

На правах рукописи

Махова Анна Александровна

**РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ СИСТЕМЫ ЦИТОХРОМА P450 3A4
ВИТАМИНАМИ И ВИТАМИНОПОДОБНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Москва – 2018

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

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Ших Евгения Валерьевна**

Научный консультант:

доктор биологических наук, профессор **Шумянцева Виктория Васильевна**

Официальные оппоненты:

Якушева Елена Николаевна, доктор медицинских наук, профессор ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Минздрава России, кафедра фармакологии с курсом фармации ФДПО, заведующая кафедрой.

Жердев Владимир Павлович, доктор медицинских наук, профессор, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В. В. Закусова», лаборатория фармакокинетики, заведующий лабораторией.

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

Ведущая организация: ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России.

Защита состоится «___» _____ 2018 года в ____ ч. на заседании диссертационного совета Д.208.040.13 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, улица Трубецкая д. 8, стр. 2.

Диссертация доступна для ознакомления в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, Москва, Зубовский бульвар, 37/1 и на сайте <https://sechenov.ru/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2018 года

Ученый секретарь диссертационного совета

д.м.н., профессор

Дроздов Владимир Николаевич

Актуальность темы

В настоящее время активно развивается персонализированная медицина, основой которой является повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии за счет ее индивидуализации, в том числе и путем учета тонких механизмов биотрансформации лекарственных препаратов [Matsui S. и др., 2013, Whirl-Carrillo M. и др., 2012]. Становится важен не только поиск новых препаратов, но и более детальное изучение метаболизма и взаимодействий уже существующих лекарственных средств, а также исследование индукторов и ингибиторов биотрансформации лекарственных веществ с целью повышения безопасности и эффективности фармакотерапии [Шумянцева В. В. и др., 2014, Кукес В. Г. и др., 2017]. Витамины и витаминоподобные вещества являются низкомолекулярными органическими соединениями, которые жизненно необходимы для поддержания физиологических функций организма человека [Сычев Д. А. и др., 2010, Кукес В. Г. и др., 2010, Сычев Д. А. и др., 2013]. Витамины и витаминоподобные вещества способны влиять на активность изоферментов цитохрома, метаболизирующих лекарственные средства, что может приводить к изменениям в межлекарственных взаимодействиях и к изменению фармакологического ответа на лекарственную терапию [Шумянцева В. В. и др., 2013, 2014, Воронина Н. В. и др., 2007]. Врачи различных специальностей часто назначают витамины и витаминоподобные вещества как в качестве монотерапии, так и в составе комплексной терапии в дополнение к основному лечению. При этом, как правило, не учитываются возможные межлекарственные взаимодействия и изменение биотрансформации препаратов из группы этиопатогенетической терапии [Бондарева И. Б. и др., 2004, Сизова Ж. М., 2015]. Так как многие витаминно-минеральные комплексы часто имеют регистрационный статус биологически активных добавок или относятся к безрецептурным лекарственным препаратам, пациенты нередко используют их без назначения врача. Наиболее широко применяются в клинической практике витамины группы В и витамины-антиоксиданты, а также коэнзим Q, таурин, L-карнитин и липоевая кислота [Ших Е. В., 2014]. Изофермент цитохрома P450 3A4

(CYP 3A4) метаболизирует более 70 процентов ксенобиотиков и является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450 [Кукес В. Г. и др., 2017]. Модуляция активности ферментов биотрансформации цитохрома P450 при проведении комплексной фармакотерапии у пациентов с коморбидной патологией является перспективным направлением повышения эффективности и безопасности [Пентюк А. А., 1990, Porter T. D., 2004]. Особый интерес представляет поиск веществ-индукторов системы биотрансформации лекарственных соединений для восстановления активности цитохрома P450, сниженной в результате воздействия препарата-ингибитора и/или из-за врожденной недостаточности активности цитохрома P450 вследствие генетических полиморфизмов [Ших Е. В., 2013; Сычев Д. А. и др., 2017]. Ингибирование функции CYP 3A4 также может происходить и вследствие генерации активных форм кислорода (АФК), которые образуются в результате разобщения основного каталитического цикла цитохрома P450 при его работе [Шумянцева В. В. и др., 2015]. В ряде исследований показано, что совместное назначение витаминов группы В с нестероидными противовоспалительными средствами позволяет снизить суточную дозу последних без уменьшения выраженности анальгетического эффекта. Это связано со снижением интенсивности метаболизма диклофенака и повышением его концентрации в плазме крови за счёт замедления биотрансформации препарата [Шумянцева В. В. и др., 2011]. На сегодняшний день влияние широко используемых в клинической практике в составе комплексной терапии витаминов и витаминоподобных веществ на активность главной системы биотрансформации лекарств — цитохром P450-монооксигеназной системы — изучено недостаточно. Одной из причин этого является отсутствие доступных экспериментальных методов исследования активности изоферментов цитохрома [Шумянцева В. В. и др., 2009]. Разработка экспериментальной методики и изучение с ее помощью влияния витаминов и витаминоподобных веществ на активность рекомбинантных CYP 3A4, а также экстраполяция результатов исследования в клинику является актуальным направлением для проведения исследований.

Степень разработанности темы исследования

В 1990-х гг. группой исследователей во главе с Пентюком А. А. [Пентюк А. А., 1990] был проведен ряд экспериментов на мелких животных с изучением влияния производных тиамин и рибофлавина на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков и фармакологический эффект анальгетиков. Эти исследования положили начало изучению рационального использования витаминных препаратов в качестве средств целенаправленной коррекции фармакологического эффекта анальгетиков. В настоящий момент данными фармакокинетических исследований подтверждено, что комплексное назначение витаминов группы В с нестероидными противовоспалительными средствами приводит к снижению интенсивности метаболизма диклофенака и к повышению его концентрации в плазме крови в связи с замедлением биотрансформации [Ших Е. В., 2011].

Цель исследования: оптимизировать фармакотерапию витаминами и витаминоподобными веществами на основе возможного регулирования активности изофермента системы CYP 3A4 указанными соединениями.

Задачи исследования:

1. Модифицировать электрохимическую методику электроанализа каталитической активности рекомбинантного CYP 3A4 для проведения анализа лекарственной интерференции по электрохимическим параметрам.
2. Изучить в эксперименте с применением методики электроанализа влияние витаминов-антиоксидантов А, С, Е на каталитическую активность рекомбинантного CYP 3A4.
3. Изучить в эксперименте с применением методики электроанализа влияние витаминов группы В (В₁, В₂, В₆) на каталитическую активность рекомбинантного CYP 3A4.
4. Изучить в эксперименте с применением методики электроанализа влияние веществ природного происхождения — коэнзима Q, таурина, L-

карнитина, липоевой кислоты — на каталитическую активность рекомбинантного СУР 3А4.

5. Изучить в эксперименте с применением методики электроанализа возможность нивелирования витаминами-антиоксидантами и витаминоподобными веществами действия ингибиторов СУР 3А4 итраконазола и эритромицина на СУР 3А4.

6. Изучить влияние таурина и L-карнитина на активность изофермента СУР 3А4 с помощью теста определения соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в моче у добровольцев.

7. Изучить влияние таурина и L-карнитина на активность изофермента СУР 3А4 с помощью теста определения соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в моче у пациентов в гипертрофическом онихомикозом ногтей на фоне терапии итраконазолом.

8. Изучить влияние диклофенака на активность изофермента СУР 3А4 с помощью теста определения соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в моче у пациентов с посттравматическим болевым синдромом.

9. На основе результатов, полученных при применении методики электроанализа, разработать классификацию витаминов по виду воздействия на каталитическую активность рекомбинантного СУР 3А4.

Научная новизна

Впервые для оценки влияния лекарственных препаратов на активность изоферментов цитохрома Р450 применена модифицированная методика электроанализа каталитической активности рекомбинантного СУР 3А4.

Впервые с применением электроанализа доказано влияние витаминов-антиоксидантов (витамина А, витамина С, витамина Е) и витаминоподобных веществ природного происхождения (таурина, L-карнитина, коэнзима Q) на электрокаталитическую активность рекомбинантного СУР 3А4.

Установлено, что тиамин, рибофлавин, пиридоксин, витамины-антиоксиданты (витамин А, витамин Е, витамин С), а также витаминоподобные вещества таурин и коэнзим Q могут применяться с целью фармакологической

регуляции активности CYP 3A4. Впервые в электрохимическом эксперименте определена субстратная принадлежность витамина E.

Впервые в эксперименте продемонстрирована способность таурина нивелировать ингибирующее действие итраконазола по отношению к CYP 3A4 за счет восстановления каталитической активности CYP 3A4. Впервые в электрохимическом исследовании доказана способность таурина снижать ингибирующее действие эритромицина на изофермент CYP 3A4.

Впервые у здоровых добровольцев доказано влияние таурина и L-карнитина на активность изофермента CYP 3A4 с помощью неинвазивного метода, заключающегося в оценке соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол в моче.

Впервые в эксперименте и в клинике установлен механизм повышения безопасности терапии итраконазолом путём уменьшения ингибирования активности CYP 3A4 при одновременном назначении с таурином, что подтверждено определением соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол в моче.

Впервые разработана классификация витаминов и витаминоподобных веществ по виду воздействия на каталитическую активность рекомбинантного CYP 3A4. Данная классификация позволяет прогнозировать возможные межлекарственные взаимодействия между витаминами, витаминоподобными веществами и этиопатогенетическими препаратами, метаболизм которых протекает при участии изофермента CYP 3A4, при применении в составе стандартной комплексной терапии.

Теоретическая и практическая значимость

Разработана неинвазивная многокомпонентная методика *in electrode* для скрининговой оценки влияния лекарственных препаратов на активность изоферментов цитохрома P450. Использование методики позволяет прогнозировать межлекарственные взаимодействия.

Доказанная в электрохимическом эксперименте способность таурина снижать ингибирующее действие итраконазола по отношению к CYP 3A4 подтверждена в исследовании *in vivo* у пациентов с гипертрофическим онихомикозом ногтей, получающих терапию итраконазолом, с помощью

неинвазивного метода определения соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол в моче. На основании проведенного исследования внесены изменения в инструкцию по применению препарата Дибикор: раздел «Показания» дополнен разрешением к использованию в качестве гепатопротектора при лекарственных поражениях печени, вызываемых противогрибковыми препаратами. В электрохимическом эксперименте доказано, что таурин способен снижать ингибирующее действие эритромицина по отношению к CYP 3A4 за счет восстановления его электрокаталитических свойств.

Проведенные исследования показали, что в связи с наличием ингибирующего действия у витаминов группы В (В₁, В₂ и В₆) в концентрации 333 мкМ и аскорбиновой кислоты в концентрации 2,8 мМ на изофермент CYP 3A4, их применение в составе комплексной терапии может увеличивать риск относительной передозировки применяемых одновременно лекарственных препаратов, метаболизирующихся этим изоферментом. В связи с наличием индуцирующего действия одновременное назначение коэнзима Q, витамина Е, витамина А, таурина, витамина С в концентрации 0,28 мМ может привести к снижению фармакологического эффекта применяемых одновременно лекарственных препаратов, метаболизирующихся CYP 3A4. Впервые разработана классификация витаминов и витаминоподобных веществ в зависимости от их влияния на систему CYP 3A4, что является важной информацией для практикующих врачей, поскольку позволяет прогнозировать возможные межлекарственные взаимодействия между витаминами, витаминоподобными веществами и препаратами из группы этиопатогенетической терапии.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Модифицированная многокомпонентная электрохимическая методика *in electrode* позволяет проводить экспериментальный скрининг межлекарственных взаимодействий с использованием диклофенака в качестве маркерного субстрата и итраконазола в качестве маркерного ингибитора CYP 3A4.

2. Витамины и витаминоподобные вещества в электрохимическом эксперименте изменяют каталитическую активность рекомбинантного CYP 3A4:

ингибирующее действие оказывают тиамин, рибофлавин, пиридоксин и витамин С (в концентрации 2,8 мМ в пробе); индуцирующее действие оказывают витамин А, витамин Е, витамин С (в концентрации 0,28 мМ в пробе), таурин, коэнзим Q.

3. L-карнитин, липоевая кислота не оказывают влияния на электрокаталитическую активность СYP 3A4.

4. Таурин и аскорбиновая кислота в низких дозах (0,28 мМ в пробе) снижают ингибирование итраконазолом электрокаталитического восстановления СYP 3A4 в эксперименте.

5. Таурин нивелирует ингибирующее действие итраконазола в отношении электрокаталитического восстановления СYP 3A4 у пациентов с гипертрофическим онихомикозом.

6. Кудесан (коэнзим Q₁₀ и витамин Е) и аскорбиновая кислота снижают ингибирование эритромицином электрокаталитического восстановления СYP 3A4.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов проведенного исследования подтверждается тем, что они были получены на сертифицированном оборудовании, откалиброванном соответственно правилам инструкции по эксплуатации приборов. Экспериментальные электрохимические исследования проводились на потенциостате AUTOLAB (производство Eco Chemie, Нидерланды). Содержание 6β-гидроксикортизола и кортизола в утренней моче определяли методом хромато-масс-спектрометрического анализа на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent G1978B MultimodeSourcefor 6410 TripleQuade LC/MS (производство AgilentTechnologies, Inc., США). Использованы современные методики сбора и обработки исходной информации, выбора объекта исследования. Численность обследованных групп пациентов и добровольцев достаточна для формирования обоснованных заключений. Использованные методы соответствуют целям и задачам диссертационного исследования. Полученные данные обработаны адекватными статистическими методами.

Основные положения диссертации доложены на IX научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование» (Школа клинического фармаколога: «Проблемы персонализации фармакотерапии на основе биомедицинских технологий»), 2013 г.; X научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование» (секция «Проблемы доклинических исследований в фармакологии и персонализации фармакотерапии»), 2014 г.; XII научно-практической конференции «Биомедицина и биомоделирование» (симпозиум «Клинико-фармакологические аспекты изучения системы цитохрома P450»), 2016 г; XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Школа для практикующих врачей по специальности «Клиническая фармакология»), 2017 г; 3-ей Московской конференции «Вотчаловские чтения» в рамках Школы молодых ученых по фармакогенетике, фармакогеномике и персонализированной медицине, 2017 г.; XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Школа для практикующих врачей по специальности «Клиническая фармакология»), 2018 г.

Работа апробирована на совместном совещании сотрудников кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней лечебного факультета ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) и Центра Клинической фармакологии ФГБУ НЦ ЭСМП (протокол №27 от 13 марта 2018 г.).

Внедрение результатов в практику

Разработанная модифицированная многокомпонентная электрохимическая методика *in electrode* внедрена в качестве скрининговой в лаборатории биоэлектрохимии отдела персонализированной медицины ФГБУ РАН «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича» для определения влияния лекарственных средств на систему CYP 3A4; для проведения экспериментального скрининга субстратов, модуляторов, ингибиторов системы цитохрома P450; для оценки межлекарственных

взаимодействий с использованием диклофенака в качестве маркерного субстрата CYP 3A4 и итраконазола в качестве маркерного ингибитора CYP 3A4.

Результаты диссертационного исследования опубликованы в монографии «Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450» под редакцией E. G. Hrycaу, S. M. Bandiera в издательстве Springer International Publishing Switzerland, 2015 г.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Сеченовского университета.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 30 печатных работ, из них 10 – в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи в иностранной печати, в журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, глава в монографии «Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450» под редакцией E. G. Hrycaу, S. M. Bandiera в издательстве Springer International Publishing Switzerland, 2015; 3 монографии.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль на всех этапах исследования, включая анализ литературы; модификацию методики для проведения электрохимических исследований; выбор маркерных соединений субстратов и ингибиторов; организацию и построение электрохимического эксперимента; осмотр, консультирование и включение в исследование пациентов; скрининг добровольцев; сбор биоматериала и его анализ, статистическую обработку и анализ результатов исследования, их обобщение; написание печатных работ и всех глав диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствует формуле специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология. Результаты проведенного

исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 4, 7, 8 и 18 паспорта специальности «фармакология, клиническая фармакология».

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов и практических рекомендаций, списка литературы, содержащего 328 источников, в том числе 85 отечественных и 243 зарубежных. Объем диссертации составляет 226 страниц машинописного текста. Работа иллюстрирована 31 таблицей и 29 рисунками.

Материалы и методы исследования

Схема организация исследования по изучению влияния витаминов и витаминоподобных веществ на активность СYP 3A4

Исследование было разделено на две части: экспериментальное исследование и клиническое, каждая из частей разбита на три этапа.

В рамках экспериментальной части исследования проведена оценка влияния веществ природного происхождения, широко применяемых в составе комбинированной терапии, на активность основного изофермента, метаболизирующего лекарственные средства, СYP 3A4. Схема организации экспериментального исследования представлена на Рис. 1. В качестве маркерного субстрата СYP 3A4 в проводимой серии электрохимических экспериментов был выбран нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак, который широко назначается в клинической практике для купирования болевого синдрома, как в виде монотерапии, так и в сочетании с другими лекарственными препаратами, в том числе с витаминами, антиоксидантами и витаминоподобными веществами. Метаболизм диклофенака хорошо изучен и складывается из двух последовательных событий: глюкуронизации кислотного участка и гидроксилирования ароматического кольца с образованием 4'-гидрокси и 5'-гидрокси производных препарата.

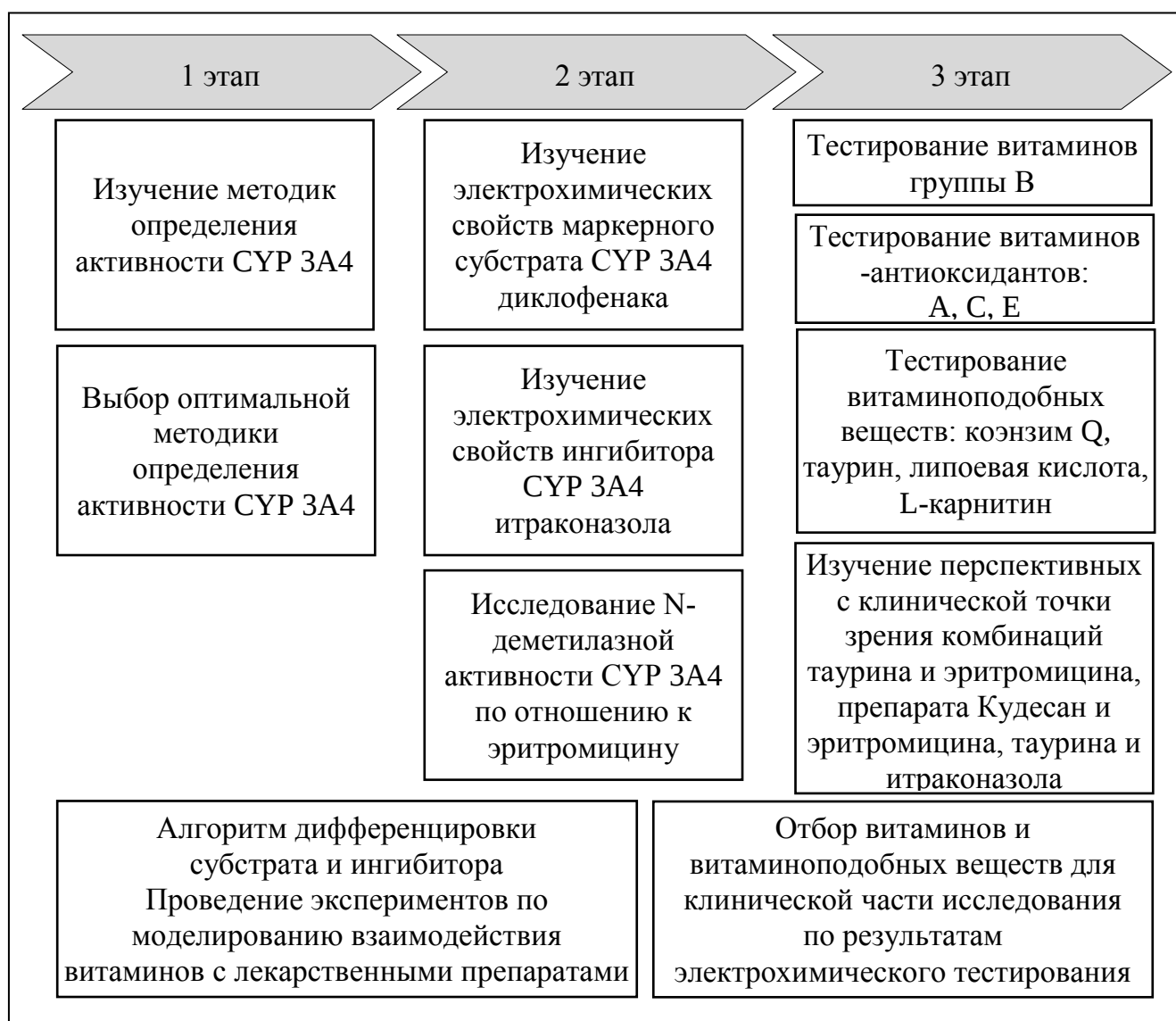


Рисунок 1. Схема организации экспериментального исследования

Итраконазол подвергается активному метаболизму в печени с образованием множества метаболитов. Основным метаболитом является гидроксиитраконазол, который *in vitro* обладает противогрибковой активностью, сопоставимой с итраконазолом. Концентрация гидроксиитраконазола в плазме крови превышает концентрацию итраконазола примерно в 2 раза. Итраконазол является не только ингибитором изофермента CYP 3A4, но и его субстратом.

Мы последовательно изучали возможность фармакологического регулирования системы CYP 3A4 витаминами и витаминоподобными веществами. С использованием рекомбинантного человеческого CYP 3A4 в электрохимическом эксперименте были изучены: витамины группы В

(витамины В₁, В₂ и В₆), витамины-антиоксиданты (витамины А, Е и С) и витаминоподобные вещества (таурин, коэнзим Q, липоевая кислота). Также экспериментально были оценены потенциально клинически значимые комбинации веществ: комбинация итраконазола с таурином, комбинация эритромицина с таурином и комбинация коэнзима Q с эритромицином.

Для выявления защитной роли таурина на ферменты системы цитохрома Р450 были проведены эксперименты по оценке N-деметиلاзной электрокаталитической активности СYP 3A4 в отношении макролидного антибиотика эритромицина в присутствии таурина.

В клинической части проведена оценка валидности электрохимического метода в качестве модели изучения взаимодействия лекарственных препаратов в организме человека на уровне системы СYP 3A4. Схема клинической части исследования представлена на Рис. 2.

На первом этапе клинического исследования у добровольцев было изучено влияние витаминоподобных веществ таурина и L-карнитина на активность СYP 3A4 с помощью неинвазивной методики по Roberts [D.M. Roberts и др., 2007]. Добровольцам назначали таурин, в виде препарата Дибикор (таблетки 250 мг, ПИК-ФАРМА ПРО, Россия) внутрь в дозе 500 мг 2 раза в сутки за 20 минут до приема пищи, длительность приема препарата составляла 14 дней. Забор биоматериала (моча) производили до начала приема препарата Дибикор, а также на фоне его приема через 3, 7, 10 и 14 дней после начала терапии. Активность СYP 3A4 оценивали неинвазивным методом по соотношению 6 β -гидроксикортизол/кортизол в моче по Roberts.

У этой же группы добровольцев через один месяц («отмывочный период») после приема препарата Дибикор была изучена активность изоферментов СYP 3A4 неинвазивным методом по Roberts на фоне приёма L-карнитина. Добровольцы получали L-карнитин (препарат Элькар, раствор для приема внутрь, 100 мл, 300 мг/мл, ПИК-ФАРМА, Россия) внутрь по 2,5 мл 3 раза в сутки 14 дней. Забор биоматериала (моча) производили до начала приема L-карнитина, а также на фоне его приема через 3, 7, 10 и 14 дней после начала терапии.

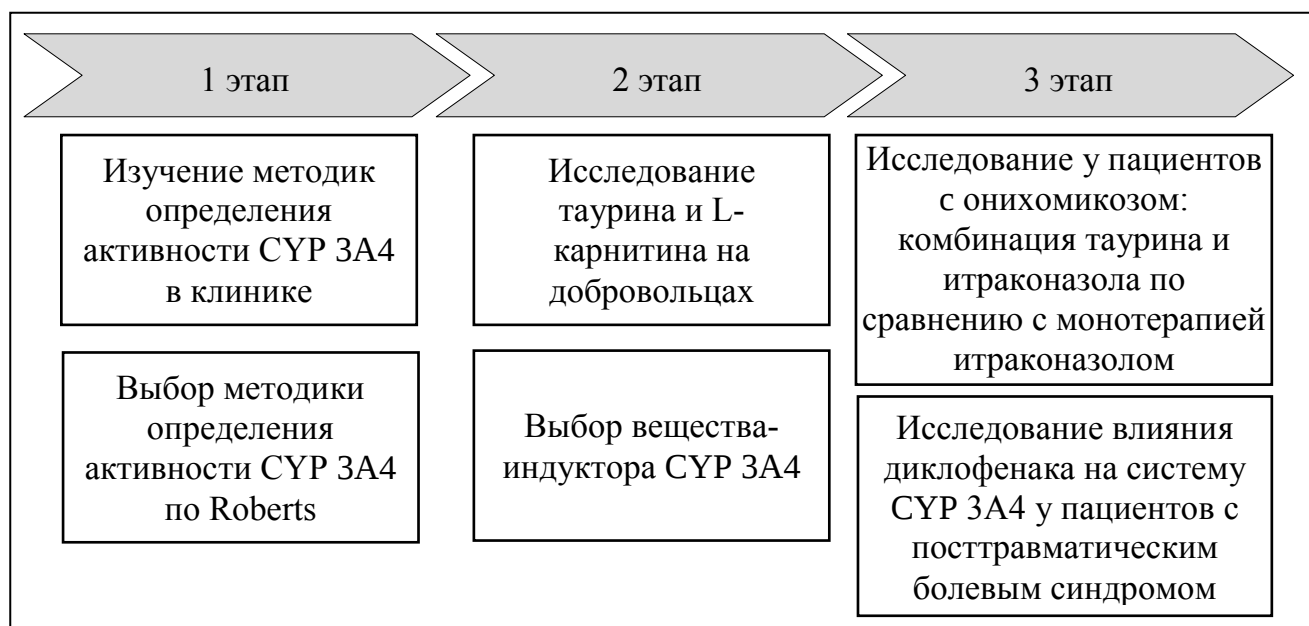


Рисунок 2. Схема организации клинического исследования

На втором этапе клинического исследования проведено изучение влияния комбинации итраконазола и таурина у пациентов с онхомикозом на активность СYP 3A4 по неинвазивной методике по Roberts. Всем пациентам этой группы был назначен противогрибковый препарат широкого спектра действия Итраконазол (таблетки 100 мг, Биоком, Россия) в виде пульс-терапии по 200 мг 2 раза в сутки после еды в течение 7 дней с перерывом в 21 день. Длительность лечения составила от 2 до 5 туров терапии. Препарат назначали в качестве монотерапии и в потенциально клинически значимой комбинации с таурином в дозе 500 мг 2 раза в сутки.

Пациенты были распределены на две подгруппы случайным образом: 18 пациентов принимали итраконазол в виде монотерапии, другие 18 пациентов получали итраконазол и препарат Дибикор (таурин). Проведено сравнение результатов, полученных на модели комбинации препарата-ингибитора и витаминopodobного вещества-индуктора (итраконазол+таурин), с результатами, полученными на модели применения препарата-ингибитора (итраконазол). Забор биоматериала (моча) производили до начала приема лекарственных препаратов, а также на фоне их приема через 3, 7, 10 и 14 дней после начала терапии.

На третьем этапе клинического исследования изучено влияние диклофенака, субстрата CYP 3A4, на активность данной изоформы цитохрома P450 у пациентов с посттравматическим болевым синдромом с использованием неинвазивной методики по Roberts (модель влияния препарата-субстрата на активность CYP 3A4). Диклофенак назначали в виде монотерапии в таблетках (Хемофарм, Сербия) 50 мг 2 раза в сутки. Забор биоматериала (моча) производили до начала приема препарата, а также на фоне его приема через 3, 7, 10 и 14 дней после начала терапии.

Методики, используемые в исследовании

Экспериментальное электрохимическое исследование влияния витаминов и витаминоподобных веществ на активность фермента CYP 3A4 проведено в серии опытов с использованием рекомбинантного человеческого CYP 3A4 на потенциостате AUTOLAB (Eco Chemie, Нидерланды). Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтаметрического анализа (квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии). При окислении и (или) гидроксировании субстратов CYP 3A4 в электрохимической системе регистрируется катодный ток, соответствующий дополнительному потоку электронов к органическому субстрату (лекарственному препарату) в системе. Катодный ток (имеющий отрицательное значение, в отличие от анодных процессов с положительным значением тока) является мерой электрокаталитической активности фермента. Субстраты соответствующих изоформ цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока при контролируемом напряжении, тогда как ингибиторы не изменяют максимальные амплитуды токов либо снижают их.

В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмония бромид (DDAB, Sigma-Aldrich), чистота 98%, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия (Sigma-Aldrich). В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные водные растворы тиамин 334 мкМ, рибофлавин 334 мкМ, пиридоксин 334 мкМ, аскорбиновой кислоты 0,28 М, масляные растворы

ретинола ацетата 0,1 М и токоферола ацетата 0,1 М, водный раствор липоевой кислоты 0,2 мМ. В работе также применяли 10 мМ раствор диклофенака в воде, 10 мМ раствор таурина в воде, 10 мМ раствор итраконазола в диметилсульфоксиде (Fisher Scientific, чистота $\geq 99,7\%$), препараты Элькар и Кудесан, 100 мкМ спиртовой раствор эритромицина, реактив Nash (4 М ацетат аммония, 0,1 М ледяная уксусная кислота, 0,04 М ацетилацетон). Кроме того, для модификации электродов был использован коллоидный раствор золота (золотые наночастицы), стабилизированный DDAB в хлороформе и получаемый с помощью восстановления тетрахлорзолотой кислоты $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ боргидридом натрия в присутствии DDAB. В исследовании применялся рекомбинантный СУР 3А4, полученный при помощи гетерологической экспрессии и очистки рекомбинантных форм СУР 3А4 в *E. coli* в Институте биоорганической химии, Минск, Республика Беларусь. В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП «КолорЭлектроникс», Москва, Россия); с графитовыми рабочим (индикаторным) и вспомогательным электродами (графит фирмы Achison), и хлорсеребряным (Ag/AgCl) электродом сравнения.

Активность СУР 3А4 оценивали неинвазивным методом по соотношению концентраций β -гидрокортизола, образующегося из кортизола исключительно под действием СУР 3А4, и кортизола (соотношение β -гидрокортизол/ кортизол). Концентрации этих веществ определяли в утренней порции мочи методом хромато-масс-спектрометрического анализа по стандартной методике высокоэффективной жидкостной хроматографии по Roberts.

Характеристика участников клинического исследования

Характеристика добровольцев, включенных в исследование активности СУР 3А4 неинвазивным методом по Roberts

В исследовании участвовала группа добровольцев, в которую вошли 18 практически здоровых лиц (мужчины) в возрасте 18–35 лет (средний возраст

26,4 ± 5,7 лет), с индексом массы тела, отличавшимся от нормальных величин не более чем на 20%.

Перед включением в исследование был проведён скрининг, включавший в себя общий и биохимический анализ крови, регистрацию электрокардиограммы, эхокардиографию, ультразвуковое исследование органов брюшной полости. В исследование не включались добровольцы с какими-либо хроническими заболеваниями, клинически значимыми изменениями лабораторных показателей, хирургическими вмешательствами на органах желудочно-кишечного тракта за три месяца до начала исследования, острыми инфекционными заболеваниями менее чем за 4 недели до начала исследования, а также лица, имеющие в анамнезе аллергические реакции на применяемые лекарственные средства.

Характеристика пациентов с онихомикозом, включенных в исследование активности CYP 3A4 неинвазивным неинвазивным методом по Roberts

В исследование было включено 36 пациентов с онихомикозом обоего пола, которые амбулаторно наблюдались в микологическом отделении кожно-венерологического диспансера №15 Юго-Восточного округа г. Москва. Возраст пациентов составлял от 27 до 44 лет (средний возраст — 35,5 ± 8,8 лет), из 36 пациентов 24 (66,6%) были мужчинами, 12 (33,3%) — женщинами. Масса тела пациентов составила от 59 до 86 кг (средняя масса тела – 72,6 ± 7,6 кг), рост от 159 см до 182 см (средний рост – 172,32 ± 9,6 см). Анамнестическая длительность заболевания варьировала от 2 месяцев до 2 лет. У всех пациентов диагностировано поражение ногтевых пластинок: пальцев стоп у 20 пациентов (55,5%), пальцев кистей у 16 пациентов (44,5%).

Перед включением в исследование у всех пациентов были выполнены общий и биохимический анализ крови, регистрация электрокардиограммы, эхокардиография, ультразвуковое исследование органов брюшной полости. В исследование не включали пациентов с какими-либо хроническими заболеваниями (за исключением микотического поражения ногтей), клинически значимыми изменениями лабораторных показателей, хирургическими вмешательствами на органах желудочно-кишечного тракта за три месяца до

начала исследования, острыми инфекционными заболеваниями менее чем за 4 недели до начала исследования, а также пациентов, имеющих в анамнезе аллергические реакции на применяемые лекарственные средства.

Микологическое исследование ногтевых пластин пальцев ног. У всех пациентов было выполнено исследование ногтевых пластин на наличие микотического поражения в клинической лаборатории кожно-венерологического диспансера №15. Применялся метод прямой микроскопии с использованием 10% р-ра калия гидроксида. Контрольные микроскопические исследования материала с ногтевых пластин проводились по достижению клинического излечения с трехкратным повтором с интервалом в 3 месяца.

*Характеристика спортсменов с посттравматическим болевым синдромом,
включенных в исследование активности СУР 3А4
неинвазивным методом по Roberts*

В исследование было включено 18 спортсменов, не имеющих хронических заболеваний, которые наблюдались в городской поликлинике №209, филиалах №140, №158, по поводу посттравматического болевого синдрома. Возраст спортсменов составлял от 18 до 25 лет (средний возраст $21,5 \pm 3,5$ лет), 14 (66,6%) из них были мужчинами, 4 (33,3%) — женщинами. Масса тела была равна от 55 до 88 кг (средняя масса тела $71,5 \pm 16,5$ кг), рост — от 164 см до 188 см (средний рост 176 ± 12 см). Выраженность болевого синдрома в среднем по 10-бальной визуальной аналоговой шкале составила $5,5 \pm 1,3$ балла.

Перед включением в исследование у всех спортсменов были проведены общий и биохимический анализ крови, электрокардиография, эхокардиография, ультразвуковое исследование органов брюшной полости. В исследование не включались лица с какими-либо хроническими заболеваниями, клинически значимыми изменениями лабораторных показателей, хирургическими вмешательствами на органах желудочно-кишечного тракта за три месяца до начала исследования, острыми инфекционными заболеваниями менее чем за 4 недели до начала исследования, а также с аллергическими реакциями на применяемые лекарственные средства в анамнезе.

На проведение исследования получено одобрение этического комитета.

Статистическая обработка результатов исследования

В работе использовались средние значения, полученные в серии экспериментов. Изучаемые количественные признаки, имеющие нормальное распределение, в работе представлены в виде средних арифметических значений и стандартного отклонения. Для проверки гипотезы о равенстве средних для двух групп использовался критерий Стьюдента. Результат расценивался как достоверный при $p < 0,05$. Статистическая обработка полученных результатов проводилась на персональном компьютере фирмы Asus на основе четырехядерного процессора Intel Intel Skylake Core i7-6700HQ (2,6 ГГц) с использованием: 1) пакета прикладных программ Microsoft Office 2016 (Microsoft Excel 2016); 2) программы Matlab версии R2017b.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты и обсуждение экспериментальной части исследования

Разработанная модифицированная многокомпонентная электрохимическая методика *in electrode* позволяет использовать систему электрод/фермент на стадии доклинических испытаний в качестве неинвазивного инструмента оценки каталитических функций цитохромов P450 с целью поиска новых субстратов, ингибиторов, модуляторов этих ферментов.

Витамины группы В как ингибиторы каталитической активности СУР 3А4 в электрохимическом эксперименте

Изучено влияние различных концентраций витаминов группы В — тиамина, рибофлавина и пиридоксина — на каталитическую активность СУР 3А4 (Табл. 1).

Проведено сравнение влияния витаминов группы В (B_1 , B_2 , B_6) в равной концентрации (334 мкМ) на каталитическую активность изофермента СУР 3А4 при помощи квадратно-волновой вольтамперометрии.

По данным измерения катодного тока, при нанесении диклофенака в качестве маркерного субстрата СУР 3А4 и витаминов группы В, мы видели замедление каталитической реакции с диклофенаком, что свидетельствовало об

ингибирующем влиянии витаминов группы В в исследуемых концентрациях на изофермент СУР 3А4. Установлено, что максимальное ингибирование каталитической активности СУР 3А4 происходит при применении рибофлавина (Рис. 3).

Таблица 1

Значения вольтамперных откликов при изучении витаминов группы В в серии экспериментов

Электрод	Позиция (V)	Высота (амплитуда) пика, мкА	Δ , мкА	Площадь электровосстановления
Серия экспериментов с тиамином 334 мкм				
DDAB/Au + P450 3A4	-0,181	$(-7,4 \pm 0,3) * 10^{-7}$	-0,74	$1,44 * 10^{-7}$
DDAB/Au + P450 3A4 + тиамин	-0,156	$(-6,6 \pm 0,2) * 10^{-7}$	-0,66	$1,16 * 10^{-7}$
DDAB/Au + P450 3A4 + тиамин + диклофенак	-0,156	$(-7,8 \pm 0,3) * 10^{-7}$	-0,78	$1,40 * 10^{-7}$
Серия экспериментов с рибофлавином 334 мкм				
DDAB/Au + P450 3A4	-0,200	$(-6,1 \pm 0,2) * 10^{-7}$	-0,61	$1,13 * 10^{-7}$
DDAB/Au + P450 3A4 + рибофлавин	-0,152	$(-5,1 \pm 0,3) * 10^{-7}$	-0,51	$6,4 * 10^{-8}$
DDAB/Au + P450 3A4 + рибофлавин + диклофенак	-0,152	$(-5,3 \pm 0,2) * 10^{-7}$	-0,53	$6,3 * 10^{-8}$
Серия экспериментов с пиридоксином 334 мкм				
DDAB/Au + P450 3A4	-0,195	$(-8,8 \pm 0,3) * 10^{-7}$	-0,88	$1,75 * 10^{-7}$
DDAB/Au + P450 3A4 + пиридоксин	-0,166	$(-1,05 \pm 0,3) * 10^{-6}$	-1,05	$2,1 * 10^{-7}$
DDAB/Au + P450 3A4 + пиридоксин + диклофенак	-0,161	$(-9,3 \pm 0,3) * 10^{-7}$	-0,93	$1,76 * 10^{-7}$
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) KBBA в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов (n = 8). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии				

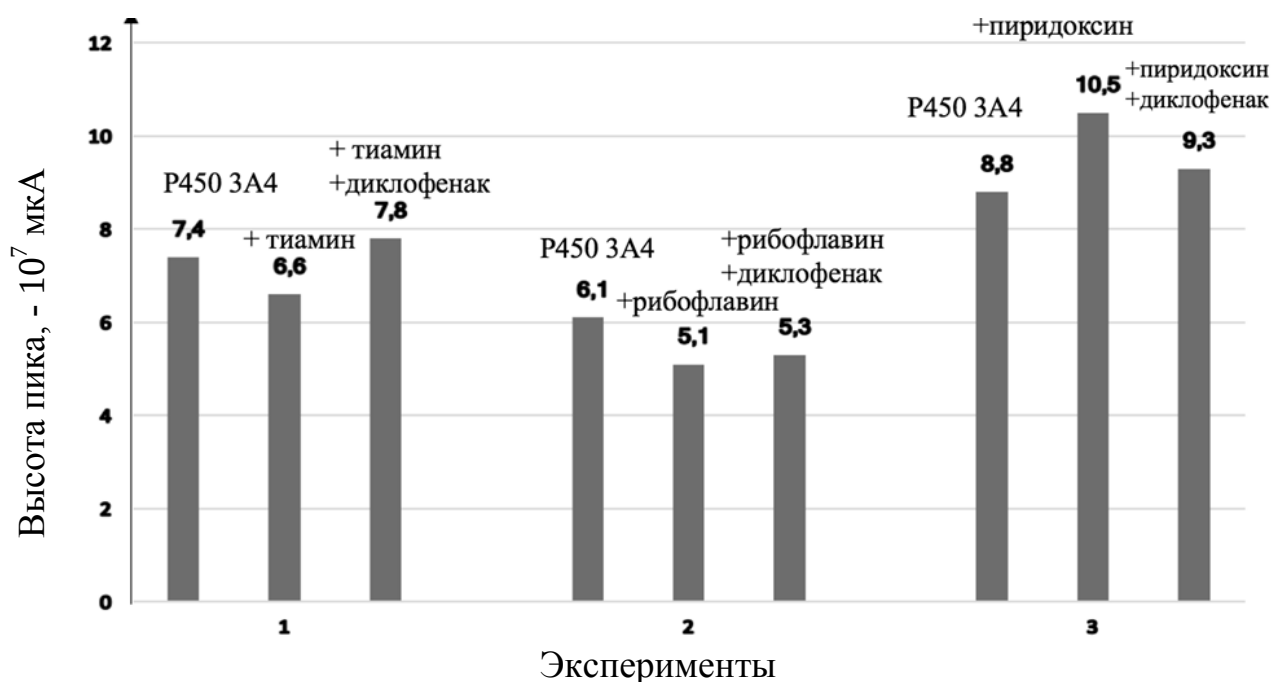


Рисунок 3. Интенсивность пиков KBVA в экспериментах с витаминами группы В в аэробных условиях электродов

1 – эксперименты с тиамином, 2 – эксперименты с рибофлавином, 3 – эксперименты с пиридоксином

Значения амплитуд токов KBVA были скорректированы по базовой линии

Витамины-антиоксиданты как индукторы каталитической активности CYP 3A4 в электрохимическом эксперименте

Цитохромы P450 являются самоинактивирующимися ферментами, потеря активности которых происходит под действием АФК (пероксида водорода, супероксид анион-радикала), генерируемых в каталитическом цикле фермента при неполном сопряжении монооксигеназных реакций. Инактивация цитохрома P450 ведёт к снижению общей каталитической активности монооксигеназной системы, что влечёт за собой замедление метаболизма лекарственных препаратов, изменение параметров их фармакокинетики и развитие побочных эффектов вследствие относительной передозировки [Шумянцева В. В. и др., 2009]

Изучение влияния витамина С на активность CYP 3A4

Выявлена концентрационная зависимость влияния витамина С на каталитическую активность CYP 3A4: витамин С в низких концентрациях

(280 мкМ в пробе) увеличивает каталитическую активность цитохрома P450, а в высоких концентрациях (2,8 мМ в пробе) ингибирует ее (Табл. 2).

Таблица 2

Влияние витамина С на электрокаталитические параметры СУР 3А4 в присутствии субстрата диклофенака и ингибитора итраконазола

№	Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
1	DDAB/Au + P450 3A4	-0,30±0,02	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С (в пробе 280 мкМ)	-0,37±0,02	123%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,61±0,03	203%
2	DDAB/Au + P450 3A4	-0,77±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С (в пробе 2,8 мМ)	-0,57±0,03	74%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,77±0,03	101%
3	DDAB/Au + P450 3A4	-0,56±0,02	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С (в пробе 0,56 мМ)	-0,78±0,03	139%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,87±0,03	155%
4	DDAB/Au + P450 3A4	-1,1±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С (в пробе 1,12 мМ)	-1,74±0,03	158%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-2,08±0,04	189%
5	DDAB/Au + P450 3A4	-0,8±0,02	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С (в пробе 1,68 мМ)	-0,58±0,02	72%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин С + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,8±0,02	100%
6	DDAB/Au + P450 3A4	-0,553±0,021	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-0,455±0,029	82%
	P450 3A4 + итраконазол + витамин С (в пробе 140 мкМ)	-0,529±0,026	96%
7	DDAB/Au + P450 3A4	-0,266±0,019	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-0,225±0,022	84%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол + витамин С (в пробе 280 мкМ)	-0,377±0,024	142%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) КВВА в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов (n = 8). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии			

В экспериментах с ингибитором СУР 3А4 итраконазолом было показано, что в низких концентрациях (140 мкМ и 280 мкМ в пробе) витамин С увеличивает каталитический ток СУР 3А4 и устраняет ингибирование каталитической активности СУР 3А4 итраконазолом.

Изучение влияния витамина А на активность СУР 3А4

Установлено, что витамин А (ретинола ацетат) оказывает концентрационно-зависимое стимулирующее влияние на электровосстановление СУР 3А4 (Табл. 3). В концентрации 100 мкМ витамин А проявляет стимулирующий эффект: катодный пик возрастает пропорционально концентрации витамина А и достигает $232 \pm 10\%$.

Таблица 3

Влияние витамина А на электрокаталитические параметры СУР 3А4 в присутствии субстрата диклофенака и ингибитора итраконазола

№	Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
1	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,451 \pm 0,023$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин А (в пробе 1 мМ)	$-0,45 \pm 0,02$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-0,46 \pm 0,02$	102%
2	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,436 \pm 0,021$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин А (в пробе 100 мкМ)	$-1,01 \pm 0,034$	232%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-1,13 \pm 0,038$	256%
3	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,87 \pm 0,02$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин А (в пробе 50 мкМ)	$-1,0 \pm 0,03$	115%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-1,03 \pm 0,04$	118%
4	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,184 \pm 0,008$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	$-0,158 \pm 0,007$	86%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол + витамин А (в пробе 100 мкМ)	$-0,239 \pm 0,012$	130%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) КВВА в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов ($n = 8$). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии			

Изучение влияния витамина Е на активность СУР 3А4

Витамин Е в концентрации 100 мкМ также проявляет стимулирующий эффект: катодный пик возрастает пропорционально концентрации витамина Е, и при концентрации 100 мкМ восстановительный пик СУР 3А4 увеличивается на $176 \pm 10\%$ (Табл. 4). Витамин Е в концентрации 1 мМ более эффективно, чем витамин А, стимулирует рост восстановительного катодного пика СУР 3А4: $119 \pm 10\%$.

Таблица 4

Влияние витамина Е на электрокаталитические параметры СУР 3А4 в присутствии субстрата диклофенака и ингибитора итраконазола

	Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
1	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,42 \pm 0,02$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин Е (в пробе 1 мМ)	$-0,5 \pm 0,02$	119%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-0,51 \pm 0,02$	121%
2	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,447 \pm 0,023$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин Е (в пробе 100 мкМ)	$-0,789 \pm 0,033$	176%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-0,759 \pm 0,025$	169%
3	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,593 \pm 0,022$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + витамин Е (в пробе 330 мкМ)	$-0,675 \pm 0,024$	114%
	DDAB/Au + P450 3A4 + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	$-0,702 \pm 0,025$	118%
4	DDAB/Au + P450 3A4	$-0,43 \pm 0,02$	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	$-0,338 \pm 0,020$	79%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол + витамин Е (в пробе 100 мкМ)	$-0,464 \pm 0,029$	108%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) KBBA в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов ($n = 8$). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии			

Несмотря на то, что витамины С, А и Е являются антиоксидантами, выявлены различия в их действии на электрокаталитическое восстановление СУР 3А4. Витамин С в разных концентрациях оказывает разнонаправленное

влияние на каталитическую активность СУР 3А4: в низких концентрациях он является индуктором работы СУР 3А4, а в высоких – его ингибитором. Согласно нашим экспериментальным данным, витамин Е является как субстратом СУР 3А4, так и его индуктором, в связи с чем не может быть использован для восстановления его активности в случае ингибирования лекарственными средствами. Витамин А не является субстратом СУР 3А4 и оказывает стимулирующее воздействие на его электрокаталитическую активность.

Были проведены исследования каталитической активности СУР 3А4 в присутствии витамина С как антиоксиданта (Рис. 4). Доказаны антиоксидантные свойства витамина А и проявление субстратных свойств витамином Е. В присутствии витамина С (в концентрации 0,28–1,12 мМ) возрастает катодный восстановительный ток СУР 3А4, но витамин А в концентрации 100 мкМ не вызывает дополнительного роста восстановительного тока.

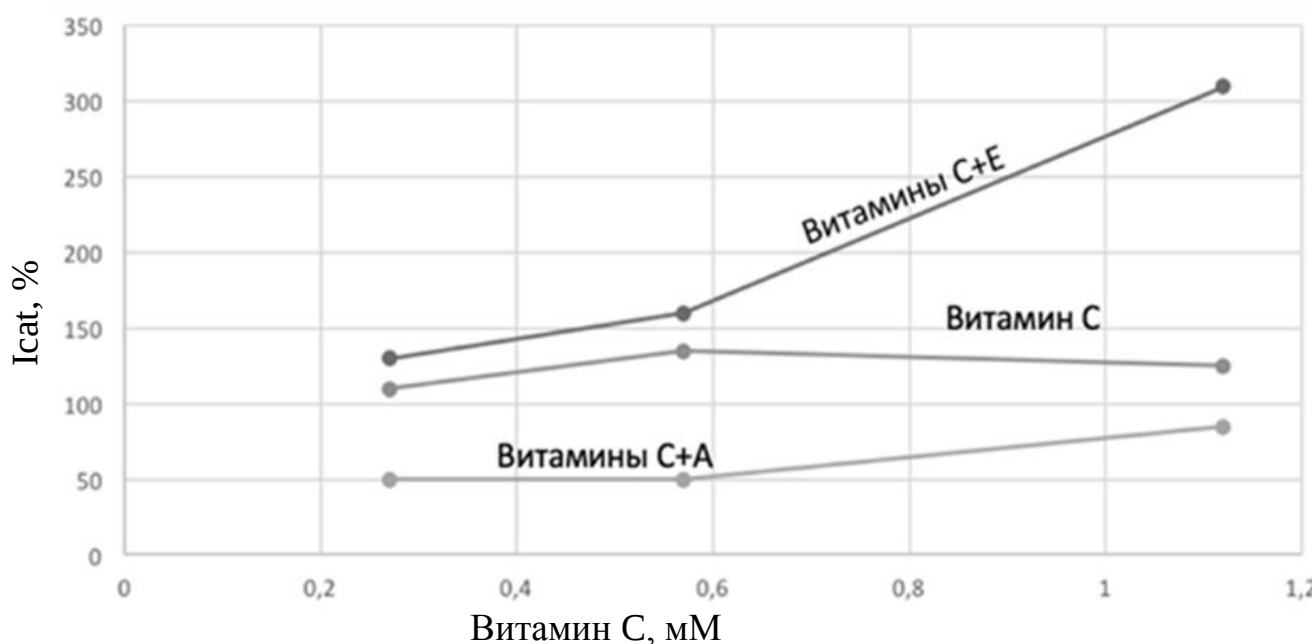


Рисунок 4. Влияние витаминов А (100 мкМ) и Е (100 мкМ) на катодный восстановительный ток СУР 3А4 в присутствии витамина С

В присутствии витамина С и витамина Е наблюдается дополнительный рост каталитического тока, что характерно для электрохимического поведения субстратов цитохромов Р450. Таким образом, нами выработан и внедрен алгоритм, позволяющий на основе анализа электрохимических параметров

дифференцировать фармакологически активные вещества по механизму действия на антиоксиданты и типичные субстраты СYP 3A4.

В данном экспериментальном исследовании продемонстрировано, что витамины С, А и Е, обладающие антиоксидантными свойствами, влияют на каталитическую активность СYP 3A4. Поскольку восстановление гема цитохрома P450 является основной стадией в катализе и сопровождается генерированием АФК [Шумянцева В. В. и др., 2013], вещества, проявляющие антиоксидантные свойства, могут влиять на каталитические функции этого гемопротеина.

Витаминоподобные вещества как индукторы каталитической активности СYP 3A4 в электрохимическом эксперименте

Изучение влияния препарата Кудесан на активность СYP 3A4

В серии экспериментов показано, что препарат Кудесан влияет на электрохимическую активность СYP 3A4 и стимулирует катодный ток, соответствуя восстановлению гема (Рис. 5). Увеличение катодного тока составляло $139 \pm 11\%$ в присутствии 2 мкл препарата Кудесан, что соответствует 20 мкМ (0,009 мг/мл) витамина Е и 70 мкМ (0,06 мг/мл) коэнзима Q₁₀. Стимулирование восстановительного тока цитохрома P450 может быть обусловлено синергическим либо суммирующим действием этих двух веществ с антиоксидантными свойствами.

Таким образом, по результатам электрохимического анализа можно сделать вывод о стимулирующем влиянии препарата Кудесан на изофермент СYP 3A4, при этом повышение каталитической активности СYP 3A4 под действием этого препарата может повлиять на скорость метаболизма других препаратов при назначении в составе комплексной терапии. Механизм действия препарата Кудесан, по-видимому, связан с антиоксидантными свойствами его компонентов, коэнзима Q₁₀ и витамина Е. Стимулирующий эффект препарата Кудесан в присутствии итраконазола не проявляется, что, возможно, обусловлено блокированием генерации АФК азольным ингибитором итраконазолом. Его ингибирующий эффект связан с образованием комплекса с железом гема, препятствующим активации кислорода.

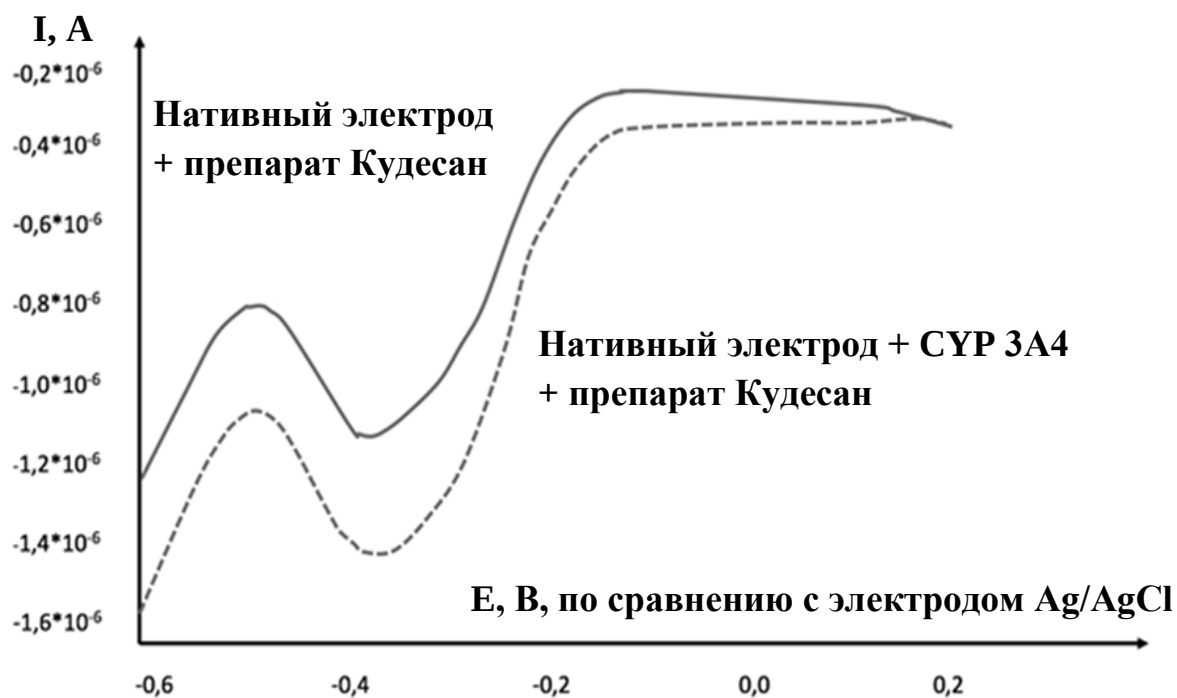


Рисунок 5. КВВА электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (сплошная линия); DDAB/Au/P450 3A4 + коэнзим Q₁₀ 5 мкл (пунктирная линия)

Изучение влияния таурина на активность СYP 3A4

Результаты экспериментального изучения влияния итраконазола на электрохимическую активность СYP 3A4 показали, что при добавлении итраконазола к электроду DDAB/Au/P450 3A4 не наблюдается увеличения катодного каталитического тока. Так, среднее значение тока DDAB/Au/P450 составило $-0,95 \pm 0,03$ мкА (100%), а при добавлении итраконазола к DDAB/Au/P450 3A4 электроду — $0,833 \pm 0,167$ мкА (91,2%). Полученные результаты можно объяснить проявлением не только субстратных, но и ингибирующих свойств итраконазола по отношению к СYP 3A4.

При добавлении таурина (конечная концентрация 50 мкМ) к электроду DDAB/Au/P450 3A4 наблюдается увеличение катодного тока, что обычно характерно для субстратов цитохрома P450. Антиоксидантные свойства таурина проявляются в нейтрализации этих АФК, что приводит к стабилизации фермента и увеличению восстановительного катодного тока. Ингибирующее действие итраконазола (в концентрации 10 мкМ) в присутствии 50 мкМ таурина существенно снижается.

В экспериментах с применением итраконазола с последующим внесением таурина итраконазол ингибировал CYP 3A4, что проявлялось в отсутствии увеличения каталитического тока (102%). Добавление таурина к электроду DDAB/Au/P450 3A4 в присутствии итраконазола дает прирост регистрируемого катодного тока (на 131,7%). Таким образом, мы продемонстрировали, что таурин нивелирует ингибирующее действие итраконазола на цитохром P450. Полученные данные представлены в Табл. 5.

Таблица 5

Влияние таурина на ингибирующие свойства итраконазола по отношению к CYP 3A4, регистрируемые с помощью анализа электрохимических параметров

№	Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
1	DDAB/Au + P450 3A4	-0,95±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин	-1,1±0,04	116%
	DDAB/Au + P450 3A4 + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-0,833±0,167	91,2%
2	DDAB/Au + P450 3A4	-0,86±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин	-0,93±0,03	108%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-1,07±0,04	124%
3	DDAB/Au + P450 3A4	-1,09±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин	-1,23±0,04	113%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-1,52±0,04	139%
4	DDAB/Au + P450 3A4	-1,5±0,04	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин + итраконазол (в пробе 10 мкМ)	-1,47±0,04	113%
	DDAB/Au + P450 3A4 + таурин + итраконазол + диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-1,48±0,04	114%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) KBBA в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов (n = 8). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии			

При оценке N-деметиلاзной электрокаталитической активности CYP 3A4 в отношении эритромицина показано, что в присутствии 50 мкМ таурина в электрохимической системе наблюдается увеличение электрокаталитической

константы на 16% по сравнению с системой, в которой таурин отсутствовал. Данные представлены в Табл. 6.

Таблица 6

Кинетические параметры электрокаталитической N-деметиلاзной активности СYP 3A4 в отношении эритромицина

Фермент + субстрат	Антиоксидант	Продукт электрокаталитической реакции (формальдегид, мкМ)	k_{cat} , мин ⁻¹
СYP3A4+ эритромицин	-	1,15± 0,2	3,1±0,3 (100%)
СYP3A4+ эритромицин	Таурин (50 мкМ)	1,32± 0,2	3,6±0,4 (116%)
В таблице приведены средние результаты трех серий опытов k_{cat} — электрокаталитическая константа			

Таурин как антиоксидант снижает накопление АФК в процессе электрокатализа, предотвращая тем самым инактивацию фермента, о чем свидетельствует увеличение скорости N-деметилазной реакции эритромицина, катализируемой СYP 3A4. Защитная роль таурина в отношении СYP 3A4 была также показана на основании способности СYP 3A4 сохранять N-деметилазную электрокаталитическую активность после электролиза при контролируемом напряжении ($E = -500$ мВ). В процессе электролиза неизбежно происходит накопление АФК, инактивирующих фермент. Показано, что после электролиза в присутствии в системе 50 мкМ таурина и эритромицина восстановительный каталитический ток СYP 3A4 составлял $71 \pm 8\%$, в то время как в отсутствие таурина — лишь $52 \pm 5\%$ (за 100% был принят каталитический ток СYP 3A4 в присутствии эритромицина до электролиза при контролируемом напряжении).

Таким образом, используя электрохимическое восстановление СYP 3A4 в качестве инструмента для исследования электрокаталитической активности гемопотеина и оценки влияния различных биологически активных веществ на активность системы цитохрома P450, можно сделать вывод о том, что таурин приводит к электрокаталитическому восстановлению СYP 3A4. При этом таурин снижает ингибирующий эффект итраконазола.

Изучение влияния L-карнитина на активность СУР 3А4

L-карнитин является витаминоподобным веществом, которое активно используется в качестве биологически активной добавки для коррекции различных состояний. В диапазоне концентраций 186–372 мкМ L-карнитин не оказывал влияния на катодный ток, соответствующий процессу $\text{Fe}^{3+} + 1\text{e} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$. Необходимо отметить, что в присутствии L-карнитина (186 мкМ) диклофенак также проявляет субстратные свойства: регистрируется каталитический ток, сравнимый с экспериментами без L-карнитина: $125 \pm 10\%$ (Табл. 7).

Таблица 7

Влияние препарата Элькар (левокарнитин) на электрохимические параметры СУР 3А4

№	Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
1	DDAB/Au + P450 3A4	-0,21±0,01	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,23±0,01	109%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 372 мкМ)	-0,19±0,01	90%
2	DDAB/Au + P450 3A4	-0,44±0,02	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,43±0,02	98%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 372 мкМ)	-0,35±0,02	79%
3	DDAB/Au + P450 3A4	-0,39±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,34±0,03	87%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 372 мкМ)	-0,39±0,02	100%
4	DDAB/Au + P450 3A4	-0,24±0,01	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,25±0,01	104%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин+ диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,30±0,02	125%
5	DDAB/Au + P450 3A4	-0,61±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,64±0,03	105%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин+ диклофенак (в пробе 100 мкМ)	-0,68±0,04	112%
6	DDAB/Au + P450 3A4	-0,65±0,03	100%
	DDAB/Au + P450 3A4 + L-карнитин (в пробе 186 мкМ)	-0,60±0,06	92%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) KBBA в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов (n = 8). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии			

Таким образом, исследование лекарственной интерференции при одновременном взаимодействии субстрата СУР 3А4 диклофенака и такого лекарственного препарата, как L-карнитин, показало, что этот препарат не влияет

на каталитический ток, регистрируемый при взаимодействии диклофенака с ферментом. Это снижает вероятность возникновения межлекарственного взаимодействия на уровне метаболизма лекарственных препаратов при использовании L-карнитина в составе комплексной фармакотерапии. Данную информацию необходимо учитывать врачам различного профиля при выборе оптимального препарата с антиоксидантными и антигипоксантами свойствами при назначении его в комплексной терапии пациентов с коморбидной патологией.

Изучение влияния липоевой кислоты на активность CYP 3A4

Липоевая кислота — витаминоподобное вещество, которое широко применяется в неврологической и эндокринологической практике. В диапазоне концентраций 50–200 мкМ липоевая кислота не оказывала влияния на катодный ток (Табл. 8). Это снижает вероятность возникновения межлекарственного взаимодействия на уровне метаболизма препаратов при применении липоевой кислоты в комбинации с другими лекарственными средствами.

По результатам данного этапа исследования мы отобрали два широко назначаемых в клинической практике витаминоподобных вещества, таурин и L-карнитин, с целью экстраполяции электрохимических данных в клиническую практику. При этом в электрохимическом эксперименте было установлено, что таурин является потенциальным индуктором CYP 3A4, а L-карнитин — потенциально электрохимически нейтральным веществом.

Таблица 8

Влияние липоевой кислоты на электрохимические параметры CYP 3A4

Система	Значение тока (мкА)	Значение тока (%)
DDAB/Au + P450 3A4	(-0,7396±0,145)	100%
DDAB/Au + P450 3A4 + липоевая кислота (в пробе 50 мкМ)	-0,56±0,11	90%
DDAB/Au + P450 3A4 + липоевая кислота (в пробе 100 мкМ)	-0,53±0,12	101%
DDAB/Au + P450 3A4 + липоевая кислота (в пробе 150 мкМ)	-0,52±0,11	99%
DDAB/Au + P450 3A4 + липоевая кислота (в пробе 200 мкМ)	-0,53±0,18	102%
Приведены средние значения максимального восстановительного тока (высота пика) KBBA в аэробных условиях, рассчитанные в серии экспериментов (n=8). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии		

Результаты и обсуждение клинической части исследования

Влияние приема субстрата на активность СYP 3A4 по результатам неинвазивного метода по Roberts

Изучено влияние диклофенака, маркерного субстрата электрохимических экспериментов, на активность СYP 3A4 у пациентов с посттравматическим болевым синдромом для построения модели валидности переноса данных электрохимических исследований в клинические условия (Табл. 9, Рис. 6.).

Таблица 9

Динамика соотношения 6β-гидроксикортизол/кортизол в моче у добровольцев на фоне приема диклофенака, таурина и L-карнитина

Лекарственное средство-субстрат СYP 3A4 диклофенак													
Длительность терапии													
	исхо дно	3 дня			7 дней			10 дней			14 дней		
			Δ%	p		Δ%	p		Δ%	p		Δ%	p
M ± m	2,82±0,2	2,79±0,2	-2,1	>0,05	2,76±0,3	-2,2	>0,05	2,73±0,2	-3,1	>0,05	2,72±0,2	-3,1	>0,05
Min	2,60	2,58			2,51			2,51			2,51		
Медиана	2,84	2,76			2,78			2,75			2,70		
Max	2,93	2,98			2,99			2,97			2,93		
Лекарственное средство-индуктор СYP 3A4 таурин													
M ± m	2,71±0,2	3,02±0,2	11,4	>0,05	3,3±0,2	21,8	<0,05	3,35±0,2	23,6	<0,05	3,4±0,3	25,4	<0,05
Min	2,49	2,78			3,09			3,13			3,1		
Медиана	2,72	3,01			3,3			3,37			3,5		
Max	2,93	3,22			3,53			3,57			3,72		
Лекарственное средство, нейтральное по отношению к СYP 3A4, L-карнитин													
M ± m	2,65±0,2	2,7±0,3	1,8	>0,05	2,6±0,2	-1,8	>0,05	2,65±0,2	0	>0,05	2,7±0,3	1,8	>0,05
Min	2,39	2,29			2,38			2,45			2,4		
Медиана	2,67	2,73			2,61			2,63			2,71		
Max	2,85	3,02			2,81			2,84			2,99		
M ± m – среднее значение ± стандартное отклонение													
Min – минимальное значение, max – максимальное значение													

В среднем по группе спортсменов с посттравматическим болевым синдромом, получавших диклофенак в суточной дозе 100 мг, соотношение β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала терапии составило $2,82 \pm 0,2$. В утренней порции мочи, забранной через 10 дней лечения, значимых изменений соотношения β -гидрооксикортизол/кортизол не выявлено. Через 14 дней после начала терапии (4 дня без препарата) значение соотношения β -гидрооксикортизол/кортизол сохранилось на прежнем уровне. Таким образом, диклофенак — субстрат CYP 3A4 — при курсовом приеме в виде монотерапии практически не влияет на активность данного изофермента цитохрома (Рис. 6), что согласуется с полученными нами ранее экспериментальными данными.

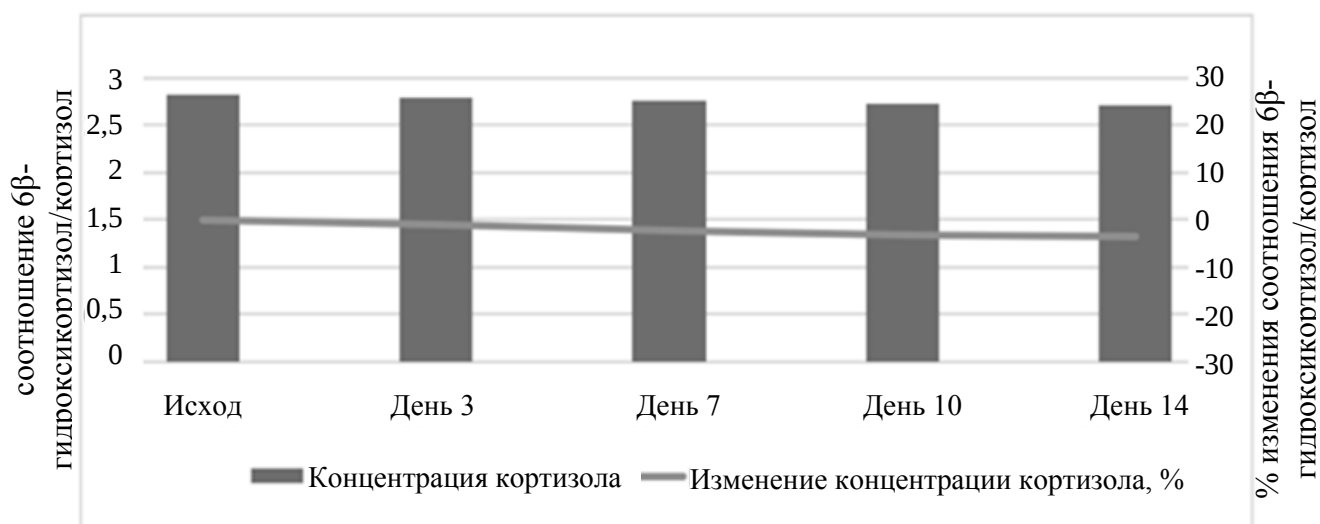


Рисунок 6. Влияние приема диклофенака на активность CYP 3A4

Изучено влияние витаминоподобных веществ таурина и L-карнитина, отобранных нами ранее в экспериментальной части исследования, на активность CYP 3A4 у добровольцев. Сопоставлены результаты электрохимических исследований с результатами, полученными при исследовании влияния веществ на систему CYP 3A4 *in vivo*. Это позволило определить возможность использования электрохимических методов в качестве валидной модели оценки таких взаимодействий в клинической практике.

Влияние приема индуктора (таурина) на активность CYP 3A4 по результатам неинвазивного метода по Roberts

В среднем по группе добровольцев соотношение 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала терапии таурином в дозе 500 мг 2 раза в сутки составило $2,71 \pm 0,2$ (Рис. 7). Через 3 дня приема препарата соотношение 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи составило $3,02 \pm 0,2$, что достоверно не отличалось от соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала лечения.

Через 7 дней приема препарата выявлено статистически значимое увеличение соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи до $3,3 \pm 0,2$ ($t=2,1$, $p<0,05$). Дальнейший анализ уровня соотношения 6 β -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи на 10й и 14й день применения таурина не продемонстрировал каких-либо значимых изменений (значения составили $3,35 \pm 0,2$ и $3,4 \pm 0,3$ соответственно). Полученные результаты согласуются с нашими собственными экспериментальными данными о наличии у таурина индуцирующего действия в отношении активности CYP 3A4.

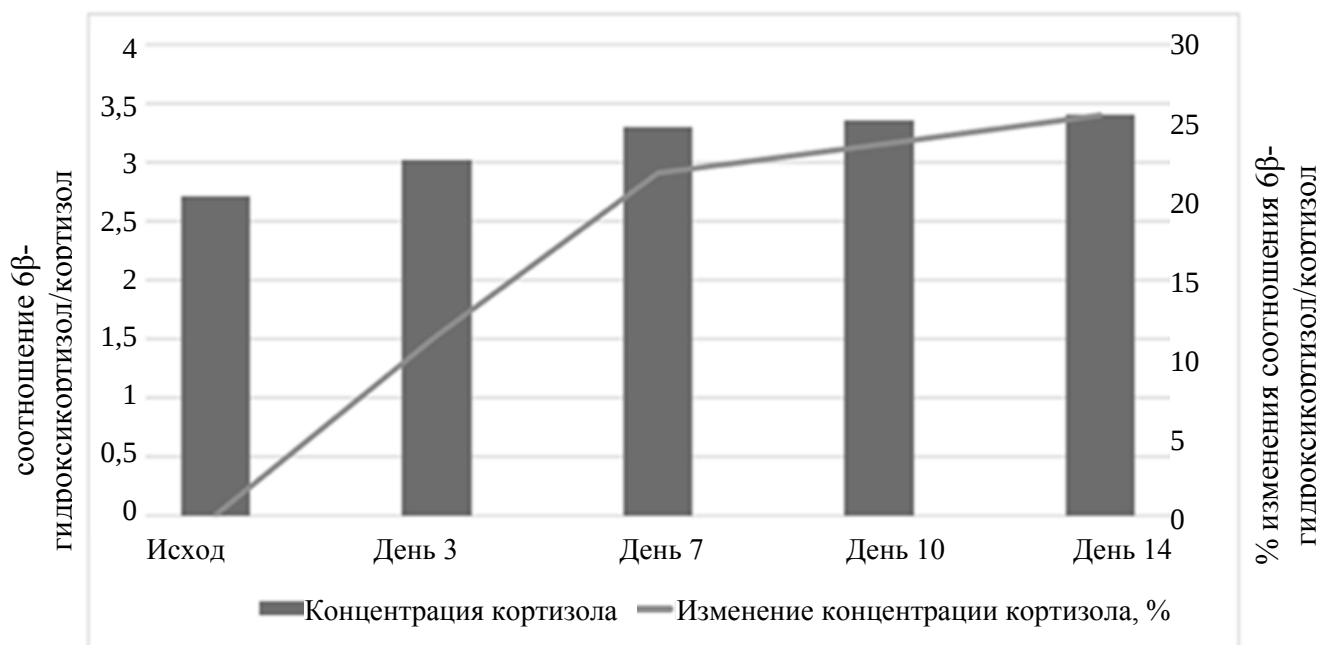


Рисунок 7. Влияние приема таурина на активность CYP 3A4

*Влияние приема L-карнитина на активность CYP 3A4 по результатам
неинвазивного метода по Roberts*

В среднем по группе добровольцев соотношение 6β -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала применения L-карнитина составило $2,65 \pm 0,2$ (Рис. 8). Через 3 дня приема L-карнитина 2,5 мл 3 раза в сутки соотношение 6β -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи составило $2,7 \pm 0,3$, что практически не отличалось от значений соотношения до начала терапии. Через 7 дней приема L-карнитина также не выявлено значимых изменений соотношения 6β -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи, которое было равно $2,6 \pm 0,2$. Дальнейший анализ соотношения 6β -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи на 10й и 14й день применения L-карнитина не продемонстрировал каких-либо значимых изменений (значения соотношения 6β -гидрокортизол/кортизол составили $2,65 \pm 0,2$ и $2,7 \pm 0,3$ соответственно).

Результаты оценки соотношения 6β -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи у добровольцев на фоне приема L-карнитина в течение 14 дней не показали каких-либо значимых однонаправленных изменений. Результаты, полученные при исследовании у добровольцев, согласуются с полученными нами ранее экспериментальными данными и подтверждают отсутствие влияния L-карнитина на активность изофермента CYP 3A4. Полученные результаты позволяют прогнозировать отсутствие межлекарственного взаимодействия на уровне CYP 3A4 при применении L-карнитина в составе комбинированной терапии одновременно с другими лекарственными средствами, метаболизирующимися этим изоферментом цитохрома.

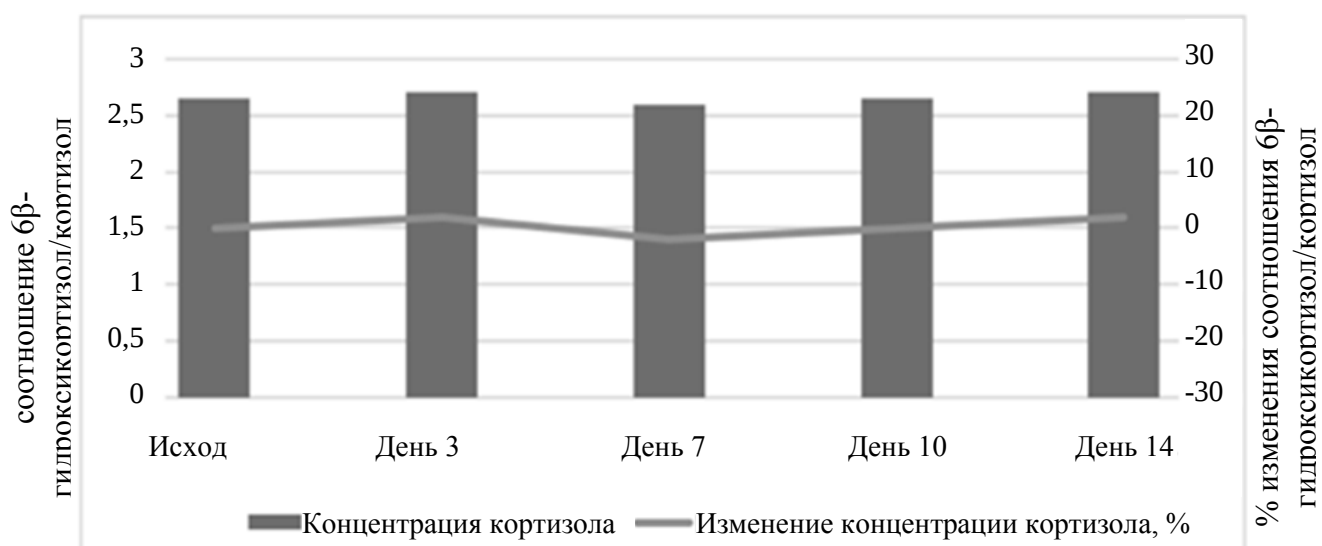


Рисунок 8. Влияние приёма L-карнитина на активность CYP 3A4

Влияние приема ингибитора (итраконазол) на активность CYP 3A4 по результатам неинвазивного метода по Roberts

В среднем по группе больных, получавших лечение итраконазолом, соотношение 6β-гидрокси-кортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала терапии составило $2,68 \pm 0,2$ (Табл. 10). После проведения первого тура терапии итраконазолом отмечено статистически значимое снижение его значения до $2,23 \pm 0,1$ ($t=2,04$; $p<0,05$). В дальнейшем при проведении туров терапии также отмечается снижение коэффициента, которое не является статистически значимым для средних по группе значений при сравнении последующего значения с предыдущим. В то же время, при проведении парного сравнения непараметрическим тестом Вилкоксона установлено достоверное снижение соотношения 6β-гидрокси-кортизол/кортизол от тура к туру на протяжении всего периода наблюдения до $1,98 \pm 0,2$ ($t=2,04$; $p<0,05$).

В среднем по группе пациентов за время наблюдения при применении итраконазола наблюдалось уменьшение соотношения в 1,35 раза (Рис. 9). Полученные результаты подтверждают данные литературы о наличии ингибирующего влияния итраконазола на активность CYP 3A4 и согласуются с собственными данными, полученными экспериментально при проведении электрохимических исследований.

**Динамика соотношения 6β-гидрооксикортизол/кортизол в моче у пациентов
на фоне приема итраконазола и при сочетании итраконазола с таурином**

Лекарственное средство–ингибитор CYP 3A4 итраконазол													
	Длительность терапии (туры)												
	исходно	1		р	2		р	3		р	4		р
			Δ%			Δ%			Δ%			Δ%	
М ± m	2,68±0,2	2,23±0,1	-16,8	<0,05	2,12±0,2	-20,9	<0,05	2,04±0,3	-23,88	<0,05	1,98±0,2	-26,11	<0,05
Min	2,43	2,12			1,97			1,7			1,76		
Медиана	2,67	2,25			2,10			2,04			2,01		
Max	2,88	2,35			2,33			2,34			2,19		
Лекарственное средство–ингибитор CYP 3A4 итраконазол + индуктор таурин													
М ± m	2,59±0,1	2,54±0,2	-1,9	0,05	2,65±0,2	2,3	>0,05	2,67±0,2	3,08	>0,05	2,65±0,3	2,3	>0,05
Min	2,48	2,33			2,43			2,45			2,33		
Медиана	2,61	2,52			2,66			2,66			2,66		
Max	2,7	2,72			2,85			2,88			2,95		
М ± m – среднее значение ± стандартное отклонение													
Min – минимальное значение, max – максимальное значение													

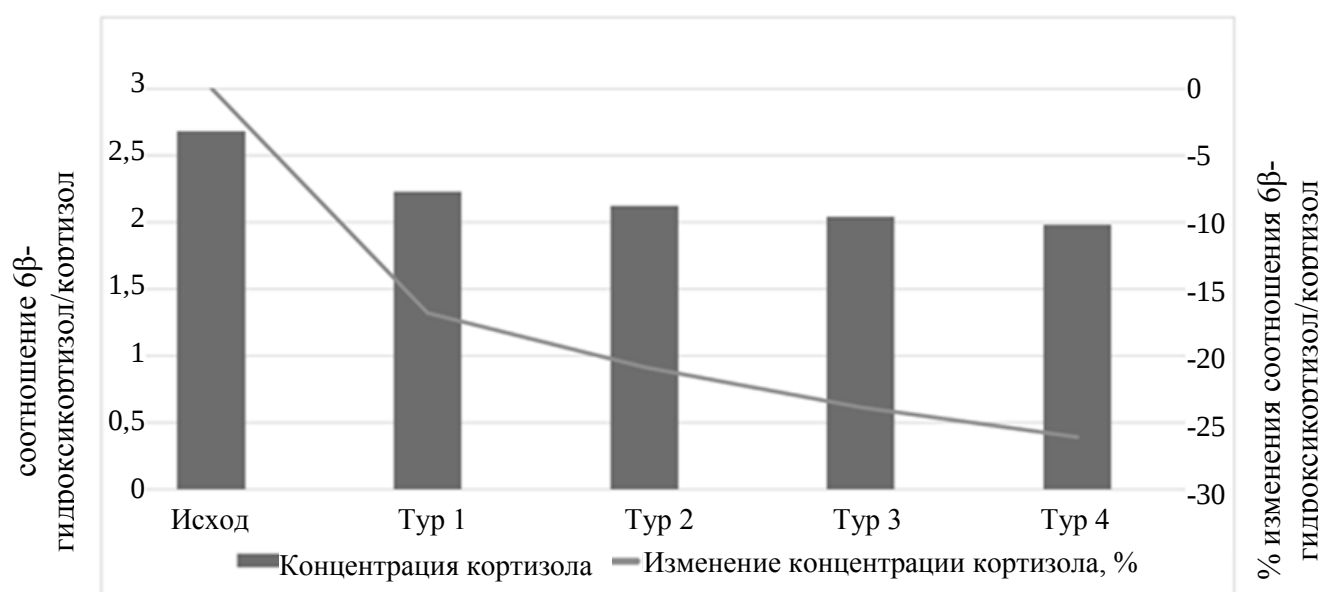


Рисунок 9. Влияние приема итраконазола на активность CYP 3A4

Перспективным направлением в повышении безопасности длительного применения азолов, которые являются одновременно и субстратами, и ингибиторами CYP 3A4, является их комбинация с индукторами CYP 3A4, механизм действия которых обусловлен, в том числе, и антиоксидантным эффектом. Увеличение продолжительности терапии итраконазолом и другими противогрибковыми препаратами, метаболизирующимися через CYP 3A4, позволит повысить её эффективность.

Влияние приема индуктора таурина одновременно с итраконазолом на активность CYP 3A4 по результатам неинвазивного метода по Roberts

В среднем по группе пациентов с опнохоникозом, которым одновременно с итраконазолом был назначен таурин в дозе 500 мг 2 раза в сутки, соотношение 6β-гидрохоникортнзол/ кортизол в утренней порции мочи до начала терапии составило $2,59 \pm 0,12$ (Табл. 10). После проведения первого тура терапии не выявлено значимого изменения соотношения 6β-гидрохоникортнзол/ кортизол в утренней порции мочи ($2,54 \pm 0,2$). Также не выявлено значимого изменения соотношения 6β-гидрохоникортнзол/кортизол в утренней порции мочи и после второго ($2,65 \pm 0,2$), третьего ($2,67 \pm 0,22$) и четвертого ($2,65 \pm 0,3$) туров проведенной терапии (Рис. 10).

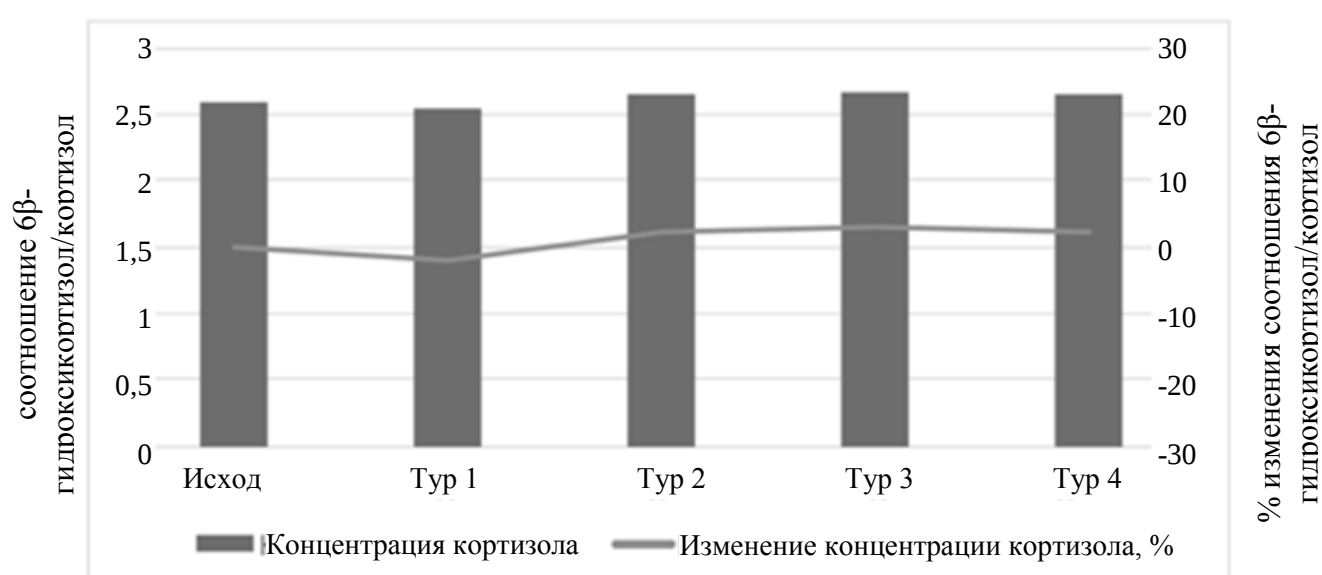


Рисунок 10. Влияние приема таурина совместно с итраконазолом на активность CYP 3A4

Полученные результаты согласуются с нашими собственными экспериментальными данными о способности таурина нивелировать ингибирующее действие итраконазола на активность СYP 3A4.

На Рис. 11 представлен итоговый график по влиянию исследуемых нами веществ на активность СYP 3A4 на основе изменения соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол в моче при приеме итраконазола, таурина, а также при одновременном приеме таурина совместно с итраконазолом.

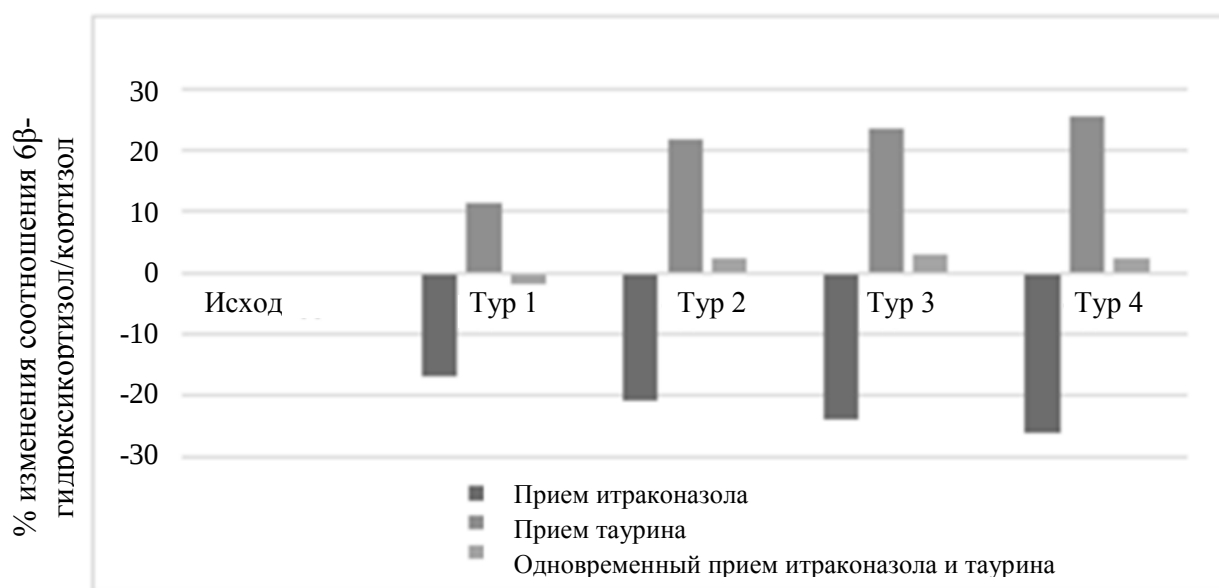


Рисунок 11. Динамика изменения соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол (в дельта %) при приеме итраконазола, таурина, а также при одновременном приеме таурина и итраконазола

Таким образом, итраконазол при назначении в виде туров противогрибковой терапии ингибировал активность изофермента СYP 3A4 и статистически значимо снижал соотношение 6 β -гидрокортизол/кортизол от тура к туру на протяжении всего периода наблюдения. Таурин при применении в дозе 500 мг/сут 2 раза в сутки в течение каждого тура терапии достоверно увеличивал величину соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол, подтверждая тем самым свою индуцирующую способность. При комбинированном применении ингибитора СYP 3A4 итраконазола с индуктором СYP 3A4 таурином величина соотношения 6 β -гидрокортизол/кортизол — а, следовательно, и активность СYP 3A4 — на протяжении четырех туров противогрибковой терапии

не менялась. Последнее объясняется тем, что итраконазол, являясь одновременно и субстратом, и ингибитором CYP 3A4, ингибирует собственный метаболизм. Следовательно, одновременное назначение индуктора CYP 3A4 представляет собой современный путь повышения безопасности терапии итраконазолом, а также позволяет увеличить продолжительность лечения и тем самым повысить его эффективность у пациентов с тяжелыми формами микозов.

Классификация витаминов и витаминоподобных веществ в зависимости от их влияния на электрокаталитическую активность CYP 3A4

Результаты проведенных экспериментальных исследований продемонстрировали способность витаминов и витаминоподобных веществ выступать в качестве средств регуляции скорости биотрансформации и выраженности фармакологического эффекта лекарственных веществ путем изменения активности системы цитохромов P450, в частности изоформы 3A4. На Рис. 12 представлена классификация витаминов и витаминоподобных веществ в зависимости от их влияния на электрокаталитическую активность CYP 3A4.

Таурин, коэнзим Q₁₀, витамин С в низких концентрациях, витамин А, витамин Е могут быть использованы в качестве средств коррекции приобретенной (вследствие назначения ингибитора, например итраконазола) или врожденной недостаточности цитохрома P450. Витамины группы В (тиамин, рибофлавин и пиридоксин), витамин С в высоких концентрациях являются ингибиторами каталитической активности цитохрома P450 3A4. К нейтральным веществам, не влияющим на каталитическую активность CYP 3A4, относится L-карнитин и липоевая кислота (см. Рис. 12).

Проведенное экспериментальное электрохимическое изучение *in electrode* и изучение в клинике *in vivo* влияния витаминов и витаминоподобных веществ на активность изофермента CYP 3A4 имеет практическое значение при проведении комбинированной фармакотерапии. Применение направленной регуляции каталитического цикла цитохрома P450 может приводить как к снижению скорости метаболизма лекарственных препаратов, так и к активации

ферментативного гидроксилирования субстратов, что может быть использовано для повышения и эффективности фармакотерапии, и её безопасности.

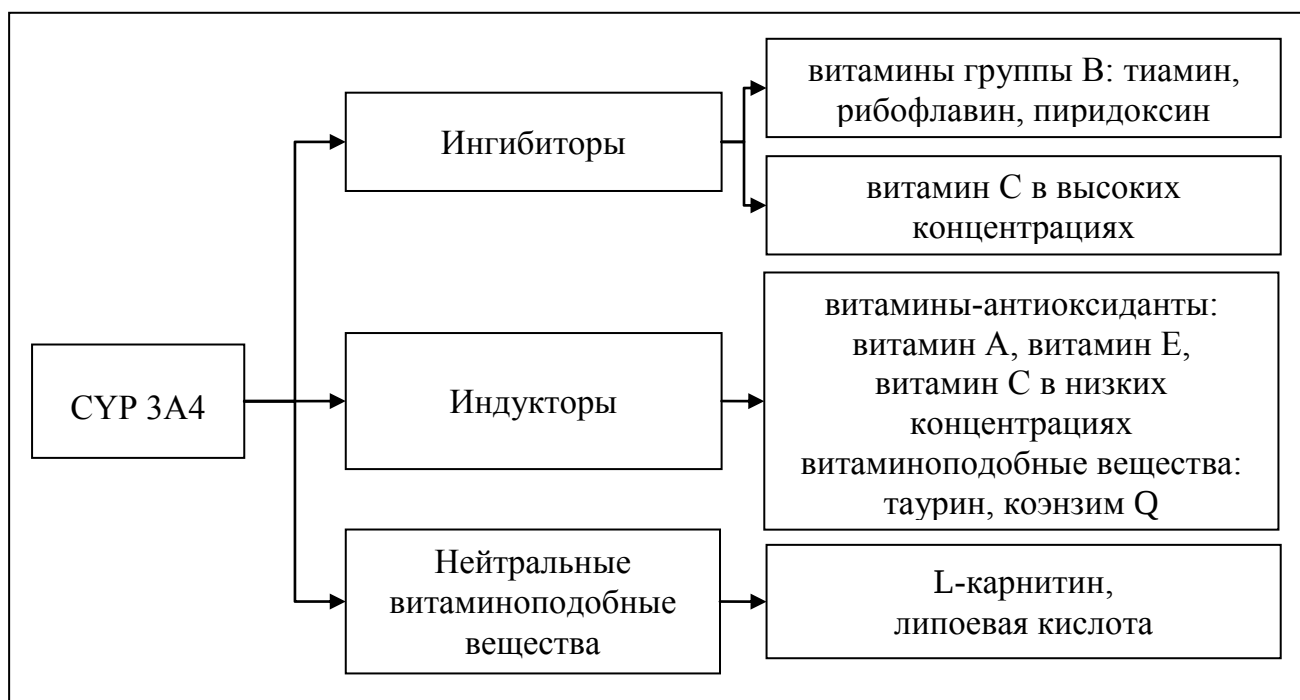


Рисунок 12. Классификация изученных в электрохимическом эксперименте витаминов и витаминоподобных веществ с точки зрения влияния на электрокаталитическую активность CYP 3A4

Выводы

1. Ингибирующее действие на электрокаталитическое восстановление CYP 3A4 в электрохимическом эксперименте оказывают тиамин, рибофлавин, пиридоксин и витамин С в высоких концентрациях (2,8 мМ в пробе).
2. Индуцирующее действие на электрокаталитическое восстановление CYP 3A4 в электрохимическом эксперименте оказывают витамин А, витамин Е, витамин С в низких концентрациях (0,28 мМ в пробе), таурин, коэнзим Q.
3. L-карнитин в электрохимическом эксперименте не оказывает достоверного влияния на электрокаталитическую активность CYP 3A4.
4. Тиамин, рибофлавин, пиридоксин, витамины А и Е, витамин С, коэнзим Q, таурин не являются субстратами CYP 3A4. В электрохимическом эксперименте подтверждена субстратная принадлежность витамина Е по отношению к CYP 3A4.

5. В электрохимическом эксперименте тиамин и рибофлавин в концентрации 0,3–1,7 мМ полностью ингибируют каталитические свойства СУР 3А4. Пиридоксин в той же концентрации частично ингибирует каталитические свойства СУР 3А4.

6. Витамин А и витамин Е в диапазоне концентраций 10–100 мкМ проявляют концентрационно-зависимое положительное влияние на электрокаталитическое восстановление СУР 3А4.

7. Витамин Е в концентрации 1 мМ более эффективно, чем витамин А, стимулирует электрокаталитическое восстановление СУР 3А4.

8. В электрохимическом эксперименте одновременное добавление к итраконазолу таурина или аскорбиновой кислоты (в концентрации 0,28 мМ в пробе) снижает ингибирование итраконазолом электрокаталитического восстановления СУР 3А4.

9. В электрохимическом эксперименте одновременное добавление на электрод к эритромицину препарата Кудесан (коэнзим Q₁₀ и витамин Е) или витамина С (в концентрации 0,28 мМ в пробе) снижает ингибирование эритромицином электрокаталитического восстановления СУР 3А4.

10. По данным неинвазивной методики по определению активности СУР 3А4, таурин снижает ингибирующий эффект итраконазола на СУР 3А4.

Практические рекомендации

1. Тиамин, рибофлавин, пиридоксин, витамины-антиоксиданты (витамин А, витамин С), а также витаминоподобные вещества таурин и коэнзим Q, могут быть использованы с целью фармакологической регуляции активности СУР 3А4.

2. Витамин Е не может быть использован в составе комбинированной терапии с целью модуляции активности СУР 3А4, так как является его субстратом.

3. В связи с наличием ингибирующего действия у витаминов группы В (В₁, В₂, В₆) и аскорбиновой кислоты в больших дозах при их назначении в составе комплексной терапии возможно изменение фармакологического действия

лекарственных средств, метаболизирующихся цитохромом P450, что повышает риск их относительной передозировки.

4. В связи с наличием индуцирующего действия коэнзима Q, витамина E, витамина A, таурина и низких доз витамина C при назначении в составе комплексной терапии, возможно изменение фармакологического действия лекарственных средств, метаболизирующихся цитохромом P450, что может привести к снижению их фармакологического эффекта.

5. При назначении витамина E в составе комплексной терапии следует учитывать, что он может вступить в конкурентное взаимодействие с другими лекарственными средствами, являющимися субстратами CYP 3A4, что может привести к изменению фармакологического эффекта.

6. С точки зрения межлекарственных взаимодействий более безопасны препараты, не влияющие на активность CYP 3A4, такие как L-карнитин и липоевая кислота.

7. Одновременное применение итраконазола с таурином может снизить ингибирование CYP 3A4 итраконазолом, что может повысить эффективность и безопасность лечения итраконазолом и другими противогрибковыми препаратами, метаболизирующимися CYP 3A4.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **А. А. Махова**, В. В. Шумянцева, Е. В. Ших, Т. В. Булко, В. Г. Кукес, О. С. Сизова, Г. В. Раменская, А. И. Арчаков. Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома Р450 3А4: электроанализ каталитических свойств // **Биомедицина**. – 2010. – Т. 1. – №3. – С. 99–100.
2. **А. А. Махова**. Изучение фармакокинетических особенностей взаимодействия диклофенака и нагрузочных доз витаминов группы В // **Биомедицина**. – 2010. – Т. 1. – №3. – С. 97–98.
3. **A. A. Makhova**, E. V. Shich, V. G. Kukes, O. S. Sizova, G. V. Ramenskaya, V. V. Shumyantseva, T. V. Bulko, A. I. Archakov, S. A. Usanov. Electroanalysis of cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: the influence of vitamin B group on diclofenac metabolism // **BioNanoScience**. – 2011. – Vol. 1. – N 1–2. – P. 46–52.
4. В. В. Шумянцева, Е. В. Ших, **А. А. Махова**, Т. В. Булко, В. Г. Кукес, О. С. Сизова, Г. В. Раменская, С. А. Усанов, А. И. Арчаков. Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома Р450 3А4: фармакокинетические исследования и электроанализ каталитических свойств // **Биомедицинская химия**. – 2011. – Т. 57. – №3. – С. 343–354.
5. **А. А. Махова**. Возможность регулирования активности цитохрома Р450 3А4 витаминами-антиоксидантами // Тюменский медицинский журнал. – 2012. – №2. – С. 62.
6. М. В. Журавлева, **А. А. Махова**. Нейротропная фармакотерапия у пациентов с дорсопатией // Фарматека. – 2012. – №6. – С. 28–33.
7. М. В. Журавлева, Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Связь анальгетического и нейротропного эффектов на примере мильгаммы // Терапевтический архив. – 2012. – Т. 84. – №12. – С. 131–134.
8. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Экспериментальное обоснование возможности регуляции активности Р450 3А4 таурином с целью оптимизации фармакотерапии антибиотиками-макролидами // **Биомедицина**. – 2013. – Т. 1. – №4. – С. 169–173.

9. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Преимущества проведения коррекции фолатного статуса с использованием витаминно-минерального комплекса, содержащего метафолин // Трудный пациент. – 2013. – Т. 11. – №8–9. – С. 26–31.
10. М. В. Журавлева, **А. А. Махова**, Е. В. Ших. Место мильгаммы в комплексной терапии болевого синдрома в спине // Фарматека. – 2013. – №19 (272). – С. 66–69.
11. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Возможности регуляции когнитивной функции у детей применением витаминно-минеральных комплексов // РМЖ. – 2013. – Т. 21. – №24. – С. 1188–1192. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/pediatric/Vozmoghnosti_regulyacii_kognitivnoy_funkcii_u_detey_primeneniem_vitaminno-mineralnyh_kompleksov/
12. В. Шумянцева, Е. Ших, **А. Махова**, Т. Булко, Е. Супрун. Влияние кудесана на цитохром P450 3A4: исследование электрохимическими методами // **Врач**. – 2013. – №4. – С. 40–44.
13. **А. А. Махова**, В. В. Шумянцева, Е. В. Ших, Т. В. Булко, Е. В. Супрун, А. В. Кузиков, В. Г. Кукес, А. И. Арчаков. Регуляция активности ферментов метаболизма лекарственных препаратов — цитохромов P450 3A4 и 2C9 — биологически активными соединениями // **Молекулярная медицина**. – 2013. – №5. – С. 49–53.
14. **А. А. Махова**, М. Л. Максимов. Коррекция витаминного статуса у беременных // РМЖ. – 2014. – Т. 22. – №14. – С. 1014–1018. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/akusherstvo/korreksiya-vitaminno-go-statusa-u-beremennykh/
15. Е. В. Ших, О. С. Сизова, **А. А. Махова**. Возможности применения гепатопротекторов в комбинированной терапии онихомикозов // РМЖ. – 2014. – Т. 22. – №18. – С. 1371–1376. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/dermatologiya/Vozmoghnosti_primeneniya_gepatoprotektorov_v_kombinirovannoyterapii_onihomikozov/
16. В. В. Шумянцева, **А. А. Махова**, Т. В. Булко, Е. В. Ших, В. Г. Кукес, Усанов, С.А., А. И. Арчаков. Влияние антиоксидантов на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4 // **Биомедицинская химия**. – 2014. – Т. 60. – №2. – С. 224–234.

17. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Витамины в клинической практике [научно-практическое издание]; под ред. акад. РАМН В. Г. Кукеса. – М: Практическая медицина, 2014. – 368 с.

18. В. В. Шумянцева, Т. В. Булко, А. В. Кузиков, **А. А. Махова**, Е. В. Ших, В. Г. Кукес, А. И. Арчаков. Мониторинг каталитической активности гемопротеинов электрохимическими методами. В сборнике: Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни». Материалы конференции. – М., 2014. – С. 161–162.

19. V. V. Shumyantseva, **A. A. Makhova**, T. V. Bulko, A. V. Kuzikov, E. V. Shich, V. Kukes, A. I. Archakov. Electrocatalytic cycle of P450 cytochromes: the protective and stimulating roles of antioxidants // **RSC Advances**. – 2015. – Vol. 5. – P. 71306-71313.

20. Е. В. Ших, **А. А. Махова**, В. В. Шумянцева. Возможности использования таурина в качестве средства, предупреждающего лекарственное поражение печени // РМЖ. – 2015. – Т. 23. – №13. – С. 754–758. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/gastroenterologiya/Vozmoghnosti_ispolyzovaniya_taurina_v_kachestve_sredstva_predupreghdayuschego_lekarstvennoe_poraghenie_pecheni/

21. Н. Н. Еременко, Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Место витаминов группы В и липоевой кислоты в фармакотерапии полинейропатий // РМЖ. – 2015. – №12. – С. 674–679. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/nevrologiya/Mesto_vitaminov_gruppy_V_i_lipoevoy_kisloty_v_farmakoterapii_polineyropatyi/

22. Е. Ших, **А. Махова** Каротиноиды и заболевания молочной железы с позиций доказательной медицины // Врач. – 2015. – №12. – С. 2–6.

23. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Роль аскорбиновой кислоты и токоферола в профилактике и лечении заболеваний с точки зрения доказательной медицины // Терапевтический архив. – 2015. – Т. 87. – №4. – С. 98–102.

24. В. В. Шумянцева, **А. А. Махова**, Т. В. Булко, Р. Бернхардт, А. В. Кузиков, Е. В. Ших, В. Г. Кукес, А. И. Арчаков. Таурин как модулятор каталитической активности цитохрома P450 3A4 // **Биохимия**. – 2015. – Т. 80. – №3. – С. 439–448.

25. V. Shumyantseva, T. Bulko, E. Shich, **A. Makhova**, A. Kuzikov and A. Archakov. Cytochrome P450 Enzymes and Electrochemistry: Crosstalk with Electrodes as Redox Partners and Electron Sources // Monooxygenase, Peroxidase and

Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol. 851 / E. G. Hrycaj, S. M. Bandiera. – Cham: Springer International Publishing Switzerland, 2015. – Chap. 9. – P. 229–246.

26. А. В. Кузиков, Т. В. Булко, Р. А. Масамрех, **А. А. Махова**, А. И. Арчаков, С. А. Усанов, Е. В. Ших, В. В. Шумянцева. Анализ влияния мельдония на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 // **Вестник Российского государственного медицинского университета**. – 2016. – №6. – С. 10–15.

27. Е. В. Ших, **А. А. Махова**, В. В. Шумянцева, О. А. Демидова. Фармакологическая регуляция активности изоферментов цитохромов P450 3A4 и P450 2C9 витаминами и природными соединениями // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2016. – №4. – С. 42–47.

28. Е. В. Ших, О. С. Сизова, **А. А. Махова**. Возможности применения гепатопротекторов в комбинированной терапии онихомикозов // **РМЖ**. – 2016. – Т. 24. – №14. – С. 958–963. – Режим доступа: www.rmj.ru/articles/dermatologiya/Vozmoghnosti_primeneniya_gepatoprotektorov_v_kombinirovannoy_terapii_onihomikozov/

29. Е. В. Ших, **А. А. Махова**. Витаминно-минеральный комплекс при беременности. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 349 с.

30. Е. В. Ших, **А. А. Махова**, Д. В. Мандыч. Влияние лекарственных средств на мужскую фертильность. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 128 с.

Список сокращений

Ag/AgCl	хлорсеребряный электрод
CYP 3A4	изофермент цитохрома P450 3A4
DDAB	дидодецилдиметиламмония бромид
АФК	активные формы кислорода
KBBA	квадратно-волновая вольтамперограмма

ДЛЯ ЗАМЕТОК