



ОПИСАНИЕ ИЗУЧЕНИЯ ВРЕМЯ-ЗАВИСИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ МИКРОСОМАЛЬНЫХ ЦИТОХРОМОВ (ВЭЖХ-МС/МС ДЕТЕКЦИЯ)

Цель исследования - изучение время-зависимого ингибирования 6-ти изоферментов цитохрома P450 (CYP450) в микросомах печени человека, используя традиционные субстраты и ВЭЖХ-МС/МС анализ. Время-зависимость ингибирования цитохромов определяют для изучения обратимости и механизма ингибирования.

Тестируемые вещества в концентрации 0,019-10 мкМ преинкубируются с микросомами человека (0,5 мг/мл, Xenotech H0610) в присутствии/без НАДФН в 96-луночных планшетах при 37 °С. После 30 минут преинкубации смесь разбавляется в 10 раз раствором, содержащим 7 специфических субстратов, для измерения остаточной активности ферментов и инкубируется. Реакцию останавливают ацетонитрилом через 15 мин после добавления субстратов. Образующиеся метаболиты детектируют с помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа. В результате определяют значения ИК50 после предварительной инкубации в отсутствие и в присутствии НАДФН для цитохромов 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8 и 3A4 (2 субстрата), и вычисляют отношение этих величин, что даёт сдвиг ИК50. В качестве контролей применяются известные специфические ингибиторы.

Протокол исследования ингибирования цитохромов (ВЭЖХ-МС/МС анализ)

Изоформы CYP450	1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8, 3A4 (по требованию панель изоформ может быть расширена)
Концентрация соединения	0,019-10 мкМ (6 концентраций, шаг 3,5)
Число повторов/концентрацию	1
Концентрация микросом	Преинкубация – 0.5 мг/мл
Кофактор	НАДФН
Субстраты	Фенацетин (1A2), мидазолам и тестостерон (3A4), толбутамид (2C9), амодиахин (2C8), s-мефенитоин (2C19), декстрометорфан (2D6). По требованию панель субстратов может быть изменена.
Метаболиты	Ацетоминофен, 1-ОН-мидазолам, 6β-ОН-тестостерон, 4-ОН-толбутамид, N-десетил амодиахин, 4-ОН-мефенитоин, декстрофан.
Метод анализа	ВЭЖХ-МС/МС
Присутствие растворителей	0.5% ацетонитрил, 0.5% - метанол
Контроли	Мин - 100% ингибирования (смесь субстратов и кофактора без микросом); Макс - 0% ингибирования (смесь субстратов, кофактора и микросом); Бланк – контроль растворителя; Специфические ингибиторы (6 концентраций): мифепристон (3A4) 0,019-10 мкМ, пароксетин (2D6) 0,0019-1 мкМ, фурафин (1A2) 0,057-30 мкМ, тиклопидин (2C19) 0,019-10 мкМ, дезэтил-амиодарон

	(2C8) 0,057-30 мкМ; тиениловая кислота (2C9) – 0,0019-1 мкМ.
Анализируемые параметры	Сдвиг ИК50 – величина, определяемая как отношение ИК50 (концентрация, при которой активность фермента снижается на 50%) в отсутствие и в присутствии НАДФН.
Число тестируемых соединений в партии	6 + 6 контролей

Изоформа СУР	Субстрат	Концентрация субстрата, мкМ	Ингибитор	Метаболит
1A2	Фенацетин	50	Фурафилин	Ацетоминофен
3A4	Мидазолам	5	Мифепристон	1-ОН-мидазолам
3A4	Тестостерон	50	Мифепристон	6β-ОН-тестостерон
2C9	Толбутамид	50	Тиениловая кислота	4-ОН-толбутамид
2C8	Амодиахин	5	Дезэтил-амиодарон	N-десетил амодиахин
2C19	S-мефенитоин	50	Тиклопидин	4-ОН-мефенитоин
2D6	Декстрометорфан	5	Пароксетин	Декстрофан

Подробнее: <http://chemrar.ru/services/adme.php>

По вопросам заказа и проведения исследований:
 Ирина Титкова
 Биоаналитическая лаборатория
 ЗАО «ИИХР», ЦВТ "ХимРар"
 тел. раб.: +7 (495) 925-30-74 +доб.(557)
 E-mail: tira@iibr.ru