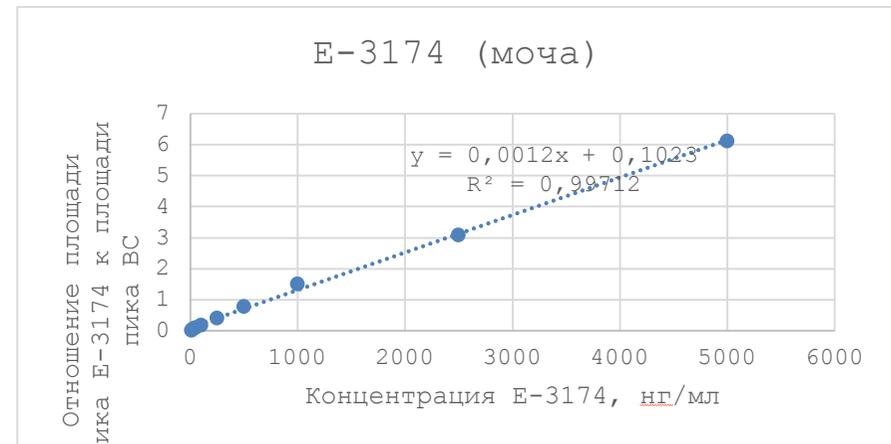
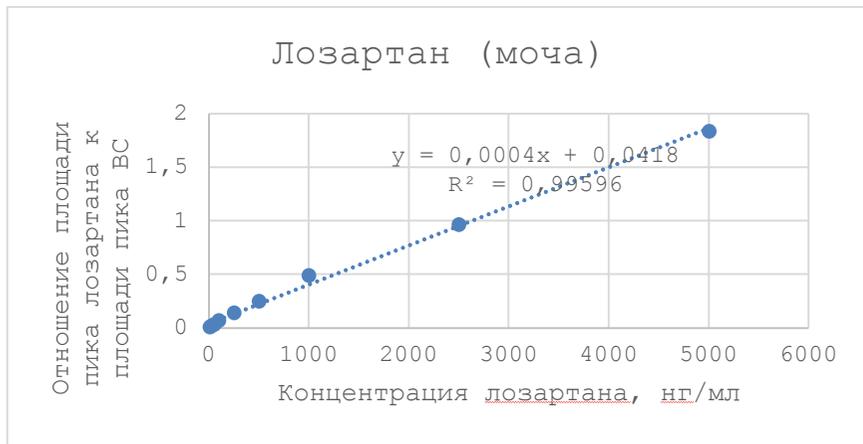
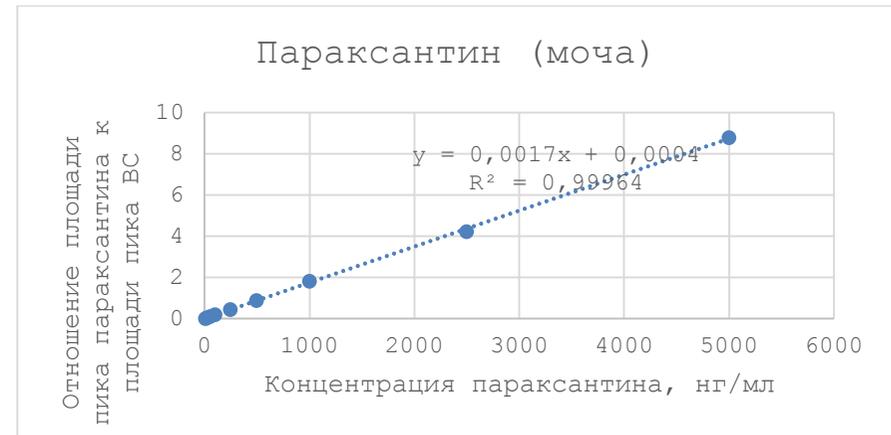
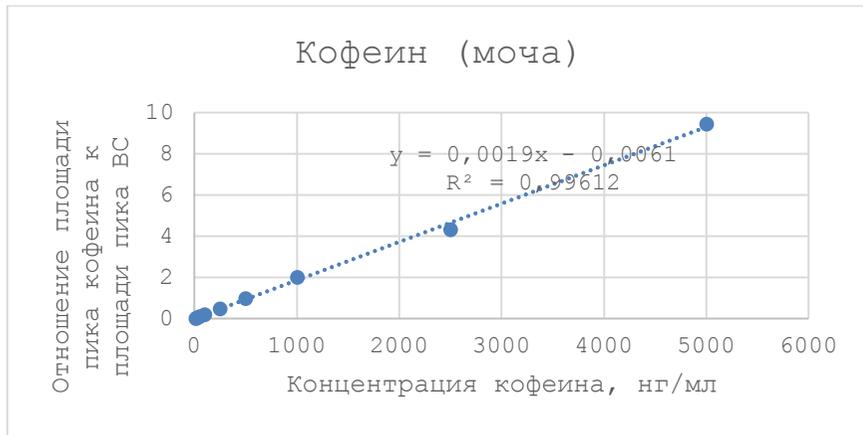
Рисунок 23 – Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества
(ВС карбамазепин)

Критерием приемлемости отсутствия потенциально мешающих веществ является то, что значения площади хроматографических пиков со временами удерживания, характерными для аналитов, не превышают 20% от значения площади пика стандарта нПКО определяемых веществ.

3.4.2. *Линейность*

Для определения линейности готовили 8 образцов интактной биологической матрицы с добавлением рабочих растворов исследуемых аналитов, как указано в Таблице 5а (моча) и Таблице 5б (плазма крови), и проводили хроматографический анализ. Затем по результатам анализа были построены калибровочные кривые (приведены на Рисунке 14а (моча) и Рисунке 15а (плазма крови)), где также приведены соответствующие уравнения калибровочных кривых.

По результатам полученных калибровочных кривых рассчитаны концентрации используемых калибровочных стандартов по калибровочным кривым. По полученным данным проведена статистическая обработка. В результате статистических расчётов была доказана линейность разработанной методики, соответствующая критерию приемлимости – расчётное значение концентрации аналитов на уровне нПКО отклоняется от значения теоретической концентрации не более, чем на 20%; отклонение значений концентраций остальных калибровочных уровней составило не более 15% от значения соответствующей теоретической концентрации.



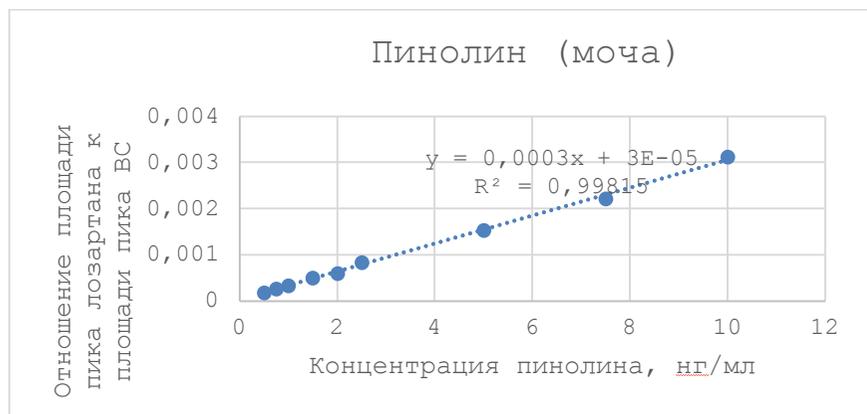
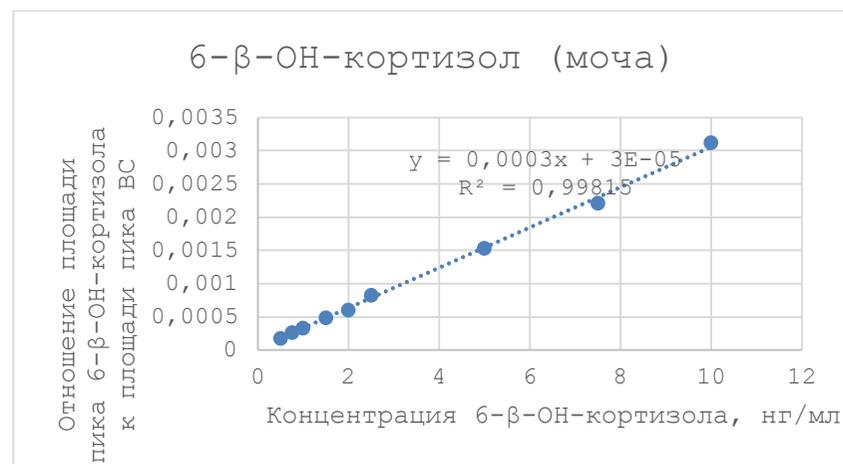
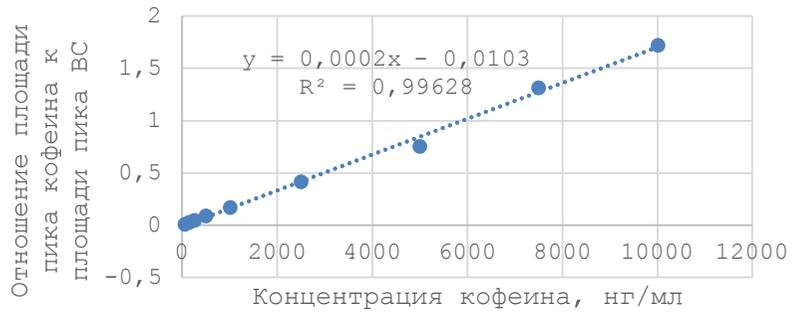
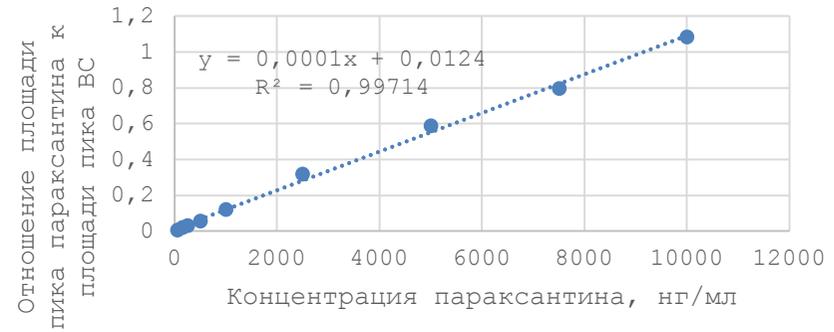


Рисунок 14а – Калибровочные кривые, построенные после анализа калибровочных образцов (моча)

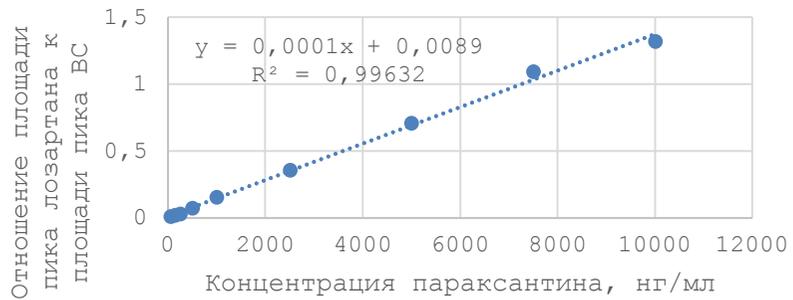
Кофеин (плазма крови)



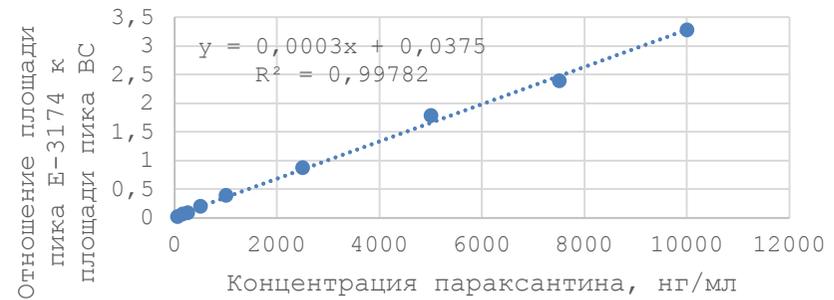
Параксантин (плазма крови)



Лозартан (плазма крови)



Е-3174 (плазма крови)



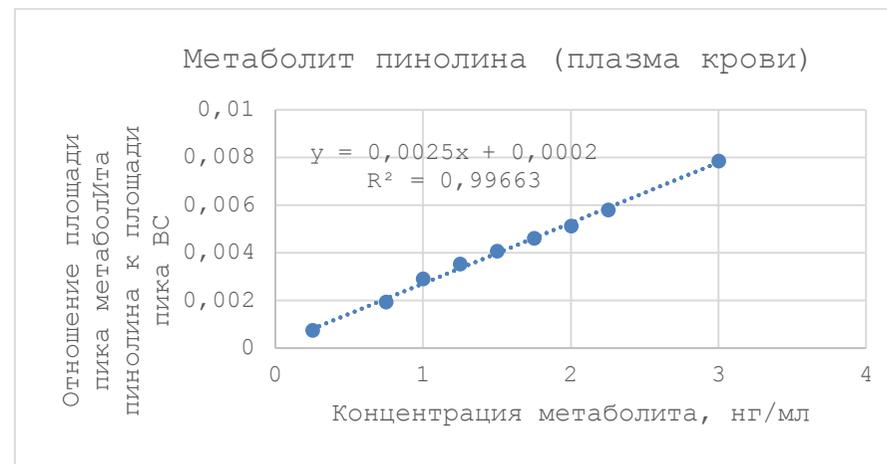
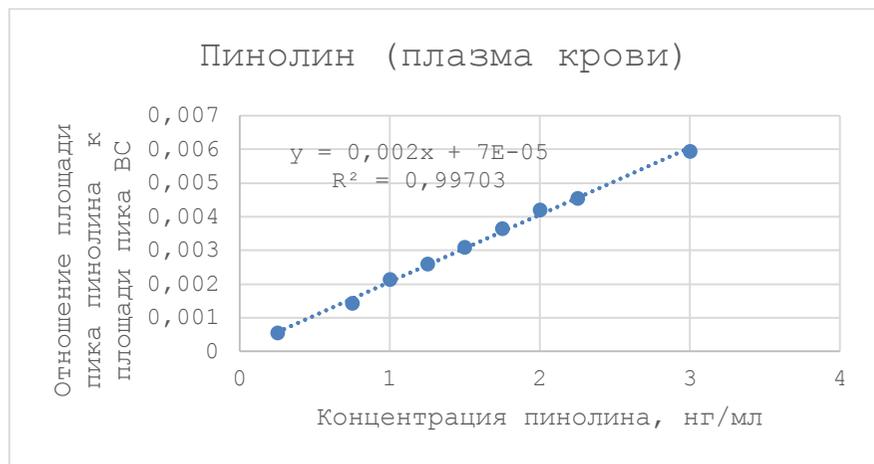
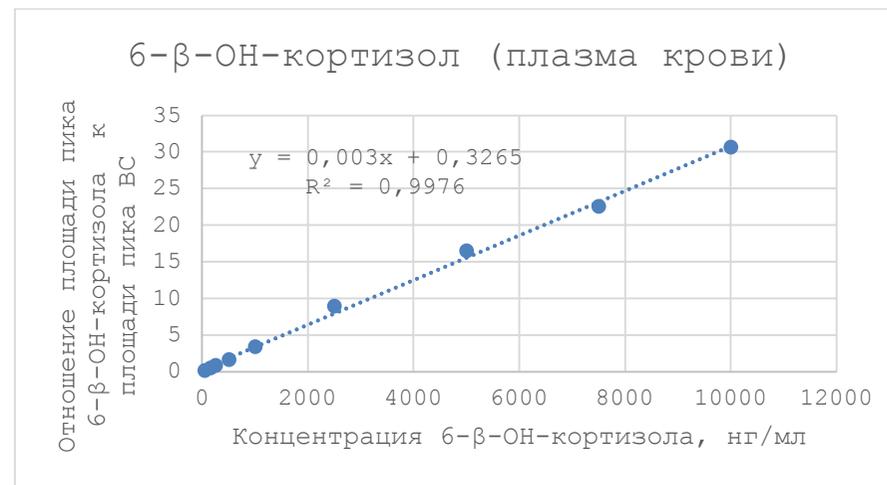
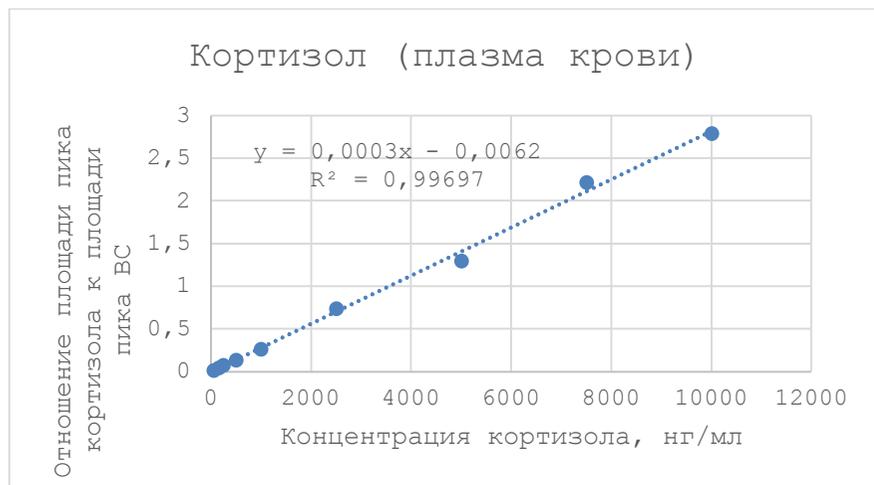


Рисунок 146 – Калибровочные кривые, построенные после анализа калибровочных образцов (плазма крови)

3.4.3. *Эффект матрицы и степень извлечения*

Для оценки влияния сопутствующих веществ, находящихся в матрице, на количественное определение исследуемых аналитов, проводят расчёт фактора матрицы, который представляет собой значения отношения площади хроматографического пика аналита в образце с матрицей к площади хроматографического пика аналита той же концентрации в чистом растворе (без матрицы). Также рассчитывается фактор матрицы, нормализованный по внутреннему стандарту, путём деления рассчитанного значения фактора матрицы аналита на значение фактора матрицы внутреннего стандарта. Для определения фактора матрицы используют образцы контроля с концентрациями аналита на уровне ККБ и ККГ (в соответствии с Таблицей 6а (моча) и 6б (плазма крови)). Анализ проводится в 6 сериях для каждого значения концентрации. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки эффекта матрицы представлены в Таблице 7а (моча) и 7б (плазма крови).

Для расчёта показателей извлечения аналитов из мочи были определены отношения площадей хроматографических пиков в образцах контроля, полученных путем экстрагирования из образцов контроля качества ККБ и ККГ с площадями хроматографических пиков из образцов без проведения экстракции. Анализ проводится в 6 сериях для каждого значения концентрации. Результаты соответствуют критериям приемлемости. Результаты оценки степени извлечения представлены в Таблице 8а (моча) и 8б (плазма крови).

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

Таблица 6а – Содержание определяемых веществ в образцах контроля качества (моча)

Образец контроля качества		ККА	ККБ	ККВ	ККГ
Концентрация аналита, нг/мл	Кофеин	10	30	2500	3750
	Параксантин	10	30	2500	3750
	Лозартан	10	30	2500	3750
	Е-3174	10	30	2500	3750
	Кортизол	10	30	2500	3750
	6-β-ОН-кортизол	10	30	2500	3750
	Пинолин	0,5	1,5	5	7,5
	Метаболит пин	0,5	1,5	5	7,5

Таблица 6б – Содержание определяемых веществ в образцах контроля качества (плазма крови)

Образец контроля качества		ККА	ККБ	ККВ	ККГ
Концентрация аналита, нг/мл	Кофеин	50	150	5000	7500
	Параксантин	50	150	5000	7500
	Лозартан	50	150	5000	7500
	Е-3174	50	150	5000	7500
	Кортизол	50	150	5000	7500
	6-β-ОН-кортизол	50	150	5000	7500
	Пинолин	0,25	0,75	1,50	2,25
	Метаболит пин	0,25	0,75	1,50	2,25

Таблица 7а – Результаты оценки эффекта матрицы (моча)

Аналит		Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	ККБ	5,12	7,65	10,12	2,76	6,87	11,03	9,84	6,73
	ККГ	4,98	11,87	11,23	4,75	12,15	10,20	9,33	10,45

Таблица 7б – Результаты оценки эффекта матрицы (плазма крови)

Аналит		Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Коэффициент вариации фактора, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта, %	ККБ	4,34	5,18	5,93	3,19	4,87	7,68	7,11	6,96
	ККГ	3,56	3,59	2,75	2,19	2,05	2,31	3,85	5,19

Таблица 8а – Результаты оценки степени извлечения (моча)

	Аналит	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Степень извлечения, %	ККБ	81,51	85,56	87,57	87,55	86,47	84,82	84,86	88,27
	ККГ	90,02	83,13	83,77	90,25	82,85	84,80	85,67	84,55
Коэффициент вариации, %	ККБ	8,58	8,43	11,74	8,89	8,47	11,18	8,53	8,64
	ККГ	10,22	8,31	8,38	9,03	12,85	8,48	6,97	9,11

Таблица 8б – Результаты оценки степени извлечения (плазма крови)

	Аналит	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
<i>Степень извлечения, %</i>	ККБ	88,15	85,46	83,27	78,88	83,25	74,93	80,88	73,60
	ККГ	85,49	83,79	81,25	78,90	79,60	74,70	83,07	76,42
<i>Коэффициент вариации, %</i>	ККБ	8,35	4,53	7,81	5,71	8,21	5,04	4,97	6,13
	ККГ	4,87	2,38	4,40	2,52	5,84	5,37	3,28	2,12

3.4.4. Точность и прецизионность

Точность и прецизионность методов внутри серии определялась по результатам анализов образцов контроля качества ККА; ККБ; ККВ; ККГ в составе одного аналитического цикла. Анализ проводится в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществлялся по формуле, соответствующей калибровочной кривой для аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 9а и 9б и соответствуют критериям приемлемости.

Точность и прецизионность разработанных методик между аналитическими циклами определялась по результатам анализа образцов контроля качества ККА; ККБ; ККВ; ККГ, произведенного в течение трех аналитических циклов одним исследователем. Анализ проводится в 5 сериях для каждого значения концентрации. Определение значений концентраций образцов контроля осуществлялся по формуле, соответствующей калибровочной кривой для соответствующего аналитического цикла. Полученные результаты приведены в Таблице 9а и 9б и удовлетворяют критериям приемлемости.

Критерии приемлемости:

- Прецизионность:..
- Точность: среднее значение концентраций для образцов контроля должно быть в пределах 15% от соответствующего теоретического значения (для НПКО – в пределах 20%).

Таблица 9а – Результаты оценки точности и прецизионности (моча)

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD, %	E, %	RSD, %	E, %
Кофеин	ККА	8,12	17,32	9,87	14,12
	ККБ	5,43	10,01	8,12	11,36
	ККВ	4,87	6,98	8,54	8,95
	ККГ	3,41	7,14	5,31	3,12
Параксантин	ККА	6,43	11,52	5,81	9,56
	ККБ	7,32	14,91	5,12	8,78
	ККВ	5,12	8,91	4,95	5,98
	ККГ	5,01	6,85	2,08	1,80
Лозартан	ККА	7,28	14,42	7,84	11,84
	ККБ	6,38	12,46	6,62	10,07
	ККВ	5,00	7,95	6,75	7,47
	ККГ	4,21	7,00	3,70	2,46
E-3174	ККА	7,70	11,87	8,86	12,98
	ККБ	5,90	11,24	7,37	10,72
	ККВ	4,93	7,46	7,64	8,21
	ККГ	3,81	7,07	4,50	2,79
Кортизол	ККА	7,06	11,70	7,33	11,27
	ККБ	6,61	13,07	6,25	9,75
	ККВ	5,03	8,19	6,30	7,09
	ККГ	4,41	6,96	3,29	2,30
6-β-ОН-кортизол	ККА	5,65	9,96	7,13	9,14
	ККБ	4,40	7,51	5,62	5,13
	ККВ	5,64	9,35	5,51	6,87
	ККГ	7,15	12,47	7,55	11,36
Пинолин	ККА	6,13	11,52	6,69	9,44
	ККБ	4,71	7,85	5,96	6,11
	ККВ	5,02	8,15	4,40	4,58
	ККГ	5,46	9,71	6,83	8,90
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	ККА	4,67	7,21	5,47	5,25
	ККБ	4,73	8,51	5,82	5,96
	ККВ	5,73	9,60	6,48	8,20
	ККГ	6,12	11,21	5,88	8,31

Таблица 9а – Результаты оценки точности и прецизионности (плазма крови)

Аналит	Образец контроля качества	Внутри серии		Между сериями	
		RSD, %	E, %	RSD, %	E, %
Кофеин	ККА	3,99	-10,40	5,88	-9,00
	ККБ	1,64	-7,20	2,99	-7,80
	ККВ	4,58	-6,16	4,92	-7,35
	ККГ	4,64	-9,10	4,01	-8,24
Параксантин	ККА	5,06	-5,60	6,19	-7,60
	ККБ	6,37	-10,00	5,28	-11,27
	ККВ	1,30	-2,15	3,52	-3,54
	ККГ	4,38	-7,34	4,69	-6,69
Лозартан	ККА	5,73	-9,60	6,74	-12,20
	ККБ	3,70	-10,00	4,19	-9,93
	ККВ	3,63	-4,90	4,99	-6,87
	ККГ	5,98	-7,79	4,90	-7,62
Е-3174	ККА	5,54	-8,00	7,13	-7,40
	ККБ	6,51	-7,07	5,90	-7,13
	ККВ	5,95	-11,32	6,45	-6,93
	ККГ	5,46	-4,80	4,90	-7,01
Кортизол	ККА	6,34	-14,80	6,48	-12,60
	ККБ	6,82	-5,87	5,89	-5,33
	ККВ	5,41	-11,10	4,08	-11,41
	ККГ	3,42	-8,54	4,76	-8,47
6-β-ОН-кортизол	ККА	5,08	-12,00	5,11	-11,40
	ККБ	3,72	-9,07	4,49	-8,40
	ККВ	6,15	-6,23	4,65	-7,73
	ККГ	2,76	-4,98	3,33	-5,97
Пинолин	ККА	6,49	-11,20	6,92	-8,60
	ККБ	2,90	-11,60	6,30	-8,13
	ККВ	4,18	-5,90	3,79	-6,71
	ККГ	2,93	-3,87	3,57	-5,28
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	ККА	8,67	-12,80	6,96	-13,80
	ККБ	5,24	-9,87	3,72	-9,27
	ККВ	4,30	-5,83	5,10	-8,06
	ККГ	5,52	-8,03	4,45	-7,59

3.4.5. *Нижний предел количественного определения*

Значение нПКО методики проводится с учётом данных точности, прецизионности и линейности. За нПКО методики принималась минимальная концентрация аналита в плазме, для которой возможно определение аналитов со значениями среднего значения концентраций и относительного стандартного отклонения не более 20 % в диапазоне линейной зависимости.

3.4.6. *Перенос пробы*

Для определения наличия переноса пробы в хроматографической системе производят ввод образца контроля качества ККГ с последующим вводом холостого образца биожидкости. По результатам анализа холостых образцов перенос аналитов внутри хроматографической системы отсутствовал ввиду отсутствия соответствующих характеристических пиков (площадь пика с соответствующим временем удерживания составляла не более 20% от площади пика на уровне нПКО).

3.4.7. *Стабильность*

Стабильность в плазме крови добровольцев определялась с использованием образцов контроля ККБ и ККГ, проведены следующие исследования стабильности:

- краткосрочная стабильность аналитов в матрице (24 ч) при комнатной температуре без пробоподготовки
- краткосрочная стабильность аналитов в матрице (24 ч) при комнатной температуре после пробоподготовки
- стабильность в процессе замораживания/ оттаивания (замораживание в морозильной камере и размораживание при комнатной температуре)
- краткосрочная стабильность аналитов после пробоподготовки в термостате автосемплера
- долгосрочная стабильность (в условиях заморозки в течение 30 дней)

Затем проводился анализ образцов совместно с вновь приготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Определялось отношение

значений концентрации образцов после хранения со средними значениями концентраций вновь приготовленных образцов контроля качества. Расчёт модуля разницы проводился по соответствующей формуле:

$$\Delta, \% = \frac{C_2 - C_1}{C_1} \times 100\% \quad (1),$$

где C_2 – среднее значение концентрации в конце исследования, C_1 – среднее значение концентрации в начале исследования.

Результаты определения стабильности соответствуют критерию приемлемости. Результаты приведены в Таблицах 10а и 10б.

Критерий приемлемости: модуль разницы не должен превышать 15%.

Таблица 10а – Результаты оценки стабильности (моча)

		Аналит	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Нормализованный модуль разницы, %	хранение при комнатной температуре и дневном свете без пробоподготовки в течение 24 часов	ККБ	5,34	6,03	3,86	9,34	7,31	9,39	12,37	10,34
		ККГ	4,98	5,91	8,04	6,39	4,85	7,91	8,01	8,78
	хранение при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 24 часов	ККБ	5,16	5,97	5,95	7,87	6,08	8,65	10,19	9,56
		ККГ	5,07	5,94	7,00	7,13	5,47	8,28	9,10	9,17
	исследование стабильности после заморозки/разморозки	ККБ	6,43	6,82	5,03	7,37	7,74	8,73	10,58	10,34
		ККГ	5,63	6,58	7,33	7,04	7,9	9,22	8,79	8,78
	исследование стабильности после пробоподготовки (хранение в термостате автосамплера при температуре 4 °С в течение 24 часов)	ККБ	10,19	11,43	8,90	9,87	13,55	12,81	10,43	8,94
		ККГ	7,96	11,73	10,23	8,01	9,55	12,14	11,87	10,31
	исследование стабильности после хранения в условиях заморозки в течение месяца	ККБ	9,74	11,04	9,88	9,54	8,71	9,12	10,14	9,63
		ККГ	8,85	11,39	10,06	8,78	9,13	10,63	11,01	9,97

Таблица 10б – Результаты оценки стабильности (плазма крови)

		Аналит	Кофеин	Параксантин	Лозартан	Е-3174	Кортизол	6-β-ОН-кортизол	Пинолин	6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин
Нормализованный модуль разницы, %	хранение при комнатной температуре и дневном свете без пробоподготовки в течение 24 часов	ККБ	6,21	8,37	8,26	7,76	9,73	3,48	7,56	3,71
		ККГ	3,86	3,25	3,45	4,27	4,30	4,08	3,51	4,34
	хранение при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 24 часов	ККБ	10,80	11,21	11,85	13,28	10,56	11,47	12,34	10,24
		ККГ	8,50	9,50	9,66	10,35	8,84	9,75	10,53	10,80
	исследование стабильности после заморозки/разморозки	ККБ	13,43	8,83	11,26	13,39	13,32	11,26	13,82	11,23
		ККГ	7,51	6,85	7,02	7,27	6,32	6,84	6,80	6,29
	исследование стабильности после пробоподготовки (хранение в термостате автосамплера при температуре 4 °С в течение 24 часов)	ККБ	8,49	9,78	10,04	10,49	10,14	7,48	9,97	6,98
		ККГ	6,17	6,37	6,54	7,29	6,55	6,91	7,01	7,57
	исследование стабильности после хранения в условиях заморозки в течение месяца	ККБ	8,49	9,78	10,04	10,49	10,14	7,48	9,97	6,98
		ККГ	6,17	6,37	6,54	7,29	6,55	6,91	7,01	7,57

3.5. Результаты определения активности системы изофермента цитохрома P450 в различных исследованиях с помощью разработанной методики

Разработанные методики позволяют применять их для различных научных и клинических целей. При этом для исследования не всегда требуется изучение активности сразу всех изоферментов. В связи с этим очень удобна универсальность разработанных методик.

Исследование активности изоферментов печени у больных гормонзависимой бронхиальной астмой.

Для оценки метаболическая активность у больных гормон-зависимой бронхиальной астмой по дизайну эксперимента было достаточно изучить только активность CYP3A4. В результате исследования было показано, что у больных гормон-зависимой бронхиальной астмой, получающих терапию системными ГКС обнаружено повышение активности CYP3A4 по сравнению со здоровыми добровольцами; отношение уровня эндогенного 6 β -гидрокортизола к кортизолу в плазме крови пациентов с БА больше на 67% ($p=0,007$ при $\alpha=0,95$) от аналогичного значения у здоровых добровольцев [122].

Исследование активности изоферментов печени, как способа оценки приживаемости печени после трансплантации.

Печень – один из самых важных органов в физиологии млекопитающих. Роль печени в организме невозможно переоценить. Её функции многообразны и широки. В первую очередь печень является крупной пищеварительной железой, вырабатывающей желчь, которая необходима для пищеварения. Кроме этого

печень принимает участие во всех видах обмена: углеводного, жирового, белкового. Ей присуща синтетическая функция (билирубин, желчные кислоты) а также функция депо (кровяного, депо витаминов и микроэлементов). У плода она выполняет кроветворную функцию. Печени свойственны также некоторые гормональные функции. Однако, наиболее интересна, с нашей точки зрения, барьерная функция. Во-первых, печень участвует в биотрансформации ксенобиотиков, а во-вторых, метаболизирует избыток эндогенных соединений, таких как гормоны, медиаторы, витамины. Эта функция выполняется главным образом благодаря разнообразию и высокой активности здесь ферментов биотрансформации, катализирующих как первую, так и вторую стадию метаболических реакций. Практически все химические вещества, поступающие в ЖКТ, предварительно проходят через печень и подвергаются воздействию печеночных ферментов. Из-за высокой активности, и из-за того, что печень первой принимает на себя удар чужеродных соединений, а также из-за высокого кровоснабжения печень часто становится уязвимой для различных заболеваний. Многие из этих заболеваний невозможно вылечить. Основным таким заболеванием являются цирроз печени, при котором происходит необратимое замещение паренхиматозной ткани печени фиброзной соединительной тканью, или стромой. Чаще цирроз развивается при длительной интоксикации алкоголем и на фоне вирусных гепатитов В, С и D и паразитарных инфекций. Кроме этого может возникнуть и при других хронических интоксикациях (в том числе фармакологического генеза). Хронический аутоиммунный гепатит также в итоге приводит к циррозу.

В связи с тем, что вирусные гепатиты В, С и D в итоге приводят к летальному исходу, а на сегодняшний день нет эффективной консервативной терапии, то для лечения пациентов используется трансплантация здоровой печени. В 1955 г. Велч выполнил первую трансплантацию печени у собак. В 1963 г. группа исследователей под руководством Старзла осуществила первую успешную трансплантацию печени у человека. Трансплантация печени является основным методом терапии на последних стадиях цирроза печени различного

генеза, а также для терапии различных врожденных нарушений биотрансформации и новообразованиях печени.

Основными показаниями для проведения операции по трансплантации являются: заболевание печени без возможности терапии с ожидаемой выживаемостью не более 1 года; патология печени, перманентно ухудшающее общее состояние; заболевание с высокой прогнозируемой выживаемостью при срочной пересадке органа. Выживаемость после пересадки составляет 85% для 1 года, 70% в течение 5 лет, 40% - в течение 20 лет [102].

Для оценки возможности пересадки печени необходимо провести ряд диагностических процедур.

План обследования для пациента перед трансплантацией представляет собой следующий набор процедур и анализов:

- Анализ крови (клинический, биохимический, коагулограмма)
- Rh-фактор.
- Анализ крови на ВИЧ, HCV-Ab, HBs, IgM, HBe.
- Анализ крови на ПЦР при подтвержденном наличии HBV или HCV-этиологии.
- При наличии признаков инфекционного воспаления - бактериологическое обследование.
- Рентген исследование органов грудной клетки, определение показателей внешнего дыхания.
- ЭКГ, ЭхоКГ при наличии показаний.
- УЗИ брюшной полости с доплерографией сосудов печени и почек.
- ЭГДС.
- Колоноскопия, ирригоскопия.
- Сцинтиграфия (статическая и динамическая)
- Радиоизотопное исследование почек.
- МРТ холангиография (при наличии показаний)
- Прямая или непрямая холангиография (при наличии показаний)

- При подозрении на онкопроцесс - компьютерная томография грудной клетки и брюшной полости с внутривенным контрастным усилением.
- При подозрении на онкопроцесс - анализ крови на онкомаркёры.
- Биопсия печени – при наличии показаний
- В случае проведения лапароцентеза – исследование асцитической жидкости.
- Специфические исследования (аутоиммунных заболеваний и т.д.) в зависимости от анамнеза.
- Антропометрические измерения.
- Осмотр анестезиолога [102].

Если пациент удовлетворяет предъявленным критериям, то ему проводят трансплантацию донорской печени. Очевидно, что существует множество факторов, влияющих на успешность проведенной операции. В первую очередь необходима специфическая поддерживающая терапия [103].

Существует множество факторов, свидетельствующих об успешности или неуспешности проведения трансплантации. Свидетельством нормализации функций печени являются скоро восстановление сознания в послеоперационный период, а также выявление дыхательных движений, позволяющих отменить ИВЛ. О недостаточной функции трансплантата свидетельствуют гипербилирубинемия, тенденция к тромбоцитопении, снижение альбумина, снижение протромбинового индекса, удлинение тромбинового времени. Выраженность травматизации во время предоперационного сохранения печени определяется уровнем АЛТ и АСТ в первые несколько дней после вмешательства. К явным признакам приживаемости трансплантируемого органа относят умеренно выраженный алкалоз, отсутствие ацидоза и восстановление функций мочевыделительной системы [103]. Учеными ведется поиск новых маркеров печеночной активности, применительно к различным группам пациентов, таким как дети, пациенты с врожденными заболеваниями печени или с циррозами вирусной этиологии [104-105]. Однако для оценки эффективности проведенной трансплантации также очень важно оценивать метаболическую активность

пересаженной печени. Для этого в основном применяется лидокаиновый или индоцианиновый тест.

Ввиду того, что пациенты могут не иметь снижения значения функционального резерва печени, прогностическая ценность отдельных печеночных тестов незначительна. В таком случае выявить функциональную недостаточность и более точно оценить прогноз заболевания могут исключительно динамические и количественные тесты функций печени [106].

Наиболее перспективными признаны клиренс-тесты с ИЦЗ и лидокаином. Тест с использованием лидокаина (MEGX-тест) используется для диагностики хронических заболеваний печени и для выявления срочности трансплантации органа с 1995 года. Было отмечено наличие высокой чувствительности уровня лидокаина и его метаболита MEGX в сыворотке крови для дифференциации между пациентами с циррозом печени и здоровыми добровольцами [107]. Продолжительность жизни для пациентов с концентрацией лидокаина в сыворотке крови менее 10 нг/мл составила менее 1 года. Однако данный тест хуже дифференцирует нарушения функций при циррозе печени от умеренных изменений по сравнению с оценкой объема элиминации галактозы. Концентрация моноэтилглицинксилида зависит от рациона питания (особенно от количества белков) и уровня кровотока. MEGX-тест значительно упрощает процедуру выявления при осложненных заболеваниях печени и является малоинформативным при прогнозировании срока жизни больных с имеющейся печеночной энцефалопатией. MEGX-тест отлично зарекомендовал себя для оценки донорской печени. При резекции печени при сывороточной концентрации MEGX на уровне 25 нг/мл риск развития осложнений составляет 20% случаев, при концентрации менее 25 нг/мл – в 75-100% случаев [108].

Для оценки функций печени также используется тест с индоцианином зеленым (ИЦЗ) путем внутривенного введения препарата с его последующим связыванием с белком альбумином плазмы. Затем образовавшийся комплекс захватывается гепатоцитами и обладает высоким печеночным клиренсом (70-90%). ИЦЗ экскретируется в неизменном виде с желчью, минуя метаболические

процессы. Таким образом, экскреция ИЦЗ отражает выводящую функцию печени и активность печеночной функции. Доказано, что уменьшение выведения ИЦЗ при циррозе печени связано с уменьшением печеночного поглощения и в меньшей степени в связи с увеличением клиренса. Благодаря этим особенностям данный тест может успешно применяться для оценки функций печени как у доноров, так и реципиентов при операции трансплантации печени, больных с выраженной хронической печеночной недостаточностью в качестве фактора прогноза и мониторинга нарушений функции печени.

Оценка функциональных резервов печени, основанная на изучении клиренса индоциана через 15 минут после внутривенного введения, является одним из наиболее популярных методов, особенно в Японии. При задержке до 10 % индоцианина возможна резекция 2-х сегментов печени, задержке до 20 % — резекция 1-го сегмента печени, при задержке более 20 % — проведение резекции сегментов невозможно, при 30 % — возможна только трансплантация органа [109].

Описано исследование японских ученых, включившее в себя 1400 случаев резекции печени, более 680 из которых было выполнено по поводу гепатоцеллюлярной карциномы. Алгоритм принятия решения состоял из трех факторов: выраженность асцита, уровень общего билирубина и уровень задержки индоцианина через 15 минут после внутривенного введения. При определении размеров участка пораженной печени, удаление которого возможно с минимальным риском для пациента, главным фактором при отсутствии асцита и нормальном уровне билирубина является исследование ИЦЗ. За 10 лет использования подобного алгоритма диагностики известен только один летальный исход [110].

Корейские исследователи при оценке функционального резерва печени определяющими параметрами считают результаты биохимических тестов, КТ-волнометрию, ультрасонографию и уровень ретенции ИЦЗ через 15 минут после введения индоцианина. На основании проведенного исследования сделан вывод о возможности безопасной эктомии 75% паренхимы печени. У пациентов

с изменениями печени впоследствии цирроза граница резекции обозначена на уровне 40 % при условии наличия компенсаторных [111].

В современных исследованиях определена корреляция скорости элиминации индоцианина с критериями Чайлда-Пью, а также уровнем альбумина, индексом гистологической активности и билирубиновым показателем [112]. В литературе описано исследование, в котором проводилась оценка функциональных резервов печени с индоцианином и метаболитами лидокаина, а также критериями Чайлда-Пью, показало, что прогностическая специфичность данных тестов находится в пределах 75-90% и 82-86% соответственно, однако оценка по критериям Чайлда-Пью демонстрировала меньшую специфичность 51-80% [113]. Однако встречаются и работы с противоположной точкой зрения. В статье S. Mukherjee et al описано исследование, в результате которых установлена необъективность клиренс-теста с ИЦЗ, несмотря на наличие достоверной корреляции между критериями Чайлда-Пью и элиминацией индоцианина [114]. Однако в данном исследовании 80% пациентов имели заболевание в стадии компенсации, ввиду чего соотнесение результатов данного исследования с более тяжелыми поражениями печени не представляется возможным [115].

Было проведено исследование активности метаболизма у пациентов после трансплантации печени с помощью разработанного «коктейльного» метода. В исследовании приняли участие 2 группы по 11 человек: в 1ую группу входили пациенты, перенесшие трансплантацию печени, во 2ую – здоровые добровольцы. Образцы мочи были получены из Отделения трансплантации печени НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. Определялась активность изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 в соответствии с разработанным методом. Полученные значения метаболических отношений приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Полученные значения метаболических отношений у группы пациентов, перенесших трансплантацию печени, и нормальных добровольцев

№№	Значение метаболического отношения			
	CYP1A2	CYP2C9	CYP3A4	CYP2D6
Группа №1				
1	3,18	0,85	0,77	4,83
2	2,03	3,53	0,82	2,80
3	3,29	3,24	1,11	0,42
4	2,15	3,53	2,28	2,74
5	1,85	3,89	3,67	2,56
6	2,75	2,34	2,62	1,53
7	3,17	2,63	3,51	2,29
8	2,78	2,14	3,57	0,50
9	1,72	0,16	0,99	2,39
10	1,82	3,19	3,38	3,34
11	1,74	3,24	1,22	4,32
Ср.знач.	2,41*	2,61*	2,18*	2,52*
Станд. откл.	0,63	1,18	1,22	1,38
Группа №2				
1	1,39	0,16	1,47	0,21
2	1,59	0,55	1,22	0,38
3	0,77	0,17	0,84	1,58
4	1,98	0,33	1,30	1,56
5	0,91	0,50	0,76	1,27
6	1,84	0,78	1,10	0,12
7	1,93	0,60	0,35	0,93
8	0,53	0,42	0,95	0,28
9	0,87	0,02	0,72	0,44
10	1,73	0,56	1,38	0,67

11	0,21	0,56	1,44	0,98
Ср.знач.	1,25	0,42	1,05	0,77
Станд. откл.	0,62	0,23	0,36	0,53
* - статистически значимое различие от значения у контрольной группы ($p < 0,05$)				

Для выявления статистически значимых различий значений метаболических отношений между 2мя группами был проведен t-тест для независимых выборок с помощью программного обеспечения IBM SPSS 27.0.0.0. В результате были выявлены статистически значимые различия в метаболической активности между изучаемыми группами (двухсторонняя значимость для каждого из изоферментов составила менее 0,05 при уровне значимости в 95%).

Исследование метаболической активности у больных с лекарственной аллергией.

В настоящее время в мире ведется большое количество исследований по разработке методик фенотипирования ферментов биотрансформации. Однако, на сегодняшний момент нет информации о взаимосвязи системы биотрансформации с развитием лекарственных аллергий, хотя для этого есть научные предпосылки, озвученные Всемирной Организацией Аллергологов.

Аллергический контактный дерматит является комплексным синдромом, представляющий собой иммунологический ответ на контакт кожи с химическими веществами, взаимодействующими с белками. Хотя многие из таких веществ могут вызывать подобную реакцию напрямую, некоторые из них требуют активации (таким образом, являясь проагпенами). Механизмы активации до конца не изучены, однако одним из возможных вариантов является метаболическая активность изоферментов цитохрома P450, находящихся в коже.

Для изучения влияния активности системы CYP на активацию подобных проагпенов предпринимались попытки создать *in vitro* «коктейль» из основных изоферментов CYP, содержащихся в коже, а именно CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6,

CYP2E1 и CYP3A5 [116]. Использование подобных *in vitro* тестов представляет собой альтернативу используемым сегодня методам определения аллергической активности химических веществ на животных. Состав данного «коктейля» соответствуют составу имеющимся в коже изоферментам CYP, однако содержатся в большей концентрации с целью увеличения метаболической активности при проведении теста *in vitro* для ускорения превращения прогаптена в метаболит-аллерген. В данном исследовании с целью апробации «коктейля» была проведена активация одного из прогаптена диеновой природы. Впервые было доказано, что активация диенового прогаптена производится в процессе его метаболического превращения изоферментами системы цитохрома P450 в соответствующий диол. Таким образом, нет необходимости использовать культуры клеток кожи для исследования биотрансформации прогаптенов, вызывающих аллергический дерматит. Это значительно упрощает метод, так использование клеток кожи в данных исследованиях зачастую делают процесс более трудоёмким и усложняют процесс качественного и количественного определения образовавшихся метаболитов. Помимо исследования метаболизма прогаптена диеновой природы, было изучено влияние активности изоферментов CYP на активацию коричневого спирта, который также является прогаптеном. Известно, что основным ферментом, превращающим коричневый спирт непосредственно в аллерген – коричневый альдегид, является алкогольдегидрогеназа [117]. В данном исследовании было доказано, что помимо алкогольдегидрогеназы, значительный вклад в активацию коричневого спирта вносит изофермент CYP2E1.

«Коктейль» аналогичного состава использовался для определения влияния активности метаболизма на механизм возникновения аллергического дерматита, вызванного гераниолом. Гераниол – широко используемый ароматизатор, считающийся слабым аллергеном, хотя его химическая структура не подразумевает возможность проявления аллергических свойств. Предполагается, что гераниол является прогаптеном и превращается в аллерген в результате

метаболических процессов, однако данный факт не был изучен. Было проведено исследование, в котором изучалась биотрансформация гераниола под действием изоферментов CYP, содержащихся в коже, *in vitro*. В состав «коктейля» изоферментов входили изоферменты CYP1A1, CYP1B1, CYP2B6, CYP2E1 и CYP3A5 [118]. В результате исследования впервые были определены 5 основных метаболитов гераниола. В последующем было проведено исследование метаболической активности отдельных изоферментов в отношении исследуемого вещества. Изофермент CYP2B6 проявил наибольшую метаболическую активность, однако изоферменты CYP1A1 и CYP3A5 являются основными изоферментами, регулирующими процесс биотрансформации гераниола в коже, так как их количественное содержание в коже превышает содержание CYP2B6. Изоферменты CYP1B1 и CYP2E1 продемонстрировали меньшую активность. Кроме того, продукт метаболизма, обесредованный данными изоферментами, не является сенсibiliзирующим агентом.

Измененная метаболическая активность P450 может приводить к нежелательным лекарственным реакциям аллергического типа при биотрансформации ксенобиотиков, не обладающих свойствами аллергена при нормальном метаболизме. В литературе описано исследование, в котором изучалось влияние генетического полиморфизма изофермента CYP2C9 на риск кожных проявлений нежелательных лекарственных реакций, вызванных в результате приёма фенитоина [119]. Было определено, что активность фермента CYP2C9 играет важнейшую роль в патологическом механизме кожных проявлений нежелательных лекарственных реакций, вызванных фенитоином. Активность системы метаболизма определялась методом генотипирования. Было выявлено, что частота возникновения кожных проявлений у пациентов с мутантными аллелями CYP2C9*3 после приёма фенитоина больше, чем у пациентов с нормальным геном. Механизм заключается в активации других изоферментов CYP для биотрансформации лекарственного вещества, что приводит к образованию метаболитов, вызывающих кожные реакции, в большем количестве.

Известно, что некоторые заболевания могут влиять на метаболизм, и пациенты с с подобными заболеваниями могут испытывать последствия «болезнь-лекарственного» взаимодействия [120]. Было доказано, что воспаления, вызванные бактериальной инфекцией или раковыми заболеваниями, могут влиять на экспрессию генов CYP и активность изоферментов системы цитохрома P450. Таким образом, возможность возникновения подобного рода взаимодействий необходимо учитывать лечащим врачам при назначении лекарственной терапии, так как измененная активность ферментов метаболизма может привести как к неэффективности фармакотерапии, так и к возникновению различных нежелательных реакций. В литературе описаны различные исследования, оценивающие влияние различных заболеваний на активность системы метаболизма. В частности, изучалось влияние на экспрессию генов CYP при анафилактической реакции у мышей после введения специфических липополисахаридов, приводящих к анафилаксии [121]. В результате исследования было установлено, что при анафилактическом шоке резко снижается активность ферментов CYP1A2, CYP2C29 и CYP3A11. Активность ферментов снизилась как за счет количественного фактора, так и качественного. Установлено, что активность ферментов CYP зависит от провоспалительных цитокинов, выделяющихся в системный кровоток при различных воспалительных реакциях.

Разработанный «коктейльный» метод определения активности изоферментов CYP методом фенотипирования был апробирован с целью выявления зависимости между риском возникновения лекарственной аллергии и измененной активностью метаболизма как следствие наличия хронической сердечной недостаточности. В исследовании принимало участие 60 человек, мужчины и женщины от 15 до 85 лет, поделенных на 3 группы по 20 человек. В первую группу входили пациенты, у которых возник эпизод лекарственной аллергии на лекарственные вещества, относящихся к различным фармакологическим группам. Во вторую группу входили пациенты с лекарственной аллергией на нестероидные противовоспалительные средства, приём которых был назначен для терапии хронической сердечной

недостаточности. Третья группа – контрольная, в которую входили пациенты без эпизодов хронической аллергии в анамнезе. У пациентов первой группы определялась активность изоферментов CYP3A4 и CYP2D6, у пациентов второй и третьей группы – CYP3A4, CYP2D6 и CYP2C9. Для определения активности CYP2C9 пациентам однократно назначался лозартан в дозе 25 мг. Определение активности CYP3A4 и CYP2D6 проводилось по эндогенным субстратам кортизолу и пинолину в соответствии с разработанной методикой.

В результате исследования были получены значения метаболических отношений, представленные в Таблице 12.

Таблица 12 – Результаты исследования активности метаболизма

№№	Значение метаболического отношения		
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9
Группа №1			
1	6,23	1,88	
2	4,01	1,25	
3	4,51	0,53	
4	5,65	0,74	
5	3,48	1,78	
6	3,71	1,68	
7	3,41	1,32	
8	5,29	0,53	
9	5,58	1,20	
10	5,31	1,50	
11	4,56	1,06	
12	2,66	1,93	
13	6,37	0,83	
14	6,21	0,59	
15	5,73	0,92	

16	4,34	0,76	
17	6,19	1,95	
18	7,37	0,87	
19	4,64	1,79	
20	5,06	1,76	
Ср. Знач.	5,01	1,24	---
Станд. откл.	1,20	0,51	---
Группа №2			
1	16,16	2,00	1,26
2	26,88	0,40	2,51
3	18,58	0,98	2,54
4	17,15	1,25	2,66
5	8,36	1,39	3,05
6	12,03	1,65	1,53
7	27,24	0,50	2,45
8	13,99	1,91	2,39
9	20,86	0,93	2,50
10	6,97	1,25	1,25
11	28,84	0,56	1,50
12	13,93	0,89	1,83
13	18,01	1,84	2,80
14	17,54	2,26	2,83
15	3,42	0,91	2,84
16	12,41	1,19	2,54
17	8,91	1,71	2,27
18	30,24	1,02	1,12
19	22,50	1,99	1,12
20	12,45	2,05	1,80
Ср. Знач.	16,82*	1,33	2,14

Станд. откл.	7,53	0,56	0,64
Группа №3			
1	4,99	1,43	0,99
2	6,79	0,60	2,26
3	5,17	1,24	1,48
4	0,51	3,35	2,41
5	7,44	2,62	2,39
6	4,95	0,96	1,35
7	3,61	2,26	3,09
8	4,72	2,52	3,13
9	0,63	2,77	1,23
10	5,39	0,46	2,63
11	3,99	2,24	3,80
12	5,09	1,13	1,92
13	0,22	1,51	2,98
14	7,10	2,40	1,53
15	8,27	1,02	0,50
16	3,30	0,14	1,99
17	3,23	2,95	3,10
18	5,20	1,24	0,77
19	2,76	2,58	3,44
20	1,52	1,46	2,08
Ср. Знач.	4,24	1,74	2,15
Станд. откл.	2,31	0,91	0,93
* - статистически значимое различие от значения у контрольной группы №3 ($p < 0,05$)			

Среднее значение метаболического отношения для изофермента СУР3А4 составило $5,01 \pm 1,20$ для группы №1, $16,82 \pm 7,53$ для группы №2 и $4,24 \pm 2,31$ для

контрольной группы. Среднее значение метаболического отношения для изофермента CYP2D6 составило $1,24 \pm 0,51$ для группы №1, $1,33 \pm 0,56$ для группы №2 и $1,74 \pm 0,91$ для контрольной группы. Среднее значение метаболического отношения для изофермента CYP2C9 составило $2,14 \pm 0,64$ для группы №2 и $2,15 \pm 0,93$ для контрольной группы.

Для выявления статистически значимых различий значений метаболических отношений между 3мя группами был проведен t-тест для независимых выборок с помощью программного обеспечения IBM SPSS 27.0.0.0. Результаты t-теста для независимых выборок представлены в Таблице 13.

Таблица 13 – Результаты t-теста для определения статистически значимых различий между значениями метаболических отношений

Сравниваемые группы	Значимость p полученного t-критерия (при $\alpha=0,95$)		
	CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9
Группа №1 – контрольная группа	0,367	0,210	---
Группа №2 – контрольная группа	0,000	0,330	0,976
Группа №1 – Группа №2	0,000	0,728	---

Из полученных данных видно, что с 95% вероятностью имеются статистические различия в активности изофермента CYP3A4 между 1-ой группой и контрольной группой, а также 1-ой группой и 2-ой группой. Активность же других изоферментов статистически не отличается. Таким образом, хроническая сердечная недостаточность как патология может оказывать влияние на метаболическую активность изофермента CYP3A4. Данный изофермент участвует в биотрансформации порядка 70% известных лекарственных веществ, в том числе и нестероидные противовоспалительные средства. Следовательно, на фоне измененной активности изофермента CYP3A4 ввиду наличия такого сопутствующего заболевания, как хроническая сердечная недостаточность, могла произойти вторичная реакция организма на принимаемые препараты в виде

лекарственной аллергии. Отсутствие статистически значимых различий в активности изоферментов между 1-ой и контрольной группами говорит о том, что измененная активность ферментов метаболизма – далеко не единственный фактор, вызывающий лекарственную аллергию. К тому же, в виду включения в 1-ую группу пациентов с различными заболеваниями, поражающими различные системы органов, так же подтверждается тот факт, что не каждое заболевание влияет на метаболическую активность организма. Для более детального исследования данного вопроса следует увеличить выборку испытуемых, имеющих в анамнезе лекарственную аллергию, а также разделять их по группам в зависимости от заболевания и пораженной системы органов, с целью получения более информативных данных о влиянии соответствующих заболеваний на активность метаболизма человека.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено изучение описанных в литературе методик определения активности изоферментов CYP методом фенотипирования *in vivo*, в том числе и «коктейльные» методы. На основании изученных данных выбраны изоферменты CYP, представляющие наибольший интерес как метаболизирующие наибольшее количество ксенобиотиков по сравнению с остальными – CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6. Выбраны субстраты-маркеры и их метаболиты для определения активности указанных изоферментов - кофеин/параксантин (CYP1A2), лозартан/Е-3174 (CYP2C9), кортизол/6-β-гидрокортизол (CYP3A4) и пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин (CYP2D6). С целью повышения эффективности и безопасности методик, для изоферментов CYP3A4 и CYP2D6 были выбраны эндогенные субстраты, а для CYP1A2 и CYP2C9, ввиду невозможности использования эндогенных субстратов, были выбраны лекарственные средства с низким риском возникновения нежелательных лекарственных явлений.
2. Разработаны методики пробоподготовки образцов плазмы крови и мочи. Для пробоподготовки плазмы крови использовался метод твердофазной экстракции, для мочи - метод жидкостной экстракции. Степень извлечения кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174, кортизола, 6-β-гидрокортизола, пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4,-тетрагидро-β-карболина из биожидкостей составляет 81-91% для мочи 73-88% для плазмы крови, что позволяет использовать разработанные методики для последующего совместного количественного определения аналитов в одной пробе.

3. Оптимизированы хроматографические условия для совместного количественного определения кофеина, параксантина, лозартана, E-3174, кортизола, 6- β -гидрокортизола, пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4,-тетрагидро- β -карболина. Разработанные методики количественного определения исследуемых веществ методом ВЭЖХ-МС/МС позволяют определить концентрации каждого из аналитов по данным одного анализа.
4. Проведена валидация разработанных методик по параметрам: селективность, линейность, точность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность. Разработанные методики удовлетворяли всем валидационным критериям приемлимости.
5. Разработанные «коктейльные» методы использовались для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 в различных исследованиях. Активность изофермента CYP3A4 определялась у больных гормонзависимой бронхиальной астмой по метаболическому индексу в плазме крови. Активность изоферментов CYP3A4, CYP2C9 и CYP2D6 по моче выявления зависимости между риском возникновения лекарственной аллергии и измененной активностью метаболизма как последствие наличия хронической сердечной недостаточности. Определялась активность CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 у пациентов после трансплантации печени. Данные исследования показали, что разработанные методики пригодны для определения активности указанных изоферментов CYP в практике специалистов лабораторий клинической фармакологии.

Практические рекомендации

Разработанные методики целесообразно использовать в лабораториях клинической фармакологии, фармакокинетики при определении активности основных изоферментов цитохрома P450 для рационализации фармакотерапии и минимизации риска возникновения нежелательных

лекарственных явлений.

Перспективы дальнейшей разработки темы

В последующих исследованиях возможно включение в «коктейль» дополнительных субстратов-маркеров других изоферментов СУР с целью определения метаболической активности большего числа изоферментов цитохрома P450 в одной пробе.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: Издательство «Реафарм», 2004.144 с.
- 2 Клиническая фармакогенетика /Сычёв Д.А. [и др.][под ред. В.Г. Кукеса, Н.П. Бочкова] М.: ГЭОТАР, 2007. 248с.
- 3 Virginie Y Martiny, Maria Miteva. Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism // Journal of Molecular Biology. 2013. Vol.7. P.207(21).
- 4 Handbook of drug metabolism, Second Edition / Ed. by Paul G . Pearson and Larry C . Wienkers – Florida: CRC Press. 2008. 675 p.
- 5 D.F.V. Lewis, M. Dickins, P.J. Eddershaw, M.H. Tarbit, P.S. Goldfard. Cytochrome P450 Substrate Specificities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries // Drug metabolism and drug interctions. 1999. Vol.15. P.151.
- 6 SF. Zhou et al. Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. // Drug Metabolism Review. 2010. Vol.42(2). P.268-354.
- 7 B. Wang. Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development. // Current Medicinal Chemistry. 2009. Vol.16 (31). P. 4066-218.
- 8 M.O'Malley et al. Effects of cigarette smoking on metabolism and effectiveness of systemic therapy for lung cancer. // Journal of Thoracic Oncology. 2014. Vol.9(7). P.917-26.

- 9 J. Christopher Gorski et al. The Effect of Echinacea (Echinacea purpurea Root) on Cytochrome P450 Activity in Vivo. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2004. Vol.75. P. 89-100
- 10 ZK Ali et al. CYP2C9 polymorphisms: considerations in NSAID therapy. // *Current Opinion in Drug Discovery and Development*. 2009. Vol. 12. P. 108-114.
- 11 CR Lee et al. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. // *Pharmacogenetics*. 2002. Vol. 12. P. 251-263.
- 12 MG Soars et al. A comparison of relative abundance, activity factor and inhibitory monoclonal antibody approaches in the characterization of human CYP enzymology. // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005. Vol. 55. P. 175-181.
- 13 AE Rettie et al. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005. Vol. 45. P. 477-494.
- 14 M. Pirmohamed et al. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. // *Toxicology*. 2003. Vol. 192. P. 23-32.
- 15 I.G.Denisov et al. Structure and chemistry of cytochrome P450. // *Chemical Reviews*. 2005. Vol.105(6). P.2253-2277.
- 16 T.L.Domanski et al. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. // *Biochemistry*. 2001. Vol.40(34). P.10150-10160.
- 17 U.M.Zanger et al. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. // *Pharmacology and Therapeutics*. 2013. Vol. 138(1). P. 103-141
- 18 C.S. Gerguson et al. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. // *Trends in Pharmacological Sciences*. 2011. Vol.32(12). P.708-714.

19 H. Qui et al. The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability. *Pharmacogenetics and Genomics*. 2010. Vol.20(3). P.167-78.

20 M. Ratajewski et al. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. // *Toxicological Letters*. 2011. Vol. 205(2). P.146-53.

21 Labbé L. et al. Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates // *Pharmacogenetics and Genomics*. – 2000. – T. 10. – №. 5. – C. 425-438.

22 V. Haufroid et al. CYP2D6 genetic polymorphisms and their relevance for poisoning due to amfetamines, opioid analgesics and antidepressants // *Clinical Toxicology*. 2015. Vol.53(6). P.501-510.

23 M.K. Su et al. Metabolism of classical cannabinoids and the synthetic cannabinoid JWH-018 // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2015. Vol.97(6). P.562-4

24 McGraw J, Waller D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2012. Vol.8. P.371-382.

25 Grover S, Kukreti R. Functional Genetic Polymorphisms from Phase-II Drug Metabolizing // *Enzymes - CNS Neuroscience Therapy*. 2012. V.18. P.705-706.

26 Preissner S, Kroll K, Dunkel M, Senger C, Goldsobel G et al. SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions // *Nucleic Acids Research*. 2010. V.38. P.D237-D243.

27 Steven L. Dubovsky. The usefulness of genotyping cytochrome P450 enzymes in the treatment of depression // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2014. V.11(3). P.1-11.

- 28 Sarah C. Preissner et al. Polymorphic Cytochrome P450 Enzymes (CYPs) and Their Role in Personalized Therapy // *PLoS One*. 2013. V.8(12). P.e82562.
- 29 Shimada T. et al. Characterization of (+/-)-bufuralol hydroxylation activities in liver microsomes of Japanese and Caucasian subjects genotyped for CYP2D6 // *Pharmacogenetics*. 2001. V.11(2). P.143-56.
- 30 de Leon J, Susce MT, Johnson M, Hardin M, Maw L et al. DNA microarray technology in the clinical environment: the AmpliChip CYP450 test for CYP2D6 and CYP2C19 genotyping. // *CNS Spectrums*. 2010. V.14. P.19-34.
- 31 Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J et al. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. // *Molecular Psychiatry*. 2004. V.9. P.442-473.
- 32 Marandi T et al. Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation polymorphisms in a Russian population living in Estonia // *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1997. V.53(3-4). P.257-260.
- 33 *Metabolic Drug interactions* / editors Levy R.H., Thummel K.E. et al. Lippincott Williams & Wilkins. V.2000. 793 p.
- 34 Perera V et al. Measurement of CYP1A2 activity: a focus on caffeine as a probe // *Current Drug Metabolism*. 2012. V.13(5). P.667-678.
- 35 Bosilkovska M. et al. Simultaneous LC-MS/MS quantification of P-glycoprotein and cytochrome P450 probe substrates and their metabolites in DBS and plasma // *Bioanalysis*. 2014. V.6(2). P.151-164.
- 36 Liu R et al. Effects of Panax notoginseng saponins on the activities of CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 in rats in vivo // *Phytotherapy Research*. 2012. V.26(8) P.1113-1118.
- 37 Zadoyan G. et al. Effect of Ginkgo biloba special extract EGb 761® on human cytochrome P450 activity: a cocktail interaction study in healthy volunteers // *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2012. V.68(5) P.553-560.

- 38 Yubero-Lahoz S et al. Changes in CYP1A2 activity in humans after 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) administration using caffeine as a probe drug // *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2012. V.27(6). P.605-613.
- 39 Jetter A, Kinzig-Schippers M, Skott A. Cytochrome P450 2C9 phenotyping using low-dose tolbutamide. // *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2004. V.60(3). P.165-171.
- 40 George M, Shewade DG, Kumar SV, Adithan C. Effect of anti-tuberculosis therapy on polymorphic drug metabolizing enzyme CYP2C9 using phenytoin as a probe drug. // *Indian Journal of Pharmacology*. 2012. V.44(4). P.485-488.
- 41 de Andres F et al. A rapid and simple LC-MS/MS method for the simultaneous evaluation of CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 hydroxylation capacity. // *Bioanalysis*. 2014. V.6(5). P.683-696.
- 42 Dorado P et al. Development of a HPLC method for the determination of losartan urinary metabolic ratio to be used for the determination of CYP2C9 hydroxylation phenotypes.// *Drug Metabolism and Personalized Therapy*. 2012. V.27(4). P.217-233.
- 43 Frank D. Et al. Evaluation of probe drugs and pharmacokinetic metrics for CYP2D6 phenotyping.// *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2007. V.63(4) P.321-333.
- 44 Bapiro TE et al. The molecular and enzyme kinetic basis for the diminished activity of the cytochrome P450 2D6.17 (CYP2D6.17) variant. Potential implications for CYP2D6 phenotyping studies and the clinical use of CYP2D6 substrate drugs in some African populations.// *Biochemical Pharmacology*. 2002. V.64(9). P.1387-1398.
- 45 Duricova J et al. Cytochrome P450 2D6 phenotype and genotype in hypertensive patients on long-term therapy with metoprolol. // *Bratislava Medical Journal*. 2013. V.114(4). P.206-212.

- 46 Chen R et al. Alternative methods for CYP2D6 phenotyping: comparison of dextromethorphan metabolic ratios from AUC, single point plasma, and urine. // International journal of clinical pharmacology and therapeutics. 2016. Epub
- 47 Antunes MV et al. Development, validation and clinical application of a HPLC-FL method for CYP2D6 phenotyping in South Brazilian breast cancer patients. // Clinical Biochemistry. 2014. V.47(12). P.1084-1090.
- 48 Jiang XL et al. Pinoline may be used as a probe for CYP2D6 activity. // Drug Metabolism & Disposition. 2009. V.37(3). P.443-446.
- 49 Tay-Sontheimer J et al. Detection of an endogenous urinary biomarker associated with CYP2D6 activity using global metabolomics. // Pharmacogenomics. 2014. V.15(16) P.1947-1962.
- 50 De Kesel PM. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping. // Clinical Pharmacokinetics. 2016. V.55(2). P.169-184.
- 51 Elens L et al. Impact of POR*28 on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin // Pharmacogenetics and Genomics. 2013 V.23(3). P.148-155.
- 52 Shibasaki H et al. Intraindividual and interindividual variabilities in endogenous cortisol 6 β -hydroxylation clearance as an index for in vivo CYP3A phenotyping in humans// Drug Metabolism & Disposition. 2013. V.41(2). P.475-479.
- 53 Shibasaki H et al. Use of endogenous cortisol 6 β -hydroxylation clearance for phenotyping in vivo CYP3A activity in women after sequential administration of an oral contraceptive (OC) containing ethinylestradiol and levonorgestrel as weak CYP3A inhibitors. // Steroids. 2014. V.87. P.137-144.
- 54 Virginie Y Martiny, Maria Miteva. Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism // Journal of Molecular Biology. 2013. V.7. P.207-221.

- 55 MC Cornelis, A El-Sohemy, EK Kabagambe, Campos H. Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction // *Journal of American Medical Association*. 2006. V.295(10). P.1135(41).
- 56 Handbook of drug metabolism, Second Edition / Ed. by Paul G . Pearson and Larry C . Wienkers – Florida: CRC Press. 2008. 675 p.
- 57 D.F.V. Lewis et al. Cytochrome P450 Substrate Specificities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries // *Drug metabolism and drug interactions*. 1999. V.15. P.151.
- 58 B. Zhu et al. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2001 V.70(5). P.61.
- 59 M. Christensen et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2003. V.73. P.517–528.
- 60 S. Chainuvati et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the “Coopers- town 5 + 1 cocktail” // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2003. V.74. P.437–447.
- 61 O.Q. Yin et al. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004. V.18. P.2921–2933.
- 62 N.K. Zgheib et al. Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2006. V.80. V.257–263.
- 63 J.Y. Ryu et al. Development of the “Inje cocktail” for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2007. V.82. P.531–540.
- 64 K.S. Oh et al. High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their

cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma // *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012. V.1 P.56-64.

65 S. Ghassabian et al. A high-throughput assay using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous in vivo phenotyping of 5 major cytochrome p450 enzymes in patients // *Therapeutic Drug Monitoring*. 2009 V.31(2). P.239-46.

66 Tanaka S. et al. Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(1):18-25.

67 В.В. Смирнов. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче с целью установления активности изофермента СYP 3A4. диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук – М.:ГОУВПО "Московская медицинская академия". 2011. 95 с.

68 В.В. Смирнов, А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента СYP 3A4 // *Биомедицина*. 2010. Т. 1. № 4. С. 56-60.

69 Ainslie GR, Wolf KK, Li Y et al. Assessment of a candidate marker constituent predictive of a dietary substance-drug interaction: case study with grapefruit juice and CYP3A4 drug substrates. // *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 2014. Vol.351(3). P.576-584

70 Tomalik-Scharte D1, Lütjohann D, Doroshyenko O et al. Plasma 4beta-hydroxycholesterol: an endogenous CYP3A metric? // *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2009. V.86(2). P.147-153.

71 de Graan AJ, Sparreboom A, de Bruijn P et al. 4β-hydroxycholesterol as an endogenous CYP3A marker in cancer patients treated with taxanes // *British journal of clinical pharmacology*. 2015. V.(3). P.560-568.

72 Rettie AE, et al. Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2005. V.45: 477–94.

73 Bing Zhu et al. Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach // *Pharmacokinetics and Drug Disposition*. 2001. V. 70(5). P. 455-461

74 Kyung-Suk Oh et al. High-sensitivity liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma // *Journal of Chromatography B*. 2012. V.895. P.56-64

75 Кукес В.Г., Фисенко В.П., Стародубцев А.К., Раменская Г.В., Сычев Д.А., Андреев Д.А., Рейхарт Д.В. Метаболизм лекарственных препаратов под ред. Академика РМН, проф. Кукеса В.Г., чл.-корр. РАМН, проф. Фисенко В.П. / М.: Палея М, 2004.

76 Goodman & Gilman's: The Pharmacological basis of theurapeutics, Twelfth Edition. / New-York, McGraw-Hill. 2011. 2084 P.

77 Thomas F. Woolf. Handbook of drug metabolism / CRC Press, 1999. 612 P.

78 Cytochrome P450: structure, mechanism and biochemistry / edited by Paul R. Ortiz de Montellano. – 3rd ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005. 689 P.

79 Phillips, I.R., Shephard E.A., Ortiz de Montellano, P.R. Cytochrome P450 Protocols / Humana Press, 2013. 315 P.

80 Р.Х. Абдрашитов, А.Е. Петухов, В.В. Смирнов. 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 // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2016. №14 (1). С. 190-195.

- 81 G.R. Wilkinson . Drug metabolism and variability among patients in drug response // *The New England Journal of Medicine*. 2005. V.352(21) P.2211–2221.
- 82 K.N. Kanebratt et al. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2008. V.84(5). P.589–594.
- 83 N. Inui et al. Chronological effects of rifampicin discontinuation on cytochrome P450 activity in healthy Japanese volunteers, using the cocktail method. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(6):702–8
- 84 M.Bosilkovska et al. Geneva cocktail for cytochrome P450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2014. V.96(3). P.349–359
- 85 R.A. Brench et al. In vivo modulation of CYP enzymes by quinidine and rifampin // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2000. V.68(4). P.401–411
- 86 L.M. Vesse et al. CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants // *Drug Metabolism & Disposition*. 2000. V.28(10). P.1176–1183.
- 87 C.F. Thorn et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP1A2 // *Pharmacogenetics & Genomics*. 2012. V.22(1). P.73–77
- 88 D. Van Booven et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9 // *Pharmacogenetics & Genomics*. 2010. V.20(4). P.277–281.
- 89 R.P. Owen et al. Cytochrome P450 2D6 // *Pharmacogenetics & Genomics*. 2009. V.19(7). P.559–562.
- 90 S.M. de Morais et al. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans // *Journal of Biological Chemistry*. 1994. V.269(22). P.15419–15422
- 91 B. Link et al. Pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in plasma and saliva in humans: usefulness of saliva as matrix for CYP3A

phenotyping // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2008. V.66(4). P.473–84.

92 Y. Caraco et al. Phenytoin metabolic ratio: a putative marker of CYP2C9 activity in vivo // *Pharmacogenetics*. 2001. V.11(7). P.587–596.

93 J.M.Maglich et al. Nuclear pregnane x receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification // *Molecular Pharmacology*. 2002. V.62(3). P.638–646.

94 J.T. Backman et al. Rifampicin is only a weak inducer of CYP1A2-mediated presystemic and systemic metabolism: studies with tizanidine and caffeine // *European Journal of Clinical Pharmacology*. 2006. V.62(6). P.451–461.

95 U. Yasar et al. Intra-individual variability in urinary losartan oxidation ratio, an in vivo marker of CYP2C9 activity // *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002. V.54(2). P.183–185

96 U. Yasar et al. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2002. V.71(1). P.89–98.

97 A. Derungs et al. Effects of Cytochrome P450 Inhibition and Induction on the Phenotyping Metrics of the Basel Cocktail: A Randomized Crossover Study // *Clinical Pharmacokinetics*. 2015. Vol.55(1). P.79-91.

98 Donzelli M. et al. The basel cocktail for simultaneous phenotyping of human cytochrome P450 isoforms in plasma, saliva and dried blood spots // *Clinical Pharmacokinetics*. 2014. Vol.53(3). P.271-282.

99 De Andrés F. Evaluation of drug-metabolizing enzyme hydroxylation phenotypes in Hispanic populations: the CEIBA cocktail // *Drug Metabolism and Drug Interactions*. 2013. Vol.28(3). P.135-146.

100 Bosilovska M. Evaluation of Mutual Drug-Drug Interaction within Geneva Cocktail for Cytochrome P450 Phenotyping using Innovative Dried Blood Sampling Method // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2016. Vol. 199(3). P.284-290.

101 Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I // *Clinical Pharmacokinetics*. 2009. V.48(11). P.689-723.

102 Хубутя М.Ш., Чжао А.В., Джаграев К.Р. Трансплантация печени как радикальный метод лечения конечных стадий заболеваний печени // *Хирургия*. 2010. 8(47). С. 13-19

103 Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Бугров А.В. Инсулиноподобный фактор роста-1 при трансплантации печени детям с врожденными и наследственными заболеваниями гепатобилиарной системы // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012. 1. С. 50-54

104 Шевченко О.П., Олефиренко Г.А., Пищулина М.Э. Неоптерин при трансплантации печени детям с врожденными заболеваниями печени и желчевыводящих путей // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012. 2. С. 58-62

105 Шевченко О.П., Цирульникова О.М., Лурье Ю.Э. Динамика гормона роста при трансплантации печени детям раннего возраста с заболеванием гепатобилиарной системы // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2012. 3. С. 31-36

106 13C-aminopyrine breath test accurately predicts long-term outcome of chronic hepatitis C / A. Rocco, G. de Nucci, G. Valente [et al.] // *J. Hepatol.* — 2012. — Apr. — Vol. 56 (4). — P. 782–7.

107 Superiority of the Child-Pugh classification to quantitative liver function tests for assessing prognosis of liver cirrhosis / I. Albers, H. Hartmann, J. Bircher, W. Creutzfeldt // *Scand. J. Gastroenterol.* — 1989. — Vol. 24. — P. 269–76.

108 Операции на печени : руководство для хирургов / В. А. Вишневский, В. А. Кубышкин, А. В. Чжао, Р. З. Икрамов. — М. : Миклош, 2003. — 153 с.

109 Prognostic value of galactose elimination capacity, aminopyrine breath test, and ICG clearance in patients with cirrhosis. Comparison with the Pugh score / C. Merkel, A. Gatta, M. Zoli [et al.] // *Dig. Dis. Sci.* — 1991. — Vol. 36. — P. 1197–203.

110 Assessment of hepatic reserve for indication of hepatic resection : decision tree incorporating indocyanine green test / H. Imamura, K. Sano, Y. Sugawara [et al.] // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* — 2005. — Vol. 12 (1). — P. 16–22.

111 Lee S. G. How I do it : assessment of hepatic functional reserve for indication of hepatic resection / S. G. Lee, S. Hwang // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* — 2005. — Vol. 12 (1). — P. 38–43.

112 Mukherjee S. Comparison of indocyanine green clearance with Child's-Pugh score and hepatic histology : a multivariate analysis / S. Mukherjee, M. A. Rogers, B. Buniak // *Hepatogastroenterology.* — 2006. — Vol. 53. — P. 1203.

113 Predictors of one-year pretransplant survival in patients with cirrhosis / M. Oellerich, M. Burdelski, H. U. Lautz [et al.] // *Hepatology.* — 1991. — Dec. — Vol. 14 (6). — P. 1029–34.

114 Mukherjee S. Comparison of indocyanine green clearance with Child's-Pugh score and hepatic histology : a multivariate analysis / S. Mukherjee, M. A. Rogers, B. Buniak // *Hepatogastroenterology.* — 2006. — Vol. 53. — P. 1203.

115 Гальперин Э. И. Регенерация печени при массивных ее резекциях и повреждениях / Э. И. Гальперин // *Анналы хирург. Гепатологии.* — 2002. — Т. 7, № 1. — С. 279.

116 Bergstorm MA, Ott H, Carlsson A, Neis M, Zwadlo-Klarwasser G, Jonsson CA, Merk HF, Karlberg AT, Baron JM. A skin-like cytochrome P450

cocktail activates prohapten to contact allergic metabolites. – J Invest Dermatol 2007, May;127(5):1145-53. Epub 2006 Nov 23.

117 Smith CK, Moore CA, Elahi EN, Smart AT, Hotchkiss SA. Human skin absorption and metabolism of the contact allergens, cinnamic aldehyde, and cinnamic alcohol. – ToxicolApplPharmacol, 2000 Nov 1: 168(3);189-99.

118 L. Hagvall et al. Cytochrome P450-mediated activation of the fragrance compound geraniol forms potent contact allergen // Toxicology and Applied Pharmacology. 2008. V.233. P.308-313.

119 A. Lee et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions // European Journal of Clinical Pharmacology. 2004. V.60. P.155-159.

120 K. Kulmatycki et al. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in disease and variability in drug response // Journal of Pharmaceutical Science, 2005. P.602-625.

121 N. Moriya et al. Different expression patterns of hepatic cytochrome P450s during anaphylactic or lipopolysaccharide-induced inflammation // Pharmazie. 2014. V.69. P.142-147.

122 Красных Л.М., Смирнов В.В., Егоренков Е.А и др. Метаболическая активность СYP3A4 у больных гормон-зависимой бронхиальной астмой // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80. № 11 – С. 7-9.