



## Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6- $\beta$ -гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента СУР 3А4

В.В.Смирнов<sup>1</sup>, А.Ю.Савченко<sup>2</sup>, Г.В.Раменская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Первый МГМУ им. И.М.Сеченова, Москва

<sup>2</sup> Институт клинической фармакологии НЦ ЭСМП Минздравсоцразвития, Москва

Контактная информация: e-mail: elmed@yandex.ru

---

Разработан чувствительный метод определения кортизола и 6- $\beta$ -гидрокортизола в моче с помощью жидко-жидкостной экстракции и жидкостной хроматографии с масс-детектором с целью определения активности изофермента СУР 3А4. Анализ проводили на приборе Agilent 1200 LC/MS. В результате были сделаны выводы о связи отношения этих гормонов с активностью СУР3А4.

**Ключевые слова:** СУР 3А4, кортизол, 6- $\beta$ -гидрокортизол, метаболизм, LC-MS.

---

Изофермент цитохрома P450 (СУР) 3А4 участвует в метаболизме большого количества лекарственных средств (более 45% всех применяемых в настоящее время лекарственных средств) [1]. Он катализирует несинтетическую стадию биотрансформации. При этом под действием СУР3А4 лекарственные средства превращаются в более гидрофильные, чем нативные вещества, метаболиты, в результате чего скорость выведения почками данных соединений возрастает. В большинстве случаев, помимо увеличения скорости выведения, в процессе метаболизма так же теряется фармакологическая активность. Однако некоторые лекарственные вещества, так

называемые пролекарства, изначально практически не обладают фармакологической активностью, и только под влиянием СУР3А4 превращаются в активные метаболиты, которые и вызывают фармакологические эффекты. Кроме того, СУР3А4 участвует в биотрансформации не только введенных извне лекарственных средств (ЛС), но и эндогенных соединений – таких, как стероидные гормоны, метаболиты витамина D и другие [2].

Некоторые вещества влияют на изофермент СУР3А4, ингибируя или индуцируя его активность. Индукция ведет к ускорению метаболизма ЛС и, как правило, к увеличению скорости выведения вещества и снижению его фармакологиче-

ской активности. Ингибирование же наоборот, снижает активность ферментов и повышает концентрацию ЛС в крови [1].

Определение активности изофермента СУР3А4 является важной задачей для рациональной фармакотерапии, особенно при одновременном назначении нескольких препаратов. Так, например, индукторы или ингибиторы изофермента СУР3А4 при совместном приеме с субстратом данного изофермента будут изменять фармакокинетические характеристики этого субстрата [3].

Принцип установления активности СУР3А4 в организме человека заключается в определении концентрации в крови или других биологических жидкостях метаболита, который образуется из какого-либо вещества исключительно под действием СУР3А4. Такие ЛС называют маркерными субстратами. В зависимости от субстрата методы определения активности изофермента СУР3А4 можно разделить на две группы: инвазивные и неинвазивные. В настоящее время для оценки активности СУР3А4 инвазивным методом в научных целях используется несколько маркерных субстратов: эритромицин, лидокаин, нифедипин, дапсон и мидозалам [2].

В большинстве из этих тестов ЛС, являющееся маркерным субстратом, вводится перорально (при этом оценивается суммарная активность СУР3А4 как в гепатоцитах, так и в энтероцитах) или внутривенно (при этом оценивается суммарная активность СУР3А4 исключительно в гепатоцитах); далее через определенное время в крови или сыворотке определяют концентрацию метаболита маркерного субстрата, а в некоторых случаях – и самого ЛС.

Неинвазивные методы определения активности изофермента СУР3А4 име-

ют 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 МEGX может образовываться из лидокаина под влиянием не только СУР3А4, но и в незначительных количествах СУР1А2, а значит, данный тест отражает суммарную активность этих 2 изоферментов цитохрома P450.

В связи с этим более перспективны, на наш взгляд, неинвазивные методы оценки активности СУР3А4. В таких случаях активность СУР3А4 определяют по концентрации в биологических жидкостях эндогенных метаболитов, которые образуются только под действием СУР3А4, что исключает необходимость введения какого-либо ЛС, а значит, делает метод на 100% безопасным для пациента.

В качестве такого неинвазивного субстрата предлагается кортизол (гидрокортизон) – стероидный гормон коры надпочечников.

Оценка активности СУР3А4 может проводиться по отношению концентрации 6-β-гидрокортизола к концентрации кортизола (6β-гидрокортизол/кортизол). Это возможно потому, что 6-β-гидрокортизол образуется из кортизола исключительно под действием СУР3А4. Так как и кортизол, и его метаболит выводятся почками, на анализ берут не плазму крови, а мочу, что

упрощает процедуру отбора биопробы. На анализ берут утреннюю мочу, так как концентрация кортикостероидов с утра самая высокая. Мочу собирают в пластмассовые пробирки, допускается замораживание мочи [4]. Ко всему прочему преимуществом теста является также возможность сбора биоматериала (мочи) в домашних условиях. Концентрации  $6\beta$ -гидроксикортизола и кортизола в моче определяются методом жидкостной хроматографии, как наиболее чувствительном и селективном, и широко используемом для данных целей [5]. Низкие значения отношения  $6\beta$ -гидроксикортизол/кортизол соответствуют низкой активности СYP3A4, а высокие – высокой.

### Экспериментальная часть

В качестве биообъекта собирали утреннюю мочу пациентов, находящихся на лечении препаратом, который ингибирует или индуцирует активность СYP3A4. Первый отбор образцов проводился до начала лечения, а затем через неделю, после начала приема препарата. Для анализа отбиралась моча у пациентов обоих полов. В качестве метода пробоподготовки была выбрана жидко-жидкостная экстракция. Экстрагентом являлась смесь этилацетат/изопропанол (85/15). К 2 мл мочи прибавляли 4 мл экстрагента. Встряхивали в течение 10 минут, для полноты экстракции. Затем центрифугировали в течение 5 минут при скорости 3000 об/мин. Органический слой отделяли. С водным слоем повторно проделывали ту же самую процедуру. После центрифугирования два органических слоя объединяли. В качестве очистки и для улучшения экстракции к объединенному органиче-

скому слою добавляли 2 мл 1М раствора NaOH, встряхивали в течение 10 минут, и потом центрифугировали 5 минут при скорости 3000 об/мин. Органический слой отделяли, а затем упаривали на вакуумно-выпарительном аппарате. Сухой остаток растворяли в 1 мл этилового спирта.

Хроматографическое определение кортизола и  $6\beta$ -гидроксикортизола в моче проводилось на приборе Agilent 1200 LC/MS. Объем вкола составлял 10 мкл. Состав подвижной фазы: 55% воды, подкисленной HCOOH (1 мл муравьиной кислоты на 1 л воды) и 45 % ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы – 0,5 мл/минуту. Колонка: обращенно-фазная Waters (5мкм; 4,6×150мм), температура колонки – 35°C. Длина волны ультрафиолетового детектора – 246 нм. Масс-детектор работал в режиме сканирования в позитивной полярности. Тип ионизации: MM-ES + APCI.

В качестве метода количественного определения был выбран метод абсолютной калибровки. Для этого были приготовлены стандартные растворы кортизола и  $6\beta$ -гидроксикортизола в моче, из которой заранее были удалены эндогенные кортизол и  $6\beta$ -гидроксикортизол, методом жидко-жидкостной экстракции. Готовили серию из 6 калибровочных растворов. Использовали стандартные растворы кортизола и  $6\beta$ -гидроксикортизола с концентрацией 10 мкг/мл в спирте. Затем из этого раствора получали растворы данных веществ в моче, избавленной от эндогенных уровней этих соединений. Концентрации калибровочных растворов были следующие – 0,1 нг/мл, 1,0 нг/мл, 10,0 нг/мл, 25,0 нг/мл, 50,0 нг/мл, 100,0 нг/мл. После хроматографирования всех этих растворов, строили калибровочный график, по которому впо-

следствии находили значения содержания кортизола и 6-β-гидрокортизола в испытуемой моче.

Разработанная методика была валидирована по показателям линейности, специфичности, точности и воспроизводимости.

Диапазон линейности определения был доказан в диапазоне от 0,1 нг/мл до 100,0 нг/мл. Уравнение прямой имело вид, коэффициент корреляции  $R = 0,99982$ .

**Специфичность метода.** У пиков кортизола и 6-β-гидрокортизола в определяемых образцах не имелось наложений другими субстанциями. По времени удерживания пики из исследуемых образцов совпадали с пиками стандартного раствора.

**Точность.** Один и тот же образец с известной концентрацией кортизола и 6-β-гидрокортизола анализировали 6 раз подряд. В одних и тех же условиях. Полученные результаты концентраций кортизола и 6-β-гидрокортизола были близкими (коэффициент вариации  $\pm 1,07\%$ ).

**Воспроизводимость.** Образец подвергали повторным исследованиям в разные дни и разными специалистами. Проводили по три измерения. Полученные результаты были схожи друг с другом (коэффициент вариации 0,90568).

**Пригодность хроматографической системы.** Коэффициент разрешения пиков кортизола и 6-β-гидрокортизола был равен 2,6; это говорит о полном их разделении. Фактор асимметрии пика кортизола 1,20, а 6-β-гидрокортизола – 1,15. Эффективность колонки для обоих веществ была выше 3000 теоретических тарелок, что говорит о высокой эффективности хроматографической системы.

## Заключение

Полученные результаты показали ожидаемое изменение отношения кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче в течение периода времени, за который отбирались пробы. Полученные результаты были соотнесены с клиническими наблюдениями, на основании чего были сделаны соответствующие выводы об эффективности методики определения отношения кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче с целью определения активности изофермента СYP 3A4.

## Выводы

Разработан чувствительный метод определения кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче с помощью жидкожидкостной экстракции и жидкостной хроматографии с масс-детектором. Проведена валидация данного метода. Метод обладает высокой чувствительностью и селективностью, благодаря сочетанию жидкостной хроматографии с УФ-детектором и масс-детектором.

Сделаны выводы о связи отношения этих гормонов с активностью СYP3A4 и возможностью использования его для оценки активности данного изофермента. Так как данный метод не требует введения в организм человека посторонних веществ, его можно применять для оценки активности метаболических ферментов даже у беременных и кормящих женщин, а так же у грудных детей.

## Список литературы

1. **Кукес В.Г.** Биотрансформация лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. М.:Рефарм. 2004. – 186 с.

2. *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.

3. *Раменская Г.В., Светый Л.И., Кулинченко А.С.* Влияние флуконазола на концентрацию блокаторов медленных кальциевых каналов в плазме крови // *Клиническая фармакология и терапия.* – 2002. – № 5. – С. 54–56.

4. *Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатъев И.В. и др.* Клиническая фармакогенетика. /Под редакцией В.Г.Кукеса, Н.П.Бочкова. М.: Гэотар-Медиа, 2007. – 248 с.

5. *Раменская Г.В.* Хроматографическое определение лекарственных средств и их метаболитов для фенотипирования изоферментов цитохрома Р-450 // *Химико-фармацевтический журнал: научно-технический и производственный журнал.* – 2005. – Т. 39, № 2. – С. 53–56.

## **Development and validation quantity method for determination of endogenous cortisol and 6- $\beta$ -hydroxycortisol in human urine for activity determination of isoensim CYP 3A4**

**V.V.Smirnov, A.U.Savchenko, G.V.Ramenskaya**

The sensitive method of definition cortisol and 6  $\beta$ -hydroxycortisol in urine by liquid-liquid extraction and LC/MS has been developed. The analysis spent on Agilent 1200 LC/MS. As a result of the work the validate method of definition endogenous cortisol and 6  $\beta$ -hydroxycortisol in urine has been developed. Conclusions are drawn on connection of the ratio of these hormones with CYP3A4 activity.

**Keywords:** CYP 3A4, cortisol, 6  $\beta$ -hydroxycortisol, metabolism, LC-MS.