

Министерство здравоохранения Российской Федерации
Государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА

На правах рукописи

АБДРАШИТОВ
Рустем Хамзиевич

РАЗРАБОТКА МЕТОДИК КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПИНОЛИНА
И ЕГО МЕТАБОЛИТА МЕТОДОМ LC/MS/MS

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Раменская Галина Владиславовна

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Система метаболизма (биотрансформации) лекарственных средств	11
1.1.1. История изучения метаболизма лекарственных препаратов	11
1.1.2. Системы и ферменты, участвующие в метаболизме ЛС	13
1.1.2.1. Основные фазы метаболизма. Суперсемейство цитохром Р450	13
1.2. Функциональные особенности и полиморфизм изофермента CYP 2D6	21
1.2.1. β -блокаторы как субстрат CYP 2D6	24
1.2.2. Метаболизм антипсихотических ЛС с участием CYP 2D6	25
1.2.3. Влияние заболеваний печени на активность CYP 2D6	26
1.3. Методы определения активности CYP 2D6 (фенотипирование)	27
1.3.1. Количественное определение дебризохина и спартеина	30
1.3.2. Количественное определение трамадола	31
1.3.3. Количественное определение метопролола	31
1.3.4. Количественное определение декстрометорфана	32
1.4. Определение активности CYP 2D6 по отношению пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин	33
1.4.1. Скрининг эндогенных субстратов CYP 2D6	33
1.4.2. Физические, химические и биохимические свойства пинолина	34
1.4.3. Существующие методики определения пинолина	36
1.4.3.1. Определение <i>ex vivo</i>	36
1.4.3.2. Определение <i>in vivo</i>	37
1.5. Метод ВЭЖХ-МС/МС	39
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	42
2.1. Оборудование и материалы	42
2.1.1. Материалы	42
2.1.1.1. Стандарты определяемых веществ	42

2.1.1.2. Биологическая матрица	42
2.1.1.3. Реактивы	42
2.1.2. Оборудование	42
2.2. Разработанная методика	43
2.3. Дизайн фармакологической части	44
ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	46
3.1 Разработка методики определения отношения пинолин и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин	46
3.1.1. Выбор внутреннего стандарта	46
3.1.2. Пробоподготовка	47
3.1.2.1. Отбор проб. Пробоподготовка	47
3.1.2.2. Пробоподготовка плазмы крови	48
3.1.2.3. Пробоподготовка мочи	50
3.1.2.4. Выводы по результатам пробоподготовки	51
3.1.3. Хроматографические условия	52
3.1.4. Масс-спектр условия	54
3.2. Валидация методики определения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин	55
3.2.1. Параметры пригодности хроматографической системы	55
3.2.1.1. Селективность	56
3.2.1.2. Линейность зависимости отклика от концентраций определяемых веществ	57
3.2.1.2.1. Получение данных для построения калибровочного графика	58
3.2.1.2.2. Построение калибровочного графика	58
3.2.1.2.3. Оценка линейности	58
3.2.1.3. Оценка правильности и прецизионности методики	62
3.2.1.4. Оценка предела количественного определения	63
3.2.1.5. Эффект матрицы	64
3.2.1.6. Стабильность анализируемых веществ	66
3.2.1.6.1. Стабильность стандартного раствора	66

3.2.1.6.2. Стабильность пинолина и его метаболита в составе биологической матрицы при хранении в замороженном состоянии	67
3.2.1.6.3. Стабильность пинолина и его метаболита после пробоподготовки	68
3.2.1.7. Тест на разведение	70
3.3. Зависимость активности изофермента CYP 2D6 и изменения отношения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина	71
3.3.1. Изучение влияния почечной патологии на активность изофермента CYP 2D6	73
3.3.2. Изменение активности изофермента CYP 2D6 под действием ингибиторов и индукторов	75
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	77
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	79

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CYP – cytochrome P450 – цитохром P450

НЛР – нежелательные лекарственные реакции

LC/MS/MS – ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемным масс-спектрометрическим детектированием

ЛС – лекарственное средство

FDA – Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов

MEGX – monoethylglycinexylidide – моноэтил-глицин-ксилидит

HPLC – ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

M1 – моно-О-дезметилтрамадол

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ТФЭ – твердофазная экстракция

MRM – multiple reaction monitoring – мониторинг множественных реакций

ЕМА – European Medicines Agency – Европейское агентство лекарственных средств

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

С проблемой частого развития нежелательных лекарственных реакций сталкивается каждый врач и частично решить данную проблему позволяют персонализированные подходы к фармакотерапии. Одним из инструментов персонализированной медицины является изучение фармакокинетики лекарственных средств.

Одним из основных фармакокинетических процессов, определяющих индивидуальный фармакологический ответ, является метаболизм, или биотрансформация лекарственных средств. Большой вклад в метаболизм многих ксенобиотиков вносит система цитохрома P450, которая состоит из множества изоферментов, отвечающих за биотрансформацию как экзогенных, так и эндогенных веществ. Однако в метаболизме лекарственных средств принимают участие ферменты семейств I, II, III. Наиболее важными для метаболизма ЛС и хорошо изученными изоферментами цитохрома P450 являются следующие изоферменты: CYP 1A1, CYP 1A2, CYP 2A6, CYP 2B6, CYP 2D6, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2E1, CYP 3A4 [11].

Определение активности того или иного фермента метаболизма ЛС по фармакокинетике его специфического субстрата («маркерного» субстрата) и его метаболита называется фенотипированием. Существуют методики определения изоферментов с применением экзогенных или эндогенных «маркеров».

В настоящее время за рубежом для оценки активности CYP 2D6 в научных целях широко используется экзогенное вещество декстрометорфан. Данный тест обладает рядом выраженных недостатков, таких как необходимость внутривенного или перорального введения препарата, применение которого сопряжено с риском развития НЛР. Также декстрометорфан в виде монокомпонентного препарата не зарегистрирован на территории РФ, что делает практически невозможным его применение в клинической практике.

В связи с этим более перспективны методы оценки активности CYP 2D6 по концентрации в биологических жидкостях эндогенного субстрата и его

метаболита. Такими субстратами являются пинолин и его метаболит 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,- тетрагидро- β -карболин, который образуются преимущественно под действием CYP 2D6 [55]. Поскольку определение эндогенного вещества исключает необходимость введения какого-либо лекарственного средства, то у пациентов не будут развиваться НЛР и такая методика будет более безопасной для больного.

Все вышесказанное определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования – разработать методику количественного определения пинолина и его метаболита методом LC/MS/MS для оценки активности изофермента CYP 2D6 с целью рационализации фармакотерапии.

Задачи исследования:

1. Выявить и теоретически обобщить, согласно результатам отечественных и зарубежных литературных источников, данные, отражающие применение различных методик определения активности изофермента CYP 2D6 методом ВЭЖХ.

2. Подобрать оптимальные условия количественного определения пинолина и 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,-тетрагидро- β -карболина в биологических жидкостях методом LC/MS/MS.

3. Провести валидацию разработанной методики.

4. Изучить активность CYP 2D6 у пациентов с помощью разработанной методики.

5. Изучить изменение активности CYP 2D6 у пациентов при приеме ингибиторов активности данного изофермента.

6. Сделать вывод о возможности использования данной методики для определения изменений активности при приеме ингибиторов активности CYP 2D6.

Научная новизна. В данной работе впервые представлены разработанные и валидированные методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,-тетрагидро- β -карболина в плазме крови и моче человека в диапазоне концентраций от 250 до 1500 пг/мл. На основании

экспериментальных данных сделан вывод о возможности определения активности СУР 2D6 у пациентов с помощью разработанной методики. Также применение данной методики количественного определения возможно при назначении ингибиторов изофермента СУР 2D6.

Методология и методы исследования. В ходе выполнения работы были применены методы пробоподготовки с твердофазной экстракцией и высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования. Разработанные биоаналитические методики были внедрены в практическую деятельность в лаборатории клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России и в филиале «Клиническая фармакология» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Степень достоверности результатов исследования. Первичные данные, полученные в результате проведения настоящего исследования, получены при помощи современных методов анализа, являются достоверными и точными, что подтверждено в ходе проведения процедуры валидации. Используемое в работе оборудование имело действующие свидетельства о поверке и зарегистрировано в Реестре средств измерений, что позволяет считать результаты исследования достоверными.

Апробация работы.

Апробация работы проведена на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева фармацевтического факультета Первого МГМУ имени И.М. Сеченова (2016 г.).

Основные положения работы и результаты исследования доложены на научном совете НИИ Фармации «Достижения и перспективы молодых ученых НИИ Фармации» (Москва, 2014 г.), научном совете НИИ Фармации «Достижения и перспективы молодых ученых НИИ Фармации» (Москва, 2015 г.), на Конгрессе Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии (ЕААСI) (Барселона, 2015 г.).

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов. Автором лично проведена разработка, валидация методик определения пинолина и его метаболита в плазме крови человека и в моче методом ВЭЖХ-МС/МС, статистическая обработка результатов, изучена активность CYP 2D6. 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.

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».

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 работ, из них 2 – в изданиях из Перечня ВАК и 1 – в издании, включенном в базу Scopus и Web of Science.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в рамках комплексной темы кафедры фармацевтической и токсикологической химии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова "Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования". Номер государственной регистрации: 01.2.011.68237.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанные методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1, 2, 3, 4,- тетрагидро- β -карболина в плазме крови и моче с помощью метода ВЭЖХ-МС/МС.

2. Результаты валидации разработанных методик, выводы по полученным результатам.

3. Результаты определения активности СYP 2D6 у пациентов с помощью разработанной методики.

4. Результаты использования данной методики для определения изменений активности при приеме индукторов активности СYP 2D6.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 89 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, 6 общих выводов и списка литературы. Диссертация включает 35 таблиц и 13 рисунков. Библиографический список содержит 101 источников, из них 82 на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Система метаболизма (биотрансформации) лекарственных средств

1.1.1. История изучения метаболизма лекарственных препаратов

Первые эксперименты по изучению метаболизма ЛС были впервые проведены и опубликованы более 180 лет назад, сначала на собаках в 1824 году и, затем, на людях в 1841 году [99, 92]. Данные эксперименты заложили основу современного понимания биотрансформации путем установления теории, что в организме протекает ряд химических реакций с экзогенным соединением для выведения его с мочой в химически модифицированной форме. Тем не менее, исследования метаболизма были ограничены сложностью изолирования и идентификации предполагаемых метаболитов. Однако существенный прогресс в области органической химии и аналитических методов привел к продвижению в исследованиях фармакокинетики и метаболизма ксенобиотиков.

Первой опубликованной реакцией метаболизма была реакция конъюгации с глицином. В 1841 и 1842 году, двое ученых независимо друг от друга приняли бензойную кислоту и, по сообщению исследователей, наблюдали данный конъюгат в моче «в обильном количестве» и «без видимых вредных последствий» [92, 56]. Выделенное соединение было схоже с бензойной кислотой, но при изучении строения молекулы было обнаружено, что в составе так же был азот. Идентифицировал это соединение, как гиппуровую кислоту, конъюгат глицина с бензойной кислотой, французский ученый по имени Дессень [35].

При дальнейшем исследовании бензойной кислоты было обнаружено, что окисление предшествует конъюгации. После приема коричной кислоты, наблюдали выведение гиппуровой кислоты [41, 100]. Но механизм этих преобразований не был изучен, поскольку в ту эпоху, организм считался просто сосудом, в котором проходят химические реакции. Многие реакции для химиков были «абсолютно загадочными», потому что, вне организма, эти реакции проходили в очень жестких условиях либо вообще были невозможны [29]. Например, когда в 1867 году *Schultzen* и *Naunyn* опубликовали определение

фенола в моче людей и собак, которые принимали бензол, окисление бензола до фенола в условиях лаборатории считалось невозможным. На сегодняшний день провести реакцию по преобразованию бензола в фенол можно только в жестких нефизиологических условиях [67].

В 1887 после приема ацетата пиридина у собак в моче был обнаружен N-метил пиридин, таким образом, была описана реакция метилирования [52]. Кроме того, в 1887 году *Jaffe* и *Cohn* впервые обнаружили вещество, сопряженное с уксусной кислотой [54]. Затем, в 1893 году *Cohn* подтвердил, что N-ацетилирование является основной реакцией конъюгации [28].

В ходе проведенных экспериментов было обнаружено, что выделяемые соединения гораздо менее токсичные, чем исходные соединения. К 1893 году накопилось достаточно доказательств для внедрения в научную литературу термина «детоксикация» [70, 1].

В XIX веке считалось, что вещества модифицируются организмом в крови. Но в начале XX века, сторонники теории трансформации веществ в органах смогли подтвердить свои предположения с помощью таких методов, как резекция печени, перфузия печени и почек лабораторных животных. О том, что в печени проходит реакция конъюгации с глюкуроновой кислотой стало известно благодаря методу с применением серий перфузированных органов собаки (например, печени или селезенки).

Систематизировал накопившиеся труды по изучению метаболизма в 1947 году *Welshman R.T. Williams*. Именно *Williams* предложил разделить реакции метаболизма на 2 фазы, что привело к появлению до сих пор известных терминов «I фаза» и «II фаза» [98].

Благодаря достижениям в области аналитических и биохимических методов анализа, начиная с 1950-х годов, ускорились темпы изучения метаболизма. Например, распределительная хроматография позволила дифференцировать ЛС от метаболитов. Возможности абсорбционной спектрофотометрии также улучшили как количественное, так и качественное определение ЛС и

метаболитов. Впервые были выяснены кофакторы ферментативных реакций и были установлены ферментативные пути биосинтеза кофакторов. В конце 1950-х и начале 1960-х была открыта и охарактеризована система ферментов цитохрома P450, с помощью которой происходит микросомальное окисление ЛС и стероидных гормонов [68, 58, 73, 72].

В 1983 году из печени человека были выделены, идентифицированы и охарактеризованы основные компоненты цитохрома P450 [95]. Определение точной структуры метаболитов и их количественное определение стало возможным благодаря развитию методов масс-спектрометрии и спектроскопии ядерного магнитного резонанса.

Несмотря на то, что направление по изучению метаболизма считают зрелым, достижения техники двигают вперед исследования по данной тематике. Фармацевтическая индустрия стимулирует к развитию большинство направлений современных технологических разработок, в том числе высокоразвитые аналитические инструменты. Также с развитием «геномной эры» были изучены генетические основы метаболизма ЛС среди индивидов и популяций. В будущем изучение метаболизма будет зависеть от появления и развития новых технологий.

1.1.2. Системы и ферменты, участвующие в метаболизме ЛС

1.1.2.1. Основные фазы метаболизма. Суперсемейство цитохром P450

Основная функция метаболизма ЛС заключается в том, чтобы облегчить выведение соединений из организма, таким образом, предотвращая нежелательное накопление чужеродных соединений или потенциально токсичных концентраций эндогенных соединений. Эта физиологическая функция описывается количественными фармакокинетическими терминами – биодоступность и клиренс. Биодоступность показывает количество принятого ЛС, которое достигло системного кровотока, т. е. количество абсорбированного ЛС минус пресистемный метаболизм. Степень выведения ЛС из системного кровотока и скорость постсистемного метаболизма характеризует клиренс. Биодоступность и клиренс в совокупности влияют на общее воздействие ЛС на

организм и количественно характеризуются площадью под фармакокинетической кривой (AUC) (рис. 1).

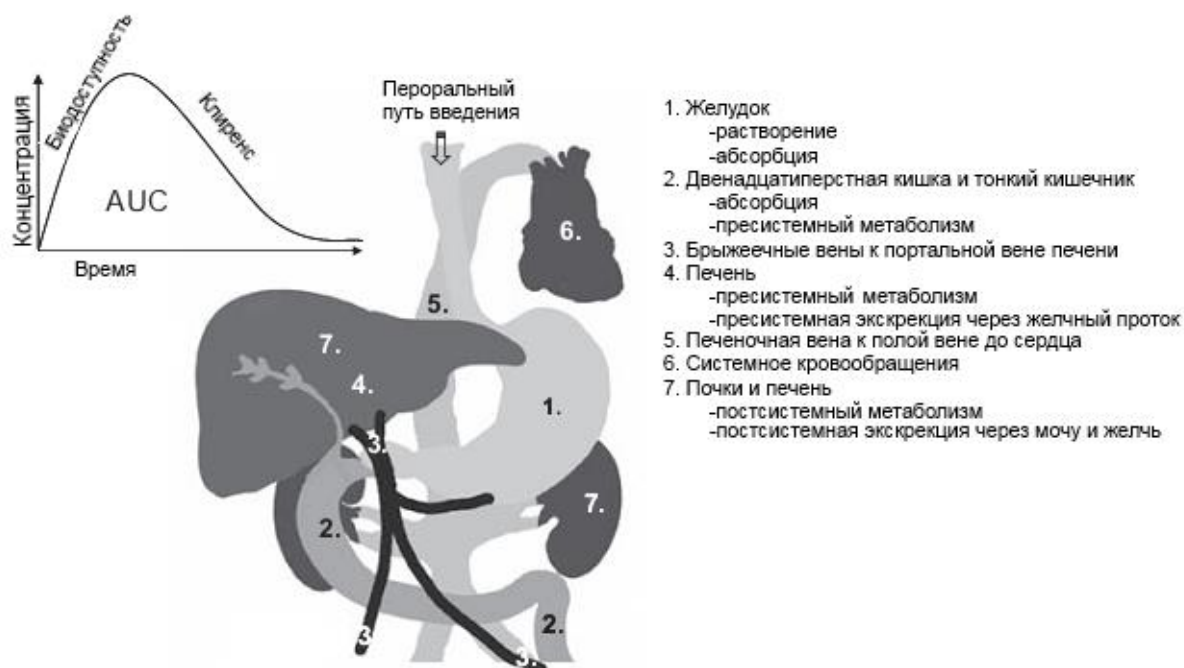


Рисунок 1 - Фармакокинетическая кривая (а) и путь перорального ЛС (b).

Каждое соединение обычно биотрансформируется через ряд параллельных и/или последовательных реакций, через так называемый метаболический путь и, при этом, на разных стадиях образуются различные соединения. Общий метаболизм любого соединения является суммой всех доступных путей метаболизма ЛС. Условно реакции метаболизма можно разделить на «I фазу» и «II фазу».

I фаза метаболизма включает в себя функциональные реакции (окисление, восстановление, гидролиз). С помощью этих реакций вводятся новые полярные функциональные группы, изменяются существующие группы с повышением полярности или гидролизуются закрытые полярные группы.

II фаза характеризуется реакциями конъюгации (глюкуронирование, сульфонирование, конъюгация с глицином/глутамином/глутатионом, ацетилирование, метилирование). После конъюгации резко увеличивается полярность соединения, что способствует лучшему выведению.

Следует отметить, что все реакции биотрансформации проходят в очень мягких условиях: нейтральный pH, приблизительно 37°C, водный растворитель и атмосферное давление. Только благодаря ферментам, участвующим в реакциях в качестве катализаторов, реакции протекают в таких условиях.

При определении биодоступности и фармакокинетики ЛС следует учитывать роль различных семейств ферментов, которые участвуют в его метаболизме. Оценивают метаболизм ЛС по тем ферментам, которые проявляют большую активность по отношению к субстрату.

В реакциях I фазы метаболизма в качестве катализаторов участвуют различные классы ферментов. Поскольку изоферменты суперсемейства цитохрома P450 широко представлены в организме, они доминируют среди других ферментов по вкладу в биотрансформацию ЛС. Подсемейства CYP 1, CYP 2 и CYP 3 метаболизируют большинство ЛС и ксенобиотиков [46, 97]. Два важных класса ферментов локализованы в эндоплазматическом ретикулуме, рядом с цитохромом P450: флавин-содержащие монооксигеназы, которые участвуют в реакциях *N*- и *S*-окисления и уридин-5-дифосфат глюкуронилтрансферазы, которые катализируют конъюгацию с уридин-5-дифосфорной глюкуроновой кислотой. В дополнение к этим семействам, существуют *N*-ацетил трансферазы, сульфотрансферазы, глутатион трансферазы, алкоголь дегидрогеназы и альдегид дегидрогеназы. Почти все метаболические пути включают один или несколько ферментов – большинство включают цитохром P450.

Цитохром P450 является одним из наиболее важных семейств ферментов, которые участвуют в регуляции фармакологически активных, токсичных и потенциально токсичных ксенобиотиков. Ферменты цитохрома являются мембранно-связанными гемопroteинами, которые соединяются с гладким эндоплазматическим ретикулумом. Известно, что субстратами цитохрома являются соединения с различными функциональными группами, которые подвергаются метаболизму путем окисления.

Цитохром делится на подсемейства в зависимости от общей аминокислотной последовательности. Более 50 различных изоферментов идентифицированы у человека. Среди них проявляют активность в метаболизме большинства ЛС следующие изоферменты: СYP 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 2J2, 3A4, 3A5, 4F2, 4F3a, 4F3b и 4F12. Фактически СYP 1A2, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 и 3A4 являются наиболее важными изоферментами при определении фармакокинетических параметров.

Эта номенклатура используется не только у человека, но и у других видов. Как правило, у различных видов изоферменты имеют схожие между собой структуру, функции и название, но, важно отметить, что они не идентичны человеческим формам. Даже небольшое различие в аминокислотной последовательности может повлиять на сродство к субстрату и на способность фермента метаболизировать субстрат и/или регион специфичное место молекулы. Изучая метаболизм, следует обращать внимание на стадии биотрансформации, которым подвергается субстрат, а также определять ферменты, под действием которых происходят такие трансформации. Фармакокинетические показатели, полученные в испытаниях *in vivo* на мышах или других лабораторных животных, не всегда коррелируют с показателями человека. Для прогнозирования фармакокинетики ЛС у человека нужно проводить анализ на разных видах животных, а также учитывать данные, полученные в испытания *in vitro* и *in silico* [84, 89].

Как семейство, несколько изоферментов вместе участвуют в окислении и биотрансформации сложных соединения. Однако у отдельных изоферментов есть тенденция к большей селективности к субстратам с определенными свойствами, что позволяет дифференцировать их (табл. 1) [64, 65]. СYP 1A1 часто участвует в метаболизме арильных углеводов [40]. У СYP 1A1 и СYP 1A2 частично совпадает сродство к субстратам; однако, СYP 1A2 преимущественно метаболизирует полициклические ароматические углеводы. Как СYP 1A1, так и СYP 1A2 участвуют в биотрансформации проканцерогенов в канцерогены. Было показано,

что CYP 1A2 является основным ферментом, метаболизирующим такие ЛС, как фенацетин и теофиллин. CYP 2A6 отдает предпочтение более мелким, нейтральным, менее липофильным молекулам, таким как кетоны и нитрозамины. CYP 2C9 и CYP 2C19 могут метаболизировать кислые молекулы. CYP 2C9 участвует в реакциях О-деметилирования фенольных радикалов, окислении ароматических метил радикалов, радикалов, содержащих атом серы, N-деалкилировании [84]. Напротив, CYP 2D6 может метаболизировать основные молекулы с атомом азота (флуоксетин, нортриптилин, декстрометорфан и буфуралол), а также катализирует реакции О-деметилирования, окисления метил радикалов и фенол О-деметилирования. CYP 2E1 эффективен в биотрансформации малых молекул (этанол, ацетаминофен, халотан и паранитрофенол), а CYP 3A4 – больших, липофильных молекул (симвастатин, тестостерон, кортизол, циклоспорин и мидазолам) [47, 64]. Также CYP 3A4 проявляет активность при N-деалкилировании, гидроксिलировании ароматических систем и окислении радикалов, содержащих серу.

Изофермент	Свойство субстрата	Пример субстрата
CYP1A1, 1A2	Плоская липофильная; нейтральная или основная молекула	Фенацетин, дапсон, такрин, рамелтеон, кофеин, теофиллин
CYP2C9	Кислотная молекула средних размеров	Диклофенак, варфарин, толбутамин, лозартан
CYP2C19	Основная молекула средних размеров	(S)-мефетоин, омепразол
CYP 2D6	Основная молекула средних размеров с протонируемым атомом азота	Флуоксетин, декстрометорфан, нортриптилин, буфуралол
CYP2E1	Маленькая, нейтральная молекула	Паранитрофенол, этанол, хлорзоксазон
CYP3A4	Большая, липофильная молекула	Тестостерон, циклоспорин А, нифедипин, мидазолам, симвастатин, кортизол

Таблица 1 - Цитохром P450 и его субстратная селективность.

3D структура белка субстрата уникальна для каждого изофермента и, таким образом, контролируются участки связывания с лигандами. Субстраты и ингибиторы должны быть в состоянии вступить во взаимодействие со связывающим участком. Несмотря на то, что у лиганда и активного центра белка есть конформационная гибкость, исследования показали, что эта гибкость ограничена атомными, водородными и прочими связями. Таким образом, каждый изофермент ограничен диапазоном лигандов, которые могут взаимодействовать с активным центром, и эти ограничения определяют субстратную, ингибиторную и региоселективность каждого изофермента цитохрома P450.

Селективность изофермента относится к способности активного центра связаться с лигандом. Например, потенциальный лиганд не сможет связаться с активным центром, если он не подходит по структуре связывающему или каталитическому участкам. Также может быть, что лиганд подходит по размеру, но у него нет дополнительных функциональных групп, необходимых для связывания с изоферментом. С помощью рационального изучения лигандов, окисленных конкретными изоформами цитохрома P450 можно разработать надежные параметры для прогнозирования специфичности [63, 90]. По данным исследования подготовлено древо решений для прогнозирования селективности основных изоферментов (рис. 2).

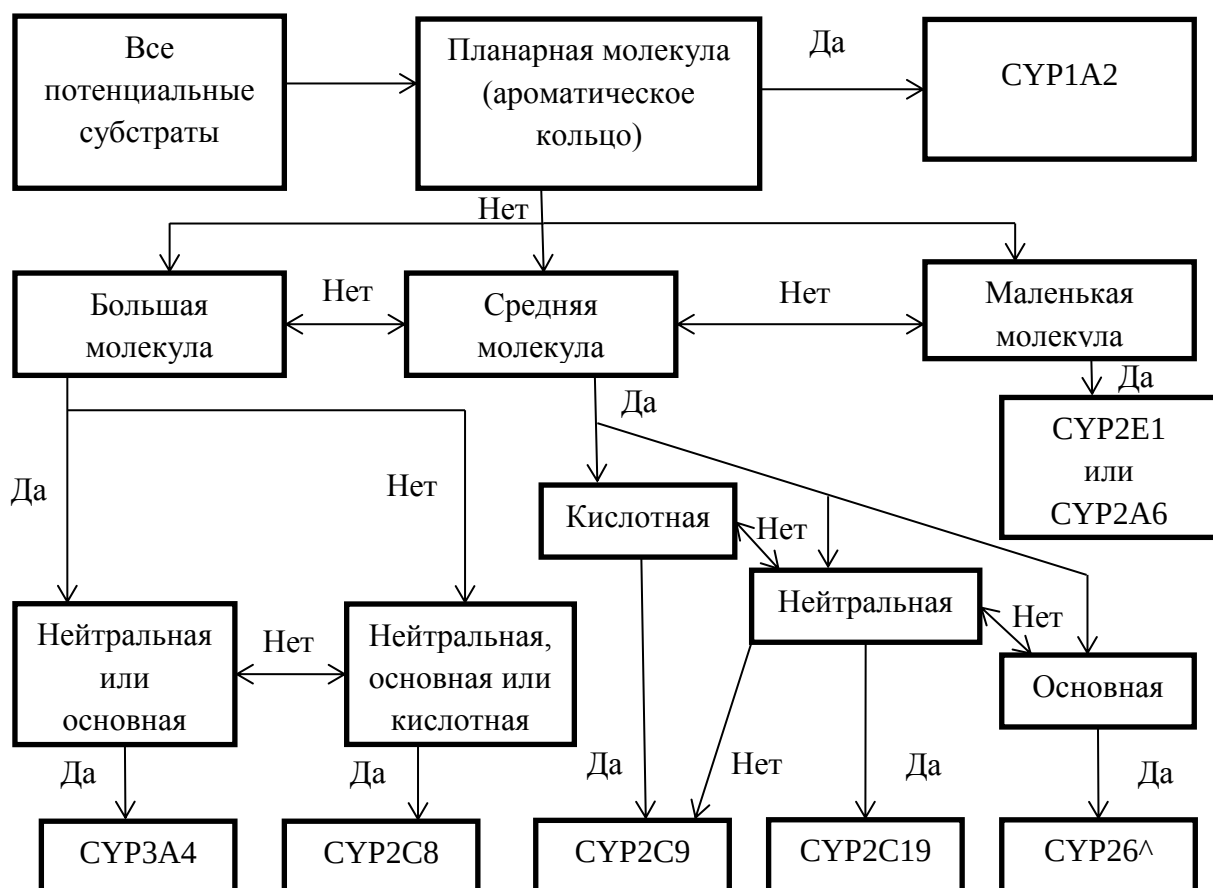


Рисунок 2 - Древо решений для прогнозирования селективности изофермента цитохрома P450.

На базе быстро развивающихся компьютерных технологий, ученые разрабатывают методы прогнозирования селективности изоферментов *in silico*. С помощью этих методов определяются участки, которые подвергаются метаболизму посредством цитохрома [101]. Разработано и валидировано компьютерное обеспечение, которое позволяет быстро обработать несколько сотен молекул потенциальных ЛС и выявить какие участки молекулы будут метаболизироваться, каким изоферментом, а также какие возможные метаболиты будут образовываться [26]. Данные, полученные *in silico*, облегчают дальнейшее изучение ЛС *in vitro* и *in vivo*.

Белки-переносчики эндогенных веществ и ЛС.

За последнее десятилетие наблюдается повышенный интерес к роли белков-переносчиков в распределении веществ в организме. На сегодняшний день

известно, что белки-переносчики могут играть ключевую роль в фармакокинетике ЛП. При ингибировании или индукции белков-переносчиков могут проявляться НЛР, снижение эффективности или межлекарственные взаимодействия [24, 93].

Белки-переносчики представлены различными семействами либо индивидуальными переносчиками (таблица 2).

Семейство	Генное семейство	Ген
ABC переносчики	Белок полирезистентности	MDR1/P - gp
		MRP1
		MRP2
		MRP3
		MRP4
	Экспортная помпа желчных солей	BSEP
	Белок резистентности рака молочной железы	BCRP
	Котранспортный белок натрия таурохолата	NTCP
Переносчики растворенных веществ	Олигопептидные переносчики	PEPT 1
		PEPT 2
	Органические анион-транспортирующие полипептиды	OATP - A/OATP1A2
		OATP - B/OATP2B1
		OATP - C/OATP1B1
		OATP8/OATP1B3
		OATP - D/OATP3A1
		OATP - E/OATP4A1
		OATP - F/OATP1C1
	Переносчики органических катионов	OCT1
		OCT2
		OCT3
	Новые переносчики органических катионов	OCTN1
		OCTN2
	Переносчики органических анионов	OAT1
		OAT2
		OAT3
		OAT4

Таблица 2 - Семейства белков-переносчиков.

Из всех белков-переносчиков, представленных в таблице 2, наиболее изучен гликопротеин-P. Ген MDR1 экспрессируется в различных тканях организма. Гликопротеин-P локализуется на внешней мембране энтероцитов, в клетках проксимальных почечных канальцев, желчных канальцев, на границе гематоэнцефалического барьера и т.д [53]. Гликопротеин-P выводит из клеток ксенобиотики обратно в кровоток или в почечные канальцы, тем самым защищая организм от экзогенных веществ. Поскольку экзогенными веществами являются и ЛП, гликопротеин-P обуславливает резистентность организма к ним и вносит большой вклад в их фармакокинетику.

Межлекарственные взаимодействия наблюдаются при ингибировании или индукции активности гликопротеина-P. Классическим примером такого взаимодействия выступают дигоксин и такие ингибиторы гликопротеина-P, как кинидин, кларитромицин или аторвастатин. При приеме этих ЛП происходит усиление эффекта дигоксина и повышается частота возникновения НЛР, поскольку гликопротеин-P не выводит дигоксин из организма. Проблема межлекарственных взаимодействий особенно остро стоит у лекарств с узким терапевтическим окном. К таким ЛП относятся, например, дигоксин, противоопухолевые препараты и иммуносупрессоры [83, 82].

При дальнейших исследованиях важной областью изучения остается понимание и предсказание межлекарственных взаимодействий, которые опосредованы белками-переносчиками. Несмотря на то, что в изучении механизмов регулирования белков-переносчиков было сделано много открытий, данная область также является перспективной.

1.2.Функциональные особенности и полиморфизм изофермента CYP 2D6

Среди десятков изоферментов цитохрома P450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент CYP 2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных средств. По данным различных исследований CYP 2D6 участвует в метаболизме от 15 до 25 % лекарств [11, 25, 31]. Изофермент в основном экспрессируется в

печени, но он так же локализуется в легких и сердце. Особенностью данного изофермента является его высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность активности, причиной которой является генетический полиморфизм. Такой полиморфизм может приводить к 30 – 40 кратной разнице в клиренсе препаратов, что приводит к выходу концентрации из терапевтического окна, как по нижней, так и по верхней границе [12]. Как следствие, такие различия в активности CYP 2D6 могут привести не только к серьезным НЛР (например, при антидепрессантной терапии), но также может наблюдаться отсутствие фармакологического эффекта (например, отсутствие анальгетического эффекта опиоидных препаратов).

Основываясь на проявлениях фенотипа, генотипы можно разделить на 3 подгруппы: «распространенные» (активные) метаболитаторы, «медленные» метаболитаторы и «сверхактивные» или «быстрые» метаболитаторы. У людей с «медленным» метаболизмом отсутствуют функциональные аллели, у «распространенных» 1 – 2 аллели, у «быстрых» более 2 аллелей. На сегодняшний день существуют различные фармакогенетические тесты для определения генотипа пациента. Методы генотипирования получили широкое применение, поскольку были определены гены, кодирующие последовательность аминокислот основных изоферментов печени. В соответствии с этой концепцией, врачи могли выбрать среди вариантов лечения ЛС и дозировки с наибольшей эффективностью и наименьшими побочными эффектами для пациента, которые основываются на его или ее генетическом профиле [12]. Однако текущий функциональный статус пациента (т.е. фенотип) может быть более значимым, чем его/ее генотип. Таким образом, применение персонализированной медицины требует понимания и рассмотрения вовлечения соответствующих негенетических факторов (включая окружающую среду и персональную изменчивость) в дополнение к генетическим факторам.

В настоящее время, исследователи все чаще отмечают такое явление, как модификационная (фенотипическая) изменчивость. При модификационной

изменчивости происходит изменение клинического ответа на ЛС под действием факторов окружающей среды, либо при сопутствующем приеме ЛС, которые являются субстратами (и/или ингибиторами, индукторами) соответствующих изоферментов [9]. Генотип при этом не меняется.

Крупномасштабное исследование по оценке модификационной изменчивости с выборкой из 900 пациентов, которых лечили от депрессии, провели *Sheldon H. Preskorn* и его коллеги [31]. На первом этапе исследования по результатам тестов генотипирования, пациенты были классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (35/900 или 3,9%) и «не медленных» (т.е. «распространенных», «быстрых» и «ультрабыстрых») метаболизаторов (865/900 или 96,1%). На втором этапе, после определения фенотипа пациентов, было получено, что к «медленным» метаболизаторам относится 243/900 или 27% пациентов, а к «не медленным» 657/900 или 73%. Таким образом, модификационная изменчивость до фенотипа «медленного» метаболизатора наблюдалась у 23% пациентов, обладающих генотипом «не медленного» метаболизатора. Эти результаты показывают, что методы генотипирования в клинической практике значительно недооценивают активность метаболизма у пациентов, которым назначают несколько препаратов. Они подчеркивают важное ограничение генотипирования: генотипирование устанавливает генетический потенциал индивида, но не обязательно функциональные возможности в любой момент времени.

Индивидуальная активность изоферментов при отсутствии ингибиторов или индукторов стабильна в течение жизни. Но активность изоферментов постоянно меняется под действием различных факторов, таких как ЛС (кинидин, рифампицин, оральные контрацептивы), а также алкоголь, курение, инфекции, еда. Таким образом, для определения точной картины ферментной активности и для подбора адекватной дозы ЛС нужно оценивать текущую активность изофермента цитохрома. Такую оценку дают методы фенотипирования, которые основаны на определении концентрации субстратов и их метаболитов.

В качестве примера возможно разобрать две широко используемые фармакологические группы:

1.2.1. β -блокаторы как субстрат CYP 2D6

β -блокаторы назначаются при лечении таких сердечно-сосудистых заболеваний, как артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и сердечная недостаточность. Поскольку данная группа ЛП обладает серьезными НЛР, следует точно подбирать дозу. К сожалению, вследствие назначения неправильной дозы ЛС (например, метопролола, бисопролола), часто происходит интоксикация с серьезными последствиями для организма пациента. Поскольку большинство β -блокаторов биотрансформируются под действием CYP 2D6, необходимо учитывать возможные изменения его активности.

Среди всех β -блокаторов, метопролол проявляет большее сродство к CYP 2D6 (около 70 – 80 % метаболизма) [79, 62]. У пациентов, которые регулярно принимают метопролол, наблюдается различная концентрация ЛС в плазме крови [87, 71]. После определения генотипов, было обнаружено, что концентрация ЛС у носителей гетерозиготной аллели CYP 2D6*10 (изофермент активен наполовину) значительно выше, чем у носителя гомозиготы с полной функциональностью. Антигипертонический эффект метопролола не коррелирует с концентрацией в плазме крови, но снижение частоты сердечных сокращений связано с концентрацией [23, 94]. У «медленных» метаболизаторов чаще возникает брадикардия по сравнению с «экстенсивными» метаболизаторами [46]. Таким образом, определение активности изофермента CYP 2D6 методами генотипирования или фенотипирования до начала терапии метопрололом может улучшить эффективность препарата и снизить частоту НЛР.

Бисопролол в меньшей степени метаболизируется изоферментом CYP 2D6, так как в его метаболизме еще участвует CYP3A4, а также около 50 % бисопролола выводится почками, не подвергаясь биотрансформации [47, 34]. Изменение концентрации бисопролола в плазме крови слабо коррелирует с активностью CYP 2D6. Однако есть случаи увеличения концентрации

бисопролола у носителей аллели CYP 2D6*10, при этом усиливался такой побочный эффект как брадикардия [87, 71]. При экспертизе клинического случая, в котором при неправильно назначенной дозе (10 мг вместо 1,35 мг) бисопролола от брадикардии погибла пациентка, было обнаружено, что концентрация бисопролола в плазме крови была более чем в 3 раза выше от теоритически возможной [50]. Поскольку у пациентки не было заболеваний почек, максимальная концентрация бисопролола после приема 2 таблеток по 5 мг в плазме крови должна была составить около 50 нг/мл. Но по экспериментальным данным концентрация составила 176 нг/мл. Затем, после проведения генотипирования было выявлено, что пациентка была носителем аллели CYP 2D6*10, что и привело к усилению побочного эффекта (брадикардии), который привел к летальному исходу.

1.2.2. Метаболизм антипсихотических ЛС с участием CYP 2D6

Концентрация ЛС, которые оказывают антипсихотическое действие, может меняться в зависимости от активности изофермента CYP 2D6, а также некоторые из них могут оказывать ингибирующее действие на метаболизм. Такими антипсихотическими препаратами являются хлорпромазин, галоперидол и тиоридазин. В нескольких исследованиях было показано, что у пациентов принимавших хлорпромазин наблюдалось снижение активности изофермента CYP 2D6. Также галоперидол, который широко применяется в клинической практике, ингибирует CYP 2D6 во время терапии. Было показано, что концентрация дебризокина, по которому определяли активность CYP 2D6, коррелирует с дозой галоперидола. Тиоридазин оказывает сильное ингибирующее действие на CYP 2D6. Рассмотренные препараты при назначении в комбинации с препаратами, которые являются субстратами CYP 2D6, усиливают их действие, что может привести к проявлению НЛР. [39]

К ЛС субстратам CYP 2D6 относятся клозапин и рисперидон. Роль CYP 2D6 в метаболизме клозапина спорна, но при одновременном назначением параксантина (ингибитора CYP 2D6), средние значения концентраций клозапина

и норклозапина значительно увеличивались, что указывает на значимую роль изофермента CYP 2D6 в биотрансформации клозапина. У пациентов, находящихся на монотерапии рисперидоном, было отмечено изменение концентрации рисперидона и отношения рисперидон/9-гидроксирисперидон, связанное с различиями в генотипах CYP 2D6. Также концентрация рисперидона повышалась после приема ингибитора CYP 2D6. [39]

1.2.3. Влияние заболеваний печени на активность CYP 2D6

Биотрансформация как экзогенных, так и эндогенных веществ в организме в значительной степени осуществляется печенью. Результаты исследований о влиянии заболеваний печени с различной тяжестью на активность изофермента CYP 2D6 не однозначны.

При исследовании пациентов с различной тяжестью заболеваний печени по сравнению с контрольной группой снижение активности CYP 2D6 было около 47 %, при этом очень сильное снижение активности наблюдали у пациентов с умеренно-тяжелыми заболеваниями печени. Активность изофермента CYP 2D6 при средней тяжести заболеваний печени не отличалась от контрольной группы. При компенсированном заболевании печени активность CYP 2D6 была такой же, как у контрольной группы, а при декомпенсированном – сравнима с умеренно-тяжелыми заболеваниями печени. Несмотря на то, что среднее снижение активности во всех группах достигает 47 %, у «медленных» метаболизаторов активность еще ниже.[43]

В другом исследовании активность CYP 2D6 у всех пациентов в среднем и по отдельности по группам не отличалась от контрольной группы. По результатам был сделан вывод, что активность не изменилась за счет изофермента CYP 2D6, который локализуется вне печени.[20]

Такие результаты двух исследований могут быть связаны с неоднородностью выборки контрольной и испытуемых групп по генотипу. Если в группах будет разное соотношение «быстрых», «медленных» и «умеренных» метаболизаторов, то результаты могут получиться либо завышенными, либо заниженными.

1.3. Методы определения активности CYP 2D6 (фенотипирование)

Субстратная специфичность определенных ферментов метаболизма ЛС позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путем измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче. На основании этих данных рассчитывается так называемый метаболический индекс или метаболическое отношение, равный отношению концентрации метаболита ЛС к концентрации нативного соединения [11]. При этом возможны следующие варианты:

- ⤴ Высокие значения концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови и, соответственно, низкий метаболический индекс, говорят о снижении активности фермента метаболизма.
- ⤴ Низкие значения концентрации «маркерного» субстрата и высокие значения концентрации его метаболита в плазме крови, и, соответственно, высокий метаболический индекс, говорят о повышении активности фермента метаболизма.
- ⤴ Низкие значения концентрации «маркерного» субстрата и низкие значения концентрации его метаболита в плазме крови говорят о нарушении всасывания ЛС, «метаболический» индекс при этом не меняется [11].

С фенотипирования начинается изучение метаболизма ЛС в клинике. Многолетние наблюдения за концентрациями большого количества ЛС в плазме крови (проведение терапевтического лекарственного мониторинга, исследования биоэквивалентности ЛС, определение биодоступности ЛС и др.) показали, что для значений фармакокинетических параметров ЛС характерен не только большой межиндивидуальный разброс, но и часто значительный внутрииндивидуальный разброс. Определение концентрации метаболитов ЛС наряду с самим ЛС

показало, что этот разброс в основном связан с различиями в скорости метаболизма [14].

Фенотипирование показало свою важность в различных клинических ситуациях. Так, например, изучение концентрации метаболита лидокаина после внутривенного введения позволило создать тест для оценки функции печени (MEGX-тест). Изучение динамики концентрации ЛС одновременно с их метаболитами позволяет определить, связано ли значительное отклонение концентрации ЛС в крови у пациента (от средних терапевтических значений) с изменениями на стадии всасывания лекарственного препарата или на стадии его метаболизма. В хронофармакологии изучение концентрации метаболитов ЛС позволяет ответить на вопрос, в какой степени изменение фармакологического эффекта после приема ЛС в различное время суток связано с изменением активности ферментов или функциональной активности органов и систем [14, 17, 66, 91].

Фенотипирование ферментов метаболизма в США стало инструментом экспертизы новых ЛС на предмет их возможного фармакокинетического взаимодействия с другими ЛС на уровне метаболизма. Так, уже созданы и функционируют рекомендации FDA по изучению влияния новых ЛС на активность ферментов метаболизма *in vitro* и *in vivo* [66, 91].

В зависимости от субстрата методы определения активности изоферментов можно разделить на две группы: инвазивные и неинвазивные.

В инвазивных методах ЛС, являющееся маркерным субстратом, вводится перорально или внутривенно далее через определенное время в крови или сыворотке определяют концентрацию метаболита маркерного субстрата, а в некоторых случаях – и самого ЛС.

Инвазивные методы определения активности изофермента имеют ряд неизбежных выраженных недостатков. В качестве примеров можно привести необходимость внутривенного введения препаратов, применение которых сопряжено с риском развития НЛР, прежде всего – аллергических реакций и

аритмогенных эффектов; необходимость, как минимум, двукратного забора крови из вены; тестирование может проводиться только в условиях лечебно-профилактического учреждения. В некоторых случаях методы могут обладать недостаточной специфичностью. Например, в настоящее время известно, что MEGX может образовываться из лидокаина под влиянием не только CYP 3A4, но и в незначительных количествах CYP 1A2, а значит, данный тест отражает суммарную активность этих 2 изоферментов цитохрома P450.

Метаболический индекс субстрата к его метаболиту рассчитывается после количественного определения обоих соединения при помощи соответствующего аналитического метода, такого как, высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) или жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометром (LC MS/MS).

Для определения активности изофермента CYP 2D6 определяется метаболический индекс специфичных веществ, в метаболизме которых не участвуют другие изоферменты. На сегодняшний день разработаны методики количественного определения ЛС дебризохина, спартеина, трамадола, метопролола и декстрометорфана методом ВЭЖХ с УФ детектором (таблица 3).

Субстрат	Метаболит	Доза, мг	Биообъект	Статус ЛС в РФ	Исследования
Дебризохин	4-гидрокси-дебризохин	10	Моча	Не зарегистрировано	[25, 32, 33, 38, 44, 85]
Спартеин	2-дегидро-спартеин, 5-дегидро-спартеин	100	Моча	Не зарегистрировано	[25, 45, 76, 81, 85]
Трамадол	моно-О-дезметил-трамадол (M1)	50	Моча	Зарегистрировано	[76, 77, 86]
Метопролол	α -гидрокси-метопролол	100	Кровь	Зарегистрировано	[25, 27, 57, 60, 74, 85]
Декстро-меторфан	декстрофан	30	Кровь, моча, слюна	Зарегистрировано в комбинации с другими ЛС	[25, 60, 85, 88, 69]

Таблица 3 - Сводная таблица основных методов фенотипирования CYP 2D6.

1.3.1. Количественное определение дебризохина и спартеина

Дебризохин и спартеин были первыми субстратами, с помощью которых стало возможным оценить большие различия в окислительном полиморфизме CYP 2D6 [38]. Дебризохин применялся для лечения повышенного кровяного давления, а спартеин как антиаритмическое средство. Эти соединения используются для фенотипирования с 1970-х годов, и их метаболические индексы показали высокую степень корреляции. Метаболитом дебризохина является 4-гидроксидебризохин, который количественно определяется в моче. Оптимальная средняя доза, которая применяется для фенотипирования, составляет 10 мг. Преимуществом применения дебризохина является высокое значение pK_a и полярность, благодаря которым pH мочи сильно не влияет на метаболический индекс. Недостаток заключается в том, что в биотрансформации дебризохина участвует не только CYP 2D6, но и CYP 1A1 [44]. Тем не менее, CYP 1A1 обеспечивает не более 2 % метаболизма дебризохина. Также, весомым недостатком является снижение артериального давления при использовании дебризохина. Еще стоит отметить, что на территории Российской Федерации ЛС дебризохин не зарегистрирован.

Метаболит спартеина 2-дегидроспартеин и 5-дегидроспартеин также обнаруживается в моче. Под действием CYP 2D6 спартеин биотрансформируется до неустойчивого N1-оксида, который в дальнейшем распадается на 2- и 5-дегидроспартеин. Доза в 100 мг при фенотипировании соответствует только 10 % от рекомендованной для антиаритмической терапии, так что никакого фармакологического эффекта не наблюдается [81]. Также нет ограничений для применения спартеина у пациентов с почечной недостаточностью, так как не образуются глюкуроновые формы и «метаболический» индекс спартеин/дегидроспартеин остается неизменным с низкой почечной функцией. При проведении фенотипирования с применением спартеина могут возникнуть НЛР в виде аллергии. Данное ЛС также не зарегистрировано на территории РФ.

1.3.2. Количественное определение трамадола

Анальгетическое действие трамадола главным образом обусловлено его метаболитом М1, у которого сродство к μ -рецептору в 200 раз выше, чем у самого препарата. Известно, что М1 образуется благодаря изоферменту CYP 2D6 [76]. Например, при применении трамадола с пароксантином (ингибитор CYP 2D6) наблюдается уменьшение анальгетического действия, так как активность изофермента снижена [77].

При изучении фармакокинетики трамадола путем сравнения метаболических индексов трамадола/М1 к декстрометорфану/декстрорфану наблюдалась слабая корреляция. В дальнейшем исследовании было обнаружено, что в метаболизме трамадола помимо изофермента CYP 2D6, также участвуют CYP2B6 и CYP2C19, и для достижения хороших результатов увеличивают дозу, что приводит к более частому проявлению НЛР. Трамадол относится к наркотическим ЛС, что также затрудняет применение его в анализах. Таким образом, применение трамадола в фенотипировании ограничено.

1.3.3. Количественное определение метопролола

Основными путями метаболизма метопролола являются О-деметилование, α -гидроксилирование и N-деалкилирование. Для фенотипирования CYP 2D6 достаточно 100 мг, около 70-80 % метаболизма приходится на α -гидроксилирование и небольшой процент на О-деметилование [57]. Различными исследованиями доказано, что α -гидроксилирование происходит только за счет CYP 2D6, в то время как в О-деметилировании могут участвовать и другие изоферменты.

При определении в моче отношения метопролола к α -гидроксиметопрололу наблюдается корреляция между рН и метаболическим индексом [27]. Таким образом, фенотипирование с метопрололом в моче неубедительно.

Следующее исследование, в котором после приема декстрометорфана (22 мг) или метопролола (100 мг) с дальнейшим отбором крови в течение 8 часов,

показало хорошую корреляцию между индексом метопролол/ α -гидроксиметопролол и декстрометорфан/декстрофан.

В целях фенотипирования метопролол может применяться только при определении в плазме крови. Также недостатком этого метода является то, что метопролол снижает давление.

1.3.4. Количественное определение декстрометорфана

Декстрометорфан является антагонистом опиоидных рецепторов, применяется в качестве противокашлевого и обезболивающего препарата. Благодаря своей безопасности, средним НЛР, декстрометорфан хорошо изучен в качестве маркера для определения активности CYP 2D6. К сожалению, в государственном реестре лекарственных средств РФ декстрометорфан представлен только в комбинации с другими ЛС, следовательно, в нашей стране декстрометорфан недоступен.

Декстрометорфан преимущественно метаболизируется при участии цитохрома CYP 2D6 в декстрофан путём О-деметилирования [69]. Другие изоферменты, такие как CYP 3A4, CYP 3A5, CYP 3A7, CYP 2C9, CYP 2C19, катализируют превращение декстрометорфана в неактивный 3-метоксиморфинан. Декстрофан и 3-метоксиморфинан деметируются в гидроксиморфинан. Все образующиеся метаболиты экскретируются с мочой, в основном в виде глюкуронидов [25, 85].

На сегодняшний день разработано много методик по определению активности, используя в качестве маркерного субстрата декстрометорфан, при этом в качестве пробы можно отбирать различные биологические жидкости: мочу, кровь и слюну. Такие методики имеют множество достоинств по сравнению с рассмотренными выше, но поскольку методики инвазивные, могут развиваться НЛР, а также стоит учитывать индивидуальную непереносимость ЛС. Учитывая, что на территории РФ декстрометорфан представлен только в виде комбинаций с другими лекарственными средствами, его не получится применить для фенотипирования изофермента CYP 2D6.

1.4. Определение активности CYP2D6 по отношению пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин

Для фенотипирования изофермента CYP 2D6 были разработаны и валидированы различные методики. Оригинальные тесты с дебризохином и спартеином постепенно заменились клинически более надежными тестами с декстрометорфаном и метопрололом. Затем соперничество между методами фенотипирования отошло на второй план, так как стали быстро внедряться методы генотипирования, основанные на ДНК. Несмотря на развитие ПЦР за последние десять лет, остается проблема прогнозирования фенотипа CYP 2D6 из методов генотипирования, основанных на ДНК. Современные методы фенотипирования по определению экзогенных «маркеров» могут приводить к развитию НЛР. Также нужно учитывать, что на территории РФ из всех возможных субстратов зарегистрированы только 2 ЛС: трамадол и метопролол. Возможно, что поиск эндогенных субстратов для CYP 2D6 будет интересен не только для расширения знаний о работе изоферментов цитохрома, но и обретет и практическое значение для новой методики фенотипирования, которой не будут присущи недостатки ранее разработанных методик [15, 16].

1.4.1 Скрининг эндогенных субстратов CYP 2D6

Проводится много исследований по поиску эндогенных веществ, которые метаболизируются только одним изоферментом. Широкое исследование провел *Ai-Ming Yu* с коллегами по поиску эндогенных веществ, специфичных изоферменту CYP 2D6. В своем исследовании ученые рассмотрели ряд эндогенных веществ потенциально являющиеся специфическими субстратами для CYP 2D6. Было установлено, что изофермент CYP 2D6 не значительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, синефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамиин, серотонин, 6-метокситриптамиин и мелатонин) и β -карболины (гарман, норгарман и триптолин). Однако, индолметиламин 5-метокси-N,N-диметилтриптамиин и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин) показали относительно высокое сродство

к CYP 2D6 и О-деметиловались только под действием CYP 2D6. При добавлении к исходным веществам моноклональных антител против CYP 2D6, О-деметилирование 5-метокси-N,N-диметилтриптамина и пинолина не наблюдалось. Специфичность пинолина по отношению к CYP 2D6 составляет около 99 % относительно других изоферментов цитохрома P450.

Пинолин подвергается О-деметилированию с образованием метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина (рис. 3).

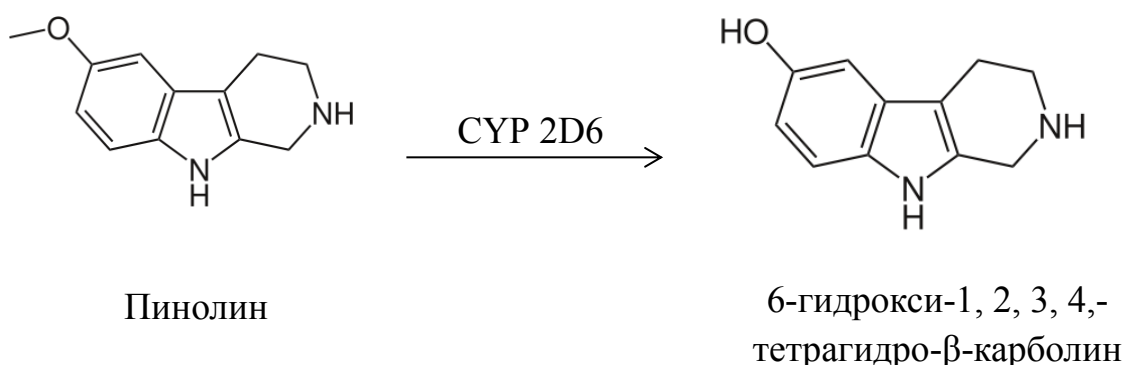


Рисунок 3 - Метаболизм пинолина посредством изофермента CYP 2D6.

1.4.2. Физические, химические и биохимические свойства пинолина

Химическое название пинолина – 6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин. Молекулярная масса составляет 202,26 г/моль. Температура плавления от 216 до 224 °С. Соединение проявляет основные свойства, значение pKa составляет 9,04. Коэффициент липофильности LogP = 1,25. Умеренно растворим в воде (1 : 35).

Пинолин (от лат. *pineale* - шишковидный) является эндогенным соединением и находится в мозгу млекопитающих и других тканях (например, сетчатка) с широким диапазоном концентраций от 2 нг/г до 21 мкг/г [11, 75]. Также пинолин встречается в растениях, например, среди β-карболинов в составе *Peganum harmala* [78]. По химической структуре пинолин относится к 1,2,3,4-тетрагидро-β-карболинам с метоксильным заместителем в положении 6 (рис. 4).

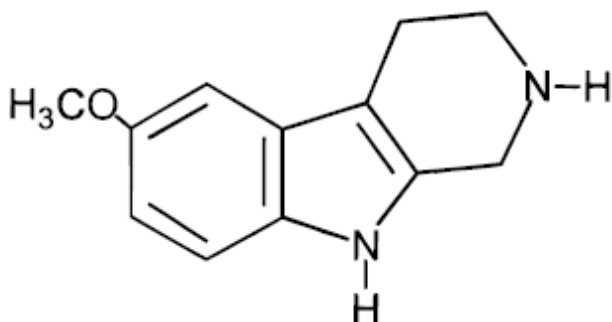


Рисунок 4. Химическая структура пинолина.

Как и весь класс β -карболинов, пинолин привлекает пристальное внимание исследователей, поскольку он участвует в разнообразных биохимических реакциях, которые могут найти практической применение в медицине и фармацевтике. Пинолин является метаболитом мелатонина, и оба вещества проявляют схожие свойства, поскольку в их структуре лежит индольное ядро. По данным исследования [75] пинолин наряду с мелатонином нейтрализует свободные радикалы и тем самым, препятствует развитию окислительного стресса. Головной мозг содержит большое количество полиненасыщенных жирных кислот, которые легко подвергаются свободнорадикальному окислению. Мелатонин и пинолин защищают ткани мозга от свободных радикалов и участвуют в поддержании баланса между появлением свободных радикалов и защитной системой.

Было показано [75], что пинолин ингибирует моноаминоксидазу А и обратный захват серотонина. Подобно антидепрессантам, пинолин может увеличивать количество серотониновых рецепторов и проявлять фармакологические эффекты серотонинэргических ЛС. Из исследования по сравнению пинолина, имипрамина гидрохлорида и амитриптилина в поведенческих тестах на крысах [75] был сделан вывод, что действие пинолина схоже с препаратами сравнения и в дальнейшем это вещество может рассматриваться как потенциальный антидепрессант.

Хорошо известно, что некоторые имидазолиновые соединения могут стимулировать выработку инсулина посредством активации I_3 имидазолиновых

рецепторов β -клеток поджелудочной железы. Основываясь на данных, что производные β -карболина активируют рецепторы I_1 и I_2 в мозгу, J. Соорер с коллегами [30] проверили гипотезу, что гарман и пинолин могут связываться с рецепторами I_3 поджелудочной железы. По данным исследования гарман и пинолин повышают секрецию инсулина. С повышением доз было замечено и повышение секреции инсулина, то есть эффект является дозозависимым. Таким образом, производные β -карболина, в том числе и пинолин, могут рассматриваться в качестве препаратов, повышающих секрецию инсулина.

1.4.3. Существующие методики определения пинолина

1.4.3.1. Определение *ex vivo*

Как сообщалось ранее, эндогенное вещество пинолин подвергается О-деметилованию микросомами печени и его биотрансформация преимущественно катализируется изоферментом цитохрома P450 CYP 2D6. Исследователи отделения фармацевтических наук университета в Баффало (США) изучили, как влияет статус изофермента CYP 2D6 на О-деметилирование пинолина и оценили, может ли пинолин применяться для определения активности CYP 2D6. Также исследовали функциональные различия между аллельными изоформами CYP 2D6.1, CYP 2D6.2, CYP 2D6.10. Затем проводились исследование кинетики, ингибирования и корреляции для определения роли CYP 2D6 в биотрансформации пинолина.

Инкубация аллельных изоформ CYP 2D6 и человеческих печеночных микросом проводилась в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, 37 °C [51, 42]. В среду вносили микросомальные протеины в концентрации 0,25 мг/мл, 0,2 μ M P450 редуктазу и 10 мкг L- α -дилаурилфосфатидилхолин. Активация реакции производилась при добавлении никотинамида аденин динуклеотид фосфата. Кинетика определялась по добавлению пинолина в концентрации от 0,2 до 20 μ M для изоформ и от 0,05 до 100 μ M для человеческих печеночных микросом. Время инкубации составило 5 минут для CYP 2D6.1 и CYP 2D6.2, 15 минут для CYP

2D6.10 и 10 минут для человеческих печеночных микросом. В качестве ингибитора использовали кинидин в концентрации 1 μM .

Количественное определение проводили методом ВЭЖХ. Хроматографические условия были следующие:

Хроматограф Agilent 1100 series

Колонка Zorbax фенил, 5 мкм, 250 мм X 4,6 мм

Подвижная фаза 50 mM аммоний фосфатный буфер (pH = 3) : ацетонитрил (95/5 об/об)

Детектор ДМД (214, 254, 280 нм)

Температура колонки 40 °C

Исследования показали, что аллельная изоформа CYP 2D6.10 (изоформа со сниженной функцией) не активна по отношению к пинолину. В то время, как под действием CYP 2D6.1 и CYP 2D6.2 (изоформы с нормальной функцией) происходило образование 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина. По сравнению с CYP 2D6.1, у изоформы CYP 2D6.2 каталитическая активность ниже. Затем, при добавлении ингибитора CYP 2D6 хинидина наблюдали полную блокировку О-деметилования пинолина, что указывает на селективность изофермента к субстрату.

1.4.3.1. Определение *in vivo*

Дальнейшее исследование *in vivo* на мышах проводилось с целью подтверждения результатов *ex vivo* и, чтобы сравнить активность изофермента CYP 2D6 у мышей дикого типа и Tg-CYP 2D6.

Для анализа были выбраны взрослые мыши (7 недель) дикого типа и Tg-CYP 2D6, средний вес 22 – 25 г. Пинолин вводился интраперитонеально в дозе около 750 мкг. В качестве пробы отбиралась моча через 24 ч после введения пинолина.

Количественное определение проводилось методом LC-MS/MS. Хроматографические условия были следующие:

Хроматограф Shimadzu prominence HPLC system

Детектор API 3000 turbo ionspray ionization triple-quadrupole mass spectrometer

Колонка Luna фенил-гексил (50 X 4,6 мм, 3 мкм)

Подвижная фаза буфер А (водный раствор муравьиной кислоты 0,02 %) буфер В (метанольный раствор муравьиной кислоты 0,02%). Хроматографирование проходило в градиентном режиме с повышением соотношения буфера В от 5 до 80 % до 9 минуты, затем устанавливался изократический режим на 2 минуты (буфер В 80 %) и с 11,5 до 15 минуты концентрация буфера В устанавливалась на 5 %.

Скорость потока 0,3 мл/мин.

Анализ подтвердил результаты *ex vivo* испытания. По результатам был сделан вывод, что у мышей О-деметилование проходит под действием CYP 2D6. Около 99 % метаболита пинолина выводится из организма с мочой, следовательно, в качестве пробы можно использовать этот биообъект. У мышей дикого типа активность CYP 2D6 была выше, чем у Tg-CYP 2D6.

		Подтип генотипа	Активность изофермента
<i>Ex vivo</i>	Человеческие печеночные микросомы	«распространенные» метаболизаторы	Средняя
	Аллельные изоформы: CYP 2D6.1 CYP 2D6.2 CYP 2D6.10	«распространенные» метаболизаторы «медленные» метаболизаторы	Средняя Ниже среднего Нет

<i>In vivo</i>	Мыши дикого типа	«распространенные» метаболизаторы	Средняя
	Мыши Tg-CYP 2D6	«медленные» метаболизаторы	Низкая

Таблица 4 - Сводная таблица существующих методов количественного определения пинолина *ex vivo* и *in vivo* [51]

Логичным продолжением рассмотренного исследования будет изучение по определению эндогенного пинолина в моче у человека для оценки активности изофермента цитохрома P450 CYP 2D6. У такой методики определения активности CYP 2D6 не будет недостатков, присущих методикам с применением экзогенных веществ, которые могут оказывать гипотензивное, антиаритмическое действия, а также могут вызывать аллергические реакции.

1.5. Метод ВЭЖХ-МС/МС

Высокоэффективная жидкостная хроматография – метод колоночной хроматографии, в котором жидкая подвижная фаза под высоким давлением подается в колонку, заполненную сорбентом (неподвижной фазой) [10]. Метод ВЭЖХ широко применяется в фармакопейном анализе для качественного и количественного анализа. В биоаналитических методиках ВЭЖХ также успешно используется как при анализе ЛС и метаболитов, ксенобиотиков, так и эндогенных веществ [18].

В качестве детекторов в зависимости от требуемой чувствительности и селективности применяются спектрофотометрические, флуориметрические, рефрактометрические, кондуктометрические, масс-спектрометрические детекторы и т. д. [13]. Поскольку в биоаналитических методиках требуется высокая селективность и чувствительность, зачастую в качестве детектора выбирают масс-спектрометрический детектор.

Масс-спектрометрия - это физический метод измерения отношения массы заряженных частиц материи (ионов) к их заряду. Существенное отличие масс-

спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что оптические, рентгеновские и некоторые другие методы детектируют излучение или поглощение энергии молекулами или атомами, а масс-спектрометрия имеет дело с самими частицами вещества. Масс-спектрометрия измеряет соотношение массы к заряду. Для этого используются законы движения заряженных частиц материи в магнитном или электрическом поле. [13]

Для того, чтобы ионизировать органическое вещество его нужно сначала из конденсированной фазы перевести в газовую. Затем, молекулы подвергаются бомбардировке пучком электронов с образованием положительно заряженных ионов. Также существуют и другие методы ионизации.

На следующем этапе происходит сортировка ионов по отношению массы к заряду (m/z) в масс-анализаторе. Поскольку в разработанной методике применялся тандемный масс-спектрометрический детектор с тройным квадруполем, то более подробно будет рассмотрен масс-анализатор квадруполь со сравнением с тройным квадруполем.

Квадруполь представляет собой 4 стержня, к которым попарно в противоположной полярности подается определенная комбинация постоянного и радиочастотного переменного напряжения [21]. Ионы, влетающие в анализатор через отверстие (1) попадают в гиперболическое поле, в котором в зависимости от отношения m/z происходит отсеивание некоторых ионов (3), оставшиеся ионы вылетают через отверстие (2) (рис. 5)

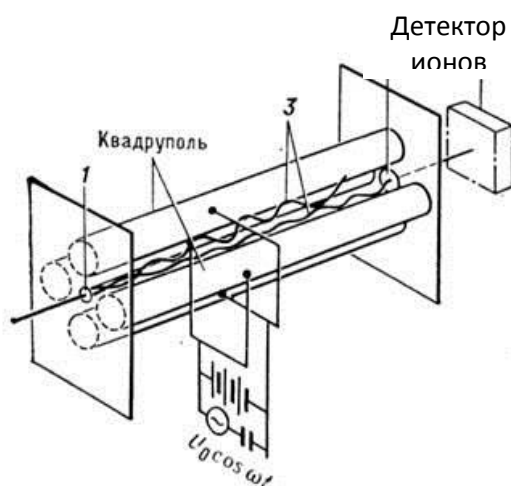


Рисунок 5 - Масс-анализатор квадруполь.

Тандемный масс-спектрометр (тройной квадруполь) состоит из двух квадруполей, соединенных октопольной реакционной ячейкой. В первый квадруполь попадают ионизированные молекулы, и происходит отсеивание части ионов, затем в октопольной реакционной ячейке проводится повторная ионизация и полученные молекулы попадают во второй квадруполь, где снова отсеивается часть ионов. Оставшиеся ионизированные молекулы попадают в детектор. На рисунке 6 приведено сравнение проведения анализа на квадруполе и на тройном квадруполе [21].

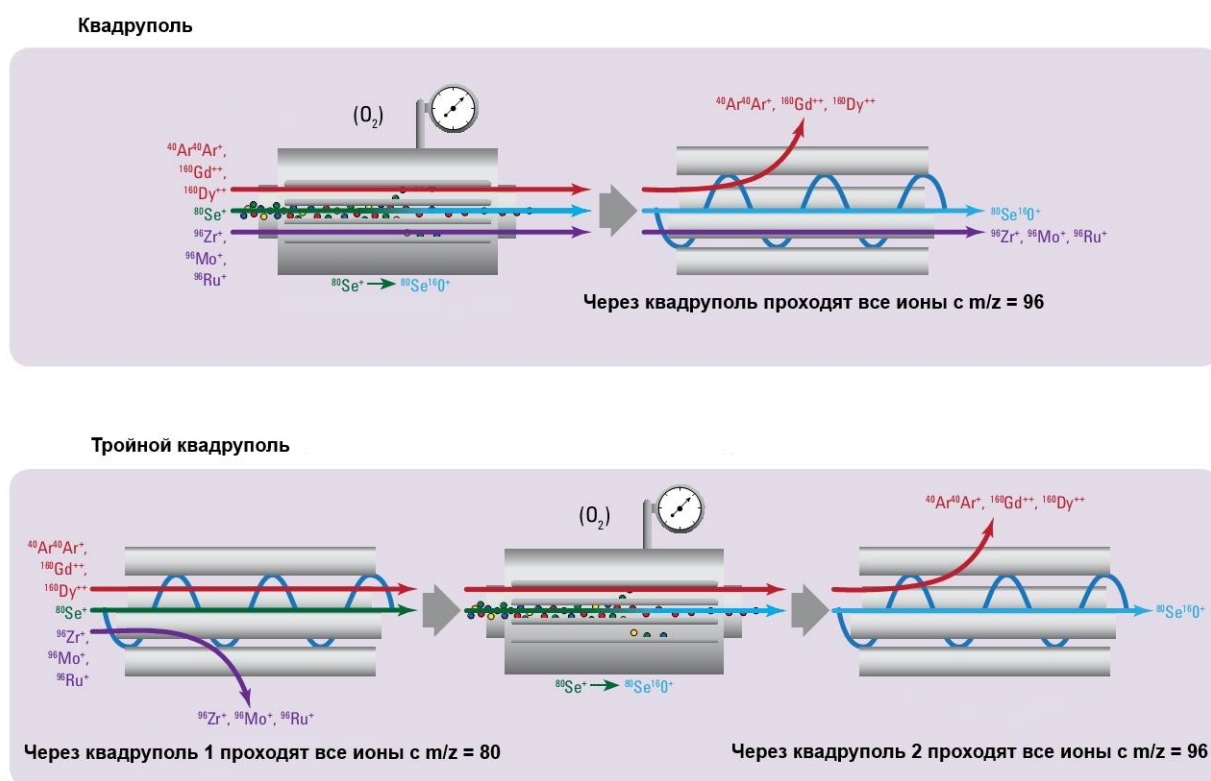


Рисунок 6 - Проведение анализа на квадруполе и тройном квадруполе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ)

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Оборудование и материалы

2.1.1. Материалы

2.1.1.1. Стандарты определяемых веществ

- стандартный образец пинолина (Sigma-Aldrich кат. № 371858);
- стандартный образец 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина (Auroga Fine Chemicals кат. № A06.795.158);
- стандартный образец галантамина гидробромида (Sigma-Aldrich кат. № Y0001279).

2.1.1.2. Биологическая матрица

Биологическая матрица для приготовления калибровочных образцов и образцов контроля качества – плазма крови человека и моча.

2.1.1.3. Реактивы

- ацетонитрил (supergradient, Scharlau, Испания);
- спирт метиловый (extra pure, Scharlau, Испания);
- муравьиная кислота (for LC-MS, Merck Millipore, США);
- аммония формиат (for LC-MS, Merck Millipore, США);
- этилацетат (extra pure, Scharlau, Испания);
- деионизированная вода, электрическое сопротивление 18,2 Мом*см, Millipore simplicity UV (Merck-Millipore, США);
- триэтиламин (reagent grade, Scharlau, Испания);
- натрия тетраборат (extra pure, Scharlau, Испания);
- борная кислота (extra pure, Scharlau, Испания).

2.1.2. Оборудование

- жидкостной хроматограф Agilent 1290 Infinity оснащенный градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, трехквадрупольным масс-селективным детектором Agilent 6460, США;

- предколонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936)
- колонка Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм (кат. № 959758-902K)
- картридж Chromabond® C18 для ТФЭ, США
- весы аналитические ES 225 SMDR, Швейцария;
- pH-метр Seven Multi, Mettler Toledo, Швейцария;
- центрифуга Eppendorf 5415D, Германия;
- встряхиватель типа вортекс ELMi, Латвия;
- концентратор Eppendorf Concentrator plus, Германия;
- дозаторы переменного объема Eppendorf 10 – 100 мкл и 100 – 1000 мкл, Германия;
- холодильник Indesit, SD 125, Россия;
- морозильник для плазмы Sanyo, Япония;
- система водоподготовки Micropure, ThermoScientific, США.

2.2. Разработанная методика

Хроматограф: Agilent 1290 Infinity;

Предколонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936);

Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм (кат. № 959758-902K);

Температура колонки: (50 ± 1) °C;

Скорость потока: 0,4 мл/мин;

Детектирование: МС/МС, MRM-переходы для пинолина $203,2 \text{ m/z} \rightarrow 174,0 \text{ m/z}$, для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина $189,2 \text{ m/z} \rightarrow 160,0 \text{ m/z}$, для галантамина $288,3 \text{ m/z} \rightarrow 213,0 \text{ m/z}$;

Метод ионизации: электроспрей (ESI) в положительной полярности;

Объем пробы: 5 мкл.

Ориентировочные времена удерживания в плазме крови:

- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин;
- пинолин – около 5,0 мин;
- галантамин – около 2,4 мин.

Ориентировочные времена удерживания в моче:

- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин;
- пинолин – около 5,0 мин;
- галантамин – около 2,4 мин.

Время хроматографирования: 14 мин

Подвижная фаза:

Элюент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01 % муравьиной кислоты в воде.

Элюент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Методика

Стабилизируют систему ВЭЖХ в условиях начального градиента (элюент А : элюент В = 95 % : 5 %) в течение 15 мин.

Градиентная программа:

Время, мин	Элюент А, % (об/об)	Элюент В, % (об/об)
0	95	5
1,5	95	5
2	70	30
8,5	40	60
12	95	5
14	95	5

2.3. Дизайн фармакологической части

В исследовании принимали участие 20 мужчин (средний возраст — $39,5 \pm 9,5$ года), страдающих алкогольной зависимостью и находящихся на стационарном лечении в ГБУЗ «МНПЦ наркологии ДЗМ». В период актуализации патологического влечения пациенты получали галоперидол в таблетированной форме (ООО «Озон», Россия) в дозировке $5,00 \pm 1,87$ мг/сут (9 пациентов, однократный прием) и в инъекционной форме (ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А», Россия) в

дозировке $5,86 \pm 2,39$ мг/сут (11 пациентов, однократный прием). Критерии включения в исследование: терапия, содержащая галоперидол длительностью 5 дней; пероральная и внутримышечная формы введения галоперидола; отсутствие в анамнезе сопутствующего психического заболевания. Критерии исключения: применение в терапии иных антипсихотических препаратов, помимо галоперидола; клиренс креатинина < 50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению галоперидола.

.

ГЛАВА 3. ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Разработка методики количественного определения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина

3.1.1. Выбор внутреннего стандарта

Для выбора внутреннего стандарта обычно руководствуются следующими принципами:

- Внутренний стандарт должен хорошо смешиваться в тех растворителях, из которых состоит анализируемая проба, также стандартное вещество должно быть инертно по отношению к компонентам пробы и подвижной фазе.
- Пик внутреннего стандарта на хроматограмме должен располагаться рядом с исследуемыми веществами, но при этом не должен накладываться на них.
- Стандартный образец внутреннего стандарта не должен содержать примеси, которые могут накладываться на анализируемые пики.

Внутренний стандарт подбирали с учетом структурной формулы, молекулярной массы и значением pK_a . Молекулярная масса и значение pK_a для пинолина составляют 203 г/моль и 9,04, $\text{LogP} = 1,25$. В качестве внутреннего стандарта был подобран галантамин с молекулярной массой 288 г/моль и значение pK_a 8,94, $\text{LogP} = 1,75$, структурная формула представлена на рисунке 7. При дальнейшем исследовании было установлено, что галантамин по всем требованиям подходит в качестве внутреннего стандарта при определении пинолина и его метаболита [5].

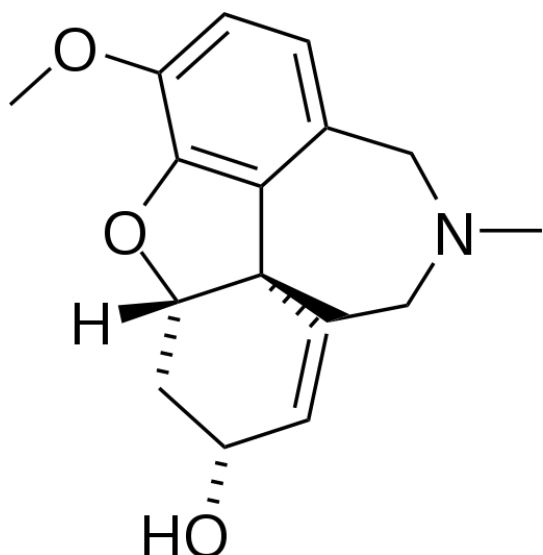


Рисунок 7 - Внутренний стандарт галантамин.

3.1.2. Пробоподготовка

3.1.2.1. Отбор проб. Пробоподготовка

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

Вот несколько общих правил, которым необходимо следовать для правильного отбора проб:

1. отбор проб должен производиться обученным и квалифицированными людьми;
2. отбор каждой пробы должен происходить отдельно;
3. приборы для отбора проб должны гарантировать отсутствие загрязнения;
4. отобранные пробы должны храниться соответствующим образом.

В качестве проб берут биообъекты — кровь и мочу. Перед экстракцией кровь центрифугируют, и для дальнейшего анализа отбирают плазму.

Правильная подготовка пробы является одним из самых главных моментов при проведении анализа. Как правило, пробоподготовка состоит из нескольких этапов: экстракция вещества из пробы и химическая обработка (дериватизация), позволяющая перевести исследуемое вещество в форму, более подходящую для анализа.

3.1.2.2. Пробоподготовка плазмы крови

Для экстракции пинолина и его метаболита были проведены несколько вариантов пробоподготовки плазмы. Пробоподготовку проводили на сериях подготовленных проб с известным содержанием исследуемых веществ и внутреннего стандарта.

Приготовление интактной плазмы. К 1000 мкл плазмы прибавляли 400 мкл боратного буфера pH 9,6 и 2000 мкл этилацетата. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. В качестве интактной плазмы отбирали нижний слой.

Пробоподготовка 1.

К 400 мкл пробы (интактной плазмы) (табл. 5) прибавляли 1200 мкл ацетонитрила для осаждения белков. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость и проводили выпаривание до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 1 % растворе муравьиной кислоты в воде.

№ пробы	Пинолин	Метаболит	Галантамин	Объем пробы (интактная плазма)
1.1	100 пг/мл	100 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
1.2	500 пг/мл	500 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
1.3	1000 пг/мл	1000 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
1.4	529 нг/мл	538 нг/мл	492 нг/мл	400 мкл
1.5 (плазма)	0	0	0	400 мкл

Таблица 5 - Концентрации стандартных веществ в пробе для пробоподготовки 1.

Пробоподготовка 2.

К 400 мкл пробы (интактной плазмы) (табл. 6) прибавляли 400 мкл ацетонитрила для осаждения белков. Также ацетонитрил является экстрагентом. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем

центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость на анализ.

№ пробы	Пиолин	Метаболит	Галантамин	Объем пробы (интактная плазма)
2.1	100 пг/мл	100 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
2.2	500 пг/мл	500 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
2.3	1000 пг/мл	1000 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
2.4	529 нг/мл	538 нг/мл	492 нг/мл	400 мкл
2.5 (плазма)	0	0	0	400 мкл

Таблица 6 - Концентрации стандартных веществ в пробе для пробоподготовки 2.

Пробоподготовка 3.

К 400 мкл пробы (интактной плазмы) (табл. 7) прибавляли 200 мкл боратного буфера pH 9,6 и 1000 мкл этилацетата. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. Отбирали надосадочную жидкость и проводили выпаривание до сухого остатка. Сухой остаток растворяли в 100 мкл 1 % растворе муравьиной кислоты в воде.

№ пробы	Пиолин	Метаболит	Галантамин	Объем пробы (интактная плазма)
3.1	100 пг/мл	100 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
3.2	500 пг/мл	500 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
3.3	1000 пг/мл	1000 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
3.4	529 нг/мл	538 нг/мл	492 нг/мл	400 мкл
3.5	0	0	0	400 мкл

Таблица 7 - Концентрации стандартных веществ в пробе для пробоподготовки 3.

Пробоподготовка 4.

Перед внесением пробы (интактная плазма) (табл. 8.) в картридж C18 для ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному насосу, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера pH 9,6.

В активированный картридж вносили 400 мкл пробы разбавленной 400 мкл физиологического раствора, затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл смеси ацетонитрил : вода (10 : 90), элюирование проводили 0,5 мл 0,1 % раствором триэтиламина в метаноле. Полученный элюат выпаривали до сухого остатка и растворяли 100 мкл 1 % муравьиной к-ты в воде.

№ пробы	Пиолин	Метаболит	Галантамин	Объем пробы (интактная плазма)
4.1	100 пг/мл	100 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
4.2	500 пг/мл	500 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
4.3	1000 пг/мл	1000 пг/мл	20 нг/мл	400 мкл
4.4	529 нг/мл	538 нг/мл	492 нг/мл	400 мкл
4.5	0	0	0	400 мкл

Таблица 8. Концентрации стандартных веществ в пробе для пробоподготовки 4.

3.1.2.3. Пробоподготовка мочи

Образцы чистой и исследуемой мочи хранили в морозильнике для плазмы при температуре от -75°C до -80°C . Стандартные растворы хранили в холодильнике при температуре $2 - 8^{\circ}\text{C}$. *Приготовление интактной мочи.* К 1000 мкл мочи прибавляли 400 мкл боратного буфера pH 9,6 и 2000 мкл этилацетата. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. В качестве интактной мочи отбирали нижний слой.

Пробоподготовку проводили на сериях подготовленных проб с известным содержанием исследуемых веществ и внутреннего стандарта методом твердофазной экстракции. Перед внесением пробы (табл. 9) в картридж C18 для

ТФЭ проводили активацию сорбента. В картридж, подключенный к вакуумному насосу, вносили 2 мл метанола, затем 1 мл воды и 2 мл боратного буфера pH 9,6.

В активированный картридж вносили 2000 мкл пробы, затем последовательно добавляли 1 мл воды, 1 мл смеси ацетонитрил : вода (10 : 90, об), элюирование проводили 0,5 мл 0,1 % раствором триэтиламина в метаноле. Полученный элюат выпаривали до сухого остатка и растворяли 100 мкл 1 % муравьиной к-ты в воде.

№ пробы	Пиолин, пг/мл	Метаболит, пг/мл	Галантамин, нг/мл	Объем пробы (интактная моча)
T.1	250	250	20	2000 мкл
T.2	375	375	20	2000 мкл
T.3	500	500	20	2000 мкл
T.4	750	750	20	2000 мкл
T.5	1000	1000	20	2000 мкл
T.6	1250	1250	20	2000 мкл
T.7	1500	1500	20	2000 мкл
T.8	0	0	20	2000 мкл

Таблица 9 - Концентрации стандартных веществ в пробе для пробоподготовки мочи.

3.1.2.4. Выводы по результатам пробоподготовки

При разработке методики были опробованы различные виды пробоподготовки. Поскольку концентрации аналитов находились в пределах нескольких сотен пикограмм, нужно было сконцентрировать пробу для определения на ВЭЖХ наиболее низкой концентрации. Из методов пробоподготовки, описанных в разделе «3.1.2.2. Пробоподготовка плазмы крови», наиболее чувствительной пробоподготовкой была с применением ТФЭ. Также пробоподготовка с ТФЭ применялась и для мочи.

3.1.3. Хроматографические условия

В качестве метода определения был выбран метод обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-детектором, как чувствительный и специфичный.

Исследуемые вещества являются неполярными, ароматическими и проявляют основные свойства. Для хроматографирования полученных проб применяли колонку Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм с предколонкой Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм.

Ниже приведены хроматографические условия разработанной методики [3, 1, 4, 6, 8, 7, 2]:

Хроматограф: Agilent 1290 Infinity;

Предколонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 12,5 x 2,1 мм, 5 мкм (кат. № 821125-936);

Колонка: Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 100 x 2,1 мм, 1,8 мкм (кат. № 959758-902K);

Температура колонки: (50 ± 1) °C;

Скорость потока: 0,4 мл/мин;

Детектирование: MS/MS, MRM-переходы для пинолина 203,2 m/z → 174,0 m/z, для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина 189,2 m/z → 160,0 m/z, для галантамина 288,3 m/z → 213,0 m/z;

Метод ионизации: электроспрей (ESI) в положительной полярности;

Объем пробы: 5 мкл.

Ориентировочные времена удерживания в плазме крови:

- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин;
- пинолин – около 5,0 мин;
- галантамин – около 2,4 мин.

Ориентировочные времена удерживания в моче:

- 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболин – около 1,1 мин;
- пинолин – около 5,0 мин;
- галантамин – около 2,4 мин.

Время хроматографирования: 14 мин.

Подвижная фаза:

Элюент А: 5 мМ аммония формиата и 0,01 % муравьиной кислоты в воде.

Элюент В: 0,01 % муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Методика

Стабилизируют систему ВЭЖХ в условиях начального градиента (элюент А : элюент В = 95 % : 5 %) в течение 15 мин.

Градиентная программа:

Время, мин	Элюент А, % (об/об)	Элюент В, % (об/об)
0	95	5
1,5	95	5
2	70	30
8,5	40	60
12	95	5
14	95	5

Пригодность хроматографической системы.

Пригодность хроматографической системы рассчитывали по хроматограмме, полученной от масс-детектора.

Эффективность колонки:

- эффективность колонки, рассчитанная по пику пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина составила 25123;
- коэффициент разрешения между пиками пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболином был больше 1,5;
- фактор асимметрии пика пинолина составил 1,37;
- фактор асимметрии пика 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина составил 1,24.

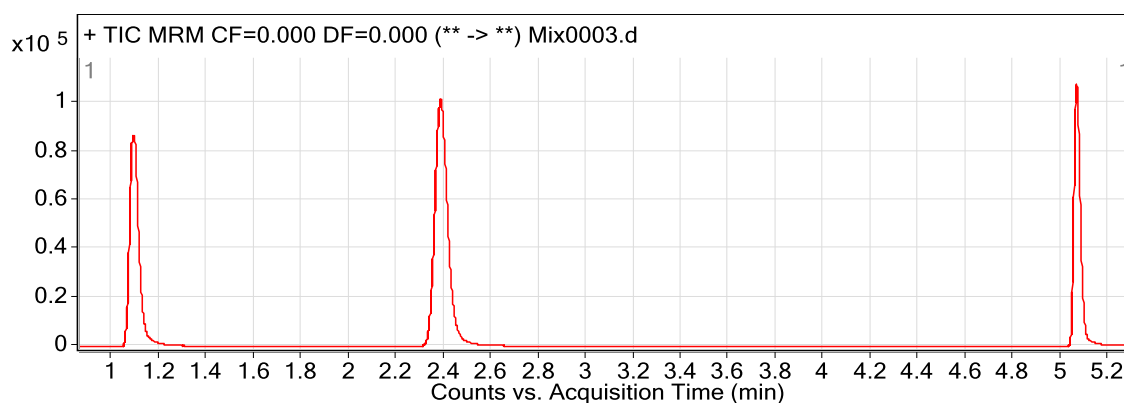


Рисунок 8 - Образец хроматограммы: пинолин, 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин и галантамин.

3.1.4. Масс спектр условия.

Были подобраны MRM переходы для пинолина, его метаболита и внутреннего стандарта галантамина методом электрораспыления в положительной полярности (табл. 10).

Пинолин 203,2 m/z		
m/z	Напряжение фрагментации (V)	Энергия соударения (V)
174	65	15
159	65	27
143	65	35
131	65	35
6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин 189, m/z		
m/z	Напряжение фрагментации (V)	Энергия соударения (V)
160	75	15
117	75	30
91	75	35
Галантамин 288,3 m/z		
m/z	Напряжение фрагментации (V)	Энергия соударения (V)
231	130	19
225	130	15
213	130	19
198	130	35

Таблица 10 - Значения напряжения фрагментации и энергии соударения для MRM переходов.

3.2. Валидация методики определения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин

Методика была валидирована на основе «Руководства по экспертизе лекарственных средств» [18], а также руководств FDA [48] и ЕМА [49].

Валидация методики проводится для подтверждения ее надежности для определения концентрации пинолина и его метаболита. Основными характеристиками, которыми должна обладать валидированная методика, являются селективность, нижний предел количественного определения, линейность, прецизионность, эффекты матрицы, стабильность исследуемых веществ в биологической матрице в течение всего периода хранения и обработки.

3.2.1. Параметры пригодности хроматографической системы

Параметры, дающие возможность оценить приемлемость выбранных условий хроматографирования для достижения объективности получаемых результатов, представлены в таблице 11. Полученные данные свидетельствуют о соответствии показателей хроматографической системы предъявляемым требованиям.

Параметр	Норма [10]	Фактическое значение
Эффективность (число теоретических тарелок)	Не менее 3000	25123
Разрешающая способность	Не менее 1,5	Больше 1,5
Коэффициент асимметрии пика Пинолин 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина	Не более 2,0 Не более 2,0	1,37 1,24
Относительное стандартное отклонение Пинолин 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина	не более 2,0% не более 2,0%	0,96% 1,04%

Таблица 11 - Основные характеристики пригодности хроматографической системы.

3.2.1.1. Селективность

Селективность методики оценивали на плазме и на моче без добавления стандартных образцов и с их добавлением.

На хроматограммах образцов интактной плазмы, очищенной от пинолина и его метаболита путем жидкостной экстракции, отобранных у 6 лиц, не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующими пинолину, метаболиту пинолина и галантамину.

На хроматограмме плазмы, содержащей стандартные образцы пинолина, его метаболита и галантамина (рис. 9), времена удерживания не накладывались. Разрешение пиков составляло более 1,5 между каждым пиком.

Приготовление интактной плазмы. К 1000 мкл плазмы прибавляли 400 мкл боратного буфера pH 9,6 и 2000 мкл этилацетата. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. В качестве интактной плазмы отбирали нижний слой.

На хроматограммах образцов интактной плазмы, очищенной от пинолина и его метаболита путем жидкостной экстракции, отобранной у 6 лиц, не наблюдалось пиков с временами удерживания, соответствующими пинолину, метаболиту пинолина и галантамину.

На хроматограмме плазмы, содержащей стандартные образцы пинолина, его метаболита и галантамина, времена удерживания не накладывались. Разрешение пиков составляло более 1,5 между каждым пиком.

Приготовление интактной мочи. К 1000 мкл мочи прибавляли 400 мкл боратного буфера pH 9,6 и 2000 мкл этилацетата. Смесь встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции, затем центрифугировали на центрифуге вортекс в течение 10 минут при скорости 13000 об/мин. В качестве интактной мочи отбирали нижний слой.

По данным результатов было сделано заключение, что методика является селективной.

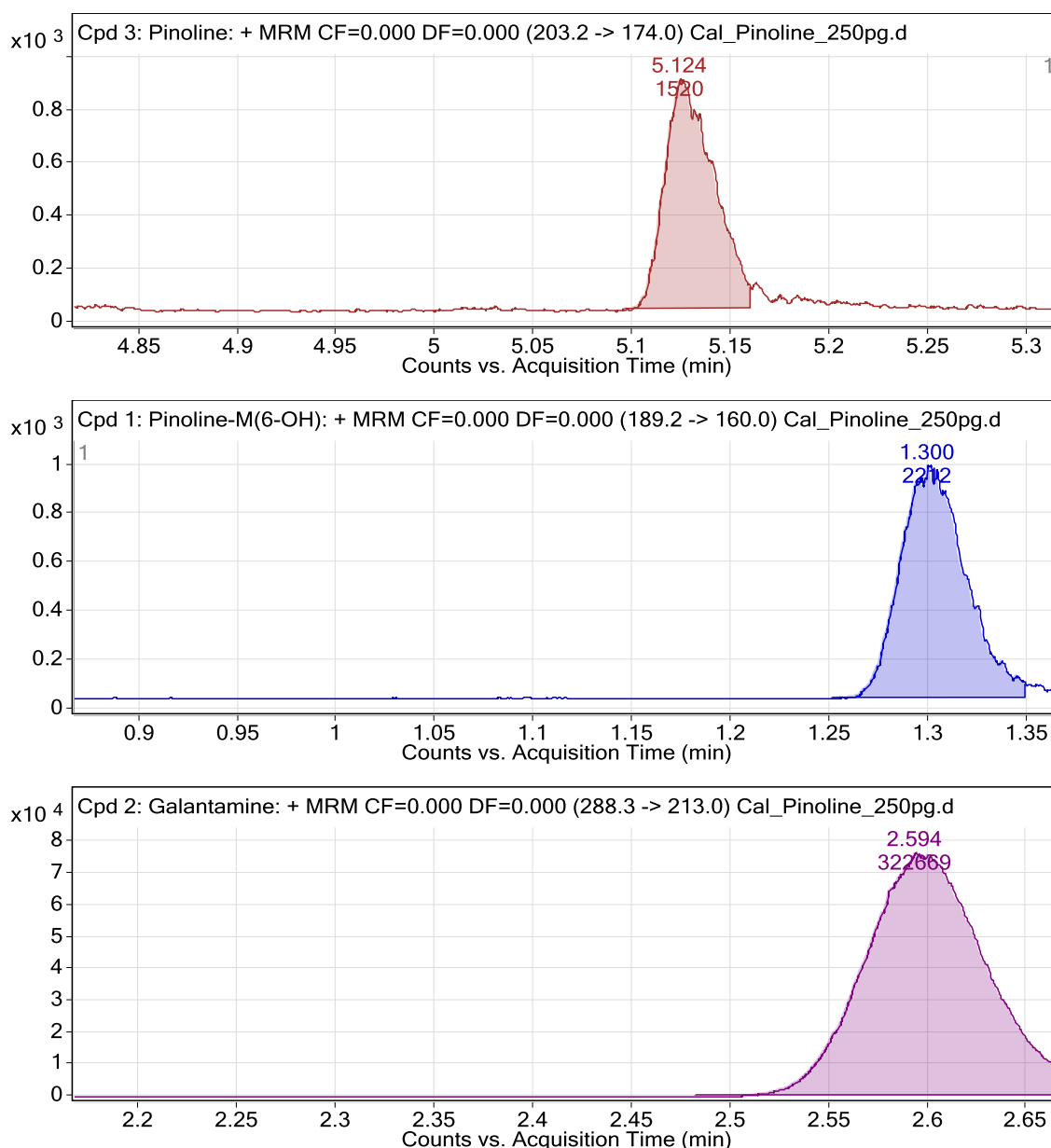


Рисунок 9 - Хроматограмма интактной плазмы, содержащего стандартные образцы пинолина, 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина и галантамина

3.2.1.2. Линейность зависимости отклика от концентраций определяемых веществ

Линейность – способность методики в диапазоне применения давать величины сигнала, прямо пропорциональные содержанию определяемого компонента.

С целью оценки линейности методики осуществлялось построение калибровочного графика. Для построения калибровочного графика готовили калибровочные модельные смеси путём внесения в интактную плазму

(приготовление см. раздел 3.2.1.1) крови и в моче пинолина, его метаболита и галантамина. Также готовили калибровочные модельные смеси в интактной моче.

3.2.1.2.1. Получение данных для построения калибровочного графика

Для получения данных, используемых при построении калибровочного графика, калибровочные образцы подвергали процедурам пробоподготовки. Также анализировали бланковые матрицы. В дальнейшем выполняли хроматографическое исследование полученных экстрактов.

3.2.1.2.2. Построение калибровочного графика

Построение калибровочного графика осуществляли с помощью программы Microsoft Excel 2010. После хроматографирования полученных растворов строили калибровочные графики зависимости отношения площадей исследуемого вещества к внутреннему стандарту (ось Y) от известных концентраций (ось X), по которым определяли концентрации пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина. При этом определяли характер зависимости, тип аппроксимации, достоверность аппроксимации и коэффициенты соответствующего уравнения регрессии.

3.2.1.2.3. Оценка линейности

Представленные данные свидетельствуют о том, что для определяемого вещества калибровочные графики описываются линейной функцией с высоким показателем достоверности аппроксимации. В плазме коэффициент корреляции (R) составил 0,99474 для пинолина и $R=0,99534$ для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина, что соответствует требованиям валидации методики (не менее 0,99 %). В моче коэффициент корреляции (R) составил 0,9913 для пинолина и $R=0,9939$ для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина, что соответствует требованиям валидации методики (не менее 0,99 %).

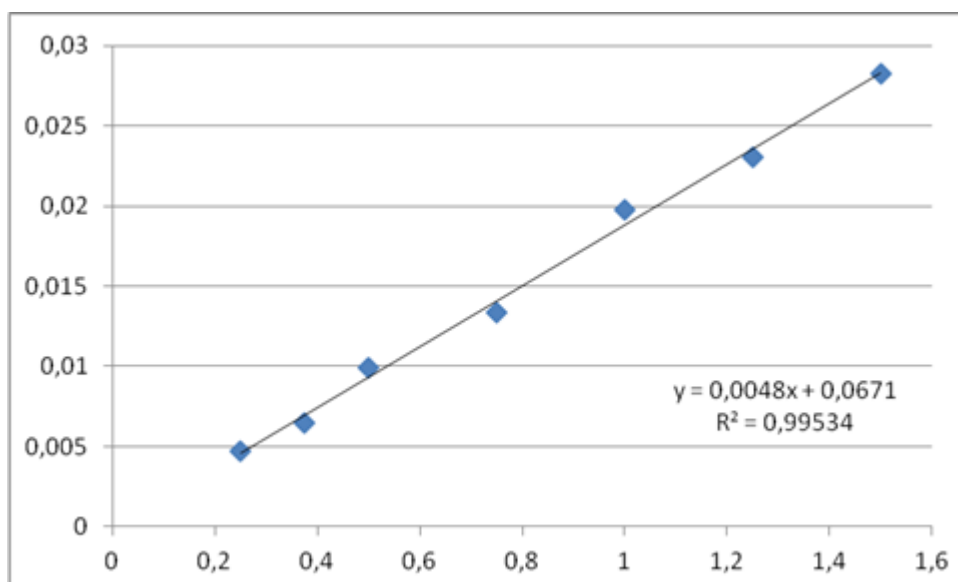


Рисунок 10 - Калибровочный график зависимости концентрации пинолина от площади пика в плазме крови.

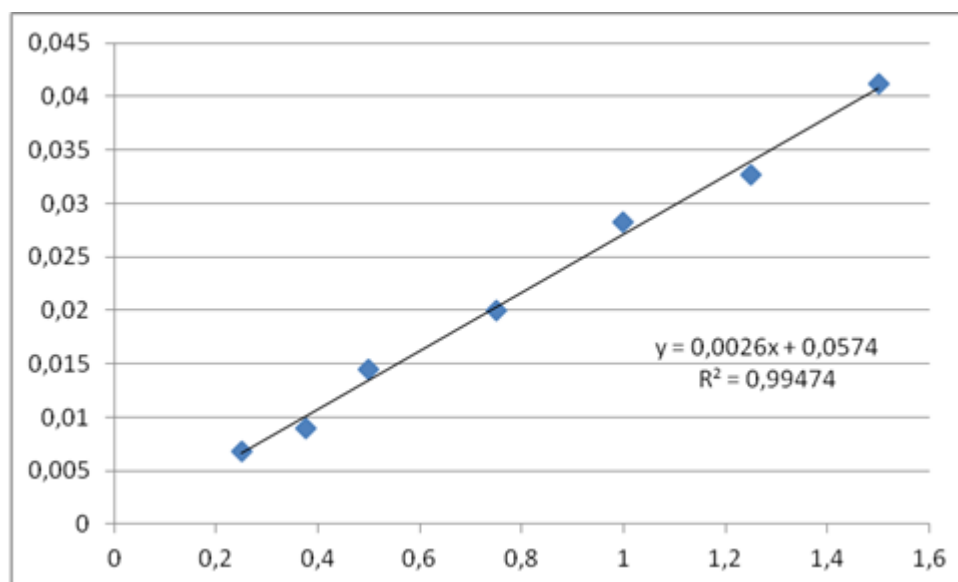


Рисунок 11 - Калибровочный график зависимости концентрации 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина от площади пика в плазме крови.

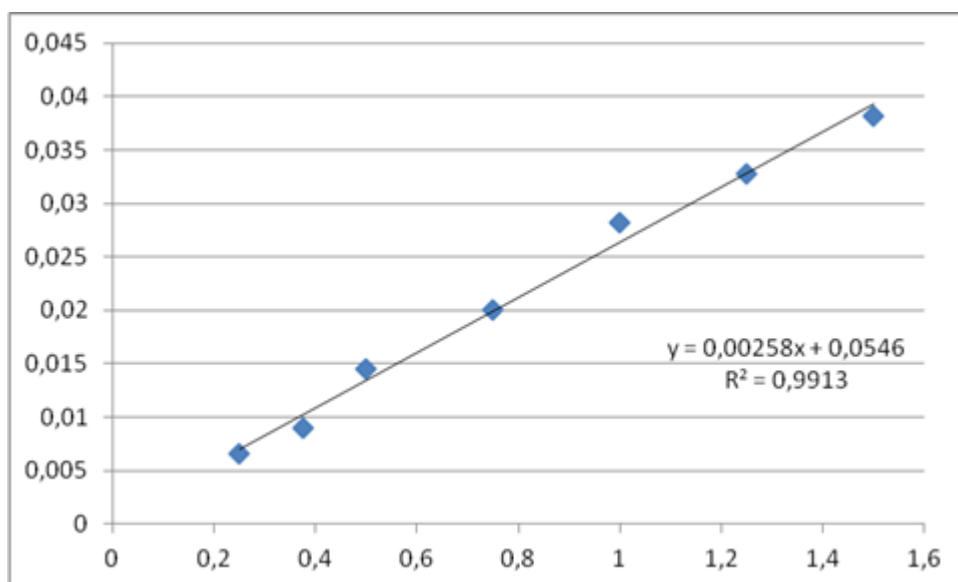


Рисунок 12 - Калибровочный график зависимости концентрации пинолина от площади пика в моче.

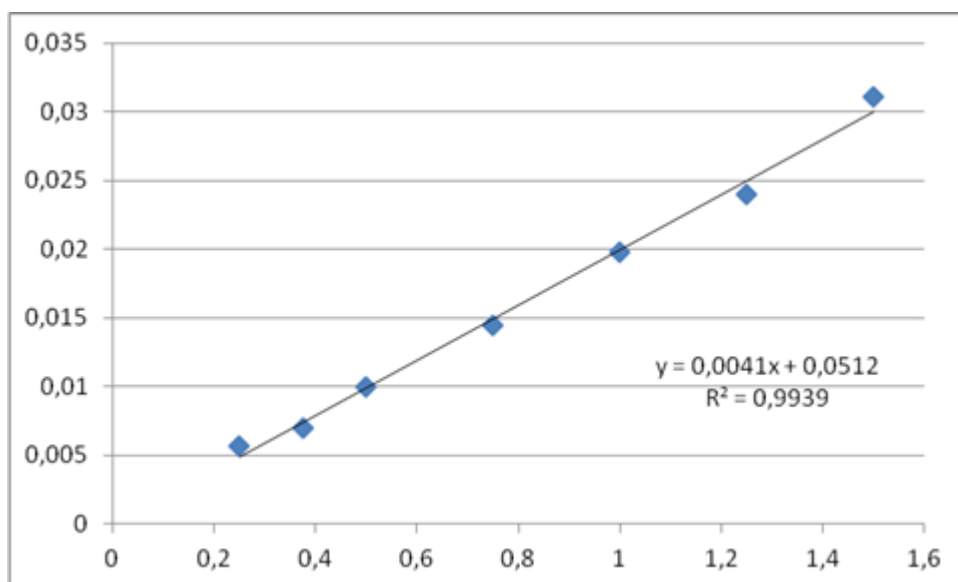


Рисунок 13 - Калибровочный график зависимости концентрации 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина от площади пика в моче.

Был выполнен расчёт концентраций пинолина и его метаболита по уравнению калибровочной зависимости, после чего полученные результаты сравнивались с фактическими, а затем были рассчитаны значения относительной погрешности (табл. 12, 13, 14, 15).

С_{факт} пг/мл	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
Площадь пика	1964	2876	3529	5571	7114	9140	10725
С_{рассчит} пг/мл	0,271	0,396	0,486	0,768	0,980	1,260	1,478
ε, %	8,27	5,70	-2,73	2,37	-1,96	0,77	-1,46
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 12 - Отклонения концентраций пинолина калибровочных растворов в плазме от фактических значений.

С_{факт} пг/мл	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
Площадь пика	1986	3057	4758	6368	9001	10475	13347
С_{рассчит} пг/мл	0,224	0,394	0,509	0,742	0,989	1,240	1,508
ε, %	-10,22	5,12	1,79	-1,06	-1,07	-0,80	0,57
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 13 - Отклонения концентраций 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина калибровочных растворов в плазме от фактических значений.

С_{факт} пг/мл	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
Площадь пика	2045	2587	3749	5527	7148	8993	10942
С_{рассчит} пг/мл	0,282	0,357	0,517	0,762	0,985	1,239	1,508
ε, %	12,73	-4,92	3,34	1,56	-1,49	-0,85	0,53
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 14 - Отклонения концентраций пинолина калибровочных растворов в моче от фактических значений.

С_{факт} пг/мл	0,25	0,375	0,5	0,75	1,0	1,25	1,5
Площадь пика	2479	2743	4478	6541	9201	10417	13195
С_{рассчит} пг/мл	0,280	0,354	4,79	0,762	1,011	1,233	1,491
ε, %	12,07	-5,67	-4,19	1,63	1,13	-1,35	-0,58
Норма	Не более 20 %	Не более 15%					

Таблица 15 - Отклонения концентраций 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина калибровочных растворов в моче от фактических значений.

Полученные значения относительной погрешности соответствуют требованиям (не более 20% - для нижней точки, не более 15% - для остальных).

3.2.1.3. Оценка правильности и прецизионности методики

Правильность – величина, отражающая степень соответствия между истинным значением измеряемой концентрации и результатом, полученным по данной методике. Показатели правильности оценивались по уровню относительной погрешности получаемых результатов (выраженное в процентах отношение разности «полученное значение – истинное значение» к истинному значению концентрации, метод «введено – найдено»).

Прецизионность – величина, выражающая степень близости (или разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Показатели прецизионности оценивались по уровню относительного стандартного отклонения.

Оценку показателей правильности и прецизионности осуществляли путём исследования образцов контроля качества на 4 уровнях концентраций: 250 пг/мл, 375 пг/мл, 750 пг/мл и 1500 пг/мл. Правильность и прецизионность определяли в течение 1 рабочего дня (внутри серии) и в течение нескольких дней (между сериями). Расчёт концентраций определяемых веществ в образцах контроля

качества выполняли по уравнению калибровочного графика, полученного в составе текущей аналитической серии. Результаты представлены в таблице 16, 17.

Введено (пг/мл)	Относительное стандартное отклонение, %		Относительная погрешность, %	
	Внутри серии (n=5)	Между сериями (n=10)	Внутри серии (n=5)	Между сериями (n=10)
250	8,95	9,01	11,24	12,48
375	7,13	7,47	7,65	8,12
750	4,67	4,81	5,12	5,87
1500	1,57	1,14	3,12	3,31

Таблица 16 - Правильность и прецизионность методики количественного определения пинолина.

Введено (пг/мл)	Относительное стандартное отклонение, %		Относительная погрешность, %	
	Внутри серии (n=5)	Между сериями (n=10)	Внутри серии (n=5)	Между сериями (n=10)
250	6,84	7,35	9,12	11,64
375	5,78	6,01	8,05	9,18
750	4,12	4,41	5,61	6,12
1500	2,85	2,90	4,12	4,48

Таблица 17 - Правильность и прецизионность методики количественного определения 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Правильность и прецизионность методики соответствуют требованиям (не более 20% - для нижней точки, не более 15% - для остальных).

3.2.1.4. Оценка предела количественного определения

Нижний предел количественного определения – минимальная концентрация анализируемого вещества в образце, которая может быть определена с требуемой правильностью и прецизионностью; критерием предела количественного определения служило соотношение «сигнал : уровень флуктуационных шумов

нулевой линии» не менее 10 : 1. Фактически в рамках представленного исследования в плазме крови предел количественного определения пинолина составил 250 пг/мл и для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина тоже составил 250 пг/мл. В моче предел количественного определения пинолина составил 250 пг/мл и для 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина тоже составил 250 пг/мл

3.2.1.5. Эффект матрицы

Влияние компонентов биологической матрицы (сыворотки крови и мочи) оценивали путём определения степени извлечения пинолина и его метаболита из модельных смесей, приготовленных аналогично калибровочным образцам и образцам контроля качества, с концентрациями, соответствующими 250 пг/мл, 750 пг/мл и 1500 пг/мл (для каждой из указанных концентраций исследовали 5 независимых модельных смесей). За 100 % принимали раствор вещества в экстрагенте с аналогичной концентрацией, с поправкой на степень концентрирования при пробоподготовке. Степень извлечения рассчитывали, как выраженное в процентах соотношение площадей пиков определяемых веществ, полученных при хроматографическом исследовании экстрактов модельных смесей и растворов в чистом экстрагенте. Результаты приведены в таблице 18, 19, 20, 21.

Концентрация пинолина в модельной смеси, пг/мл	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
250	86,02	11,09
750	84,67	10,07
1500	80,31	12,04

Таблица 18 - Степень извлечения пинолина из модельных смесей на плазме крови.

Концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина в модельной смеси, пг/мл	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
250	83,93	12,22
750	86,28	8,89
1500	81,72	10,13

Таблица 19 - Степень извлечения 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина из модельных смесей на плазме крови.

Концентрация пинолина в модельной смеси, пг/мл	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
250	84,16	9,52
750	83,13	10,14
1500	82,32	10,37

Таблица 20 - Степень извлечения пинолина из модельных смесей на моче.

Концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина в модельной смеси, пг/мл	Степень извлечения, %	Коэффициент вариации, %
250	79,33	10,19
750	81,71	11,05
1500	83,34	10,78

Таблица 21 - Степень извлечения 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина из модельных смесей на моче.

Полученные значения соответствуют предъявляемым требованиям, поскольку степень извлечения не превышает 100% и является воспроизводимой: коэффициент вариации рассматриваемого показателя не превышает 15%.

3.2.1.6. Стабильность анализируемых веществ

Оценивалась стабильность анализируемого вещества в составе стандартных растворов, биологической матрицы при хранении, а также после пробоподготовки.

3.2.1.6.1. Стабильность стандартного раствора

Стабильность стандартного раствора оценивали путём его хроматографического исследования после разведения до концентраций, соответствующих концентрациям образцов контроля качества; указанное разведение учитывали в дальнейшем при расчёте концентраций. Оценивали стабильность в течение 1 недели, анализируя раствор на начало и окончание указанного периода. Исследовали по 3 независимых образцов каждой концентрации. Результаты представлены в таблице 22, 23.

Фактическая концентрация пинолина в стандартном растворе, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1438	737	244
	Окончание периода	1383	697	218
Стандартное отклонение	Начало периода	0,73	0,43	0,25
	Окончание периода	1,21	0,48	0,17
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,50	4,41	10,26
	Окончание периода	2,48	5,11	7,79

Таблица 22 - Стабильность стандартных растворов пинолина.

Фактическая концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина в стандартном растворе, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1427	714	229
	Окончание периода	1391	695	206
Стандартное отклонение	Начало периода	0,81	0,52	0,23
	Окончание периода	1,27	0,59	0,14
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,58	4,21	9,86
	Окончание периода	2,54	4,97	7,28

Таблица 23 - Стабильность стандартных растворов 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стандартный раствор пинолина и его метаболита стабилен при хранении в течение не менее 1 недели.

3.2.1.6.2. Стабильность пинолина и его метаболита в составе биологической матрицы при хранении в замороженном состоянии

Для оценки стабильности анализируемого вещества в составе плазмы при хранении в замороженном состоянии готовили образцы, аналогичные по составу образцам контроля качества. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные – после хранения в замороженном состоянии в течение 3 недель. Исследовали по 3 независимых образца каждой концентрации. Результаты представлены в таблице 24, 25, 26, 27.

Фактическая концентрация пинолина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1484	735	239
	Окончание периода	1473	703	229
Стандартное отклонение	Начало периода	0,53	0,28	0,05
	Окончание периода	0,65	0,08	0,02
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,09	3,04	1,51
	Окончание периода	1,35	0,72	0,43

Таблица 24 - Стабильность пинолина при хранении в составе плазмы.

Фактическая концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1474	734	241
	Окончание периода	1427	711	235
Стандартное отклонение	Начало периода	0,51	0,27	0,07
	Окончание периода	0,63	0,06	0,04
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,07	3,07	1,53
	Окончание периода	1,32	0,71	0,44

Таблица 25 - Стабильность 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина при хранении в составе плазмы.

Фактическая концентрация пинолина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1477	729	237
	Окончание периода	1438	713	229
Стандартное отклонение	Начало периода	0,61	0,37	0,19
	Окончание периода	0,73	0,18	0,12
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,11	3,14	1,62
	Окончание периода	1,28	0,84	0,47

Таблица 26 - Стабильность пинолина при хранении в составе мочи.

Фактическая концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β-карболина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1467	736	241
	Окончание периода	1432	711	226
Стандартное отклонение	Начало периода	0,60	0,35	0,17
	Окончание периода	0,76	0,19	0,13
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,12	3,16	1,61
	Окончание периода	1,27	0,82	0,45

Таблица 27 - Стабильность 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина при хранении в составе мочи.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пинолин и его метаболит стабильны в составе плазмы и мочи при хранении в замороженном состоянии в течение не менее 3 недель.

3.2.1.6.3. Стабильность пинолина и его метаболита после пробоподготовки

Для оценки стабильности пинолина и его метаболита после пробоподготовки исследовали экстракты, полученные из образцов контроля качества. Половину экстрактов анализировали сразу после получения, а остальные экстракты – после хранения в холодильнике (+4°C) в течение 1 недели.

Исследовали по 3 независимых образца каждой концентрации. Результаты представлены в таблице 28, 29, 30, 31.

Фактическая концентрация пинолина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1475	738	242
	Окончание периода	1429	701	231
Стандартное отклонение	Начало периода	0,55	0,36	0,12
	Окончание периода	0,70	0,18	0,08
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,13	3,15	1,58
	Окончание периода	1,26	0,84	0,44

Таблица 28 - Стабильность пинолина при хранении в составе экстрактов, полученных из плазмы крови

Фактическая концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β-карболина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1478	740	238
	Окончание периода	1427	712	221
Стандартное отклонение	Начало периода	0,53	0,33	0,14
	Окончание периода	0,68	0,17	0,09
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,03	3,17	1,60
	Окончание периода	1,16	0,81	0,51

Таблица 29 - Стабильность 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина при хранении в составе экстрактов, полученных из плазмы крови.

Фактическая концентрация пинолина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1474	736	239
	Окончание периода	1421	708	220
Стандартное отклонение	Начало периода	0,52	0,34	0,16
	Окончание периода	0,67	0,16	0,10
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,04	3,18	1,61
	Окончание периода	1,15	0,80	0,50

Таблица 30 - Стабильность пинолина при хранении в составе экстрактов, полученных из мочи

Фактическая концентрация 6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β-карболина в образце, пг/мл		1500	750	250
Среднее значение	Начало периода	1474	736	237
	Окончание периода	1420	706	225
Стандартное отклонение	Начало периода	0,49	0,36	0,12
	Окончание периода	0,62	0,15	0,07
Относительное стандартное отклонение, %	Начало периода	1,07	3,17	1,60
	Окончание периода	1,19	0,83	0,52

Таблица 3 -. Стабильность 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина при хранении в составе экстрактов, полученных из мочи

3.2.1.7. Тест на разведение

Изучена возможность количественного определения целевого анализа в концентрациях, превышающих верхний предел диапазона калибровки. Для этих целей готовили модельные образцы с концентрацией пинолина и его метаболита 2 нг/мл. Исследовали 3 независимых образца каждой концентрации. Образцы разводили в 2 раза бланковой сывороткой и мочой. Результаты представлены в таблице 32, 33.

Состав образца	Пинолин, 2000 пг/мл	6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β- карболин, 2000 пг/мл
Результаты исследования разведённых образцов (с учётом фактора разведения 2), среднее значение, пг/мл	1868	1857
Стандартное отклонение	3,62	3,53
Относительное стандартное отклонение, %	1,26	1,17
Относительная погрешность, %	-4,37	-4,25

Таблица 32 - Результаты теста на разведение бланковой сывороткой.

Состав образца	Пинолин, 2000 пг/мл	6-гидрокси-1,2,3,4- тетрагидро-β- карболин, 2000 пг/мл
Результаты исследования разведённых образцов (с учётом фактора разведения 2), среднее значение, пг/мл	1887	1860
Стандартное отклонение	3,26	3,38
Относительное стандартное отклонение, %	1,53	1,35
Относительная погрешность, %	-4,56	-4,35

Таблица 33 - Результаты теста на разведение бланковой мочой.

Полученные результаты указывают на достаточную точность количественного определения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина после разведения исходных образцов.

3.3. Зависимость активности изофермента CYP 2D6 и изменения отношения пинолина и 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина

Изофермент CYP 2D6 участвует в метаболизме по разным оценкам от 15 до 25 % ЛС [11, 25, 31]. Субстратами этого изофермента являются сильнодействующие ЛП, которые применяются в психиатрии и при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. При неправильной дозировке или при изменении активности изофермента CYP 2D6 вследствие генетических факторов или внешних воздействий могут проявиться серьезные НЛР, а также может наблюдаться отсутствие фармакологического эффекта.

Целью нашей работы является разработать методику количественного определения пинолина и его метаболита методом LC/MS/MS для оценки активности изофермента CYP 2D6. Для достижения этой цели были подобраны оптимальные условия пробоподготовки биологических матриц и была разработана и валидирована методика количественного определения. Затем, методика была апробирована на пациентах для изучения активности CYP 2D6 [19, 36, 37]. Также для оценки возможности использования методики для определения изменений активности при приеме ингибиторов активности CYP 2D6 количественное определение проводили у пациентов при приеме ингибиторов.

В исследовании принимали участие 20 мужчин (средний возраст — $39,5 \pm 9,5$ года), страдающих алкогольной зависимостью и находящихся на стационарном лечении в МНПЦ наркологии. В период актуализации патологического влечения пациенты получали галоперидол в таблетированной форме (ООО «Озон», Россия) в дозировке $5,00 \pm 1,87$ мг/сут (9 пациентов, однократный прием) и в инъекционной форме (ЗАО «БРЫНЦАЛОВ-А», Россия) в дозировке $5,86 \pm 2,39$ мг/сут (11 пациентов, однократный прием). Критерии включения в исследование: терапия, содержащая галоперидол длительностью 5 дней; пероральная и внутримышечная формы введения галоперидола; отсутствие в анамнезе сопутствующего психического заболевания. Критерии исключения: применение в терапии иных антипсихотических препаратов, помимо галоперидола; клиренс креатинина < 50 мл/мин, концентрация креатинина в плазме

крови $\geq 1,5$ мг/дл (133 мкмоль/л); масса тела менее 60 кг или превышающая 100 кг; возраст 75 лет и более; наличие противопоказаний к применению галоперидола.

В качестве биообъекта собирали утреннюю мочу пациентов, находящихся на лечении препаратом. Забор материала проводили в количестве не менее 10 мл в сухой стерильный флакон. Первый отбор образцов проводился до начала лечения, а затем через 5 дней, после начала приема препарата.

Время от момента забора клинического материала до его доставки в лабораторию составляло: при комнатной температуре (18–25 °C) — не более 6 часов; при температуре 2–80 °C — не более 1 суток (при доставке в лабораторию в специальных термоконтейнерах с хладогеном, термосах с термопакетами). Образцы исследуемой мочи хранили в морозильнике для плазмы при температуре от – 75 °C до – 80 °C.

Метод пробоподготовки отобранной мочи, описан в разделе «3.1.2.3. Пробоподготовка мочи».

3.3.1. Изучение влияния почечной патологии на активность изофермента CYP 2D6

В исследовании приняли участие те же пациенты, так как у них в анамнезе у всех значился алкогольный гепатит. В контрольной группе исследовались 20 добровольцев мужского пола в возрасте от 30 до 48 лет с верифицированным диагнозом «здоров», не принимавших никакого лечения (табл. 34).

№ пациента	Испытуемая группа до начала лечения			Контрольная группа		
	Пиолин (пг/мл)	Метаболит (пг/мл)	Метаболическое отношение	Пиолин (пг/мл)	Метаболит (пг/мл)	Метаболическое отношение
1	490	1493	3,043393	488	1426	2,917906
2	1487	642	0,431773	423	983	2,32079
3	1021	1111	1,088149	979	963	0,983573
4	1166	743	0,637221	679	1499	2,206862
5	309	1341	4,339806	1183	1241	1,04931
6	1478	252	0,170464	700	539	0,77086

7	885	1578	1,783051	613	1276	2,081413
8	1208	865	0,71606	580	905	1,559852
9	751	841	1,11984	354	1014	2,860647
10	504	278	0,551587	663	882	1,329482
11	853	1014	1,188746	1025	1134	1,106569
12	1493	264	0,176753	911	1328	1,457815
13	398	740	1,859296	764	1232	1,611318
14	1011	1427	1,411474	1049	1388	1,32309
15	1495	832	0,556522	409	995	2,429642
16	367	480	1,307902	1600	629	0,39362
17	1488	278	0,186818	304	910	2,988876
18	1445	825	0,570934	860	965	1,12166
19	256	1407	5,496094	537	1108	2,06386
20	1463	267	0,182483	434	978	2,251161
Ср. значение	978	834	1,340918	728	1070	1,741415
Медиана	1016	829	0,902105	671	1005	1,58
Коэф- фициент вариации	47,27	53,75	106,44	44,71	23,43	43,24

Таблица 34 - Расчитанные значения концентраций пинолина и его метаболита, метаболический индекс.

Статистический анализ результатов исследования производили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica v. 10.0. При выборе метода брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (при статистической мощности свыше 80 %). Для определения корреляционной связи между количественными характеристиками вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Значение коэффициента корреляции r_s в диапазоне от 0,3 до 0,7 при $p < 0,05$ означало положительную умеренную, но достоверную

корреляцию между признаками; $r_s > 0,7$ при $p < 0,05$ — сильную и достоверную связь; отрицательное значение r_s соответствовало обратной корреляции.

Было доказано, что статистически значимого отличия между больными алкогольным гепатитом и здоровыми добровольцами в отношении метаболической активности CYP 2D6 нет ($p > 0,05$).

3.3.2. Изменение активности изофермента CYP 2D6 под действием ингибиторов и индукторов

Так как пациенты получали галоперидол, который является классическим ингибитором CYP 2D6, то в нашем исследовании были измерены метаболические отношения по пинолину до начала лечения и после 2 недель приема галоперидола. Результаты приведены в таблице 35.

№ пациента	До начала лечения			После 2 недель приема галоперидола		
	Пинолин (пг/мл)	Метаболит (пг/мл)	Метаболическое отношение	Пинолин (пг/мл)	Метаболит (пг/мл)	Метаболическое отношение
1	490	1493	3,043393	1228	273	0,222649
2	1487	642	0,431773	849	1447	1,702913
3	1021	1111	1,088149	1104	471	0,426584
4	1166	743	0,637221	732	403	0,550722
5	309	1341	4,339806	1374	1319	0,960297
6	1478	252	0,170464	955	630	0,660424
7	885	1578	1,783051	1049	728	0,693815
8	1208	865	0,71606	1429	851	0,595611
9	751	841	1,11984	460	357	0,776271
10	504	278	0,551587	438	677	1,544867
11	853	1014	1,188746	486	1404	2,884012
12	1493	264	0,176753	1109	962	0,867568
13	398	740	1,859296	367	1498	4,081744
14	1011	1427	1,411474	1475	1211	0,820703
15	1495	832	0,556522	1295	547	0,422461
16	367	480	1,307902	936	1252	1,337017
17	1488	278	0,186818	1011	940	0,92988
18	1445	825	0,570934	395	921	2,328051

19	256	1407	5,496094	843	471	0,55854
20	1463	267	0,182483	1334	782	0,58678
Ср. значение	978	834	1,340918	943	766	1,149015
Медиана	1016	829	0,902105	983	816	0,80
Коэф- фициент вариации	47,27	53,75	106,44	38,64	45,36	83,85

Таблица 35 - Расчитанные значения концентраций пинолина и его метаболита, метаболический индекс.

Статистический анализ результатов исследования производили методами непараметрической статистики с помощью пакета прикладных программ Statsoft Statistica v. 10.0. При выборе метода брали во внимание нормальность распределения выборок, которую оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$ (при статистической мощности свыше 80 %). Для определения корреляционной связи между количественными характеристиками вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s). Значение коэффициента корреляции r_s в диапазоне от 0,3 до 0,7 при $p < 0,05$ означало положительную умеренную, но достоверную корреляцию между признаками; $r_s > 0,7$ при $p < 0,05$ — сильную и достоверную связь; отрицательное значение r_s соответствовало обратной корреляции.

Как видно из приведенных данных в процессе лечения ингибитором CYP 2D6 галоперидолом метаболическое отношение снижается (r_s в диапазоне от 0,3 до 0,7 при $p < 0,05$). Данную методику можно использовать для оценки активности изофермента CYP 2D6 при приеме индукторов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. На основании изученных научных статей и монографий обоснован выбор в качестве объектов исследования пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина и подхода к их количественному определению в плазме крови человека и моче. Учитывая все рассмотренные данные, был сделан вывод об актуальности данного исследования и были созданы общие подходы к анализу изучаемых веществ.

2. Разработаны методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболина в плазме крови человека и моче с помощью метода высокoeffективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием. Подобраны оптимальные условия хроматографирования анализируемых веществ. Из различных опробованных методов пробоподготовки выбран метод ТФЭ, как наиболее чувствительный.

3. Разработанная методика валидирована на основе «Руководства по экспертизе лекарственных средств» [5], а также руководств FDA [29] и EMA [30]. Валидацию проводили по следующим параметрам: селективность, нижний предел количественного определения, линейность, правильность, прецизионность, эффекты матрицы, стабильность исследуемых веществ в биологической матрице в течение всего периода хранения и обработки

4. Проведена оценка активности изофермента цитохрома P450 CYP 2D6 у пациентов с алкогольным гепатитом с помощью разработанной методики. По результатам было доказано, что статистически значимого отличия между больными алкогольным гепатитом и здоровыми добровольцами в отношении метаболической активности CYP 2D6 нет ($p > 0,05$).

5. Было изучено изменение активности CYP 2D6 у пациентов при приеме ингибитора активности данного изофермента галоперидола. В результате приема ингибитора наблюдали снижение метаболического индекса, что указывает на снижение активности изофермента. После проведения статистической обработки была доказана достоверность полученных данных

6. Полученные данные по оценке активности изофермента CYP 2D6 у пациентов с алкогольным гепатитом по сравнению с контрольной группой и снижение метаболического отношения после приема индуктора галоперидола позволяют сделать вывод о возможности применения разработанной методики у пациентов, принимающих ингибиторы изофермента CYP 2D6.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдрашитов Р.Х. Количественное определение пинолина для определения активности изоферментов цитохрома P450 // Сборник материалов международного симпозиума посвященный 5-летию Клинико-диагностического центра Международного Казахско-Турецкого Университета им. Ахмеда Ясауи «Инновации в оказании скорой неотложной медицинской помощи и актуальные вопросы медицины». – г. Туркестан, Казахстан, 2014. – С. 214-216.

2. Абдрашитов Р.Х. Разработка количественного определения пинолина для оценки активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 14-15 апреля 2014 г. – СПб.: Изд-во СПХФА, 2014. – С. 377 – 378.

3. Абдрашитов Р.Х. Разработка методик количественного определения пинолина для оценки активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом ВЭЖХ / Сеченовский вестник. – 2014. - №. 2(16) – С. 102.

4. Абдрашитов Р.Х. Разработка методики количественного определения пинолина и его метаболита для измерения активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS // Сборник материалов 74 Всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Современные аспекты медицины и фармации». – г. Запорожье, Украина, 2014. – С. 161.

5. Абдрашитов Р.Х., Петухов А.Е., Смирнов В.В. Разработка и валидация биоаналитической методики количественного определения пинолина и его метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина с целью определения активности изофермента CYP 2D6 // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 1 (14). – С. 120 - 124.

6. Абдрашитов Р.Х., Смирнов В.В. Количественное определение пинолина для определения активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS // Всероссийская научная Интернет-конференция с международным

участием «Фармакологическая наука – от теории к практике». – г. Казань, 2014. – С. 5 – 6.

7. Абдрашитов Р.Х., Смирнов В.В. Разработка методики определения активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS // Сборник материалов XXI Российский Национальный Конгресс «Человек и лекарство». – г. Москва, 2014. – С. 190.

8. Абдрашитов Р.Х., Смирнов В.В. Разработка методки количественного определения пинолина для измерения активности изофермента CYP 2D6 цитохрома P450 методом LC/MS/MS // Сборник материалов Украинской научно-практической конференции «Проблемы синтеза биологически активных веществ и создание на их основе лекарственных субстанций». – г. Харьков, Украина, 2014. – С. 87.

9. Влияние изофермента CYP 2D6 на метаболизм лекарственных препаратов и методы определения его активности/ В.В. Смирнов [и др.] // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2015. – № 3. – С. 32-35.

10. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIII издание, том 1. - М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – С. 464-467.

11. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. - М.: Издательство «Реафарм», 2004. – 144 с.

12. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Ших Е.В. Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии // Врач. – 2007. – № 1. – С. 6 - 8.

13. Медведев Ю. и др. Физические методы исследования и их практическое применение в химическом анализе. – Litres, 2016. – С. 9 - 21.

14. Метаболизм лекарственных препаратов/ Под ред. Академика РМН. Проф Кукеса В.Г.. чл.-кооп. РАМН, проф. Фисснко В.П. М : Палея-М. 2001.

15. Обзор существующих методик оценки активности CYP 2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров / Р.Х. Абдрашитов [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2015. – № 1. – С. 4 - 11.

16. Перспективы методики оценки активности CYP 2D6 с применением пинолина / Р.Х. Абдрашитов [и др.] // Фармация. – 2015. – № 5. – С. 41-44.
17. Раменская Г.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография в оценке биотрансформации лекарственных средств (фармакокинетика и фармакогенетика). Автореф.диссер. на соиск. ум. степени докт. Фарм. наук. 2003.
18. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 1 / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2013. — 328 с.
19. Смирнов В.В., Абдрашитов Р.Х. Оценка активности изоферментов цитохрома Р450 при иммунокорректирующем лечении // Сборник научных работ VII Международной Научно-практической конференции «Современные концепции научных исследований». – г. Москва, 2014. - № 7. – С. 143 – 144.
20. Adedoyin A. et al. Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6 //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 1998. – Т. 64. – №. 1. – С. 8-17.
21. Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS (ICP-QQQ) brochure [Электронный ресурс] URL: https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-0079EN_8800_ICPQQQ_Brochure.pdf (дата обращения: 06.05.2016)
22. Bachmann C., Bickel M.H. History of drug metabolism: the first half of the 20th century // Drug Metab. Rev. –1985. –№ 16(3). – С. 185-253.
23. Bengtsson C., Johnsson G., Regårdh C. G. Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure and heart rate in hypertensive patients after an acute dose and between two doses during long-term treatment //Clinical pharmacology and therapeutics. – 1975. – Т. 17. – №. 4. – С. 400-408.
24. Bodó A. et al. The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity //Toxicology letters. – 2003. – Т. 140. – С. 133-143.
25. Bozkurt A. et al. Metabolic ratios of four probes of CYP 2D6 in Turkish subjects: a cross-over study //European journal of drug metabolism and pharmacokinetics. – 1996. – Т. 21. – №. 4. – С. 309-314.

26. Burton J. et al. Virtual screening for cytochromes p450: successes of machine learning filters //Combinatorial chemistry & high throughput screening. – 2009. – T. 12. – №. 4. – C. 369-382.
27. Cerqueira P. M. et al. Influence of chronic renal failure on stereoselective metoprolol metabolism in hypertensive patients //The Journal of Clinical Pharmacology. – 2005. – T. 45. – №. 12. – C. 1422-1433.
28. Cohn R. Concerning the occurrence of acetylated conjugates following the administration of aldehydes //Z. physiol. Chem. – 1893. – T. 17. – C. 274.
29. Conti A., Bickel M. H. History of drug metabolism: discoveries of the major pathways in the 19th century //Drug Metabolism Reviews. – 1977. – T. 6. – №. 1. – C. 1-50.
30. Cooper E. J. et al. Effects of the β -carbolines, harmaline and pinoline, on insulin secretion from isolated human islets of Langerhans //European journal of pharmacology. – 2003. – T. 482. – №. 1. – C. 189-196..
31. Cytochrome P450 2D6 Phenoconversion Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine / H.P. Sheldon [et al] // J.Clin. Psychiatry. – 2013. – № 74(6). – P. 614-621.
32. Dalen P. et al. Inhibition of debrisoquine hydroxylation with quinidine in subjects with three or more functional CYP 2D6 genes //British journal of clinical pharmacology. – 2000. – T. 49. – №. 2. – C. 180-184.
33. Dayer P. et al. Bioactivation of the narcotic drug codeine in human liver is mediated by the polymorphic monooxygenase catalyzing debrisoquine 4-hydroxylation (cytochrome P-450 db1/buf1) //Biochemical and biophysical research communications. – 1988. – T. 152. – №. 1. – C. 411-416.
34. de Groote P., Ennezat P. V., Mouquet F. Bisoprolol in the treatment of chronic heart failure //Vascular health and risk management. – 2007. – T. 3. – №. 4. – C. 431.
35. Dessaignes V./ C. R. Acad. Sci. – 1845. – № 21. – 1224 p.

36. Development of validated method for simultaneous cytochrome P450 isoforms activity determination in drug allergy testing / V. Smirnov [et al] // Abstract BOOK EAACI 2014. – 2014. – P. 262.
37. Development of validated method for CYP 2D6 phenotyping in studies of correlation between drug allergy and cytochrome P450 activity/ R.Kh. Abdrashitov [et al] // Allergy. – 2015. – T. 70. № S101. – P. 227.
38. Distlerath L. M., Guengerich F. P. Characterization of a human liver cytochrome P-450 involved in the oxidation of debrisoquine and other drugs by using antibodies raised to the analogous rat enzyme //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1984. – T. 81. – №. 23. – C. 7348-7352.
39. Dorado P., Peas-Lled E. M., LLerena A. CYP 2D6 polymorphism: implications for antipsychotic drug response, schizophrenia and personality traits //Pharmacogenomics. – 2007. – T. 8. – №. 11. – C. 1597-1608.
40. Drahushuk A. T. et al. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture //Carcinogenesis. – 1998. – T. 19. – №. 8. – C. 1361-1368.
41. Erdmann O. L., Marchand R. F. Metabolism of cinnamic acid to hippuric acid in animals //Ann. Chem. Pharm. – 1842. – T. 44. – C. 344.
42. Felmlee M. A. et al. Cytochrome P450 expression and regulation in CYP3A4/CYP 2D6 double transgenic humanized mice //Drug Metabolism and Disposition. – 2008. – T. 36. – №. 2. – C. 435-441.
43. Frye R. F. et al. Liver disease selectively modulates cytochrome P450–mediated metabolism //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2006. – T. 80. – №. 3. – C. 235-245.
44. Granvil C. P. et al. 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine //Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2002. – T. 301. – №. 3. – C. 1025-1032.
45. Griesse E. U. et al. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP 2D6 in a German population //Pharmacogenetics and Genomics. – 1998. – T. 8. – №. 1. – C. 15-26.

46. Guengerich F. P. Cytochromes P450, drugs, and diseases //Molecular interventions. – 2003. – T. 3. – №. 4. – C. 194.
47. Guengerich F. P. et al. Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6: lack of an obligatory role of aspartate 301-substrate electrostatic bonding //Biochemistry. – 2002. – T. 41. – №. 36. – C. 11025-11034.
48. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2001.
49. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft).European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2009.
50. Hashiyada M. et al. Unexpectedly high blood concentration of bisoprolol after an incorrect prescription: A case report //Legal Medicine. – 2013. – T. 15. – №. 2. – C. 103-105.
51. Herraiz T., Galisteo J. Endogenous and dietary indoles: a class of antioxidants and radical scavengers in the ABTS assay //Free radical research. – 2004. – T. 38. – №. 3. – C. 323-331.
52. His W. On the metabolic products of pyridine //Arch. Ex. Pathol. Pharmacol. – 1887. – T. 22. – C. 253-260.
53. Ho R. H., Kim R. B. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2005. – T. 78. – №. 3. – C. 260-277.
54. Jaffe M., Cohn R. // Ber. Dtsch. Chem. Ges. – 1887. – T. 20. – 2311c.
55. Jiang X. L., Shen H. W., Yu A. M. Pinoline may be used as a probe for CYP 2D6 activity //Drug Metabolism and Disposition. – 2009. – T. 37. – №. 3. – C. 443-446.
56. Keller W. M. Keller on the Conversion of Benzoic into Hippuric Acid //Provincial medical journal and retrospect of the medical sciences. – 1842. – T. 4. – №. 92. – C. 256.

57. Kim M. et al. Inhibition of the enantioselective oxidative metabolism of metoprolol by verapamil in human liver microsomes //Drug metabolism and disposition. – 1993. – T. 21. – №. 2. – C. 309-317.
58. Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes //Archives of biochemistry and biophysics. – 1958. – T. 75. – №. 2. – C. 376-386.
59. Knollmann B. C. (ed.). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. – New York : McGraw-Hill Medical, 2011. – T. 12. – C. 327-328.
60. Labbé L. et al. Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP 2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates //Pharmacogenetics and Genomics. – 2000. – T. 10. – №. 5. – C. 425-438.
61. Lennard M. S. et al. Oxidation phenotype—a major determinant of metoprolol metabolism and response //New England Journal of Medicine. – 1982. – T. 307. – №. 25. – C. 1558-1560.
62. Lennard M. S. et al. Oxidation phenotype—a major determinant of metoprolol metabolism and response //New England Journal of Medicine. – 1982. – T. 307. – №. 25. – C. 1558-1560.
63. Lewis D. F. V. Essential requirements for substrate binding affinity and selectivity toward human CYP2 family enzymes //Archives of biochemistry and biophysics. – 2003. – T. 409. – №. 1. – C. 32-44.
64. Lewis D. F. V., Dickins M. Substrate SARs in human P450s //Drug discovery today. – 2002. – T. 7. – №. 17. – C. 918-925.
65. Lewis D. F. V., Jacobs M. N., Dickins M. Compound lipophilicity for substrate binding to human P450s in drug metabolism //Drug discovery today. – 2004. – T. 9. – №. 12. – C. 530-537.
66. Marandi T. et al. Debrisoquine and S-mephenytoin hydroxylation polymorphisms in a Russian population living in Estonia //European journal of clinical pharmacology. – 1997. – T. 53. – №. 3-4. – C. 257-260.
67. March , J. Advanced Organic Chemistry 4th edn // John Wiley & Sons, Inc. – 1992. – C. 553 – 554.

68. Mason H. S. Mechanism of Oxygen Metabolism. *Adv. Enzymol.* 19, 79–233 (1957).—Cf. *ibid.* 16, 105 (1955) // *Oxidases. Ann. Revs. Biochem.* – 1965. – T. 34. – C. 595-634..
69. Moltke L. L. et al. Multiple Human Cytochromes Contribute to Biotransformation of Dextromethorphan In-vitro: Role of CYP2C9, CYP2C19, CYP 2D6, and CYP3A // *Journal of pharmacy and pharmacology.* – 1998. – T. 50. – №. 9. – C. 997-1004.
70. Neumeister R. *Lehrbuch der physiologischen Chemie: mit Berücksichtigung der pathologischen Verhältnisse.* – G. Fischer, 1897.
71. Nozawa T. et al. Influence of CYP 2D6 genotype on metoprolol plasma concentration and β -adrenergic inhibition during long-term treatment: A comparison with bisoprolol // *Journal of cardiovascular pharmacology.* – 2005. – T. 46. – №. 5. – C. 713-720.
72. Omura T. et al. Function of cytochrome P-450 of microsomes // *Federation proceedings.* – 1965. – T. 24. – №. 5. – C. 1181.
73. Omura T., Sato R. A new cytochrome in liver microsomes // *Journal of Biological Chemistry.* – 1962. – T. 237. – №. 4. – C. PC1375-PC1376.
74. Otton S. V. et al. Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 1988. – T. 247. – №. 1. – C. 242-247.
75. Pähkla R., Harro J., Rägo L. Behavioural effects of pinoline in the rat forced swimming, open field and elevated plus-maze tests // *Pharmacological research.* – 1996. – T. 34. – №. 1. – C. 73-78.
76. Pedersen R. S., Damkier P., Brosen K. Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study // *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* – 2005. – T. 77. – №. 6. – C. 458-467.
77. Poulsen L. et al. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP 2D6* // *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* – 1996. – T. 60. – №. 6. – C. 636-644.

78. Qi W. et al. Increased levels of oxidatively damaged DNA induced by chromium (III) and H₂O₂: protection by melatonin and related molecules //Journal of pineal research. – 2000. – T. 29. – №. 1. – C. 54-61.
79. Regårdh C. G., Johnsson G. Clinical pharmacokinetics of metoprolol //Clinical pharmacokinetics. – 1980. – T. 5. – №. 6. – C. 557-569.
80. Rodrigues A. D. Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping //Biochem Pharmacol. – 1999. – T. 57. – C. 465-480.
81. Schellens J. H. et al. Lack of pharmacokinetic interaction between nifedipine, sparteine and phenytoin in man //British journal of clinical pharmacology. – 1991. – T. 31. – №. 2. – C. 175-178.
82. Schinkel A. H. et al. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs //Journal of Clinical Investigation. – 1996. – T. 97. – №. 11. – C. 2517.
83. Seelig A., Gottschlich R., Devant R. M. A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1994. – T. 91. – №. 1. – C. 68-72.
84. Sheridan R. P. et al. Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9 //Journal of medicinal chemistry. – 2007. – T. 50. – №. 14. – C. 3173-3184.
85. Streetman D. S., Bertino Jr J. S., Nafziger A. N. Phenotyping of drug-metabolizing enzymes in adults: a review of in-vivo cytochrome P450 phenotyping probes //Pharmacogenetics and Genomics. – 2000. – T. 10. – №. 3. – C. 187-216.
86. Subrahmanyam V. et al. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes //Drug Metabolism and Disposition. – 2001. – T. 29. – №. 8. – C. 1146-1155.
87. Takashima T. et al. Evaluation of dextromethorphan metabolism using hepatocytes from CYP 2D6 poor and extensive metabolizers //Drug metabolism and pharmacokinetics. – 2005. – T. 20. – №. 3. – C. 177-182.
88. Tegeder I., Lötsch J., Geisslinger G. Pharmacokinetics of opioids in liver disease //Clinical pharmacokinetics. – 1999. – T. 37. – №. 1. – C. 17-40.

89. Terfloth L., Bienfait B., Gasteiger J. Ligand-based models for the isoform specificity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 substrates //Journal of chemical information and modeling. – 2007. – T. 47. – №. 4. – C. 1688-1701.
90. Totah R. A., Rettie A. E. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance //Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2005. – T. 77. – №. 5. – C. 341-352.
91. Trager W. F. et al. Oral anticoagulants //Metabolic Drug Interactions. – 2000. – 748 c.
92. Ure A. On gouty concretions, with a new method of treatment //Medico-chirurgical transactions. – 1841. – T. 24. – C. 30.
93. Van Montfoort J. E. et al. Drug uptake systems in liver and kidney //Current drug metabolism. – 2003. – T. 4. – №. 3. – C. 185-211.
94. Von Bahr C. et al. Plasma levels and effects of metoprolol on blood pressure, adrenergic beta receptor blockade, and plasma renin activity in essential hypertension //Clinical pharmacology and therapeutics. – 1976. – T. 20. – №. 2. – C. 130-137.
95. Wang P. P. et al. Purification and characterization of six cytochrome P-450 isozymes from human liver microsomes //Biochemistry. – 1983. – T. 22. – №. 23. – C. 5375-5383.
96. Ward C., Sumpter, Miller F. M. Heterocyclic compounds with indole and carbazole systems. – Interscience, 1954.
97. Williams J. A. et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios //Drug Metabolism and Disposition. – 2004. – T. 32. – №. 11. – C. 1201-1208.
98. Williams R. T. et al. Detoxication mechanisms. The metabolism of drugs and allied organic compounds //Detoxication mechanisms. The metabolism of drugs and allied organic compounds. – 1947.
99. Wöhler F. Tiedemann's Z //Physiol. – 1824. – T. 1. – C. 142.

100. Wöhler F., Frerichs F. T. Concerning the modifications which particular organic materials undergo in their transition to the urine //Ann Chem Pharm. – 1848. – T. 63. – C. 335.

101. Yap C. W., Chen Y. Z. Prediction of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 inhibitors and substrates by using support vector machines //Journal of chemical information and modeling. – 2005. – T. 45. – №. 4. – C. 982-992.