

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Раменская Галина Владиславовна**

Официальные оппоненты:

Каленикова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Факультет фундаментальной медицины, кафедра фармацевтической химии, фармакогнозии и организации фармацевтического дела, заведующий кафедрой

Жердев Владимир Павлович – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно– исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации, заведующий лабораторией фармакокинетики

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерство науки и высшего образования Российской Федерации (ФГАОУ ВО РУДН), г. Москва

Защита диссертации состоится «__»_____2019 г. в _____ ч. на заседании Диссертационного Совета Д 208.040.09 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Zubovskiy bul., d. 37/1 и на сайте организации www.sechenov.ru.

Автореферат разослан «__»_____2019 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета Д **208.040.09**

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ 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 Р450 (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 CYP. В последнее время, в связи с появлением таких высокочувствительных и селективных методов, как высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным 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 CYP, 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 СYP 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-гидроксикортизол, 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 СYP (СYP1A2, СYP3A4, СYP2C9, СYP2D6) в практике фармакокинетических лабораторий.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

Разработаны условия пробоподготовки биообъектов для дальнейшего совместного определения активности СYP1A2, СYP3A4, СYP2C9, СYP2D6 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). Аprobация 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 изданиях, включенных в базу Scopus и Web of Science.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

1. Стандарты определяемых веществ

Стандартные образцы кофеина (Merck, C1778-1VL), параксантина (Santa Cruz Biotechnology, sc-212526), лозартана (Merck, 61188-100MG), E-3174 (Sigma-Aldrich кат. № 981273), кортизола (Merck, H4001-1G), 6- β -гидрокортизола (Merck, H6904-1MG), пинолина (Merck, 37858-100MG), 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина (Auroa Fine Chemicals, A06.795.158), карбамазепина (Merck, 94996-100MG).

2. Биологическая матрица

Биологическая матрица – бланковая моча и плазма крови человека, освобожденные от содержащихся эндогенных аналитов (кортизол, 6- β -гидрокортизол, пинолин, 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин).

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.

Предварительный процесс экстракции позволяет в дальнейшем проводить количественное определение эндогенных веществ в любых образцах мочи и плазмы крови без необходимости предварительного определения среднего эндогенного уровня в популяции.

3. Реактивы

Ацетонитрил, муравьиная кислота, аммония формиат, этилацетат, диэтиловый эфир, изопропиловый спирт, деионизированная вода, натрия тетраборат, борная кислота, натрия гидроксид, триэтиламин, ацетон.

4. Оборудование

Жидкостной хроматограф, оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, трехкврупольным масс-селективным детектором; колонка с неподвижной фазой C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм; центрифуга с охлаждением; встряхиватель типа вортекс; морозильник низкотемпературный для хранения замороженной биожидкости; весы аналитические; дозаторы пипеточные одноканальные переменного объема 100-1000 мкл.

5. Обработка результатов

Валидация методик была проведена по основным валидационным параметрам: селективность, линейность, эффект матрицы, степень извлечения, точность и прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Результаты исследования

1. Выбор внутреннего стандарта.

В качестве внутреннего стандарта был выбран карбамазепин. После изучения описанных в литературе «коктейльных» методов, в качестве внутренних стандартов были опробованы следующие вещества: метопролол, пропранолол, парацетамол и карбамазепин. Метопролол, пропранолол и парацетомол часто применяются в клинической практике для коррекции различных патологических состояний, что может привести к наличию этих веществ в изначальных образцах биожидкости. Методики с использованием карбамазепина в качестве внутреннего стандарта 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.

2. Пробоподготовка.

Пробоподготовка мочи

Пробоподготовка мочи проводилась методом жидкостной экстракции.

К образцу мочи, помещенному в стеклянную пробирку для экстракции, прибавляли стандартный раствор внутреннего стандарта, встряхивали смесь на вихреобразной мешалке, затем в пробирку прибавляли экстрагент составом этилацетат:гексан:диэтиловый эфир (50:35:15), после чего пробирку помещали в вихревую мешалку и экстрагировали. После процедуры экстракции органический слой отделяли и помещали в чистую пробирку для экстракции. К оставшейся водной фазе добавляли боратный буфер (pH=9,4) и смесь этилацетат:гексан (50:50), после чего проводили процедуру экстракции на вихревой мешалке. Органический слой отделяли и объединяли с органическим слоем, полученным после первого этапа экстракции. Объединенный органический слой упаривали в вакуумно-ротаторном испарителе, после чего сухой остаток перерастворяли в метаноле.

Пробоподготовка плазмы

Пробоподготовка плазмы крови проводилась методом твёрдофазной экстракции.

Картридж с носителем C18 активировали последовательным добавлением метанола, ацетона, воды и боратного буфера (pH=9,6). К образцу плазмы добавляли внутренний стандарт и концентрированную ортофосфорную кислоту. Полученную смесь осторожно перемешивали, выдерживали и вводили в картридж самотеком. Очистку проводили последовательным добавлением воды деионизированной, 0,1 М раствора гидроксида натрия, смеси ацетонитрил – вода (10:90), после чего высушивали под вакуумом. Элюировали 0,1% раствором триэтиламина в метаноле в стеклянные флаконы и упаривали досуха. Сухой остаток перерастворяли в смеси метанол:вода деионизированная (50:50).

Разработанные методики пробоподготовки биообразцов позволяют экстрагировать исследуемые вещества в одну пробу, что значительно ускоряет и упрощает процесс последующего количественного определения.

3. Условия хроматографирования и масс-спектрометрии

В качестве метода определения был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой. Детектирование проводилось методом tandemной масс-спектрометрии, являющимся наиболее чувствительным и

специфичным из существующих методов, что позволяет совместное определение большого количества аналитов за одну аналитическую серию.

Хроматографическое разделение проводилось на колонке с неподвижной фазой C18, 2,1*50 мм, 1,8 мкм. Для лучшего разделения веществ был разработан метод градиентного элюирования, что позволило разделить аналиты надлежущим образом. Подвижная фаза: раствор 5 мМ аммония формиата в 0,01% растворе муравьиной кислоты в воде и 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле. Метод получения заряженных частиц – ионизация распылением в электрическом поле (электроспрей, ESI), метод детектирования – MRM-переходы.

Значения m/z ионов и времена удерживания аналитов представлены в Таблице 1.

Таблица 1 – Параметры масс-спектрометрии

Аналит	Ион-прекурсор (m/z)	Дочерний ион (m/z)	Приблизительное время удерживания, мин
Кофеин	195,0	138,3	4,1
Параксантин	181,0	123,4	3,0
Лозартан	423,2	207,1	7,0
Е-3174	437,2	235,1	6,2
Кортизол	407,0	331,0	4,9
6-β-гидрокортизол	423,0	347,0	4,3
Пинолин	203,2	147,0	5,0
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин	189,0	117,0	1,1
Карбамазепин	237,1	194,0	7,2

Количественное определение проводилось методом внутреннего стандарта. После хроматографирования калибровочных образцов, по полученным данным строились калибровочные графики зависимости отношения площади пика аналита к площади пика ВС от концентрации аналита.

4. Валидация

Валидация разработанных методик проводилась в соответствии с нормативными документами по следующим параметрам: селективность, линейность, точность и прецизионность, эффект матрицы, степень извлечения, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность.

Селективность

Для определения параметров селективности отбирали 6 образцов бланковой биожидкости (плазма крови или моча), очищенных от эндогенных веществ (очистка проводилась в соответствии с разделом Материалы и методы 2. Биологическая матрица), к которым добавляли стандартные растворы определяемых аналитов. На хроматограммах образцов интактной биожидкости **отсутствовали пики**, характеристические для определяемых веществ, либо их площадь **не превышала 20%** от значения площади пика образца, содержащего определяемые вещества на уровне нижнего предела количественного определения (нПКО), что соответствует критериям приемлемости.

Хроматограммы, полученные при определении селективности методик, приведены на Рисунках 1 – 4 (моча) и 5 – 8 (плазма крови).

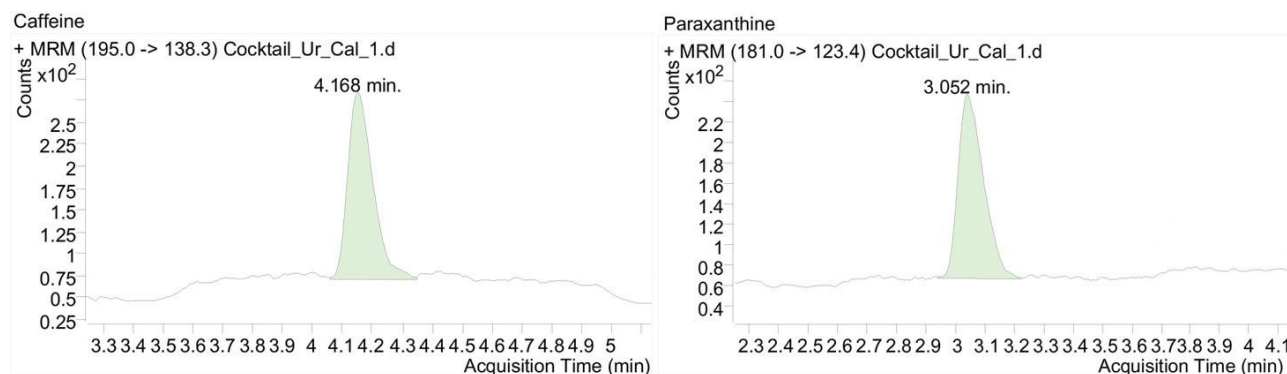


Рисунок 1 — Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (кофеин/параксантин) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

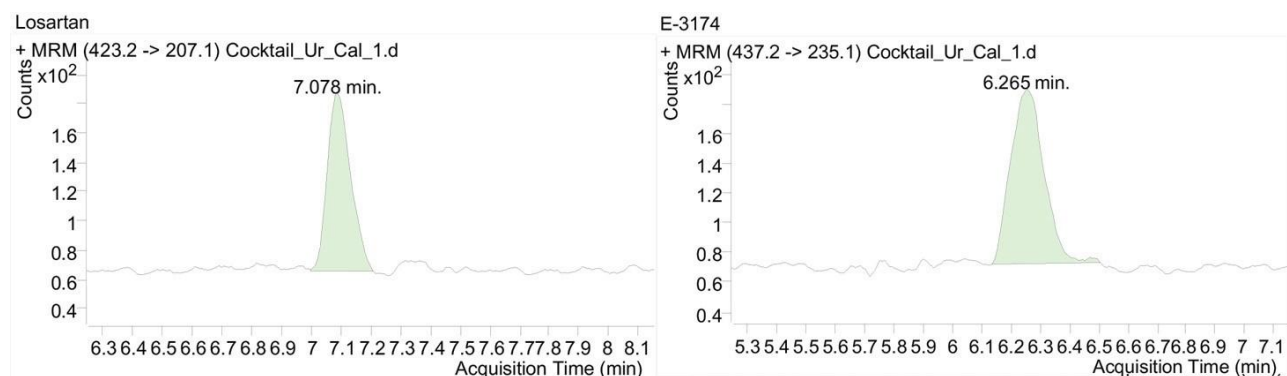


Рисунок 2 — Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (лозартан/Е-3174) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

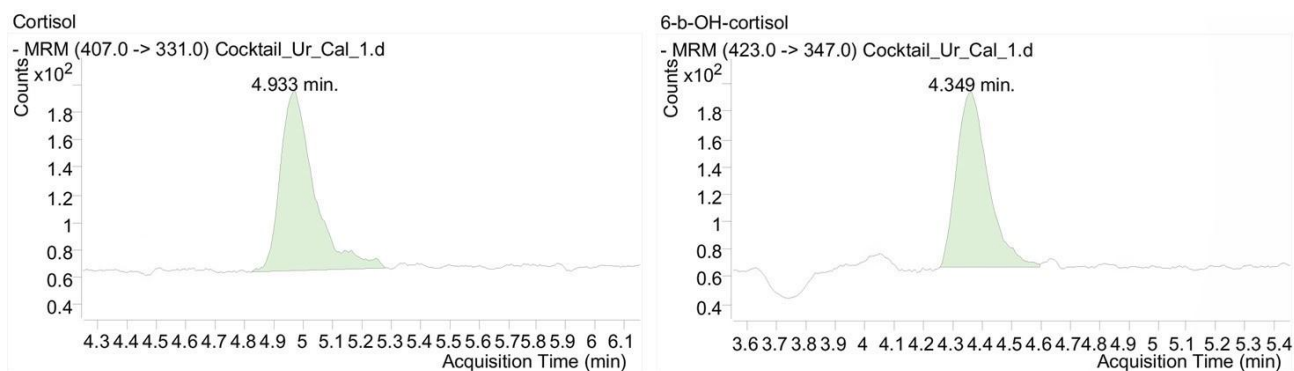


Рисунок 3 — Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (кортизол/6-β-гидроксикортизол) на уровне нПКО (10 нг/мл; 10 нг/мл)

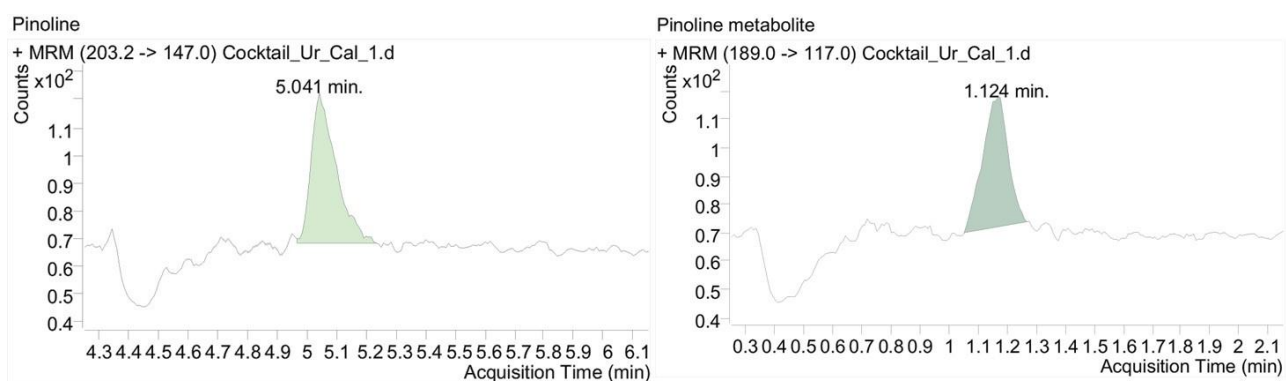


Рисунок 4 — Хроматограмма образца мочи, содержащей определяемые вещества (пинолин/метаболит) на уровне нПКО (0,5 нг/мл; 0,5 нг/мл)

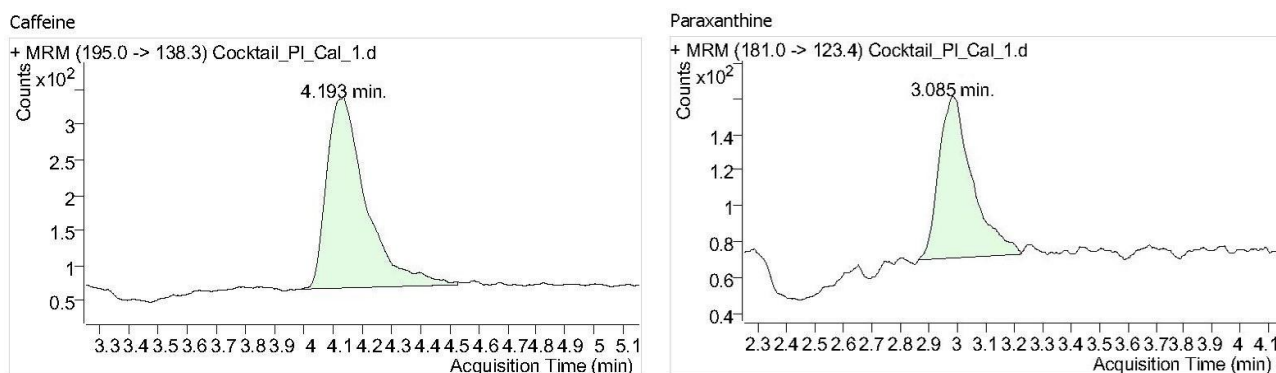


Рисунок 5 — Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (кофеин/параксантин) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

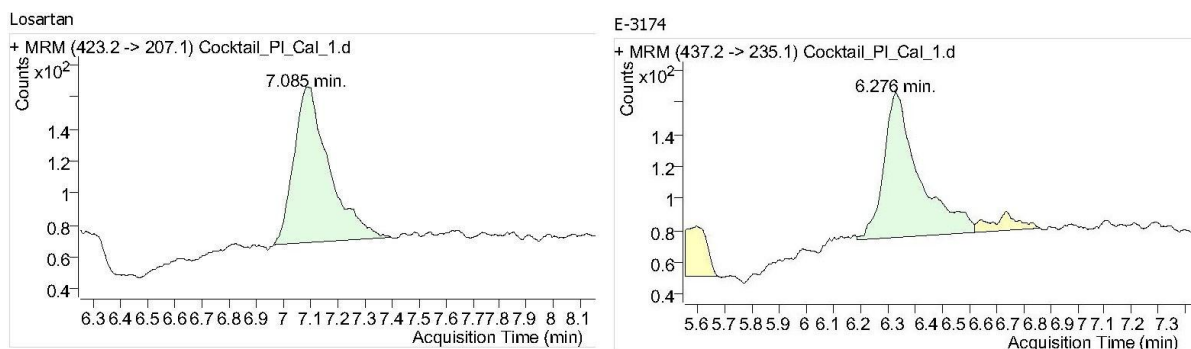


Рисунок 6 — Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (лозартан/Е-3174) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

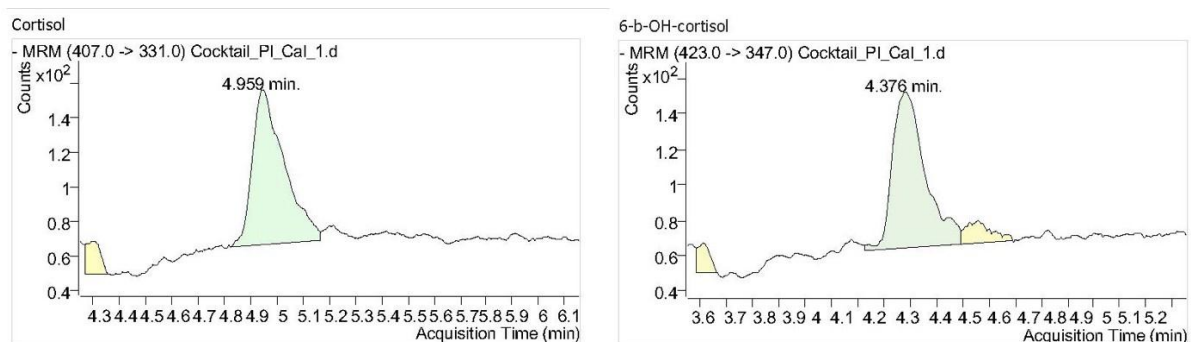


Рисунок 7 — Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (кортизол/6-β-гидрокортизол) на уровне нПКО (50 нг/мл; 50 нг/мл)

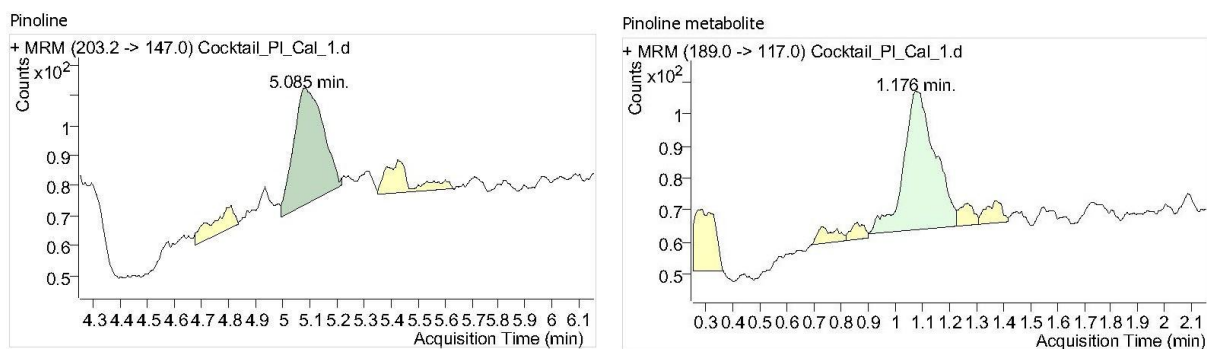


Рисунок 8 — Хроматограмма образца плазмы крови, содержащей определяемые вещества (пинолин/метаболит) на уровне нПКО (0,25 нг/мл; 0,25 нг/мл)

Линейность

Для определения линейности методик готовили калибровочные образцы в пределах следующих аналитических диапазонов: **10 – 5000 нг/мл** для кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174, кортизола, 6-β-гидрокортизола и

0,50 – 10,00 нг/мл пинолина и его метаболита *в моче*; **50 – 10000 нг/мл** для кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174, кортизола, 6-β-гидрокортизола и **0,25 – 3,00 нг/мл** пинолина и его метаболита *в плазме крови*.

По полученным результатам анализа были построены калибровочные графики, значения коэффициента корреляции r^2 которых составило **более 0,99**, а отклонения расчётных значений концентраций от теоретических составило **не более 20%** для точек на уровне нПКО и **не более 15%** - для остальных точек, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Эффект матрицы и степень извлечения

Для определения факторы матрицы и прочих валидационных параметров готовили соответствующие *образцы контроля качества*: **ККА** (концентрация аналитов на уровне нПКО); **ККБ** (концентрация аналитов на уровне трёхкратного нПКО); **ККВ** (концентрация аналитов на уровне 50% от верхнего предела количественного определения (вПКО)); **ККГ** (концентрация аналитов на уровне 75% от вПКО).

Для оценки влияния сопутствующих веществ, находящихся в матрице, на количественное определение исследуемых аналитов, проводят расчёт фактора матрицы. Для определения фактора матрицы используют образцы контроля с концентрациями аналита на уровне ККБ и ККГ. Анализ проводили в 6 сериях.

Коэффициент вариации значений фактора матрицы, нормализованного по внутреннему стандарту, составил **не более 15%**, что удовлетворяет критериям приемлемости.

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 к площадям хроматографических пиков из образцов без проведения экстракции. Анализ проводили в 6 сериях.

Значения степени извлечения составили **не менее 81,51%** для кофеина; **83,13%** для параксантина; **83,77%** для лозартана; **87,55%** для Е-3174; **82,85%**

для кортизола; **84,80%** для 6-β-ОН-кортизола; **84,86%** для пинолина; **84,55%** для метаболита пинолина *в моче*;

не менее 85,49% для кофеина; **83,79%** для параксантина; **81,25%** для лозартана; **78,88%** для Е-3174; **79,60%** для кортизола; **74,70%** для 6-β-ОН-кортизола; **80,88%** для пинолина; **73,60%** для метаболита пинолина *в плазме крови*.

Значение коэффициента вариации степени извлечения составило **не более 15%**, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Точность и прецизионность

Точность и прецизионность методов внутри и между сериями определялась по результатам анализов образцов контроля качества ККА; ККБ; ККВ; ККГ в составе одного аналитического цикла и трёх аналитических циклов, выполненных одним исследователем. Анализ проводится в 5 сериях для каждого значения концентрации.

Отклонение среднего значения полученных концентраций для образцов контроля качества от теоретического значения находилось **в пределах 20%** для ККА и **в пределах 15%** для остальных образцов, что соответствует критериям приемлемости точности.

Относительное стандартное отклонение полученных значений концентраций для образцов контроля качества составило **не более 20%** для ККА и **не более 15%** для остальных образцов, что соответствует критериям приемлемости прецизионности.

Нижний предел количественного определения

За нПКО методики принималась минимальная концентрация аналита в плазме, для которой возможно количественное определение со значениями среднего значения концентраций и относительного стандартного отклонения не более 20 % в диапазоне линейной зависимости.

Значения нПКО методик составило **10 нг/мл** для кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174, кортизола, 6-β-гидрокортизола и **0,50 нг/мл** пинолина и его метаболита *в моче*; **50 нг/мл** для кофеина, параксантина, лозартана, Е-3174,

кортизола, 6-β-гидрокортизола и **0,25 нг/мл** пинолина и его метаболита в плазме крови.

Перенос пробы

Для определения наличия переноса пробы в хроматографической системе производят ввод образца контроля качества ККГ с последующим вводом бланкового образца биожидкости. Площадь пика с соответствующими временами удерживания аналитов составляла **не более 20%** от площади пика на уровне нПКО, что соответствует критериям приемлемости.

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)

Анализ проводится в 3х сериях для каждого образца контроля качества.

Стабильность аналитов определяется модулем разницы средних значений концентраций до и после исследования. Модуль разниц значений концентраций составил **не более 15%**, что соответствует критериям приемлемости.

5. Результаты фенотипирования изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 в различных исследованиях с помощью разработанных методик

Разработанные методики были успешно использованы для фенотипического исследования изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4 и CYP2D6 в различных исследованиях.

Методика была использована для доказательства изменения активности метаболизма у больных гормон-зависимой бронхиальной астмой. Для оценки метаболической активности у больных 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 бронхиальной астмой больше на 67% ($p=0,007$ при $\alpha=0,95$) от аналогичного значения у здоровых добровольцев.

Методика была использована для определения изменения активности системы биотрансформации у пациентов после трансплантации печени. Образцы мочи были получены из Отделения трансплантации печени НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского. В исследовании приняли участие 2 группы по 11 человек: в 1ую группу входили пациенты, перенесшие трансплантацию печени, во 2ую – здоровые добровольцы в качестве контроля. Полученные значения метаболических индексов приведены в Таблице 3.

Таблица 3 – Средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) метаболических индексов

	CYP1A2	CYP2C9	CYP3A4	CYP2D6
Группа №1	2,41 $\pm$ 0,63 *	2,61 $\pm$ 1,18 *	2,18 $\pm$ 1,22 *	2,52 $\pm$ 1,38 *
Контроль	1,25 $\pm$ 0,62	0,42 $\pm$ 0,23	1,05 $\pm$ 0,36	0,77 $\pm$ 0,53
* - статистически значимое различие от значения контрольной группы ($p<0,05$)				

В результате были выявлены статистически значимые различия в метаболической активности изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 между группами (двухсторонняя значимость для каждого из изоферментов составила менее 0,05 при уровне значимости в 95%).

Разработанный «коктейльный» метод применялся для определения активности основных изоферментов CYP методом фенотипирования у больных с риском возникновения лекарственной аллергии с хронической сердечной недостаточностью в анамнезе. В исследовании принимало участие 3 группы по 20 человек. Первая группа – пациенты с эпизодом лекарственной аллергии на препараты различных фармакологических групп. Вторая группа - пациенты с лекарственной аллергией исключительно на нестероидные противовоспалительные средства. Третья группа – контрольная, без эпизодов лекарственной аллергии. Полученные данные приведены в Таблице 4.

Таблица 4 – Средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) метаболических индексов

	CYP3A4	CYP2D6	CYP2C9
Группа №1	5,01 $\pm$ 1,20	1,24 $\pm$ 0,51	---
Группа №2	16,82 $\pm$ 7,53 *	1,33 $\pm$ 0,56	2,14 $\pm$ 0,64
Контроль	4,24 $\pm$ 2,31	1,74 $\pm$ 0,91	2,15 $\pm$ 0,93
* - статистически значимое различие от значения контрольной группы ($p < 0,05$)			

Из полученных данных был сделан вывод, что с 95% вероятностью имеются статистически значимые 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. Следовательно, могла произойти вторичная реакция организма на принимаемые препараты в виде лекарственной аллергии на фоне измененной активности изофермента CYP3A4.

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, Е-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 и 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 CYP с целью определения метаболической активности большего числа изоферментов цитохрома P450 в одной пробе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

- 1 **Egorenkov E.A.** Development of validated method for CYP2D6 phenotyping in studies of correlation between drug allergy and cytochrome P450 activity / Abdrashitov R.Kh., **Egorenkov E.A.**, Smirnov V.V., Ramenskaya G.V., Khaitov M.R. // *Allergy*. – 2015. – Т. 70. № S101. – P.227.
- 2 **Егоренков Е.А.** Разработка и валидация методики совместного количественного определения субстратов – маркёров основных изоферментов цитохрома P450 и их метаболитов с использованием ВЭЖХ-МС/МС / **Егоренков Е.А.**, Смирнов В.В // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2016. – №4 (17). – С. 198-202.
- 3 **Егоренков Е.А.** Изучение метаболической активности у пациентов с лекарственной аллергией «коктейльным» методом фенотипирования / **Егоренков Е.А.**, Смирнов В.В., Мясникова Т.Н., Романова Т.С. // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2016. – №3 (16). – С. 170-172.
- 4 **Егоренков Е.А.** Коктейльные методы определения метаболической активности *in vivo* с помощью биоаналитических методик: обзор сузествующих методов и перспектива их использования в клинической практике / **Егоренков Е.А.**, Смирнов В.В. // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2016. – №1 (14). – С. 184-188.
- 5 **Егоренков Е.А.** Методики фенотипирования изофермента CYP3A4, применяемые для персонализации фармакотерапии / **Егоренков Е.А.**, Смирнов В.В., Кузина В.Н., Дементьев С.П., Раменская Г.В. // *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. – 2017. – Т. 7. № 1. – С. 20-24.
- 6 **Егоренков Е.А.** Метаболическая активность CYP3A4 у больных гормон-зависимой бронхиальной астмой / Красных Л.М., Смирнов В.В., **Егоренков Е.А.**, Червинская Т.А., Курбачева О.М. // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2017. – Т. 80. № 11 – С. 7-9.