

# ПЕРСПЕКТИВЫ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ CYP2D6 С ПРИМЕНЕНИЕМ ПИНОЛИНА

**Р.Х. Абдрашитов\***, **Г.Н. Гильдеева**, канд. фарм. наук,  
**Г.В. Раменская**, докт. фарм. наук, профессор, **В.В. Смирнов**, канд. фарм. наук  
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова,  
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*E-mail: r.abdrashitov@expert-ls.ru

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

**Ключевые слова:** биотрансформация, фенотипирование, CYP2D6, цитохром P450, пинолин, персонализированная медицина.

Безопасность лекарственных средств (ЛС) зависит от индивидуальных особенностей организма, что требует персонализированного подхода к каждому конкретному человеку. 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 удастся определить индивидуальные особенности пациента. С фенотипирования начинается изучение метаболизма ЛС в клинике. Существующий межиндивидуальный и внутрииндивидуальный разброс фармакокинетических параметров связан с различиями в характере и скорости метаболизма.

В биотрансформации широкого диапазона структурно разнообразных химических веществ экзогенного и эндогенного происхождения участвует цитохром P450 из группы изоферментов. С помощью цитохрома происходит синтез стероидных гормонов, холестерина, желчных кислот и простагландинов. Изоферменты выделены и идентифицированы в печени и других тканях, включая почки, легкие, кишечник и мозг. Несмотря на высокую

степень сходства аминокислотной последовательности, многие из этих ферментов имеют различные каталитические функции [1]. На данный момент выделено более 1000 видов изоформ цитохрома P450, разделенных на семейства. В метаболизме ЛС принимают участие ферменты семейств I, II, III. Наиболее важными для метаболизма ЛС и хорошо изученными изоферментами цитохрома P450 являются: CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A4 [2].

Установлено, что CYP2D6 отвечает за метаболизм 20–30% лекарственных препаратов, к которым относятся трициклические антидепрессанты, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, антагонисты 5HT<sub>3</sub> рецепторов, антипсихотики, опиаты, амфетамины, а также и антагонисты β-адренорецепторов и антиаритмические средства. CYP2D6 локализуется не только в печени; этот изофермент находят и в мозге, и сердце [3]. Часто возникают такие межлекарственные взаимодействия, как ингибирование метаболизма нортриптилина дезипраминапароксантином, венлафксинадифенгидрамин, метопрололагидрохлорохином и индукция метаболизма кодеина рифампицином. Часто возникают нежелательные лекарственные реакции (НЛР), в частности периферическая нейропатия, лактат-ацидоз.

Особенностью изофермента CYP2D6 является его высокая межвидовая и внутривидовая вариабельность активности, причина которой – генетический полиморфизм [4]. Такой полиморфизм может приводить к 30–40-кратной разнице в клиренсе препаратов, в результате чего происходит выход концентрации из терапевтического окна, как по нижней, так и по верхней границе [5]. Вследствие таких различий в активности CYP2D6 возможны не только серьезные НЛР (например, при антидепрессантной терапии), но и абсолютное отсутствие фармакологического эффекта (например, отсутствие анальгетического эффекта опиоидных препаратов).

На сегодняшний день существуют различные фармакогенетические тесты для определения генотипа пациента. Однако текущий функциональный статус пациента (т.е. фенотип) может быть более значимым, чем его/ее генотип. Применение персонализированной медицины требует понимания и рассмотрения вовлечения соответствующих негенетических факторов (включая окружающую среду и персональную изменчивость) в дополнение к генетическим факторам. Индивидуальная активность изоферментов при отсутствии ингибиторов или индукторов стабильна в течение жизни. Но активность изоферментов постоянно меняется под действием различных препаратов (например, кинидина, рифампицина, оральных контрацептивов), а также алкоголя, курения, инфекции, еды. Таким образом, для определения точной картины ферментной активности и для подбора адекватной дозы препарата нужно оценивать текущую активность изофермента цитохрома.

Субстратная специфичность конкретных 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 [6]. На основании этих данных рассчитывается так называемый «метаболический» индекс, равный отношению концентрации ЛС к концентрации его метаболита.

Для фенотипирования изофермента CYP2D6 были разработаны и валидированы различные методики (см. таблицу). Оригинальные тесты с дебризохином и спартеином постепенно заменились клинически более надежными тестами с декстрометорфаном и метопрололом. Затем конкуренция среди методов фенотипирования потеряла свою остроту, так как стали быстро внедряться методы генотипирования, основанные на ДНК. Современные методы фенотипирования по определению экзогенных «маркеров» могут приводить к развитию НЛР. Кроме того, следует учитывать, что на территории России из всех возможных субстратов заре-

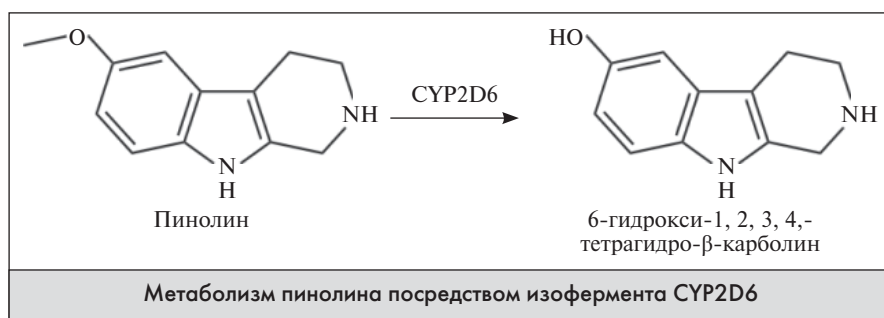
гистрированы только 2 лекарственных препарата: трамадол и метопролол. Поиск эндогенных субстратов для CYP2D6 интересен не только для расширения знаний о работе изоферментов цитохрома, но и имеет практическое значение для разработки новой методики фенотипирования, у которой не будет недостатков, присущих ранее разработанным методикам.

Было проведено широкое исследование по поиску эндогенных веществ, специфичных изоферменту CYP2D6 [17]. Установлено, что изофермент CYP2D6 незначительно метаболизирует эндогенные фенилэтиламины (2-фенилэтиламин, октопамин, синефрин, метанефрин и норметанефрин), индолэтиламины (триптамин, серотонин, 6-метокситриптамин и мелатонин) и  $\beta$ -карболины (гарман, норгарман и триптолин). Индолметиламин 5-метокси-N,N-диметилтриптамин (5-MDMT) и пинолин (6-метокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -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 составила около 99% относительно других изоферментов цитохрома P450.

Пинолин подвергается O-деметилированию микросомами печени с образованием метаболита 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболина (см. рисунок). Его биотрансформация катализируется преимущественно изоферментом цитохрома P450 CYP2D6. При изучении влияния статуса изофермента CYP2D6 на O-деметилирование пинолина и оценке возможности применения пинолина для определения активности CYP2D6 [18] были рассмотрены функциональные различия между аллельными изоформами CYP2D6.1, CYP2D6.2, CYP2D6.10, а также исследованы кинетика, ингибирование и корреляция для определения роли CYP2D6 в биотрансформации пинолина. Инкубация аллельных изоформ CYP2D6 и человеческих печеночных микросом осуществлялась в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,4 и температуре 37°C [17, 19]. В среду вносили микросомальные протеины в

#### МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ CYP2D6

Субстрат	Метаболит	Доза, мг	Биообъект	Метод	Исследования
Дебризохин	4-гидрокси-дебризохин	10	Моча	ВЭЖХ, УФ-детектор	[4, 7]
Спартеин	2-дегидро-спартеин, 5-дегидро-спартеин	100	То же	То же	[7, 8]
Трамадол	Моно-O-дезметил-трамадол (M1)	50	—»—	—»—	[8–10]
Метопролол	$\alpha$ -Гидрокси-метопролол	100	Кровь	—»—	[11–13]
Декстро-меторфан	Декстрофан	30	Кровь, моча, слюна	—»—	[14–16]



### Вывод

Методика определения активности CYP2D6 по отношению к пинолину не имеет недостатков, присущих методикам с применением экзогенных веществ, которые могут оказывать гипотензивное и антиаритмическое действие, а также вызывать аллергические реакции.

концентрации 0,25 мг/мл, 0,2  $\mu\text{M}$  P450 редуктазу и 10  $\mu\text{g}$  L- $\alpha$ -дилаурилфосфатидилхолин. Реакция активировалась добавлением никотинамида адениндинуклеотида фосфата. Кинетика определялась по добавлению пинолина в концентрации от 0,2 до 20  $\mu\text{M}$  для изоформ и от 0,05 до 100  $\mu\text{M}$  – для человеческих печеночных микросом. Время инкубации составило: 5 мин – для CYP2D6.1 и CYP2D6.2; 15 мин для – CYP2D6.10 и 10 мин – для человеческих печеночных микросом. В качестве ингибитора использовали кинидин в концентрации 1  $\mu\text{M}$ . Количественное определение выполняли методом ВЭЖХ с УФ детектором. Согласно результатам исследования, аллельная изоформа CYP2D6.10 (изоформа со сниженной функцией) не активна по отношению к пинолину. В то же время под действием CYP2D6.1 и CYP2D6.2 (изоформы с нормальной функцией) происходило образование 6-гидрокси-1,2,3,4-тетрагидро- $\beta$ -карболина. По сравнению с CYP2D6.1 у изоформы CYP2D6.2 каталитическая активность ниже. Затем при добавлении ингибитора CYP2D6 хинидина наблюдали полную блокировку O-деметилирования пинолина, что указывает на селективность изофермента к субстрату. Дальнейшее исследование *in vivo* на мышах проводилось с целью подтверждения результатов *in vitro*, а также для сравнения активности изофермента CYP2D6 у мышей дикого типа и Tg-CYP2D6. Для анализа были выбраны взрослые мыши (7 нед) дикого типа и Tg-CYP2D6, со средним весом 22–25 г. Пинолин вводился интраперитонеально в дозе около 750  $\mu\text{g}$ . В качестве пробы отбиралась моча через 24 ч после введения пинолина. Количественное определение проводилось методом LC-MS/MS. Анализ подтвердил результаты *in vitro* испытания. У мышей O-деметилирование проходит под действием CYP2D6, около 99% метаболита пинолина выводится из организма с мочой, а значит, в качестве пробы можно использовать этот биообъект. У мышей дикого типа активность CYP2D6 была выше, чем у Tg-CYP2D6 [18].

Логичным завершением данного исследования должно стать определение эндогенного пинолина в моче у человека для оценки активности изофермента цитохрома P450 CYP2D6.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sheridan R.P., Korzekwa K.R., Torres R.A., Walker M.J. Empirical regioselectivity models for human cytochromes P450 3A4, 2D6, and 2C9. J. Med. Chem., 2007; 50 (14): 3173–3184.
2. Смирнов В.В., Савченко А.Ю., Раменская Г.В. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6- $\beta$ -гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP 3A4. Биомедицина, 2010; 4: 56–60 (Smirnov V.V., Savchenko A.Ju., Ramenskaja G.V. Development and validation of methods of quantitative determination of endogenous cortisol and 6- $\beta$ -hydrocortisol in the urine with the aim of determine the activity of CYP 3A4 isoenzyme. Biomedicina, 2010; 4: 56–60 (in Russian)).
3. 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: 1688–1701.
4. Guengerich F.P., Miller G.P., Hanna I.H., Martin M.V., Leger S., Black C., Chauré N., Silva J.M., Trimble L.A., Yergey J.A., Nicoll - Griffith D.A. Diversity in the oxidation of substrates by cytochrome P450 2D6: lack of an obligatory role of aspartate 301 – substrate electrostatic bonding. Biochemistry, 2002; 41: 11025–11034.
5. Кукес В.Г., Сычев Д.А., Ших Е.В. Изучение биотрансформации лекарственных средств – путь к повышению эффективности и безопасности фармакотерапии. Врач, 2007; 1: 6–8 (Kukes V.G., Sychev D.A., Shih E.V. Study of the biotransformation of drugs - a way to increase the effectiveness and safety of pharmacotherapy. Vrach, 2007; 1: 6–8 (in Russian)).
6. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.: Реафарм, 2004; 144 (Kukes V.G. Drug metabolism: clinical and pharmacological aspects. Moscow: Reafarm, 2004; 144 (in Russian)).
7. Griese E.U., Zanger U.M., Brudermanns U., Gaedigk A., Mikus G., Morike K., Stuvén T., Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. Pharmacogenetics, 1998; 8: 15–26.
8. 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: 458–467.
9. Poulsen L., Arendt-Nielsen L., Brosen K., Sindrup S.H. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. Clin. Pharmacol. Ther., 1996; 60: 636–644.
10. Subrahmanyam V., Renwick A.B., Walters D.G., Young P.J., Price R.J., Tonelli A.P., Lake B.G. Identification of cytochrome P-450 isoforms responsible for cis-tramadol metabolism in human liver microsomes. Drug Metab. Dispos., 2001; 29: 1146–1155.
11. Kim M., Shen D.D., Eddy A.C., Nelson W.L., Roskos L.K. Inhibition of the enantio selective oxidative metabolism of metoprolol by verapamil in human liver microsomes. Drug Metab. Dispos., 1993; 21: 309–317.
12. Labbe L., Sirois C., Pilote S., Arseneault M., Robitaille N.M., Turgeon J., Hamelin B.A. 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: 425–438.
13. Cerqueira P.M., Coelho E.B., Gelelele T.J., Goldman G.H., Lanchote V.L. Influence of chronic renal failure on stereo selective metoprolol metabolism in hypertensive patients. Clin. Pharmacol., 2005; 45: 1422–1433.
14. Tegeder I., Lotsch J., Geisslinger G. Pharmacokinetics of opioids in liver disease. Clin. Pharmacokinet., 1999; 37: 17–40.

15. Von Moltke L.L., Greenblatt D.J., Grassi J.M., Granda B.W., Venkatakrisnan K., Schmider J., Harmatz J.S., Shader R.I. Multiple human cytochromes contribute to biotransformation of dextromethorphan in-vitro: role of CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A. *J. Pharm. Pharmacol.*, 1998; 50: 997–1004.

16. Chainuvati S., Nafziger A.N., Leeder J.S., Gaedigk A., Kearns G.L., Sellers E., Zhang Y., Kashuba A.D., Rowland E., Bertino J.S. 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: 437–447.

17. Yu A. M., Idle J. R., Herraiz T., Kupfer A., Gonzalez F. J. Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamine O-demethylase. *Pharmacogenetics*, 2003; 13: 307–319.

18. 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): 443–446.

19. Zhang W.Y., Tu Y.B., Haining R.L., Yu A.M. Expression and functional analysis of CYP2D6.24, CYP2D6.26, CYP2D6.27 and CYP2D7 isozymes. *Drug Metab. Dispos.*, 2009; 37: 1–4.

*Поступила 25 ноября 2014 г.*

## PROSPECTS FOR A PROCEDURE FOR ASSESSING CYP2D6 ACTIVITY USING PINOLINE

**R.Kh. Abdrashitov, G.N. Gildeeva, PhD; Professor G.V. Ramenskaya, PhD; V.V. Smirnov, PhD**

*I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 119991*

### SUMMARY

Cytochrome P450 isoenzymes are involved in the biotransformation of different endogenous and exogenous substances, including medications. The paper considers the specific features of the functioning and polymorphism of the cytochrome P-450 isoenzyme CYP2D6 and the possible consequences of its malfunction influenced by genetic factors and inhibitors or inducers. It also deals with the advantages, disadvantages, and limitations of existing procedures for determining its activity with exogenous markers. Screening studies of endogenous substrates that are prone to biotransformation that is predominantly affected by the isoenzyme CYP2D6 are reviewed. The compounds indole methylamine, 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine (5-MDMT) and pinoline (6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline) had the greatest affinity for CYP2D6. The specificity of pinoline was about 99%. The paper covers the results of investigations dealing with the relationship of pinoline to its metabolite 6-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline *in vitro* on cell culture and *in vivo* in mice for further assessment of CYP2D6 activity.

**Key words:** biotransformation, phenotyping, CYP2D6, cytochrome P450, pinoline, personalized medicine.