

# Перспективы использования «коктейльных» методов определения активности изоферментов цитохрома P450 *in vivo* с целью рационализации фармакотерапии

Егоренков Е.А.<sup>1,2</sup>, Смирнов В.В.<sup>1,2,4</sup>, Литвин А.А.<sup>3</sup>, Колыванов Г.Б.<sup>3</sup>, Раменская Г.В.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> — ГБОУ ВПО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России

<sup>2</sup> — ФГБУ «Государственный Научный Центр Институт Иммунологии» Федерального Медико-Биологического Агентства России, г. Москва

<sup>3</sup> — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

<sup>4</sup> — ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, г. Москва

**Резюме.** Под рациональной фармакотерапией подразумевается грамотное комбинирование лекарственных препаратов и корректировка их доз с целью минимизации риска развития нежелательных лекарственных реакций и достижения необходимого терапевтического эффекта. Одним из важнейших факторов, влияющих на эффективность действия лекарственных средств, является активность системы метаболизма. В данной статье проведён обзор перспективного «коктейльного» метода определения активности ферментов биотрансформации *in vivo*.

**Ключевые слова:** цитохром P450, CYP, «коктейльный» метод, персонализированная медицина, рациональная фармакотерапия

## Aspects of «Cocktail» cytochrome P450 activity determination methods application with the view of drug treatment rationalization

Egorenkov E.<sup>1,2</sup>, Smirnov V.<sup>1,2,4</sup>, Litvin A.<sup>3</sup>, Kolyvanov G.<sup>3</sup>, Ramenskaya G.<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> — I.M. Sechenov First Moscow State Medical University

<sup>2</sup> — National Research Center Institute of Immunology Federal Medical Biological Agency of Russia

<sup>3</sup> — FSBSI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

<sup>4</sup> — FSBI «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medical Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

**Abstract.** Rational pharmacotherapy is understood as intelligent drug combination and dosage adjustment for the purpose of drug adverse events development risk minimization and achievement of suitable therapeutical effect. One of the main factors affecting on drug potency is activity of biotransformation system. In this work, a review of promising “cocktail” method of biotransformation enzymes activity determination *in vivo* is given.

**Keywords:** cytochrome P450, CYP, «cocktail» approach, personalized medicine, rational pharmacotherapy

Автор, ответственный за переписку:

Редакция журнала — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

## Введение

Проблема возникновения нежелательных лекарственных явлений является одной из наиболее серьёзных с момента становления фармакотерапии. С целью обезопасить пациента от риска возникновения подобных явлений, следует правильно комбинировать лекарственные препараты и своевременно корректировать их дозу. Основным фактором, влияющим на эффективность лекарственных препаратов и развитие нежелательных лекарственных явлений, является активность системы метаболизма человека. В частности, к возникновению таких реакций ведёт межлекарственное взаимодействие, проявляющееся

при совместном приёме препаратов, которые могут перекрёстно влиять на активность отдельных ферментов системы метаболизма, первая (несинтетическая) фаза которой в основном представлена системой изоферментов цитохрома P450. Система цитохрома P450 (CYP) играет важнейшую роль в метаболизме как ксенобиотиков, так и эндогенных веществ. В недавнем времени был доказан значительный вклад этой системы в метаболизм канцерогенных веществ. Помимо этого, на активность системы CYP могут влиять и другие факторы: пол, возраст, сопутствующие заболевания, пищевой рацион, общее состояние организма и прочие факторы. Существует два основных метода определения активности изоферментов

цитохрома P450 *in vivo*: генотипирование и фенотипирование. Генотипический метод предполагает метод определения активности того или иного фермента метаболизма ЛС на основании изучения его гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) [1]. С помощью данного метода можно выявить мутантные аллели, производящие изоферменты с измененной активностью, и, таким образом, составить «ферментный портрет» человека на основании его генетической информации. Однако этот метод имеет ряд недостатков; в частности, генотипирование предоставляет данные об активности изоферментов лишь по генотипической информации, таким образом, абсолютно не учитывая условия окружающей среды, воздействующие на испытуемого [2, 3]. Фенотипический метод, в свою очередь, полностью учитывает воздействия окружающей среды на организм, и возможно получить данные о реальной активности метаболизма в данный момент времени. Метод заключается в прямом определении активности того или иного фермента метаболизма лекарственных средств по фармакокинетике его специфического субстрата («маркерного» субстрата) и его метаболита [1]. К маркерному субстрату предъявляется ряд требований: он должен метаболизироваться преимущественно одним из изоферментов CYP; субстрат должен метаболизироваться преимущественно с образованием только одного специфического метаболита; он должен быть безопасен для испытуемого (в идеале, это должно быть эндогенное вещество); субстрат и его метаболит должны содержаться в биожидкостях (кровь, моча) в достаточной концентрации для количественного определения выбранным аналитическим методом.

Одним из самых современных и перспективных аналитических методов, используемых для количественного определения концентрации субстратов-маркёров и их метаболитов в биожидкостях организма при фенотипировании, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Данный метод отличается наибольшей специфичностью, точностью, чувствительностью и воспроизводимостью по сравнению с другими аналитическими методами.

Существует множество методик определения активности различных изоферментов CYP *in vivo*, использующих различные вещества в качестве субстратов-маркёров. Рассмотрим их достоинства и недостатки с точки зрения перспективности использования в рутинной клинической практике с целью определения активности системы CYP у пациентов.

### Основные изоферменты цитохрома P450

Цитохром P-450 имеет множество изоформ — изоферментов, которых на данный момент выделено более 1000. Изоферменты цитохрома P-450 по классификации Nebert (1987) принято разделять по бли-

зости (гомологии) нуклеотид/аминокислотной последовательности на семейства, а последние, в свою очередь, на подсемейства. Изоферменты цитохрома P-450 с идентичностью аминокислотного состава более 40% объединены в семейства, которых выделено 36, из них 12 обнаружены у млекопитающих [1].

У каждого из изоферментов CYP своя специфическая функция в метаболических процессах и свой специфический субстрат. Несмотря на всё изобилие изоферментов, лишь несколько из них делают основной вклад в метаболизм ксенобиотиков; это изоферменты CYP1A2, CYP2E1, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 и CYP2D6 (рис. 1).

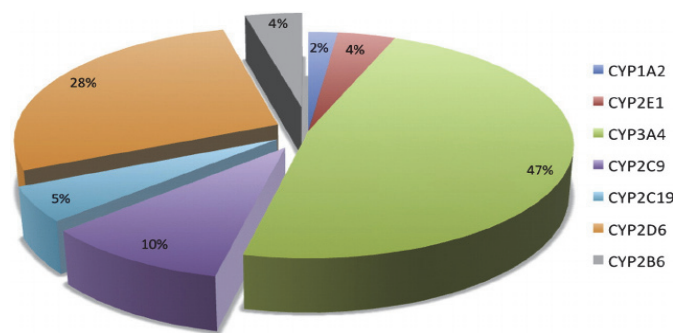


Рис. 1. Процентное соотношение метаболизируемых ксенобиотиков основными изоферментами цитохрома P450 [4].

CYP1A2 метаболизирует порядка 2–8% известных лекарственных средств и участвует в метаболической активации проканцерогенных ариламинов и гетероциклических аминов, образующихся при термической обработке пищи [5]. Является главным изоферментом метаболизма производных ксантина (теофиллин, кофеин). В качестве «маркерных субстратов» для фенотипирования CYP1A2 в основном используются фенацетин, кофеин и ксантин [1, 6].

CYP2C9 метаболизирует около 10–15% известных лекарственных средств. Основными субстратами данного изофермента являются многие нестероидные противовоспалительные препараты, в том числе селективные ингибиторы циклооксигензы-2, антагонистов ангиотензиновых рецепторов, пероральных гипогликемических препаратов (производных сульфонилмочевины), непрямых антикоагулянтов (варфарин, аценокумарол) и др. Следует отметить, что CYP2C9 имеет «стереоселективность» и метаболизирует в основном S-варфарин и S-аценокумарол, в то время как R-варфарин и R-аценокумарол метаболизируются другими изоферментами цитохрома P450 (CYP1A2, CYP3A4) [1, 6, 7].

CYP3A4 метаболизирует большинство известных лекарственных веществ — от 30 до 40%, в том числе блокаторы медленных кальциевых каналов, макролидные антибиотики, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы. CYP3A4 также катализирует реакцию 6-β-гидроксилирования эндогенных стероидов, в том числе тестостерона, прогестерона, кортизола. Маркерными субстра-

тами для определения активности CYP3A4 являются эритромицин, нифедипин, лидокаин, кортизол [1, 6].

CYP2D6 катализирует метаболизм 18–28% лекарственных веществ, в том числе нейролептики, антидепрессанты,  $\beta$ -адреноблокаторы. CYP2D6 также метаболизирует некоторые наркотики: кокаин, MDMA. Для некоторых ЛС окисление CYP2D6 является «дополнительным» путём метаболизма. Например, основным ферментом метаболизма дилтиазема является CYP3A4, в то время как CYP2D6 катализирует «дополнительный» путь метаболизма препарата N-деметилдизацетилирование [1, 6, 7].

### «Коктейльные» методы: основные условия перспективного использования

Для разработки перспективного «коктейльного» метода необходим правильный подбор веществ субстратов, не влияющих перекрёстно на активность других изоферментов. Более того, подобранные субстраты должны быть безопасны и не подвергать пациентов риску различных нежелательных лекарственных явлений. Кроме того, в основе «коктейльного» метода лежит совместное количественное определение нескольких пар веществ, что требует точного, селективного и воспроизводимого метода количественного определения исследуемых веществ. С учётом перспективы использования метода в клинической практике необходимо, чтобы аналитический метод был максимально прост и быстр для возможности его рутинного использования в лаборатории. Ниже приведены описанные в литературе «коктейльные» методы, используемые для определения активности основных изоферментов CYP *in vivo*.

Одной из самых ранних работ, описывающих «коктейльный» метод фенотипирования, является работа Bing Zhu и соавторов, опубликованная в 2001 г. [8]. В данной работе перед авторами стояла задача провести разработку и валидацию «коктейльного» метода для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2E1, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4. Исследование проводилось на 14 здоровых, некурящих добровольцах, принявших «коктейль», состоящий из 100 мг кофеина, 200 мг хлорзоксазона, 100 мг мефенитоина, 100 мг метопролола и 7,5 мг мидазолама. В качестве биообъектов использовалась плазма, и моча. Плазму использовали для определения активности изоферментов CYP3A, CYP2E1 и CYP1A2, мочу — для изоферментов CYP2D6 и CYP2C19. Количественное определение исследуемых веществ проводилось методом обратнофазной ВЭЖХ с использованием УФ-детектора.

Используемый для определения активности CYP2E1 центральный миорелаксант хлорзоксон в основном входит в состав «коктейлей» для определения активности ферментов метаболизма *in vitro* [9, 10]. Используемая в «коктейле» дозировка хло-

роксазона близка к минимальной терапевтической (250 мг), что делает данный «коктейль» небезопасным для пациента. Более того, начиная с 2008 г. официально не зарегистрировано ни одного препарата, содержащего данное лекарственное вещество. Метопролол, использующийся для определения активности CYP2D6, применяется уже в терапевтической дозе, что может привести к развитию нежелательных явлений. К тому же, недостатком данной методики является большой объём работы, связанный с пробоподготовкой и хроматографическим разделением, что не позволит использовать её в рутинной лабораторной практике.

Затем «коктейльный» метод стал набирать популярность среди учёных, как метод определения активности ферментов метаболизма *in vivo*. В 2003 г. был описан «коктейль» Karolinska, состоящий из кофеина 100 мг (CYP1A2), лозартана 25 мг (CYP2C9), омепразола 20 мг (CYP2C19), дебризохина 10 мг (CYP2D6) и хинина 250 мг (CYP3A4) [11]. При определении активности CYP2C9 с помощью лозартана необходимо учитывать, что лозартан также метаболизируется изоферментом CYP3A4 [12], что необходимо иметь в виду при расчёте активности соответствующих изоферментов. Омепразол в данном «коктейле» применяется в терапевтической дозе, что ставит под сомнение безопасность использования данного метода. Комбинация дебризохина и хинина может привести к нежелательным лекарственным явлениям со стороны сердечно-сосудистой системы, что также делает этот «коктейль» небезопасным для использования в клинической практике.

В том же году был описан коктейль Cooperstown 5+1, позволяющий с помощью кофеина, декстрометорфана, омепразола, мидазолама и S-варфарина определять активность изоферментов CYP1A2, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 и CYP2C9 соответственно [13]. Использование данного коктейля затруднительно ввиду ограниченного оборота препаратов декстрометорфана на территории РФ.

Затем, в 2004 г. была опубликована статья, в которой Yin и соавторы предложили использовать комбинацию кофеина (CYP1A2), толбутамида (CYP2C9), омепразола (CYP2C19), дебризохина (CYP2D6) и мидазолама (CYP3A) с целью определения активности соответствующих изоферментов *in vivo* [14]. Затем в 2006 г. был описан «коктейль» Pittsburgh, состоящий из кофеина, мефенитоина, хлорзоксазона и флурбипрофена для определения активности изоферментов CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 и CYP2C9 соответственно [15]. Наконец, в 2008 г. была опубликована одна из самых популярных «коктейльных» методик определения активности изоферментов CYP под названием Inje, содержащей 93 мг кофеина (CYP1A2), 20 мг омепразола (CYP2C19), 30 мг декстрометорфана (CYP2D6), 30 мг лозартана (CYP2C9) и 2 мг мидазолама (CYP3A4) [16].

К общим недостаткам этих методов можно отнести несовместное извлечение исследуемых веществ как из плазмы, так и из мочи; затрудненная многоэтапная подготовка; использование достаточно высоких доз лекарственных веществ-маркеров (в некоторых случаях граничащих с терапевтическими), а также их относительная небезопасность. В качестве метода количественного определения в данных методиках в основном использовался метод ВЭЖХ-УФ; также некоторые методы использовали ВЭЖХ-МС.

В 2012 г. *Kyung-Suk Oh u соавт.* описали созданный ими «коктейль» для определения активности *in vivo* изоферментов CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A, в состав которого входят 10 мг кофеина, 2 мг лозартана, 200 мкг омепразола, 2 мг декстрометорфана и 100 мг мидазолама. [17].

Описанный в данной статье метод пригоден для использования в клинической практике по нескольким причинам. Используемые дозировки препаратов в 10–100 раз ниже их терапевтических доз. Извлечение и количественное определение исследуемых веществ производится совместно в одной пробе, что в разы сокращает время и затраты на исследование. К недостаткам метода можно отнести инвазивность метода (используется плазма крови) и использование относительно небезопасных сильнодействующих веществ (например, декстрометорфан, оборот которого, к тому же, ограничен на территории РФ).

Использование состава «коктейля», приведенного выше, встречается неоднократно в описанных исследованиях определения активности изоферментов цитохрома P450. К примеру, несколько раньше, в 2009 г., *Ghassabian u соавт.* использовали такой же коктейль для определения активности метаболизма у больных шизофренией. Следует отметить, что лекарственные вещества применялись в другой дозе, а именно — 100 мг кофеина, 20 мг омепразола, 25 мг лозартана, 30 мг

декстрометорфана и 2 мг мидазолама [18]. К недостаткам метода можно отнести сравнительно высокие концентрации используемых субстратов (например, доза мидазолама составляет 0,4 от терапевтической), сравнительно долгая пробоподготовка с использованием твёрдофазной экстракции и использование относительно небезопасных препаратов.

## Заключение

Описанные выше «коктейльные» методы определения активности основных изоферментов цитохрома P450 позволяют достаточно точно определить активность соответствующих изоферментов, однако всё же имеют ряд недостатков. Для того, чтобы было возможно использовать подобный метод в рутинной клинической практике для определения активности метаболизма у каждого конкретного пациента с целью коррекции дозировок назначаемых препаратов и рационализации фармакотерапии, используемый метод должен быть быстр, точен и безопасен для пациента. Таким образом, основными характеристиками «коктейльного» метода для введения в клиническую практику являются сравнительно быстрая пробоподготовка в один этап (извлечение всех исследуемых веществ из биообъекта в одну пробу), совместное хроматографическое разделение и количественный анализ исследуемых веществ (использование высокоточных и чувствительных методов, каким является ВЭЖХ-МС/МС) и преимущественное использование мочи в качестве биообъектов и эндогенных соединений в качестве субстратов (например, известны методики определения активности CYP3A4 с использованием в качестве субстрата-маркёра кортизола и его метаболита 6- $\beta$ -гидроксикортизола [19, 20, 21], использование эндогенного пинолина в качестве субстрата-маркёра изофермента CYP2D6 [22, 23] и др.).

## Литература

1. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: Издательство «Реафарм», 2004; 144.
2. Середин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М.: МИА. 2004; 303.
3. Сычёв Д.А. Клиническая фармакогенетика. Клиническая фармакология под ред. Академика РАМН, проф. Кукеса В.Г. М.:ГЕОТАР-МЕД, 2004; 156.
4. *Virginie Y. Martiny, Maria Miteva.* Advances in Molecular Modeling of Human Cytochrome P450 Polymorphism // Journal of Molecular Biology. 2013; 7: 207(21).
5. *Cornelis M.C., El-Sohemy A., Kabagambe E.K., Campos H.* Coffee, CYP1A2 genotype, and risk of myocardial infarction // Journal of American Medical Association. 2006; 295 (10): 1135(41).
6. Handbook of drug metabolism, Second Edition / Ed. by Paul G. Pearson and Larry C. Wienkers — Florida: CRC Press. 2008; 675.
7. *Lewis D.F.V., Dickins M., Eddershaw P.J., Tarbit M.H., Goldford P.S.* Cytochrome P450 Substrate Specificities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries // Drug metabolism and drug interactions. 1999; 15: 151.
8. *Zhu B., Ou-Yang D.S., Chen X.P., Huang S.L., Tan Z.R., He N., Zhou H.H.* Assessment of cytochrome P450 activity by a five-drug cocktail approach // Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics. 2001; 70 (5): 61.
9. *Yatamura Y., Koyama N., Umehara K.* Comprehensive kinetic analysis and influence of reaction components for chlorzoxazone 6-hydroxylation in human liver microsomes with CYP antibodies. // Xenobiotica. 2015; 45 (4): 353–60.
10. *Peng Y., Wu H., Zhang X. et al.* A comprehensive assay for nine major cytochrome P450 enzymes activities with 16 probe reactions on human liver microsomes by a single LC/MS/MS run to support reliable in vitro inhibitory drug-drug interaction evaluation. // Xenobiotica. 2015; 45 (11): 961–77

11. *Christensen M., Andersson K., Dalen P., et al.* The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2003; 73: 517–528.
12. *Lo M.W., Goldberg M.R., McCrea J.B. et al.* Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans. // *Clinical pharmacology and therapeutics*. 1995; 58 (6): 641–9.
13. *Chainuvat S., Nafziger A.N., Leeder J.S., et al.* Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the “Coopers- town 5 + 1 cocktail” // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2003; 74: 437–447.
14. *Yin O.Q., Lam S.S., Lo C.M., et al.* Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2004; 18: 2921–2933.
15. *Zgheib N.K., Frye R.F., Tracy T.S., et al.* Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2006; 80: 257–263.
16. *Ryu J.Y., Song I.S., Sunwoo Y.E., et al.* Development of the “Inje cocktail” for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms in vivo // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. 2007; 82: 531–540.
17. *Oh K.S., Park S.J., Shinde D.D., Shin J.G., Kim D.H.* High-sensitivity liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of five drugs and their cytochrome P450-specific probe metabolites in human plasma // *Journal of Chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2012; 1: 56–64.
18. *Ghassabian S., Chetty M., Tattam B.N., Chem M.C., Glen J., Rahme J., Stankovic Z., Ramzan I., Murray M., McLachlan A.J.* A high-throughput assay using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous in vivo phenotyping of 5 major cytochrome p450 enzymes in patients // *Therapeutic Drug Monitoring*. 2009; 31 (2): 239–46.
19. *Tanaka S., Uchida S., Inui N., Takeuchi K., Watanabe H., Namiki N.* Simultaneous LC-MS/MS analysis of the plasma concentrations of a cocktail of 5 cytochrome P450 substrate drugs and their metabolites. *Biol Pharm Bull*. 2014; 37 (1): 18–25.
20. *Смирнов В.В.* Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидрокортизола в моче с целью установления активности изофермента СУР 3А4. диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук М.: ГОУВПО «Московская медицинская академия». 2011.; 95.
21. *Смирнов В.В., Савченко А.Ю., Раменская Г.В.* Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента СУР 3А4 // *Биомедицина*. 2010; 1: 4: 56–60.
22. *Отделёнов В.А., Смирнов В.В., Дмитриев А.В., Поройков В.В., Шумянцева В.В., Красных Л.М., Сычёв Д.А., Кулес В.Г.* Влияние этилметилгидроксипиридина малата на активность СУР3А4: комплексный подход к оценке влияния на систему биотрансформации лекарственных средств // *Лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия*. 2013; 3: 30–36.
23. *Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Г.В. Раменская Г.В., Смирнов В.В.* Обзор существующих методик оценки активности СУР2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2015; 1: 4–11.
24. *Сычёв Д.А., Застрожин М.С., Смирнов В.В., Савченко Л.М., Брюн Е.А., Гущина Ю.Ш., Сорокин А.С., Агузаров А.Д.* Ассоциация активности изофермента СУР2D6 с профилем эффективности и безопасности галоперидола у пациентов, страдающих патологическим влечением к алкоголю // *Вестник РГМУ*. 2015; 4: 32–36.