

МИНИСТЕРСТВО РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ДЕЛАМ
ГРАЖДАНСКОЙ ОБОРОНЫ, ЧРЕЗВЫЧАЙНЫМ СИТУАЦИЯМ
И ЛИКВИДАЦИИ ПОСЛЕДСТВИЙ СТИХИЙНЫХ БЕДСТВИЙ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины
имени А.М. Никифорова»

УТВЕРЖДАЮ
Главный врач МЧС России
член-корреспондент РАН
Заслуженный врач РФ
д.м.н. профессор



С.С. Алексанин

**ОЦЕНКА ИНДИВИДУАЛЬНОГО
ДЕТОКСИКАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА ОРГАНИЗМА
СОТРУДНИКОВ ФПС ГПС МЧС РОССИИ**

Методические рекомендации

Санкт-Петербург
2020

Оценка индивидуального детоксикационного потенциала организма сотрудников ФПС ГПС МЧС России: методические рекомендации / Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова МЧС России. СПб. : ООО «НПО ПБ АС», 2020. 44 с. под ред. С.С. Алексанина

Авторы: Шантырь И.И., Родионов Г.Г., Неронова Е.Г., Ушал И.Э., Колобова Е.А., Светкина Е.В.

Настоящие методические рекомендации подготовлены в рамках НИР «Исследование индивидуального детоксикационного потенциала организма сотрудников ФПС ГПС МЧС России» (п. 1 раздела VIII Плана научно-исследовательских и опытно-конструкторских работ МЧС России на 2019 год и на плановый период 2020 и 2021 годов, утвержденного приказом МЧС России от 02.04.2019 № 195).

В рекомендациях представлены методы оценки индивидуального детоксикационного потенциала организма сотрудников ФПС ГПС МЧС России по результатам гено- и фенотипирования активности изоферментов цитохрома P-450. Методики генодиагностики полиморфизмов CYP3A4 и фенотипирования CYP3A4, исходя из оценки соотношений эндогенных веществ и их метаболитов, абсолютно безопасны для пациентов и не требуют введения в организм экзогенных «маркеров».

Методические рекомендации предназначены для медицинских учреждений и врачей-специалистов МЧС России, задействованных в оказании специализированной помощи и проведении периодических медицинских осмотров (обследований) спасателей и сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

Методические рекомендации могут быть использованы в качестве дополнительных методов диагностики при проведении военно-врачебной экспертизы сотрудников ФПС ГПС МЧС России, а также в образовательном процессе при реализации программ высшего (аспирантура, ординатура) и дополнительного профессионального образования для повышения квалификации врачей-клинической лабораторной диагностики, терапевтов, токсикологов.

Рецензенты:

Шабанов П.Д. – заведующий кафедрой фармакологии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова МО РФ, д.м.н. профессор.

Шилов В.В. – гл. науч. сотр. ФБУН «Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» Роспотребнадзора, д.м.н. профессор.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ПОНЯТИЕ О ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ОРГАНИЗМ.....	7
2 ГЕНОДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМОВ СУРЗА4 У ПОЖАРНЫХ И СПАСАТЕЛЕЙ МЧС РОССИИ.....	14
2.1 Методика генодиагностики полиморфизмов СУРЗА4.....	14
2.2 Распределение пожарных и спасателей МЧС России по скорости метаболизма в зависимости от генотипа СУРЗА4.....	16
3 КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИЗОЛА И 6-В-ГИДРОКСИКОРТИЗОЛА У ПОЖАРНЫХ И СПАСАТЕЛЕЙ МЧС РОССИИ.....	19
3.1 Методика определения концентрации кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче.....	19
3.2 Распределение обследованных пожарных и спасателей МЧС России в зависимости от уровня активности СУРЗА4.....	23
4 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ.....	30
5 ВОЗМОЖНЫЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P-450 У ПОЖАРНЫХ И СПАСАТЕЛЕЙ МЧС РОССИИ.....	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	39

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

AUC	– площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время»
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
КС	– ксенобиотик
ЛС	– лекарственное средство
ФПС	– федеральная противопожарная служба
ЧС	– чрезвычайная ситуация
СУР	– цитохром Р-450

ВВЕДЕНИЕ

Профессиональная деятельность пожарных заключается в тушении пожаров и осуществляется, как правило, в условиях агрессивного воздействия химических факторов на фоне повышенной физической нагрузки и выраженного психологического напряжения. По данным Международной организации труда, профессия пожарных входит в десять самых опасных. Экстремальные условия деятельности способствуют развитию чрезмерного напряжения функциональных резервов организма данных специалистов и могут приводить к формированию расстройств здоровья или даже смерти.

Особую опасность для пожарных представляют химические соединения (продукты горения, тяжелые металлы, другие аварийно-химически опасные вещества), которые содержатся в продуктах горения и обладают мембраноповреждающим и канцерогенным эффектом, в результате которого усиливаются процессы свободнорадикального окисления белков, жиров и углеводов, что приводит к развитию «оксидативного» стресса [1].

В соответствии с многочисленными научными данными, окислительный стресс приводит к таким тяжелым и высоко значимым социально заболеваниям, как нейродегенеративные, онкологические, воспалительные, к патологиям сердечно-сосудистые и некоторым другим. В связи с этим представляется необходимым как в процессе профессионального отбора, так и в ходе мониторинга за состоянием здоровья сотрудников ФПС ГПС МЧС России оценивать активность в печени изоферментов цитохрома P-450, активно участвующих в ее детоксикационной способности. В результате определения генов, кодирующих аминокислотные последовательности важных изоферментов печени, востребованными и широко применяемыми стали методы генотипирования, однако связь генотипа и функциональных особенностей, установлены для ограниченного перечня изоформ фермента и генетических полиморфизмов. Исходя из вышеизложенного, для установления реальной

активности ферментов, нужно оценивать текущую активность изофермента цитохрома Р-450 и проводить поиск информативных генетических маркеров, характеризующих особенности метаболизма. Очевидно, что безопасность при профессиональной деятельности сотрудников ФПС ГПС МЧС России зависит от персональных особенностей организма, что требует индивидуального подхода к каждому случаю.

1. ПОНЯТИЕ О ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА ОРГАНИЗМ

Учитывая условия профессиональной деятельности пожарных, в которой доминирующую роль играет необходимость пребывать в агрессивной химически опасной среде, на первый план выступает необходимость рассмотреть процессы детоксикации организма от ксенобиотиков, которые включают многоуровневые системы взаимосвязанных механизмов [2].

Исходя из современных представлений, систему детоксикации авторы [3] определяют как сложный комплекс биохимических и биофизических реакций, обеспечиваемых функциональным взаимодействием барьерных структур, специальных ферментов, иммунной, антиоксидантной и выделительных систем, с целью повышения функционирования организма.

Процессы биотрансформации в комплексе с системой антиоксидантной защиты, объединяющей антирадикальные и антиперекисные механизмы, представляют собой универсальную биохимическую систему естественной детоксикации [4].

В целом данная система биотрансформации (метаболизма) превращений чужеродных химических соединений осуществляется в три фазы (Рис. 1):

- первая - с помощью специальных микросомальных ферментных систем перевод экзогенных химических ксенобиотиков в различные метаболиты;
- вторая - связывание этих метаболитов с белками, аминокислотами и рядом кислот, в результате чего образуются нетоксичные соединения, способные выводиться экскреторными органами;
- третья – непосредственно выведения («фаза эвакуации»).

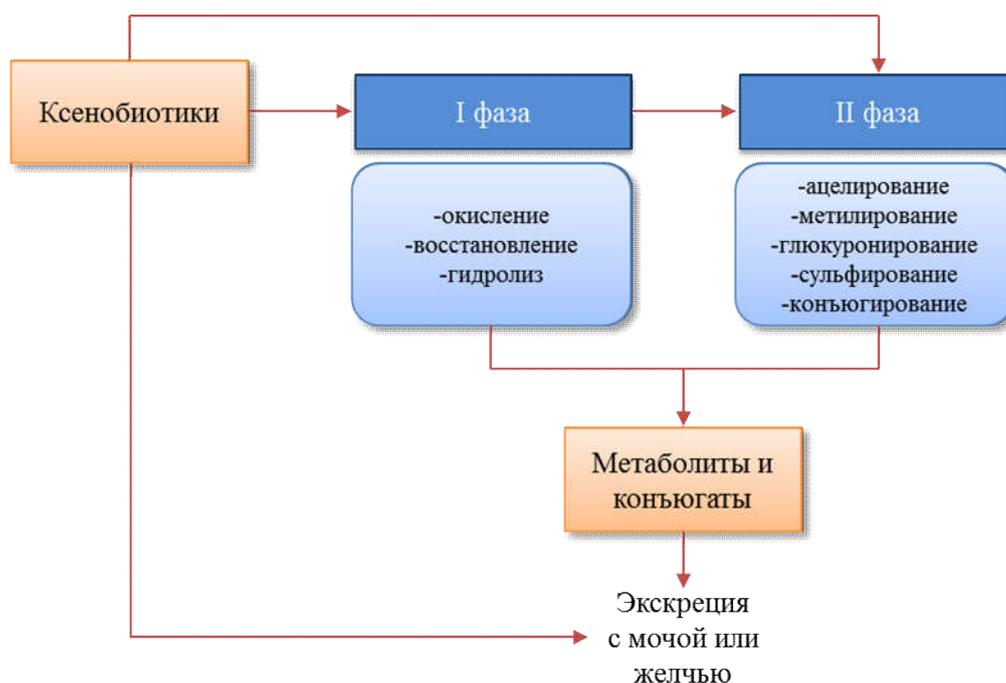


Рис. 1. Фазы биотрансформации

Реакции биотрансформации I и II фаз протекают последовательно далеко не всегда. Метаболизм некоторых ксенобиотиков протекает только путем реакций I фазы, а некоторых, только II фазы, не подвергаясь биотрансформации за счет реакций других фаз. [5].

Изоферменты цитохрома P-450, алкогольдегидрогеназы, альдегиддегидрогеназы, аминоксидазы относят к основным ферментам реакций окисления I фазы биотрансформации. Реакции восстановления I фазы биотрансформации протекают, в основном при участии нитро- и азоредуктаз, а гидролиза – эстераз [6].

Семейство ферментов цитохрома P-450 является наиболее важным, в метаболизме ксенобиотиков, как токсичных, так и потенциально токсичных. Цитохромы P-450 ответственны за 75 % реакций I фазы биотрансформации лекарственных средств и за метаболизм огромного числа пищевых веществ, эндогенных субстанций и чужеродных органических соединений [7-10].

Номенклатура цитохромов P-450 [11], состоит из сокращенного наименования цитохромов P-450 (CYP), после которого идет обозначение семейства генов – более 40% аминокислотных последовательностей идентичны,

далее следует буквенной обозначение подсемейства, где идентичность аминокислот в последовательности более 55%, затем – цифра, указывающая на изофермент.

Цитохром P-450, НАДФН-цитохром P450 редуктаза и фосфолипиды биологических мембран, в которые встроены эти ферменты, образуют микросомальный монооксигеназный комплекс [12].

Этот комплекс, по мнению А. И. Арчакова [13] отличается высокой мощностью и многообразием осуществляемых метаболических реакций:

1. Гидроксилирование алифатических и ароматических углеводов (бензол, фенол, полициклических ароматических углеводов) барбитуратов;
2. Окисление по азоту и сере (аминазин, никотин, аминифлюарен);
3. Эпоксидирование (бенз(а)пирен, нафталин);
4. Окислительное деалкилирование гетероатомов (O-, N-, Si-, S-деалкилирование);
5. Окислительное дезаминирование ксенобиотиков, в том числе лекарственных веществ;
6. Дегалогенирование (галогенсодержащие пестициды, гексохлоран);
7. Восстановление нитро- (нитробензол) и азосоединений (азокрасители);
8. Десульфирование.

Большинство реакций микросомального окисления протекает при участии цитохрома P-450, так как молекулярный кислород активируется данным цитохромом. Система цитохром P-450 имеет более тысячи изоферментов, которые объединены в семейства CYP: CYP1, CYP2, CYP3 и т.д. Прямое отношение к метаболизму ксенобиотиков имеют шесть цитохромов P-450 (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), которые катализируют по данным авторов Руководства по клинической фармакокинетике [9] 90 % всех реакций окисления ксенобиотиков. Это подтверждается и результатами ряда других исследователей [14, 15].

Применительно к условиям труда пожарных, описанными нами ранее, наибольший интерес представляют изоформы цитохрома P-450 подсемейства 1A (CYP1A), которое состоит из двух ферментов CYP1A1 и CYP1A2. Это связано с тем, что они участвуют в метаболическом окислении многих канцерогенов, образующихся во время пожаров (полициклических ароматических углеводородов, диоксинов и т.д.) [16, 17].

Генетический полиморфизм CYP1A2 обуславливает степень индукции CYP1A2 при равнозначном воздействии. Аллель CYP1A2*1C приводит к точечной мутации, связанной со снижением метаболической активности CYP1A2 (по результатам кофеинового теста) в сравнении с диким вариантом CYP1A2*1A. CYP1A2*1F — результат точечной мутации в интроне 1, которая повышает индуктивную способность, особенно у курящих (по результатам кофеинового теста) в сравнении с аллелью дикого типа CYP1A2*1A. Распространение различных генотипов CYP1A2 таково: *1F/*1F (нуклеотидная последовательность A/A) ~ 46 %; *1A/*1F (нуклеотидная последовательность C/A) ~ 44%; и *1A/*1A (нуклеотидная последовательность C/C) ~ 10%, таким образом, наиболее распространенным фенотип с повышенной индуктивной способностью [18].

Входящие в большом количестве в состав табачного дыма ПАУ (полициклические ароматические углеводороды), выступают аутоиндукторами CYP1A2 и, под действием CYP1A2 трансформируются в канцерогенные соединения [19]. Так же индукторами CYP1A2 являются мясо, прошедшее тепловую обработку на огне [20] и брокколи [21]. Некоторые лекарственные средства, например антибиотик ципрофлоксацин и антидепрессант флувоксамин ингибируют CYP1A2 [22].

Ферменты цитохрома P-450 локализованы главным образом в печени, легких и тонком кишечнике. Наиболее представлен в организме CYP3A4. В печени, на его долю приходится от 30 до 60 %, а в кишечнике - 70% от всех цитохромов P-450, экспрессирующихся в нём, и 50 % от содержания в печени. Значимо так же содержание в печени цитохромов 2C9/10/19, 1A2, 2D6 и 2E1, их

доля составляет 20 %, 12 %, 4 % и 6 % соответственно. CYP3A4 и очень близкий ему по структуре CYP3A5 отвечают за метаболическое превращение ксенобиотиков, широкого спектра фармакологических препаратов, что, в совокупности с их высокой экспрессией в организме, обуславливает наибольшую значимость данных цитохромов в терапевтическом отношении [23-26].

Имеется значительная межиндивидуальная вариабельность экспрессии и активности CYP3A4 в печени человека. На сегодняшний день описано 19 различных аллелей (<http://www.imm.ki.se/CYPalleles/cyp3a4.htm>) и несколько аллелей с мутациями в 5'-вышележащей регуляторной области, значение которых пока неясно. Только некоторые из них нарушают функцию фермента [27]. Более того, недавние скрининговые исследования показали, что среди 500 североамериканских представителей европеоидной расы только одна мутация CYP3A4 — CYP3A4*3, встречается со значительной частотой (1%), в то время как все другие формы практически отсутствуют [28].

Таким образом, этот фермент исключительно хорошо представлен. В связи с этим необходимо уделить пристальное внимание полиморфизму генов, кодирующих белки, принимающих участие в регуляции транскрипции CYP3A4, например рецептор беременности X [29], а также генам, осуществляющим посттрансляционный контроль, что, возможно, позволит найти генетическое обоснование высокой межиндивидуальной вариабельности содержания и индуцибельности CYP3A4 среди людей. Малое число вариант фенотипических изменений в или вокруг гена CYP3A4 согласуются с унимодальным распределением экспрессии CYP3A4 [30]. Такое распределение обычно свидетельствует о вовлечении многих аллелей с небольшим вкладом в фенотип или большим значением негенетических факторов (окружающей среды). Однако, несмотря на то, что факторы окружающей среды являются установленными предикторами экспрессии CYP3A4, 90 % межиндивидуальной вариабельности активности CYP3A4 в печени принято считать следствием генетических влияний [31], имеющих мультифакториальный и мультиаллельный характер. Образовавшиеся в результате окисления ксенобиотиков метаболиты (результат

первой фазы детоксикации) в дальнейшем подвергаются реакциям конъюгации или дериватизации (результат второй фазы) и, с помощью так называемых «транспортных белков», экскретируются из цитоплазм клеток в желчь или кровь с последующим выведением из организма (третья фаза) [32].

Данные методические рекомендации явились результатом научного исследования целью, которого было определение индивидуального детоксикационного потенциала организма сотрудников ФПС ГПС МЧС России по результатам гено- и фенотипирования активности изоферментов цитохрома P-450 для целенаправленного проведения лечебно-профилактических и реабилитационных мероприятий.

Для достижения поставленной цели нами были решены следующие задачи:

- провели анализ научных, методических и информационных материалов по изучению процессов детоксикации организма от чужеродных веществ – ксенобиотиков, проведению поиска биомаркеров детоксикации, патогенетически значимых метаболизирующих ферментов и полиморфизма генов системы метаболических превращений (биотрансформации);

- разработали валидированный хромато-масс-спектрометрический метод определения активности изоферментов цитохрома P-450 CYP3A4 по концентрации 6-β-гидрокортизола и кортизола в моче;

- провели и оценили результаты медицинского осмотра 64 человек (30 спасателей Северо-Западного регионального поисково-спасательного отряда и 34 пожарных территориальных пожарных частей г. Санкт-Петербурга). Все обследованные лица мужского пола, средний возраст $29,8 \pm 5,5$ года. При анализе данных обследованные разделены на группы в зависимости от стажа работы по специальности (до 5 лет, от 5 до 10 лет, старше 10 лет).

- при проведении медицинского осмотра отобрали биопробы и провели исследование:

- а) генетических полиморфизмов цитохрома P-450 CYP3A4: полиморфизм Phe189Ser гена CYP3A4 (rs 4987161) и полиморфизм A/G гена

CYP3A4_3 (rs2740574) методом ПЦР в реальном времени в крови у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России;

б) активности изоферментов цитохрома Р-450 CYP3A4 по концентрации 6-β-гидрокортизола и кортизола в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

2. ГЕНОДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМОВ СУР3А4 У СОТРУДНИКОВ ФПС ГПС МЧС РОССИИ

2.1. Методика генодиагностики полиморфизмов СУР3А4

Для генотипирования брали кровь из локтевой вены в вакутейнер с ЭДТА. В пробирку типа «эппендорф» отбирали 100 мкл крови для последующего выделения ДНК. Пробы крови хранили при -40°C до момента выделения ДНК.

Генотипирование состояло из трех основных этапов – выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции с использованием соответствующих праймеров и анализ результатов. ПЦР проводили в режиме «реального времени» на термоциклере CFX96 (рис. 2.).

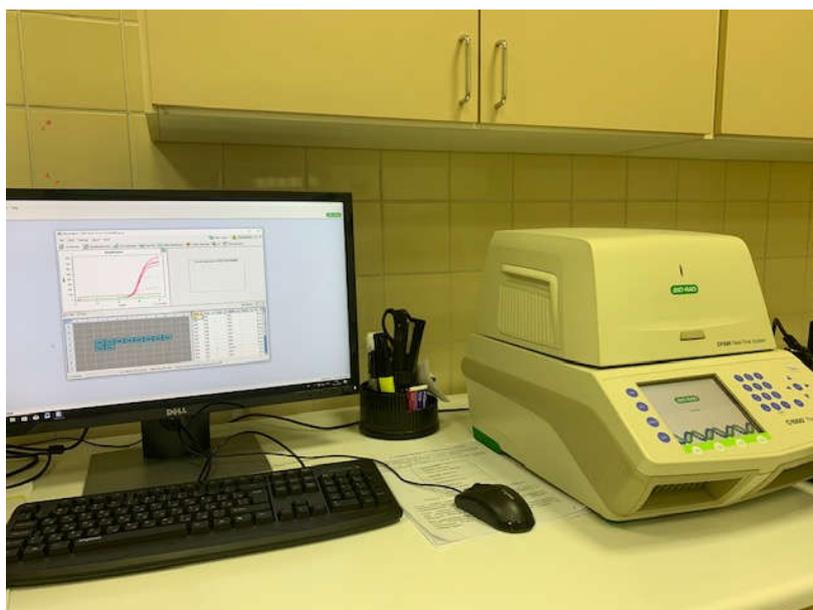


Рис. 2. Прибор для проведения ПЦР в режиме «реального времени» CFX96, BIORAD

Выделение ДНК проводили с использованием наборов фирмы «ДНК-технологии» по прилагаемой методике:

В пробирку с подготовленным биоматериалом в объеме 100 мкл вносили по 600 мкл лизирующего раствора, затем 3-5 секунд встряхивали с помощью

перемешивающего устройства типа «Vortex», после чего центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин и удаляли надосадочную жидкость.

К полученному осадку добавляли 300 мкл реактива «Проба-Рапид», и встряхивали закрытые пробирки 5-10 секунд с помощью перемешивающего устройства типа «Vortex». Затем пробирки помещались на 10 минут в термостат, прогретый до 98 °С, после чего центрифугировались 3 мин. при 13000 об/мин.

Экстрагированную в надосадочной жидкости ДНК, использовали для выполнения ПЦР-амплификации. Допустимо хранение полученного материала ДНК в холодильнике (2-8°С) в течение семи суток, а также в морозильной камере при температуре порядка 20°С в течение одного месяца.

ПЦР и анализ результатов проводили с использованием тест-систем производства фирмы «Синтол»:

- «Набор реагентов для определения полиморфизма Phe189Ser гена CYP3A4 (rs 4987161);

- «Набор реагентов для определения полиморфизма A/G гена CYP3A4_3 (rs2740574).

Согласно методике размораживали реагенты, перемешивали их и центрифугировали. Приготавливали смесь для проведения реакции из расчета на 1 образец:

- 10 мкл 2.5X Реакционной смеси,
- 10 мкл 2.5X Разбавителя,
- 0,5 мкл Tag ДНК-полимеразы.

Реагенты перемешивали и центрифугировали. Вносили в ПЦР-пробирки по 20 мкл приготовленной смеси и по 5 мкл выделенной ДНК.

Параллельно с исследуемыми образцами ставили реакцию с прилагаемыми к тест-системе контрольными образцами (3 положительных контроля и один отрицательный контрольный образец) по сходной методике.

После добавления ДНК-пробирки центрифугировали, помещали в прибор и проводили реакцию в соответствие с протоколом (табл. 1).

Протокол проведения реакции

	Phe189Ser гена CYP3A4 (rs4987161)		A/G гена CYP3A4_3 (rs2740574)	
1	95°C	3 мин	95°C	3 мин
2	95°C	15 сек	95°C	15 сек
3	60°C	40 сек	63°C	40 сек
4	Сканирование		Сканирование	
5	Циклирование с пункта 2 - 39 раз		Циклирование с пункта 2 - 39 раз	

Результаты реакции анализировали по пороговому циклу, учитывая результаты реакций положительных контрольных образцов.

Пример диалогового окна получения результатов генотипирования по одному из исследованных полиморфизмов представлен на Рис. 3.

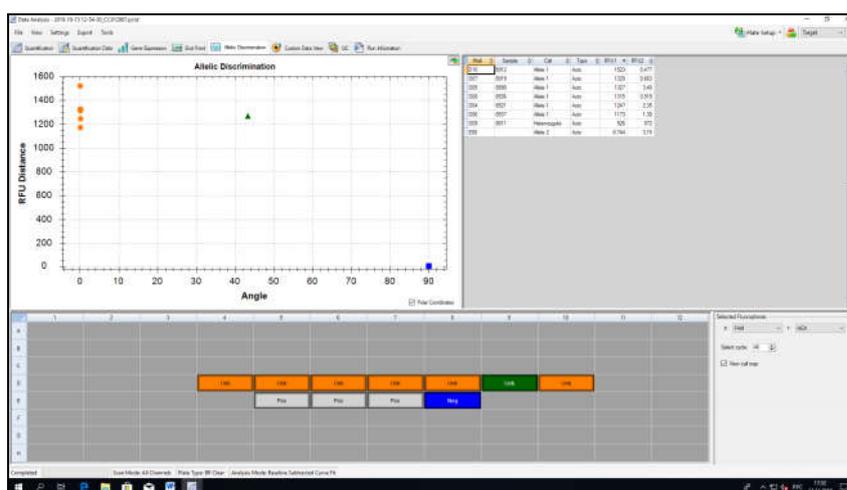


Рис. 3. Диалоговое окно анализа результатов генотипирования по одному из исследованных полиморфизмов, выполненное в режиме «Дискриминация аллелей»

2.2. Распределение пожарных и спасателей МЧС России по скорости метаболизма в зависимости от генотипа CYP3A4

В настоящем исследовании анализировались генетические особенности у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России по полиморфизму A/G гена CYP3A4

(rs2740574) и полиморфизму Phe189Ser гена CYP3A4 (rs4987161), способные повлиять на активность фермента.

Полиморфизм rs4987161, известен также как 566Т>С, 15615Т>С или F189S. (С) аллель полиморфизма rs4987161 принято обозначать как CYP3A4*17 вариант. Данный полиморфизм находится в экзонной последовательности гена, что может влиять на функциональную активность фермента.

Результаты генотипирования аллелей гена CYP3A4 у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России представлены в таблице 2.

Таблица 2

Результаты генотипирования гена CYP3A4

	A/G гена CYP3A4_3			Phe189Ser гена CYP3A4		
	A/A	A/G	G/G	T/T	T/C	C/C
Количество обследованных	58	6	0	64	0	0

По результатам тестов генотипирования аллеля rs4987161(566Т>С) гена CYP3A4 все пожарные и спасатели МЧС России отнесены к «не медленным» метаболизаторам.

Полученные результаты не противоречит данным, полученным в ходе выполнения проекта 1000 Genomes Project. Согласно информации, представленной в базе данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) частота минорного аллеля С по результатам нескольких исследований составила 0,02 %, что свидетельствует об очень низкой частоте встречаемости данного аллеля.

Вероятно, в нашем исследовании, объем исследуемой группы оказался недостаточным для выявления минорного аллеля по этому полиморфизму и оценки влияния генотипа полиморфизм rs4987161 на функциональную активность фермента CYP3A4.

По результатам тестов генотипирования аллеля rs2740574 (392А>G) гена CYP3A4 обследованные пожарные и спасатели классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (9,4 %) и «не медленных» (80,6 %). Согласно

информации, представленной в базе данных Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>) частота минорного аллеля G по результатам нескольких исследований составила от 0,23 % до 36 %. Частота этого аллеля значительно варьирует в различных популяциях мира и составляет среди народов негроидной расы до 80 %, у европейцев до 2-9 % и практически отсутствует у лиц азиатского происхождения [33, 34].

Согласно литературным данным, на долю минорного аллеля rs2740574*G гена CYP3A4 в популяции русских, татар и башкир приходится 4,0 %, 0,5 % и 0,9 % соответственно.[35]. Частота минорного аллеля в проведенном нами исследовании составила 5 %, что согласуется с выше представленными данными, полученными при обследовании популяции русских, проживающих в Республике Башкортостан [36].

SNP rs2740574 локализован в 5'-регуляторном регионе CYP3A4. Данный полиморфизм рассматривают в качестве одного из наиболее клинически значимых полиморфных вариантов CYP3A4. Обусловлено это тем, что в результате однонуклеотидной замены в нифедипин-чувствительном элементе rs2740574 гена CYP3A4, происходит снижение экспрессии кодируемого геном изофермента CYP3A4, что может являться причиной повышенного риска негативных последствий для здоровья.

Для оценки биологической значимости данного полиморфизма у обследованных, мы сопоставили их с мета-анализом данных Human Genome Epidemiology (HuGE) [37], в который включено 11 публикаций, 3810 пациентов с онкологическими заболеваниями и 3173 лиц контрольной группы. Установлено, что G аллель и GG генотип CYP3A4*1B связаны с повышенным риском развития онкологических заболеваний.

В исследовании других авторов установлен повышенный риск развития рака яичников [38] и риск мелкоклеточного рака легких в связи с курением и в зависимости от пола [39]. В целом в многочисленных исследованиях показана значимость данного полиморфизма в реакции организма при применении лекарственных средств [40-42].

3. КОНЦЕНТРАЦИЯ КОРТИЗОЛА И 6-В-ГИДРОКСИКОРТИЗОЛА У СОТРУДНИКОВ ФПС ГПС МЧС РОССИИ

3.1. Методика определения концентрации кортизола и 6-β-гидрокортизола в моче

Определение концентрации кортизола и 6-β-гидрокортизола в утренней порции мочи проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в сочетании со спектрофотометрическим детектированием с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа «1200» («Agilent Technologies», США) с диодно-матричным детектором (рис. 4).



Рис. 4. Высокоэффективный жидкостный хроматограф «1200» (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором.

Идентификацию кортизола и 6-β-гидрокортизола осуществляли по времени удерживания и спектру, регистрируемому с помощью диодно-матричного детектора в диапазоне длин волн 190-400 нм. Количественное определение проводили методом абсолютной градуировки.

Оборудование.

Высокоэффективный жидкостный хроматограф «1200» (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором.

Весы «Sartorius» (Германия) с измерением массы до 250 г. С точностью 0,0001-0,00001 г. или аналогичные.

Центрифуга «Allegra 25R» (BECKMAN COULTER, США) или аналогичная.

Шкаф лабораторный в комплекте «Koettermann» (Германия) 1800x900x2250.

Смеситель лабораторный Vortex V-3.

Реактивы и материалы.

Субстанция кортизола (99.8%, «Dr. Ehrenstorfer GmbH», сухое вещество).

Субстанция 6-β-гидрокортизола (98%, «Sigma-Aldrich», твердое вещество).

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709.

Кислота муравьиная фирмы Agilent, номер по каталогу G 2453-85060.

Ацетонитрил для ВЭЖХ, 99,9%, «Biosolve Chimie», Франция.

трет-Бутилметилловый эфир, «Panreac», Испания.

Этилацетат, х.ч., Россия.

Средства измерения и вспомогательная посуда.

Колбы мерные вместимостью 10 и 100 мл, 1 класса точности, с погрешностью $\pm 0,025$ мл и $\pm 0,1$ мл соответственно по ГОСТ 1770.

Автоматические пипетки с объемом дозирования 0,5-5000 мкл (Biohit).

Виалы полипропиленовые вместимостью 250 мкл (Agilent).

Приготовление стандартных растворов 6-β-гидрокортизола и кортизола.

Для приготовления стандартных растворов кортизола и 6-β-гидрокортизола навески соответствующих субстанций ($10,0 \pm 0,1$ мг) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл и добавляли 50 мл ацетонитрила и 40 мл деионизованной воды. После полного растворения гормонов, содержимое колбы доводили до метки деионизованной водой.

Приготовление рабочих растворов кортизола и 6-β-гидрокортизола

Рабочие растворы в диапазоне концентраций 2,5-100,00 мкг/мл готовили разбавлением стандартных опорных растворов в необходимое количество раз.

Приготовление калибровочных образцов кортизола и 6-β-гидрокортизола.

В качестве бланкового образца мочи использовали физический раствор, содержащий 0,9% хлорида натрия. К каждой пробе объемом 500 мкл добавляли 5 мкл соответствующего рабочего раствора кортизола и 6-β-гидрокортизола, затем 3000 мкл экстрагирующей смеси состава *трет*-бутилметилловый эфир: этилацетат (50/50, объемн.), встряхивали 15 минут с помощью перемешивающего устройства типа «Vortex», затем 10 минут центрифугировали со скоростью 3000 об/мин. Органический слой полностью переносили в чистую пробирку «Sarstedt» и высушивали при комнатной температуре в токе азота.

Сухой остаток растворяли в 75 мкл 50 % раствора ацетонитрила, после чего переносили в чистую виалу и анализировали. Градуировочный диапазон составляет 25-1000 нг/мл.

Подготовка хроматографа к выполнению измерений.

Настройка хроматографа проводилась в соответствии с руководством по эксплуатации. Хроматографическое разделение 6-β-гидрокортизола и кортизола выполнялось с помощью колонки для обращено-фазовой хроматографии Zorbax Eclipse Plus C18 100 мм × 4.6 мм × 3.5 мкм с соответствующей предколонкой в градиентном режиме со скоростью элюирования 0,6 мл/мин. В качестве подвижной фазы А использовалась вода с 0,1% муравьиной кислоты, в качестве подвижной фазы В – ацетонитрил.

Подробно градиентный режим разделения кортизола и 6-β-гидрокортизола представлен в таблице 3.

Таблица 3

Градиентный режим элюирования кортизола и 6-β-гидрокортизола

Время	% В
0	5
20.0	60
22.0	80
24.0	80
25.0	5

Подготовка проб к измерениям.

Непосредственно перед проведением измерений пробы размораживали при комнатной температуре. К каждой пробе объемом 500 мкл добавляли 3000 мкл экстрагирующей смеси состава *трет*-бутилметиловый эфир: этилацетат (50/50, объемн.), перемешивали с помощью устройства типа «Vortex» в течение 15 минут, после чего центрифугировали 10 минут со скоростью 3000 об/мин. Весь органический слой переносили в чистую пробирку «Sarstedt» и высушивали при комнатной температуре в токе азота. Сухой остаток растворяли в 75 мкл 50% раствора ацетонитрила, после чего переносили в вials и анализировали.

Выполнение измерений и обработка результатов измерений.

При выполнении измерений условия совпадали с условиями при проведении градуировки. Регистрировали хроматограммы при длине волны детектирования 242 нм. В условиях автоматической регистрации и обработки данных определяли в условных единицах площадь пиков аналитов. Их массовую концентрацию вычисляли по установленной ранее градуировочной зависимости. Типичная хроматограмма образца утренней мочи при определении кортизола и 6- β -гидрокортизола представлены на Рис. 5.

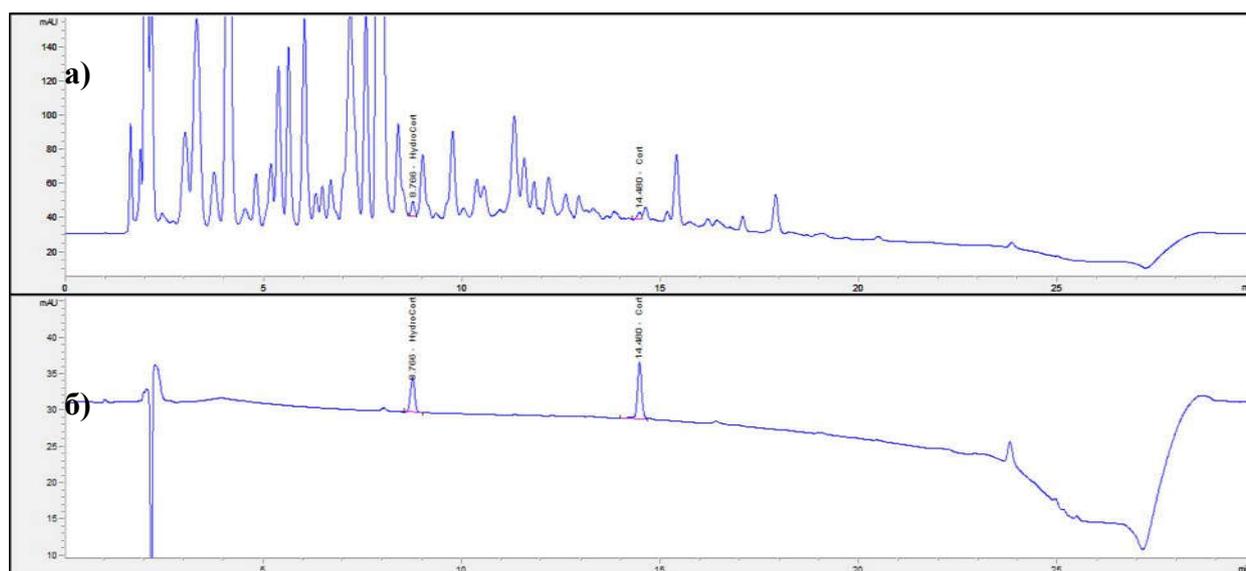


Рис. 5. Типичные хроматограммы при определении кортизола и 6- β -гидрокортизола: а) хроматограмма образца мочи, б) хроматограмма калибровочного раствора.

3.2. Распределение обследованных сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от уровня активности СУРЗА4

В таблице 4 представлено содержание кортизола, 6-β-гидрокортизола и их соотношение в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

Таблица 4

Содержание кортизола, 6-β-гидрокортизола и их соотношение в моче
у сотрудников ФПС ГПС МЧС России

Показатель, ед. изм.	Среднее значение	Медиана	50 % интервал	Среднее геометрическое
Кортизол, нг/мл	301	202	117 - 430	219
6-β-гидрокортизол, нг/мл	472	322	174 - 591	321
Отношение 6-β-гидрокортизола/кортизол, усл.ед.	2,17	1,38	0,72 - 3,08	1,47

В результате статистического анализа величин коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России была получена следующая log-нормальная гистограмма их распределения (рис. 6).

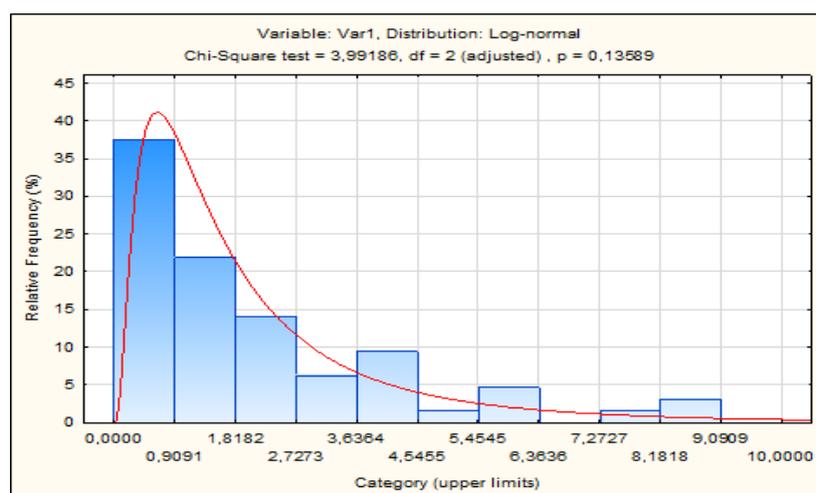


Рис. 6. Гистограмма log-нормального распределения величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче подчиняется log-нормальному распределению, поэтому в дальнейшем мы будем оперировать его log-преобразованными значениями, представленными на рис. 7.

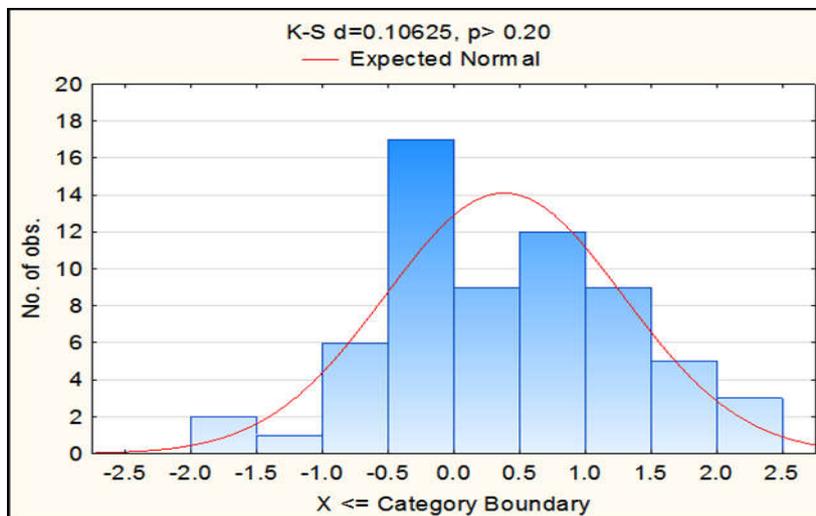


Рис. 7. Распределение log-преобразованных значений величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

Из полученных данных построен график нормальной вероятности величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче (рис. 8).

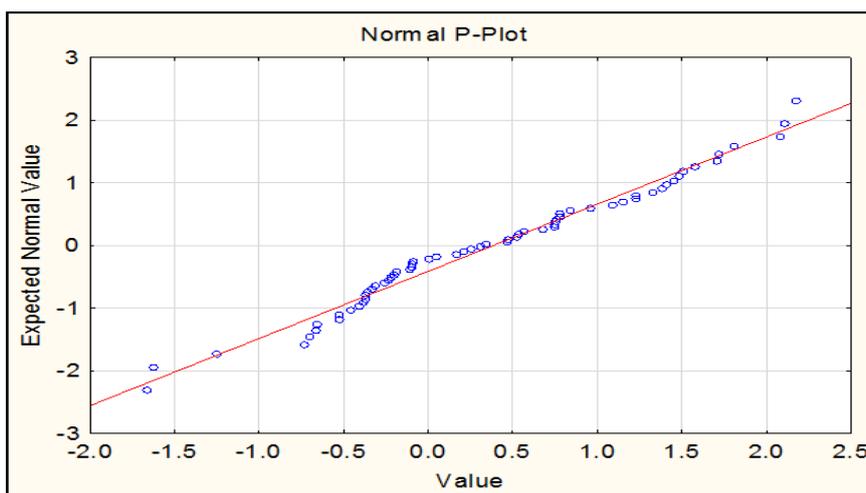


Рис. 8. График нормальной вероятности величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у сотрудников ФПС ГПС МЧС России.

На основании полученных данных стало возможным разделить уровни активности СУРЗА4 обследованных сотрудников ФПС ГПС МЧС России на три

типа в зависимости от величины отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче (табл. 5).

Таблица 5

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от уровня активности СУР3А4

Уровень активности СУР3А4	Отношение 6-β-гидрокортизола/кортизол, усл. ед.
Нормальная активность (n=43)	0,59 – 3,27
Низкая активность (n=8)	< 0,59
Высокая активность (n=13)	> 3,27

На рис. 9 представлено распределение уровней метаболизма у обследованных сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от величины отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче. Из всех обследованных с нормальным уровнем активности СУР3А4 было 67 %, с низким уровнем активности – 13 %, а с высоким уровнем активности – 20 %.

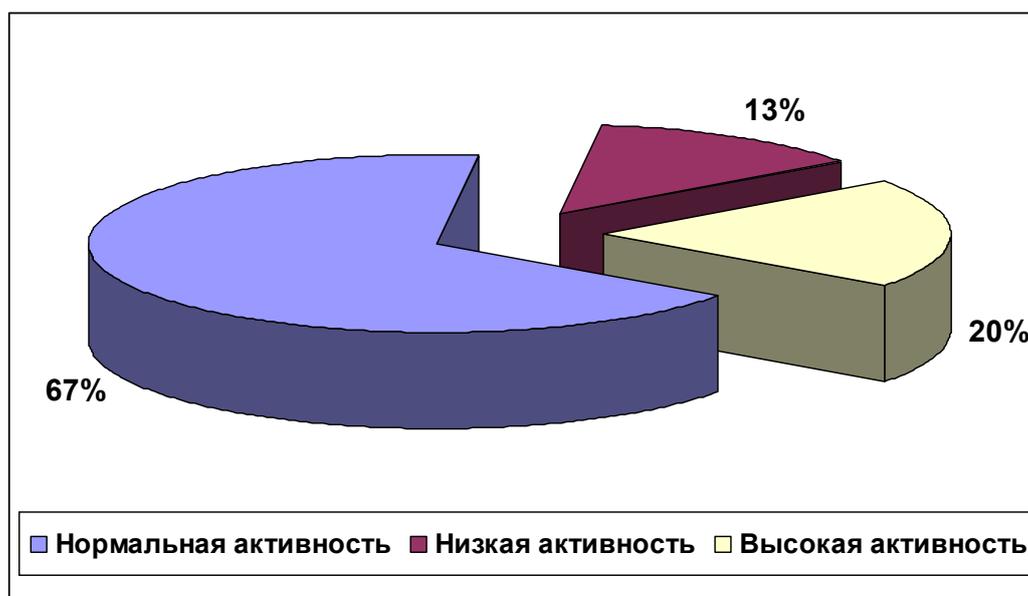


Рис. 9. Распределение уровней активности СУР3А4 у обследованных сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от величины отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче.

Статистически значимых различий величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста, стажа работы и вида деятельности не выявлено (табл. 6 - 9). Наблюдалась тенденция увеличения в 1,8 раза коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче в зависимости от возраста и стажа работы (группы сравнения менее 5 лет и более 10 лет).

Таблица 6

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста

Возраст, лет	Медиана	50 % интервал	Значимость критерия Фишера, p
20-29 (n=32)	1,21	0,74 - 2,04	0,085
30 и более (n=32)	2,12	0,72 - 4,34	

Таблица 7

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от вида деятельности

Вид деятельности	Медиана	50 % интервал	Значимость критерия Фишера, p
Пожарные (n=30)	1,44	0,73 - 2,18	0,980
Спасатели (n=34)	1,38	0,70 - 3,42	

Таблица 8

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от стажа работы

Стаж работы, лет	Медиана	50 % интервал	Значимость критерия Фишера, p
Менее 5 (n=13)	0,91	0,77 - 1,97	0,452
5-9 (n=30)	1,50	0,70 - 2,32	
более 9 (n=21)	1,68	0,73 - 4,08	

Таблица 9

Значимость критерия Фишера для коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России с различным стажем работы

	Менее 5 (n=13)	5-9 (n=30)	более 9 (n=21)
Менее 5 (n=13)	-	p=0,245	p=0,088
5-9 (n=30)	p=0,245	-	p=0,398
Более 9 (n=21)	p=0,088	p=0,398	-

Статистически значимых различий величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 34 пожарных ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста и стажа работы не выявлено (табл. 10 - 12).

Таблица 10

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче у 34 пожарных ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста

Возраст, лет	Медиана	50 % интервал	Значимость критерия Фишера, p
20-29 (n=18)	1,21	0,69 - 1,97	0,470
Более 30 (n=16)	2,12	0,76 - 4,34	

Таблица 11

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол (усл. ед.) в моче у 34 пожарных ФПС ГПС МЧС России в зависимости от стажа работы

Стаж работы, лет	Медиана	50 % интервал	Значимость критерия Фишера, p
Менее 5 (n=6)	0,86	0,68 - 1,97	0,545
5-9 (n=16)	1,67	0,76 - 2,23	
более 9 (n=12)	1,44	0,76 - 4,17	

Таблица 12

Значимость критерия Фишера для коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 34 пожарных ФПС МЧС России с различным стажем работы

Стаж работы, лет	Менее 5 (n=6)	5-9 (n=16)	Более 9 (n=12)
Менее 5 (n=6)	-	p=0,482	p=0,213
5-9 (n=16)	p=0,482	-	p=0,618
более 9 (n=12)	p=0,213	p=0,618	-

Статистически значимых различий величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 30 спасателей ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста и стажа работы не выявлено (табл. 13 - 15).

Таблица 13

Величина коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 30 спасателей ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста

Возраст, лет	Медиана	50% интервал	Значимость критерия Фишера, p
20-29 (n=14)	1,19	0,77 - 2,12	0,479
Более 30 (n=16)	2,01	0,61 - 4,41	

Таблица 14

Величина коэффициента соотношения 6- β -гидрокортизола/кортизол в моче у 30 спасателей ФПС ГПС МЧС России в зависимости от стажа работы

Стаж работы, лет	Медиана	50% интервал	Значимость критерия Фишера, p
Менее 5 (n=7)	0,91	0,77 - 3,17	0,798
5-9 (n=14)	1,21	0,70 - 2,98	
более 9 (n=9)	2,61	0,63 - 3,42	

Таблица 15

Значимость критерия Фишера для коэффициента соотношения 6- β -гидрокортизола/кортизол в моче у 30 спасателей ФПС ГПС МЧС России с различным стажем работы

Стаж работы, лет	Менее 5 (n=7)	5-9 (n=14)	более 9 (n=9)
Менее 5 (n=7)	-	p=0,757	p=0,564
5-9 (n=14)	P =0,757	-	p=0,652
более 9 (n=9)	p=0,564	p=0,652	-

4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ И ВЫВОДЫ

В результате определения генов, кодирующих аминокислотные последовательности основных изоферментов печени, были разработаны и используются фармакогенетические тесты. Важная цель их применения – индивидуальный подбор эффективной и безопасной дозировки ЛС исходя из генетического профиля пациента.

Однако текущий функциональный статус пациента формируется не только под действием генетической предрасположенности, но и под влиянием целого ряда других факторов, в том числе – окружающей среды и индивидуальной изменчивости, которые также необходимо учитывать при персонифицированном медицинском подходе к лечению пациента [43].

Многие исследователи отмечают высокую значимость модификационной или фенотипической изменчивости, приводящей к изменению клинического ответа на ЛС под действие факторов окружающей среды и/или сопутствующей терапии. При этом, генотип остается не затронут.

Sheldon H. Preskorn и его коллеги [44] провели широкомасштабное исследование фенотипической изменчивости, в которое были включены 900 пациентов, проходивших лечение от депрессии. В ходе исследования были выявлены существенные расхождения результатов генетической и фенотипической оценок активности метаболизма. В соответствии с полученными данными, 23 % пациентов, отнесенных по результатам генотипирования к «не медленным» метаболитаторам претерпели модификационные изменения до фенотипа «медленного» метаболитатора.

Полученные результаты наглядно демонстрируют ограничения применения методов генотипирования с использованием отобранных генетических полиморфизмов для оценки реальной метаболической активности у пациентов в текущий момент времени, что свидетельствует о необходимости поиска информативных, физиологически значимых генетических маркеров. В отсутствие

молекулярно-генетических маркеров подобного рода в настоящее время огромную значимость имеют методы функциональной оценки ферментов.

Сходные данные были получены и в нашем исследовании при сравнении данных гено- и фенотипирования активности CYP3A4 у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России. Так, по результатам теста генотипирования аллеля rs2740574 (392A>G) гена CYP3A4 сотрудники ФПС ГПС МЧС России были классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (9,4 %) и «не медленных» (80,6 %), а по результату отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче уровни активности CYP3A4 классифицированы на фенотипы с низкой активностью фермента 13 %, нормальной и высокой активностью фермента 87 %.

При этом только один человек с установленным на первом этапе исследования медленным метаболизмом по аллелю rs2740574 гена CYP3A4 попал в аналогичную группу по фенотипу (величина отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче), а другие 5 сотрудников в группу с нормальной и высокой активностью (1 человек в группу с высокой активностью и 4 человека с нормальной активностью). Таким образом, модификационная изменчивость до фенотипа «не медленного» метаболизатора наблюдалась у 83 % сотрудников ФПС ГПС МЧС России, обладающих генотипом «медленного» метаболизатора (рис. 10).

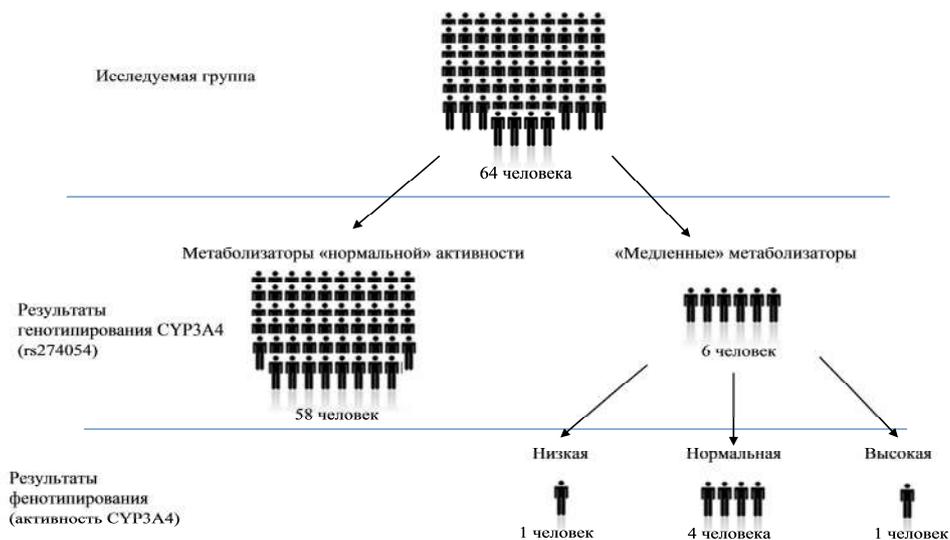


Рис. 10. Фенотипическая изменчивость активности CYP3A4.

Если допустить возможность ситуации, при которой на организм отсутствует какое-либо влияние индукторов и ингибиторов, то в таком случае индивидуальная активность изоферментов будет оставаться стабильна на протяжении всей жизни. В современном мире изолироваться от всех факторов, оказывающих влияние на цитохромы, практически невозможно. Активность изоферментов постоянно меняется под действием профессионального и экологического контакта с ксенобиотиками (ароматические амины, биспиридины, фураны, гидразины, нитрозамины, ПАУ, пирролины, фенолы, галогеналканы, соединения тяжелых металлов и др.), лекарственных препаратов (барбитураты, антибиотики т.д.), оральных контрацептивов, различных привычек (прием алкоголя, курение), инфекции, особенности питания.

Полученные результаты показывают, что методы генотипирования на практике значительно недооценивают активность метаболизма у человека. Они подчёркивают важное ограничение генотипирования: генотипирование устанавливает генетический потенциал метаболизма индивида, но не обязательно его функциональные возможности в любой момент времени.

Исходя из вышеизложенного, очевидна востребованность методов, дающих точную индивидуальную характеристику ферментативной активности изоферментов цитохрома для оценки детоксикационного потенциала в текущий момент времени. Таковыми, несомненно, являются методы, основанные на определении соотношений концентрации субстратов и их метаболитов. Особенно удобны методы, основанные на определении соотношений эндогенных метаболитов и субстратов, так как не требуют введения в организм экзогенных веществ. Исследования активности изоферментов цитохрома актуальны, например, при профессиональном отборе лиц, деятельность которых связана с рисками воздействия токсических веществ, а также для выбора эффективной и безопасной дозы лекарственного препарата персонально для пациента. Такую оценку позволяют дать методы фенотипирования, которые основаны на определении концентрации субстратов и их метаболитов.

ВЫВОДЫ

1. По результатам тестов генотипирования аллеля rs2740574 (392A>G) гена CYP3A4 обследованные сотрудники ФПС ГПС МЧС России классифицированы на генотипы «медленных» метаболизаторов (9,4 %) и «не медленных» (80,6 %). По результатам тестов генотипирования аллеля rs4987161(566T>C) гена CYP3A4 все сотрудники ФПС ГПС МЧС России МЧС России отнесены к «не медленным» метаболизаторам.

2. Разработан неинвазивный валидированный хромато-масс-спектрометрический метод определения активности изофермента CYP3A4 по концентрации 6-β-гидрокортизола и кортизола в утренней моче.

3. В зависимости от величины отношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче стало возможным разделить уровни активности CYP3A4 у сотрудников ФПС ГПС МЧС России на три типа:

- нормальная активность - у 67 %;
- низкая активность - у 13 %;
- высокая активность - у 20 %.

4. Статистически значимых различий величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у сотрудников ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста, стажа работы и вида деятельности не выявлено. Наблюдается тенденция увеличения в 1,8 раза коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче пожарных групп сравнения (менее 5 лет и более 9 лет).

5. Статистически значимых различий величины коэффициента соотношения 6-β-гидрокортизола/кортизол в моче у 34 пожарных и 30 спасателей ФПС ГПС МЧС России в зависимости от возраста и стажа работы не выявлено.

6. Установлено, что модификационная изменчивость CYP3A4 до фенотипа «не медленного» метаболизатора наблюдалась у 83 % сотрудников ФПС ГПС МЧС России, обладающих генотипом «медленного» метаболизатора.

7. При сравнении данных генотипирования исследованных полиморфизмов и фенотипирования активности CYP3A4 у 64 сотрудников ФПС ГПС МЧС России, связь установленных генетических маркеров с активностью метаболизма не выявлена.

8. Методы генотипирования устанавливают генетический потенциал активности цитохрома Р-450 индивида, но не функциональные возможности его активности в любой момент времени, поэтому для определения точной картины ферментной активности цитохрома Р-450 нужно оценивать его текущую активность на основе методов фенотипирования.

5. ВОЗМОЖНЫЕ СПОСОБЫ ПОВЫШЕНИЯ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЦИТОХРОМА P-450 У СОТРУДНИКОВ ФПС ГПС МЧС РОССИИ

В настоящее время описано более 250 химических соединений, вызывающих индукцию микросомальных ферментов. Индукторами процессов биотрансформации являются хлорорганические пестициды, полициклические углеводороды, диоксины, этиловый и другие спирты, никотин, ионы некоторых тяжелых металлов, барбитураты, кетоны, некоторые стероиды и др. Несмотря на разнообразие химического строения, все индукторы имеют ряд общих признаков: их относят к числу липофильных соединений, и они служат субстратами для ферментов биотрансформации. Чаще всего имеют длительный период полувыведения. Индукция ферментов биотрансформации ведет к ускорению биотрансформации и снижению активности ксенобиотика [3].

Многочисленные индукторы монооксигеназных систем можно разделить на два класса [3]:

- первый класс (барбитураты, некоторые лекарственные средства и инсектициды) вызывают выраженную пролиферацию гладкого эндоплазматического ретикулума в печени и увеличение активности цитохрома P-450.

- второй класс (ПАУ, бензпирен, диоксины и др.) не вызывают пролиферацию гладкого эндоплазматического ретикулума в печени, но при этом существенно возрастает активность P-450, УДФГ-трансферазы, глутатионтрансфераз, гидроксилаз.

Ксенобиотики, как правило, вызывают индукцию нескольких ферментативных систем.

Индукция изоферментов цитохрома P-450 приводит к увеличению их количества и/или каталитической активности и снижению концентрации их субстратов (КС, ЛС). Схематично это показано на (рис. 11). Клинически в большинстве случаев индукция изоферментов приводит к ослаблению

фармакологических эффектов ксенобиотиков и лекарственных средств являющихся их субстратами. В ситуациях, когда биотрансформация ЛС приводит к образованию метаболитов с высокой активностью, индукция изоферментов цитохрома Р-450 может приводить к усилению фармакологических эффектов, вплоть до токсических. Так, например, индукция СУР2Е1 при приеме парацетамола приводит к усиленному образованию N-ацетил-пара-бензохинона имида, являющегося гепатотоксичным [45].

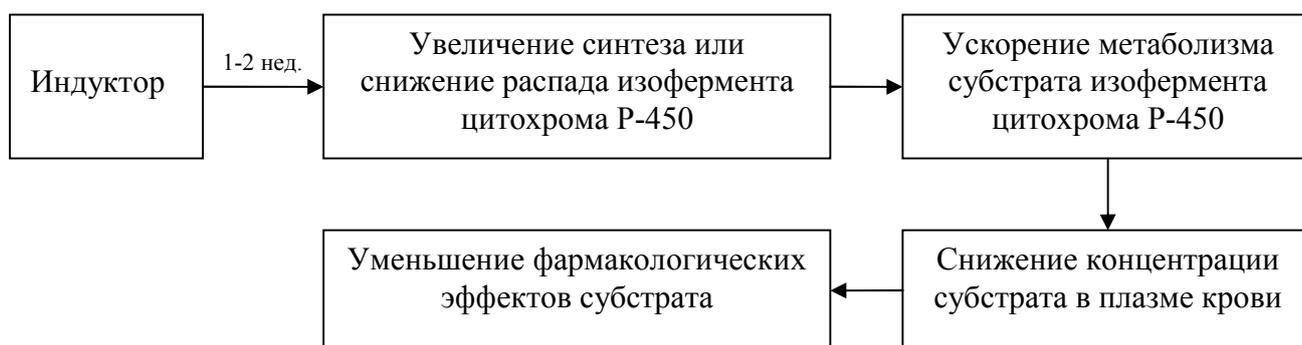


Рис. 11. Схема взаимодействия индуктора и субстрата изофермента цитохрома Р-450 [46].

Механизмы индукции могут быть, как связаны с воздействием на специфические рецепторы, так и реализовываться без взаимодействия с ними. При взаимодействии индуктора с внутриклеточными рецепторами происходит образования комплекса индуктор+белок-регулятор. Данный комплекс проникает в ядро клетки и увеличивает экспрессию гена, кодирующего изофермент цитохрома Р-450, путем воздействия на его регуляторную область. Примерами таких внутриклеточных рецепторов являются прегнан-Х-рецептор, конститутивный андростановый рецептор, арил-гидрокарбоновый рецептор и др. [47].

Одним из примеров индукции, не связанной с взаимодействием индуктора со специфическими рецепторами является индукция СУР2Е1 путем посттранскрипционной стабилизацией молекул данного изофермента [48].

В зависимости от влияния на субстрат изофермента цитохрома, индукторы делят на сильные, действие которых приводит к уменьшению для КС/ЛС площади под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (AUC) более, чем на 80 %, умеренные - уменьшение AUC при их действии составляет 50-80 % и слабые, приводящие к уменьшению AUC на 20-50 %) [49].

В связи с тем, что индукция многих изоферментов цитохрома P-450 реализуется, в том числе, через индукцию транскрипции гена, кодирующего изофермент и последующий синтез изофермента, обычно требуется несколько дней для развития взаимодействия между КС/ЛС-индуктором изофермента цитохрома P-450 и КС/ЛС-субстратом данного изофермента.

В литературе описано разнонаправленное влияние на каталитическую активность цитохрома P-450 3A4 витаминов группы В. Так тиамин и рибофлавин ингибируют, а пиридоксин стимулирует электровосстановление этого гемопротейна [50].

В работе А. А. Маховой с соавторами [51] исследовано влияние широкого спектра биологически активных веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, на электрокаталитические свойства цитохрома P 450 3A4 и 2C9. Было показано, что в присутствии витаминов А, С, Е, таурина, кудесана, этоксида и мексидола, восстановление цитохрома P-450 3A4 и 2C9 протекает более эффективно. Так же было исследовано влияние метаболического средства с антигипоксическими, антиоксидантными и цитопротекторными свойствами – цитохрома С на P-450 3A4 в диапазоне концентраций 10-100 мкМ. Максимальный эффект наблюдался при концентрации цитохрома С 50 мкМ.

Существенное влияние на судьбу ЛС в организме оказывают и факторы питания. В широкомасштабном исследовании 116 растительных пищевых добавок [52], разрешенных к применению, было установлено влияние 87 из них на экспрессию изоформ CYP1A2, 2C11, 2D6, 2E1 и 3A1, и только 29 никак не влияли на этот процесс. На все случаи ингибирования экспрессии наибольшая доля, а именно - 51 %, приходилась на изоформу CYP2C11. Индукция экспрессии чаще всего наблюдалась для изоформы CYP1A2 (21 %).

Одним из ярких и хорошо изученных примеров взаимодействий пищевых продуктов и ЛС является грейпфрутовый сок, который ингибирует активность изоформы CYP3A4 в тонком кишечнике, что приводит к существенной редукции предварительного метаболизма ЛС. Кроме того, сок грейпфрута ингибирует активность Р-гликопротеиновых транспортеров, которые перемещают ЛС из энтероцитов обратно в просвет кишечника.

Употребление грейпфрутового сока совместно с ЛС может усиливать токсичность амиодарона и пропafenона, существенно влиять на концентрации в крови препаратов с узким терапевтическим диапазоном – бензодиазепинов, циклоспорина и др. [53], приводить к нарушениям предсердножелудочковой проводимости при совместном приеме с верапамилом [54], быть причиной причиной гипогликемии при приеме репаглинида, вызывать подъем кровяного давления взаимодействия с сибутрамином, ослаблять антитромбоцитарную активность при введении клопидрогеля.

Возможность витаминов и витаминоподобных веществ выступать в качестве средств регуляции скорости биотрансформации и выраженности фармакологического эффекта ЛС путем изменения активности ферментов метаболизма ксенобиотиков, в том числе системы цитохромов Р-450 продемонстрирована в ряде исследований, как экспериментальных, так и клинических. Наиболее часто в состав комплексной терапии ряда заболеваний включают природные антиоксиданты: витамины, таурин, коэнзим Q10 и другие. Целесообразным представляется изучение возможности влияния природных антиоксидантов на активность системы цитохромов Р-450 в клинике, что откроет перспективы более широкого использования этой группы ЛС.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Отчет о НИР «Оценка значимости биоэлементов, полиненасыщенных жирных кислот и микробиоты кишечника в развитии оксидативного стресса у сотрудников ГПС МЧС России» / Рук. НИР Шантырь И.И., СПб., ФГБУ ВЦЭРМ им. А.М. Никифорова МЧС России, 2018. - 87 с.
2. Черняк Ю.И. Состояние процессов биотрансформации ксенобиотиков при воздействии различных классов полициклических соединений: Автореф. дисс ...д.б.н. – Иркутск, 2005.- 28 с.
3. Рембовский В.Р. Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм /В.М.Рембовский, МЛ.А.Могиленкова. – СПб. : Изд-во Политехн. Ун-та, 2017. – 384 с.
4. Черняк Ю.И. Состояние процессов биотрансформации ксенобиотиков при воздействии различных классов полициклических соединений: Автореф дисс... д.б.н. - Иркутск, 2005. – 24 с.
5. Hodgson, E. (2004). A textbook of modern toxicology, John Wiley & Sons, Inc., Retrieved from <http://faculty.ksu.edu.sa/73069/Documents/Toxicology.pdf/>
6. Tomlin Mark E. Pharmacology & Pharmacokinetics a Basic Reader. New York: Springer, 2010. 4.
7. Щербаков В.М., Тихонов А.В. Изоформы цитохрома Р – 450 печени человека. – М.: Биохим. технологии, 1995.- 102 с.
8. Кржечковская В.В. Мембрансвязанный цитохром В₅. Роль цитохрома В₅ в регуляции активности цитохрома Р-450 //Мембраны. – 2005. - № 2. – С. 10 – 22.
9. Клиническая фармакокинетика: теоретические прикладные и аналитические аспекты: руководство / Под ред. В.Г.Кукеса. – 2009. – 432 с.
10. Ingelman-Sundberg M. REVIEW Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes:properties and polymorphisms. / Ingelman-Sundberg M. // Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol. — 2004. — V.369. — p. 89–104.

11. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. / Nebert DW. // Pharmacogenetics. — 1996. — V.6. — pp. 1–42.
12. Рембовский В.Р. Процессы детоксикации при воздействии химических веществ на организм /В.М.Рембовский, МЛ.А.Могиленкова. — СПб. : Изд-во Политехн. Ун-та, 2017. — 384 с.
13. Арчаков А.и. //Микросомальное окисление. М.: «Наука», 1975. — 326 с.
14. Rendic S., Di Carlo F.J. Human cytochrome P 450 enzymes: a status report summarizing their resotions, substrates, inducers, and inhibitors. //Drug Metab. Rev.- 1997.- N 29.- P. 413 – 580.
15. Guengerich F.P. Cytochromes P 450, drugs, and diseases. //Mol. Interv. — 2003/ - N 3. — P. 194 – 204.
16. Granvil C.P. et al. 4-Hydroxy Lation of debrisoquine by human GYP1A1 and its inhibition by quinidine and quinine. //J. Pharmacol. Exp. Ther. — 2002. — N 301. — P. 1025 – 1032.
17. Pjpa-Burke I.G. et al. Streamlined system for pur ifying 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.- N 76. — P. 7278 – 7287.
18. Eap C.B. Non-response to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: Clinical data and analysis of CYP1A2 gene. / Eap C.B., Bender S., Jaquenoud Sirot E. et al. // Journal of Clinical Psychopharmacology. — 2004. — V.24. — pp. 214-219.
19. Ayari I., Fedeli U., Saguem S., Hidar S., Khlifi S., Pavanello S. Role of CYP1A2 polymorphisms in breast cancer risk in women. Mol Med Rep. 2013 Jan; 7 (1): 280–6.
20. Fontana R.J., Lown K.S., Paine M.F., Fortlage L., Santella R.M., Felton J.S., Knize M.G.,Greenberg A., Watkins P.B. Effects of a chargrilled meat diet on expression ofCYP3A, CYP1A, and P-glycoprotein levels in healthy volunteers. Gastroenterology. 1999 Jul; 117 (1): 89–98.

21. Hakooz N., Hamdan I. Effects of dietary broccoli on human in vivo caffeine metabolism: a pilot study on a group of Jordanian volunteers. *Curr Drug Metab.* 2007 Jan; 8 (1): 9–15.
22. Karjalainen M.J., Neuvonen P.J., Backman J.T. In vitro inhibition of CYP1A2 by model inhibitors, anti-inflammatory analgesics and female sex steroids: predictability of in vivo interactions. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008 Aug; 103 (2): 157–65.
23. Zuber R., Anzenbacherov E., Anzenbacher P. // *J.Cell.Mol.Med.* - 2002. - № 6(2). - P. 189-198.
24. Geick A. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. / Geick A, Eichelbaum M, Burk O // *J Biol Chem.* — 2001.— V.276. — pp. 14581–14587.
25. McKinnon RA. Characterisation of CYP3A gene subfamily expression in human gastrointestinal tissues. / McKinnon RA, Burgess WM, Hall PM et al. // *Gut.* — 1995. — V.36. — pp. 259–267.
26. Zhang QY Characterization of human small intestinal cytochromes P-450. / Zhang QY, Dunbar D, Ostrowska A, Zeisloft S et al. // *Drug Metab Dispos.* — 1999. — V.27. — pp. 804–809.
27. Eiselt R. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. / Eiselt R, Domanski TL, Zibat A et al. // *Pharmacogenetics.* — 2001. — V.11. — pp. 447–458.
28. Van Schaik RHN. CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 variant alleles in the Dutch Caucasian population. / Van Schaik RHN, van der Werf M, van der Heiden IP et al. // *Clin Pharmacol Ther.* — 2003. — V.73. — p. 42.
29. Hustert E. Natural protein variants of pregnane X receptor with altered transactivation activity toward CYP3A4. / Hustert E, Zibat A, Presecan-Siedel E. et al. // *Drug Metab Dispos.* — 2001. — V.29. — pp. 1454–1459.
30. Koch I. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. / Koch I, Weil R, Wolbold R et al. // *Drug Metab Dispos.* — 2002. — V.30. — pp. 1108–1114.

31. Ozdemir V. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. / Ozdemir V, Kalowa W, Tang BK et al. // *Pharmacogenetics*. — 2000. — V.10. — pp. 373–388.
32. Чекман И.С., Гриневич А.И. Конъюгация ксенобиотиков // *Фармакол. токсикология* – 1988. - № 1. – С. 86 – 93.
33. 100 McGraw J, Waller D. Cytochrome P450 variations in different ethnic populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2012 Mar;8(3):371-82.
34. 101 Drogemoller B, Plummer M, Korkie L et al. Characterization of the genetic variation present in CYP3A4 in three South African populations. *Front. Genet*. 4, 17 (2013).
35. О. Е. Мустафина, И. А. Туктарова, Д. Д. Каримов, Р. Ш. Сомова, Т. Р. Насибуллин Полиморфизм генов CYP2D6, CYP3A5 и CYP3A4 в популяциях русских, татар. и башкир. *Генетика* 2015, том 51, № 1, с. 109-119.
36. О. Е. Мустафина, И. А. Туктарова, Д. Д. Каримов, Р. Ш. Сомова, Т. Р. Насибуллин Полиморфизм генов CYP2D6, CYP3A5 и CYP3A4 в популяциях русских, татар. и башкир. *Генетика* 2015, том 51, № 1, с. 109-119.
37. Zhou LP, Yao F, Luan H, Wang YL, Dong XH, Zhou WW, Wang QH. CYP3A4*1B polymorphism and cancer risk: a HuGE review and meta-analysis. *Tumour Biol*. 2013 Apr; 34(2):649-60.
38. Assis J., Pereira D., Medeiros R. Influence of CYP3A4 genotypes in the outcome of serous ovarian cancer patients treated with first_line chemotherapy: implication of a CYP3A4 activity profile // *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2013. V. 6. № 7. P. 552–561.
39. Dally H, Edler L, Jäger B, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Drings P, Schulz V, Kayser K, Bartsch H, Risch A. The CYP3A4*1B allele increases risk for small cell lung cancer: effect of gender and smoking dose. *Pharmacogenetics*. 2003 Oct;13(10): 607-18.
40. Birdwell KA, Grady B, Choi L, Xu H, Bian A, Denny JC, Jiang M, Vranic G, Basford M, Cowan JD, Richardson DM, Robinson MP, Ikizler TA, Ritchie MD, Stein CM, Haas DW. The use of a DNA biobank linked to electronic medical records to characterize pharmacogenomic predictors of

tacrolimus dose requirement in kidney transplant recipients. *Pharmacogenetics and genomics*. 2012, 1, p. 32-42..

41. Chu W, Fyles A, Sellers EM, McCreedy DR, Murphy J, Pal T, Narod SA. Association between CYP3A4 genotype and risk of endometrial cancer following tamoxifen use. *Carcinogenesis*. 2007, 10, P. 2139-42.

42. Kile DA, MaWhinney S, Aquilante CL, Rower JE, Castillo-Mancilla JR, Anderson PL. A population pharmacokinetic-pharmacogenetic analysis of atazanavir. *AIDS research and human retroviruses*. 2012., 10, P. 1227-34.

43. Абдрашитов Р.Х., Гильдеева Г.Н., Раменская Г.В., Смирнов В.В. Обзор существующих методик оценки активности CYP2D6 с применением экзогенных и эндогенных маркеров / *Фармакокинетика и фармакодинамика*. - №1. – 2015. – С. 4-11.

44. Sheldon H.P. et al. Cytochrome P450 2D6 Phenoconversion Is Common in Patients Being Treated for Depression: Implications for Personalized Medicine. // *J.Clin. Psychiatry*. — 2013. —№ 74(6). — P. 614-621.

45. Michaut A., Moreau C., Robin M.A., Fromenty B. Acetaminopheninduced liver injury in obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int*. 2014 Aug; 34 (7): e171–9.

46. Ritter J. (Ritter, James. *A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 5th ed. London: Hodder Arnold, 2008.

47. Tompkins L.M., Wallace A.D. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J BiochemMol Toxicol*. 2007; 21 (4): 176–81.

48. Azzalis L.A., Fonseca F.L., Simon K.A., Schindler F., Giavarotti L.,Monteiro H.P., Videla L.A., Junqueira V.B. Effects of ethanol on CYP2E1 levels and relatedoxidative stress using a standard balanced diet. *Drug Chem Toxicol*. 2012 Jul; 35 (3): 324–9.

49. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. URL: <http://>

www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf

50. Makhova A., Shumyantseva V., Shich E. et al. Electro analysis of cytochrome P450 3A4 catalytic properties with nanostructured electrodes: The influence of vitamins B group on diclofenac metabolism // *BioNanoScience*. – 2011; 1: 46–52.

51. Регуляция активности ферментов метаболизма лекарственных препаратов-цитохромов P450 3A4 И 2C9 – биологически активными соединениями А.А. Махова, Е.В. Ших, , Т.В. Булко, Е.В. Супрун, А.В. Кузиков, В.Г. Кукес, А.И. Арчаков / *Молекулярная медицина* № 5, 2013 , С. 49-53.

52. Jang E.H., Park Y.C., Chung W.G. // *Food Chem. Toxicol.* - 2004.- № 42(11). - P.1749-1756.

53. Dahan A., Altman H. // *Eur. J Clin. Nutr.* - 2004. - № 58(1). - P.1-9.

54. Bailey D.G., Dresser G.K. // *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* - 2004. - № 4. - P. 281-297.