

Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров

Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., Смирнов В.В.

ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова», г. Москва

Резюме. Приведены особенности функционирования и полиморфизма изофермента цитохрома P450 CYP2D6. Рассмотрены существующие методики определения его активности при помощи эндогенных маркеров. Представлен обзор исследований по скринингу эндогенных субстратов, подвергающихся биотрансформации преимущественно под воздействием изофермента CYP2D6. Изложены результаты по определению отношения пинолина к его метаболиту 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболину *in vitro* на культуре клеток и *in vivo* на мышах для последующей оценки активности изофермента CYP2D6.

Ключевые слова: биотрансформация, межлекарственные взаимодействия, фенотипирование, CYP2D6, цитохром P450, пинолин, персонализированная медицина

Review of existing methodologies to assess the activity of CYP2D6 using exogenous and endogenous markers

Abdrashitov A.D., Gildeeva G.N., Ramenskaya G.V., Smirnov V.V.

First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow

Abstract. Peculiarities of functioning and polymorphism of cytochrome P450 isoenzyme CYP2D6. Existing methods for determining its activity using endogenous markers. A review of studies on the screening of endogenous substrates, biotransformation mainly under the influence of isoenzyme CYP2D6. The results by determination pinoline relationship to its metabolite 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline *in vitro* in cell culture and *in vivo* in mice for evaluation isoenzyme activity CYP2D6.

Keywords: biotransformation, drug interactions, phenotyping, CYP2D6, cytochrome P450, pinoline, personalized medicine

Автор, ответственный за переписку:

Абдрашитов Рустем Хамзиевич — аспирант, ГБОУ ВПО «Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова»; адрес: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2; e-mail: rustixx13@gmail.com; тел.: +7 (966) 140-93-69

Введение

К межлекарственному взаимодействию проявляют большой интерес учёные, участвующие в исследованиях лекарств, а также регулирующие органы, которые отвечают за общественное здоровье. Поскольку «полипрагмазия», или применение нескольких лекарственных средств (ЛС) для лечения одного или нескольких заболеваний, стала обычной практикой, лекарственные взаимодействия стали одной из основных причин госпитализации и даже смерти. Таким образом, усилия исследователей направлены на изучение препаратов, чтобы предотвратить развитие межлекарственных взаимодействий.

Наиболее распространённым механизмом, лежащим в основе межлекарственного взаимодействия, является ингибирование, либо индуцирование активности цитохрома P450. При ингибировании активности изоферментов происходит снижение метаболизма ЛС и концентрация препарата повышается, что приводит к усилению фармакологического действия препарата и к повышению частоты возникновения нежелательных лекарственных реакций (НЛР). Индукция активности цитохрома P450 повышает метаболизм ЛС, и концентрация препарата не попадает в терапевтический диапазон.

Очевидно, что безопасность ЛС зависит от индивидуальных особенностей организма, поэтому их применение требует персонализированного подхода к каждому конкретному человеку. Подобный адресный подход, лежащий в основе персонализированной медицины, позволит не только повысить безопасность медикаментозного лечения, но и сократить расходы на коррекцию нежелательных реакций. Персональный подбор лекарств и доз достигается методами генотипирования и фенотипирования, с помощью которых становится возможно определить индивидуальные особенности пациента. С фенотипирования начинается изучения метаболизма лекарственных средств в клинике. Ряд исследований показал, что существует межиндивидуальный и внутрииндивидуальный разброс фармакокинетических параметров, который связан с различиями в характере и скорости метаболизма.

История изучения метаболизма лекарственных средств

Первые эксперименты по изучению метаболизма лекарственных препаратов (ЛП) были впервые проведены и опубликованы более 180 лет назад, сначала на

собаках в 1824 году и, затем, на людях в 1841 году [1, 2]. Данные эксперименты заложили основу современного понимания биотрансформации путём установления парадигмы, 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 привёл к прогрессу в исследованиях фармакокинетики и метаболизма ксенобиотиков.

Первой опубликованной реакцией метаболизма была реакция конъюгации с глицином. В 1841 и 1842 году, двое учёных независимо друг от друга приняли бензойную кислоту и, по сообщению исследователей, наблюдали данный конъюгат в моче «в обильном количестве» и «без видимых вредных последствий» [2-4]. 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 учёный по имени *Дессень* [5].

В ходе проведённых 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» [6, 7].

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» [8].

В 1983 году из печени человека были выделены, идентифицированы и охарактеризованы основные компоненты цитохрома P450 [9]. Определение точной структуры метаболитов и их количественное определение стало возможным благодаря развитию методов масс-спектрометрии и ядерно-магнитного резонанса.

Несмотря на то, что направление по изучению метаболизма считают зрелым, достижения техники двигают вперёд 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

ЛП среди индивидов и популяций. В будущем изучение метаболизма будет зависеть от появления и развития новых технологий.

Изоферменты цитохрома P450

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 ЛП. Подсемейства CYP1, CYP2 и CYP3 метаболизируют большинство ЛП и ксенобиотиков [10, 11]. 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, глутатионтрансферазы, алкоголь дегидрогиназы и альдегид дегидрогиназы. 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 [12]. Известно, что субстратами цитохрома являются соединения с различными функциональными группами, которые подвергаются метаболизму путём окисления.

Цитохром P450 состоит из группы изоферментов, которые участвуют в биотрансформации широкого диапазона структурно разнообразных химических веществ, как экзогенного, так и эндогенного происхождения. Также синтез стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот и простагландинов происходит с помощью цитохрома. Многие изоферменты были выделены и идентифицированы в печени и других тканях, включая почки, лёгкие, кишечник и мозг. Хотя эти ферменты имеют высокую степень сходства их аминокислотной последовательности, многие из них имеют различные каталитические функции [12]. Цитохром P450 имеет множество изоформ — изоферментов, которых на данный момент выделено более 1000 видов, разделённых на семейства. 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: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4.

Эта номенклатура используется не только у человека, но и у других видов. Как правило, у различных видов изоферменты имеют схожие между собой структу-

ру, 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 ЛП у человека нужно проводить анализ на разных видах животных, а также учитывать данные, полученные в испытаниях *in vitro* и *in silico* [12, 13].

Как семейство, несколько изоферментов вместе участвуют в окислении и биотрансформации сложных соединения. Однако, у отдельных изоферментов есть тенденция к большей селективности к субстратам с определёнными свойствами, что позволяет дифференцировать их [14, 15]. CYP1A1 часто участвует в метаболизме арильных углеводов [16]. У CYP1A1 и CYP1A2 частично совпадает сродство к субстратам; однако, CYP1A2 преимущественно метаболизирует полициклические ароматические углеводы. Как CYP1A1, так и CYP1A2 участвуют в биотрансформации проканцерогенов в канцерогены. Было показано, что CYP1A2 является основным ферментом, метаболизирующим такие ЛП, как фенацетин и теофиллин. CYP2A6 отдаёт предпочтение более мелким, нейтральным, менее липофильным молекулам, таким как кетоны и нитрозамины. CYP2C9 и CYP2C19 могут метаболизировать кислые молекулы. CYP2C9 участвует в реакциях O-деметилирования фенольных радикалов, окислении ароматических метил радикалов, радикалов, содержащих атом серы, N-деалкилировании [12]. Напротив, CYP2D6 может метаболизировать основные молекулы с атомом азота (флуоксетин, нортриптилин, декстрометорфан и буфуралол), а также катализирует реакции O-деметилирования, окисления метил радикалов и фенол O-деметилирования. CYP2E1 эффективен в биотрансформации малых молекул (этанол, ацетаминофен, галотан и паранитрофенол), а CYP3A4 — больших, липофильных молекул (симвастатин, тестостерон, циклоспорин и мидазолам) [14, 17]. Также CYP3A4 проявляет активность при N-деалкилировании, гидроксильровании ароматических систем и окислении радикалов, содержащих серу.

Из всех изоферментов наибольший интерес учёных вызывают изоферменты CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, так как количество ЛС, в метаболизме которых они участвуют, составляет около 80%. Оценка активности данных изоферментов играет важную роль для определения особенностей метаболизма определённого ЛС, либо комбинации ЛС.

Было обнаружено, что CYP2D6 отвечает за метабо-

лизм 20-30% лекарственных препаратов. К этим препаратам относятся трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антагонисты 5HT₃ рецепторов, антипсихотики, опиаты, амфетамины, а также и антагонисты β-адренорецепторов и антиаритмические средства. Интересно, что CYP2D6 локализуется не только в печени, но этот изофермент находят и в мозге, и сердце. Часто возникают межлекарственные взаимодействия, такие как ингибирование метаболизма нортриптилина и дезипрамина пароксетином, венлафаксина дифенгидрамином, метопролола гидроксихлорохином и индукция метаболизма кодеина рифампицином. Часто возникают такие НЛР, как периферическая нейропатия, лактатацидоз.

Функциональные особенности и полиморфизм изофермента CYP2D6

Среди десятков изоферментов цитохрома P450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков, изофермент CYP2D6 является одним из наиболее важных ферментов, осуществляющих метаболизм лекарственных средств. По данным различных исследований CYP2D6 участвует в метаболизме от 15 до 25% лекарств. Изофермент в основном экспрессируется в печени, но он так же локализуется в лёгких 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 [18]. Как следствие, такие различия в активности CYP2D6 могут привести не только к серьёзным 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:

1. «распространённые» (активные) метаболизаторы,
2. «медленные» метаболизаторы,
3. «сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы.

У людей с «медленным» метаболизмом отсутствуют функциональные аллели, у «распространённых» 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 лекарства и дозировки с наибольшей эффективностью.

стью и наименьшими побочными эффектами для индивидуального пациента, которые основываются на его или её генетическом профиле. Однако текущий функциональный статус пациента (т.е. фенотип) может быть более значимым, чем его/её 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 всё чаще отмечают такое явление, как модификационная (фенотипическая) изменчивость. При модификационной изменчивости происходит изменение клинического ответа на ЛС под действие факторов окружающей среды, либо при сопутствующем приёме лекарств, которые являются субстратами (ингибиторами, индукторами) соответствующих изоферментов. 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 [19]. На первом этапе исследования по результатам тестов генотипирования, пациенты были классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (35/900 или 3,9%), «не медленных» (т.е. «распространённых», «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 67%. 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 подчёркивают 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 на активность изоферментов постоянно меняется под действием различных препаратов, таких как хинидин, рифампицин, оральные контрацептивы, а также алкоголь, курение, инфекции, еда. Таким образом, для определения точной картины ферментной активности и для подбора адекватной дозы препарата нужно оценивать текущую активность изофермента цитохрома. Такую оценку позволяют определить методы фенотипирования, которые основаны на определении концентрации субстратов и их метаболитов.

Определение активности изоферментов цитохрома P450

В основе оценки активности изоферментов цитохрома P450, для последующего определения индивидуального клинического ответа на приём ЛС, лежат методы генотипирования и фенотипирования. Субстратная специфичность определённых ферментов метаболизма ЛС позволила разработать методы их фенотипирования. Активность того или иного фермента метаболизма определяется по фармакокинетике его специфического субстрата, называемого «маркерным» субстратом, путём измерения его концентрации и концентрации его метаболита в плазме крови или в моче [20]. На основании этих данных рассчитывается так называемый «метаболический» индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

Методы фенотипирования позволяют определять концентрацию ЛС в динамике, что является важным для того, чтобы установить на какой стадии произошло отклонение концентрации (на стадии всасывания или метаболизма). Также данные методы используются и в хронофармакологии для определения степени изменения фармакологического эффекта после приёма лекарственного препарата в различное время суток. При разработке оригинальных ЛС и их клинических испытаний, оценка активности изоферментов применяется для определения фармакокинетики препарата, а при разработке дженериковых ЛС методы фенотипирования позволяют оценить биоэквивалентность к оригинальной формуле.

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 определённое время в крови или сыворотке определяют концентрацию метаболита маркерного субстрата, а в некоторых случаях — и самого ЛС.

Инвазивные методы определения активности изофермента CYP3A4 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 CYP3A4, но и в незначительных количествах CYP1A2, а значит, данный тест отражает суммарную активность этих 2-х изоферментов цитохрома P450 [20].

При помощи скрининга определяются специфические субстраты, которые могут быть экзогенной или эн-

догенной природы. Большое распространение получили методики, основанные на экзогенных «маркерных» субстратах, таких как кофеин для CYP1A2, диклофенак для CYP2C9, декстрометорфан для CYP2D6, лидокаин для CYP3A4. Однако применение таких методик может привести к развитию у пациентов НЛР, таких как аллергические реакции и аритмогенные эффекты. Методики по определению эндогенных веществ и их метаболитов являются более перспективными, так как позволяют оценить активность изоферментов без введения пациенту специфических «маркеров». Данные методики являются на 100% безопасными. Одна из таких методик по определению кортизола и 6- α -гидрокортизола в моче с целью оценки активности CYP3A4 внедрена и успешно используется в Филиале «Клиническая фармакология» НЦ БМТ РАМН и Институте Клинической Фармакологии ФГУ «НЦ ЭСМП» [21] (табл. 1).

Количественное определение дебризохина и спартеина

Дебризохин и спартеин были первыми субстратами, с помощью которых стало возможным оценить большие различия в окислительном полиморфизме CYP2D6. 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-гидрокси-дебризохин, который количественно определяется в моче [31]. Оптимальная средняя доза, которая применяется для фенотипирования составляет 10 мг. Преимуществом применения дебризохина является высокое значение pK_a и полярность, благодаря которым рН мочи сильно не влияет на «метаболический» индекс [32]. Недостаток заключается в том, что в биотрансформации дебризохина участвует не только CYP2D6, но и CYP1A1. Тем не менее, CYP1A1 обеспечивает не более 2% метаболизма дебризохина [22]. Также, весомым недостатком является снижение артериального давления при использовании дебризохина. Ещё стоит отметить, что на территории Российской Федерации препараты дебризохина не зарегистрированы.

Метаболит спартеина 2-дегидроспартеин и 5-дегидроспартеин также обнаруживается в моче. Под

действием CYP2D6 спартеин биотрансформируется до неустойчивого N1-оксида, который в дальнейшем распадается на 2- и 5-дегидроспартеин [23]. Доза в 100 мг при фенотипировании соответствует только 10% от рекомендованной для антиаритмической терапии, так что никакого фармакологического эффекта не наблюдается. Также нет ограничений для применения спартеина у пациентов с почечной недостаточностью, так как не образуются глюкуроновые формы и «метаболический» индекс спартеин/дегидроспартеин остаётся неизменным с низкой почечной функцией [33]. При проведении фенотипирования с применением спартеина могут возникнуть НЛР в виде аллергии. Данный препарат также не зарегистрирован на территории РФ.

Количественное определение трамадола

Анальгетическое действие трамадола главным образом обусловлено его метаболитом M1 (моно-О-деметилтрамадол), у которого сродство к μ -рецептору в 200 раз выше, чем у самого препарата [25]. Известно, что M1 образуется благодаря изоферменту CYP2D6. Например, при применении трамадола с пароксетином (ингибитор CYP2D6) наблюдается уменьшение анальгетического действия, так как активность изофермента снижена [29].

При изучении фармакокинетики трамадола путём сравнения «метаболических» индексов трамадола/M1 к декстрометорфану/декстрорфану наблюдалась слабая корреляция [24]. В дальнейшем исследовании было обнаружено, что в метаболизме трамадола помимо изофермента CYP2D6, также участвуют CYP2B6 и CYP2C19, и для достижения хороших результатов увеличивают дозу, что приводит к более частому проявлению НЛР [26]. Трамадол относится к наркотическим ЛП, что также затрудняет применение его в анализах. Таким образом, применение трамадола в фенотипировании ограничено.

Количественное определение метопролола

Основными путями метаболизма метопролола являются О-деметилирование, α -гидроксилирование и N-деалкилирование. Для фенотипирования CYP2D6 достаточно 100 мг, около 70-80% метаболизма приходится на α -гидроксилирование и небольшой процент на О-деметилирование [34]. Различными исследованиями доказано, что α -гидроксилирование происходит

Существующие методики определения активности CYP2D6

Таблица 1

Субстрат	Метаболит	Доза, мг	Биообъект	Метод	Исследования
Дебризохина	4-гидроксидебризохин	10	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[22, 14]
Спартеин	2-дегидроспартеин, 5-дегидроспартеин	100	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[23, 24]
Трамадол	моно-О-деметилтрамадол (M1)	50	Моча	ВЭЖХ, УФ детектор	[24, 25, 26]
Метопролол	α -гидроксиметопролол	100	Кровь	ВЭЖХ, УФ детектор	[27, 28]
Декстрометорфан	Декстрофан	30	Кровь, моча, слюна	ВЭЖХ, УФ детектор	[28, 29, 30]

только за счёт CYP2D6, в то время как в O-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 приёма 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 артериальное давление.

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 CYP2D6. К сожалению, в государственном реестре лекарственных средств РФ декстрометорфан представлен только в комбинации с другими лекарственными веществами, следовательно, в нашей стране декстрометорфан недоступен.

Декстрометорфан преимущественно метаболизируется при участии цитохрома CYP2D6 в декстрофан путём O-деметилирования [32]. Другие изоферменты, такие как CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C9, CYP2C19, катализируют превращение декстрометорфана в неактивный 3-метоксиморфинан. Декстрофан и 3-метоксиморфинан деметилируются в гидроксиморфинан. Все образующиеся метаболиты экскретируются с мочой, в основном в виде глюкуронидов.

На сегодняшний день разработано много методик по определению активности, используя в качестве пробы декстрометорфан, при этом в качестве пробы можно отбирать различные биологические жидкости: мочу, кровь и слюну [30]. Такие методики имеют множество достоинств по сравнению с рассмотренными выше, но поскольку методики инвазивные, могут развиваться НЛР, а также стоит учитывать индивидуальную переносимость препарата.

Определение активности CYP2D6 по отношению пинолин/6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-бета-карболин(6-НО-ТНВС)

Для фенотипирования изофермента CYP2D6 были разработаны и валидированы различные методики. Оригинальные тесты с дебризохином и спар-

теином постепенно заменились клинически более надёжными 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, остаётся проблема прогнозирования фенотипа CYP2D6 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 два ЛП: трамадол и метопролол. Возможно, что поиск эндогенных субстратов для CYP2D6 будет интересен не только для расширения знаний о работе изоферментов цитохрома, но и обретёт и практическое значение для новой методики фенотипирования, которой не будут присущи недостатки ранее разработанных методик.

Скрининг эндогенных субстратов CYP2D6

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 CYP2D6 [35]. В своём исследовании учёные рассмотрели ряд эндогенных веществ потенциально являющиеся специфическими субстратами для CYP2D6. Было установлено, что изофермент CYP2D6 не значительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, синефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамин, серотонин, 6-метокси-триптамин и мелатонин) и β -карболины (гарман, норгарман и триптолин). Однако, индолметиламин 5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MDMT) и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- β -карболин) показали относительно высокое сродство к CYP2D6 и O-деметилировались только под действием CYP2D6. При добавлении к исходным веществам моноклональных антител против CYP2D6, O-деметилирование 5-MDMT и пинолина не наблюдалось. Специфичность пинолина по отношению к CYP2D6 около 99% относительно других изоферментов цитохрома P450.

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

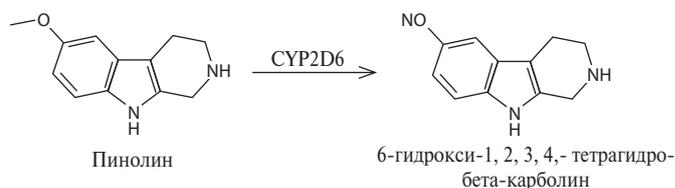


Рис. 1. Метаболизм пинолина посредством изофермента CYP2D6

Существующие методики определения пинолина

Определение *in vitro*. Как сообщалось ранее, эндогенное вещество пинолин подвергается O-деметилированию микросомами печени и его биотрансформация преимущественно катализируется изоферментом цитохрома P450 CYP2D6. Исследователи отделения фармацевтических наук университета в Баффало (штат Нью-Йорк, США) изучили, как влияет статус изофермента CYP2D6 на O-деметилирование пинолина и оценили, может ли пинолин применяться для определения активности CYP2D6. Также исследовали функциональные различия между аллельными изоформами CYP2D6.1, CYP2D6.2, CYP2D6.10. Затем проводились исследования кинетики, ингибирования и корреляции для определения роли CYP2D6 в биотрансформации пинолина.

Инкубация аллельных изоформ CYP2D6 и человеческих печёночных микросом проводилась в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,4, 37°C [35, 36, 37]. В среду вносили микросомальные протеины в концентрации 0,25 мг/мл, 0,2 мМ P450 редуктазу и 10 мкг L-α-дилаурилфосфатидилхолин. Активация реакции производилась при добавлении никотинамидадениндинуклеотид фосфата. Кинетика определялась по добавлению пинолина в концентрации от 0,2 до 20 мМ для изоформ и от 0,05 до 100 мМ для человеческих печёночных микросом. Время инкубации составило 5 минут для CYP2D6.1 и CYP2D6.2, 15 минут для CYP2D6.10 и 10 минут для человеческих печёночных микросом. В качестве ингибитора использовали хинидин в концентрации 1 мМ.

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 мМ 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 CYP2D6.10 (изоформа со сниженной функцией) не активна по отношению к пинолину. В то время, как под действием CYP2D6.1 и CYP2D6.2 (изоформы с нормальной функцией) происходило образование 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро-β-карболина. По сравнению с CYP2D6.1, у изоформы CYP2D6.2 ката-

литическая активность ниже [38]. Затем, при добавлении ингибитора CYP2D6 хинидина наблюдали полную блокировку O-деметилирования пинолина, что указывает на селективность изофермента к субстрату.

Определение *in vivo*. Дальнейшее исследование *in vivo* на мышах проводилось с целью подтверждения результатов *in vitro* и, чтобы сравнить активность изофермента CYP2D6 у мышей дикого типа и Tg-CYP2D6.

Для анализа были выбраны взрослые мыши (7 недель) дикого типа и Tg-CYP2D6, 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:

- Shimadzu prominence HPLC system
- детектор API 3000 turbo ion spray ionization triple quadrupole mass spectrometer
- 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 *in vitro* испытания. По результатам был сделан вывод, что у мышей O-деметилирование проходит под действием CYP2D6. Около 99% метаболита пинолина выводится из организма с мочой, следовательно, в качестве пробы можно использовать этот биообъект [38]. У мышей дикого типа активность CYP2D6 была выше, чем у Tg-CYP2D6 (табл. 2).

Определение пинолина *in vitro* и *in vivo*. Логичным продолжением рассмотренного исследования будет изучение по определению эндогенного пинолина в моче у человека для оценки активности изофермента цитохрома P450 CYP2D6. У такой методики определения активности CYP2D6 не будет недостатков, присущих методикам с применением экзогенных веществ, которые могут оказывать гипотензивное, антиаритмическое действия, а также могут вызывать аллергические реакции [38].

Активность CYP2D6

Таблица 2

		Подтип генотипа	Активность изофермента
In vitro	Человеческие печёночные микросомы	«распространённые» метаболиты	Средняя
	Аллельные изоформы: CYP2D6.1 CYP2D6.2 CYP2D6.10	«распространённые» метаболиты «медленные» метаболиты	Средняя Ниже среднего Нет
In vivo	Мыши дикого типа	«распространённые» метаболиты	Средняя
	Мыши Tg-CYP2D6	«медленные» метаболиты	Низкая

Литература

1. *Wöhler F.* // Tiedemann's Z. Physiol. — 1824. — № 1. — 142 p.
2. *Ure A.* On gouty concretions with a new method of treatment. // Pharm. J. Trans. — 1841. — № 1. — 24 p.
3. *Keller W.* On the conversion of benzoic acid into hippuric acid. // Ann. Chem. Pharm. — 1842. — № 43. — P. 108.
4. *Conti A., Bickel M.H.* History of drug metabolism: discoveries of the major pathways in the 19th century. // Drug Metab. Rev. — 1977. — № 6(1). — P. 1-50.
5. *Dessaigues V.* // C. R. Acad. Sci. — 1845. — № 21. — 1224 p.
6. *Neumeister R.* Lehrbuch der physiologischen Chemiemit Berücksichtigung der pathologischen Verhältnisse. // Gustav Fischer. — 1893. — № 2. — 346 p.
7. *Bachmann C., Bickel M.H.* History of drug metabolism: the first half of the 20th century. // Drug Metab. Rev. — 1985. — № 16(3). — P. 185-253.
8. *Caldwell J.* Drug metabolism and pharmacogenetics: the British contribution to fields of international significance. // Br. J. Pharmacol. — 2006. — № 147. — P. 89-99.
9. *Wang P.P. et al.* Purification and characterization of six cytochrome P — 450 isozymes from human liver microsomes. // Biochemistry. — 1983. — № 22. — P. 5375-5383.
10. *Rendic S., Di Carlo F.J.* Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. // Drug Metab. Rev. — 1997. — № 29. — P. 413-580.
11. *Guengerich F.P.* Cytochromes P450, drugs, and diseases. // Mol. Interv. — 2003. — № 3. — P. 194-204.
12. *Sheridan R.P. et al.* Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9. // J. Med. Chem. — 2007. — № 50(14). — P. 3173-3184.
13. *Terfloth L., Bienfait B., Gasteiger J.* Ligand — based models for the isoform specificity of cytochrome P450 3A4, 2D6, and 2C9 substrates. // J. Chem. Inf. Model. — 2007. — № 47. — P. 1688-1701.
14. *Granvil C.P. et al.* 4-Hydroxylation of debrisoquine by human CYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2002. — № 301. — P. 1025-1032.
15. *Popa-Burke I.G. et al.* Streamlined system for purifying and quantifying a diverse library of compounds and the effect of compound concentration measurements on the accurate interpretation of biological assay results. // Anal. Chem. — 2004. — № 76(24). — P. 7278-7287.
16. *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. — № 19. — P. 1361-1368.
17. *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. — № 41. — P. 11025-11034.
18. *Кукес В.Г., Сычев Д.А., Шух Е.В.* Изучение биотрансформации лекарственных средств — путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии. // Врач. — 2007. — № 1. — С. 6-8.
19. *Sheldon H.P. et al.* Cytochrome P450 2D6 Phenocopy Conversion Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine. // J. Clin. Psychiatry. — 2013. — № 74(6). — P. 614-621.
20. *Кукес В.Г.* Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. — М.: Издательство «Реафарм», 2004. — 144 с.
21. *Смирнов В.В., Саеченко А.Ю., Раменская Г.В.* Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4. // Биомедицина. — 2010. — № 4. — С. 56-60.
22. *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. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 1984. — № 81. — P. 7348-7352.
23. *Griese E.U. et al.* Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. // Pharmacogenetics. — 1998. — № 8. — P. 15-26.
24. *Pedersen R.S., Damkier P., Brosen K.* Tramadol as a new probe for cytochrome P450 2D6 phenotyping: a population study. // Clin. Pharmacol. Ther. — 2005. — № 77. — P. 458-467.
25. *Poulsen L. et al.* The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. // Clin. Pharmacol. Ther. — 1996. — № 60. — P. 636-644.
26. *Subrahmanyam V. et al.* Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. // Drug Metab. Dispos. — 2001. — № 29. — P. 1146-1155.
27. *Kim M. et al.* Inhibition of the enantio selective oxidative metabolism of metoprolol by verapamil in human liver microsomes. // Drug Metab. Dispos. — 1993. — № 21. — P. 309-317.
28. *Labbe L. et al.* Effect of gender, sex hormones, time variables and physiological urinary pH on apparent CYP2D6 activity as assessed by metabolic ratios of marker substrates. // Pharmacogenetics. — 2000. — № 10. — P. 425-438.
29. *Tegeeder I., Lotsch J., Geisslinger G.* Pharmacokinetics of opioids in liver disease. // Clin. Pharmacokinet. — 1999. — № 37. P. 17-40.
30. *von Moltke L.L. et al.* Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in-vitro: role of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A. // J. Pharm. Pharmacol. — 1998. — № 50. — P. 997-1004.
31. *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/bufl). // Biochem. Biophys. Res. Commun. — 1988. — № 152. — P. 411-416.
32. *Chainuvati S. et al.* Combined phenotypic assessment of cytochrome p4501A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the "Cooperstown 5+1 cocktail". // Clin. Pharmacol. Ther. — 2003. — № 74. — P. 437-447.
33. *Schellens J.H. et al.* Lack of pharmacokinetic interaction between nifedipine, sparteine and phenytoin in man. // Br. J. Clin. Pharmacol. — 1991. — № 31. — P. 175-178.
34. *Cerqueira P.M. et al.* Influence of chronic renal failure on stereo selective metoprolol metabolism in hypertensive patients. // J. Clin. Pharmacol. — 2005. — № 45. — P. 1422-1433.
35. *Yu A. et al.* Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. // Pharmacogenetics. — 2003. — № 13. — P. 307-319.
36. *Felmler M.A. et al.* Cytochrome P450 expression and regulation in CYP3A4/CYP2D6 double transgenic humanized mice. // Drug Metab. Dispos. — 2008. — № 36. — P. 435-44.
37. *Zhang W.Y. et al.* Expression and functional analysis of CYP2D6.24, CYP2D6.26, CYP2D6.27 and CYP2D7 isozymes. // Drug Metab. Dispos. — 2009. — № 37. — P. 1-4.
38. *Jiang X.L., Shen H.W., Yu A.M.* Pinoline May be Used as a Probe for CYP2D6 Activity. // Drug Metabolism and Disposition. — 2013. — № 37(3). — P. 443-446.