

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМОВ (ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД)

Экспериментальный метод по изучению ингибирования цитохромов печени входит в панель тестов АДМЕ. Несмотря на разнообразие изоферментов цитохрома в организме человека, биотрансформация лекарственных средств происходит с участием преимущественно ограниченного количества основных представителей семейства P450: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4. Более редкими являются изоформы 2E1, 2B6, 1B1, 2C8 и другие. Знание особенностей метаболизма лекарственного средства определенными изоформами системы цитохрома P450 является необходимым при прогнозировании возможных нежелательных явлений, вызванных лекарственным взаимодействием, которые могут приводить к изменению концентрации лекарственного средства или его метаболитов (включая активные или токсические метаболиты) в плазме крови, а, следовательно, в области молекул-мишеней. Для оценки влияния препаратов на активность цитохромов печени в процессе разработки лекарств широко используются тест-системы с рекомбинантными ферментами и флуоресцентными субстратами, а также микросомы с метаболическими субстратами и ВЭЖХ-МС/МС анализ.

Краткое описание флуоресцентного метода

Цель исследования - определение влияния соединения на активность основных изоформ цитохромов P450 – 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 2E1, 2B6 при помощи тест-систем Invitrogen с флуоресцентными субстратами. Одним из наиболее быстрых и удобных методов тестирования большого ряда соединений на ингибирование цитохромов является флуоресцентный метод с использованием Vivid® CYP450 Screening Kits фирмы Invitrogen. Данные флуоресцентные киты разработаны для каждой изоформы цитохрома, основаны на взаимодействии рекомбинантных ферментов (CYP450 Vacuosomes®) и их специфических флуоресцентных субстратов (Vivid® Substrates). В результате метаболической реакции субстраты переходят в сильно флуоресцирующие продукты, которые детектируются флуориметром. Снижение флуоресцентного сигнала говорит о степени ингибирования активности цитохрома.

Тестируемые вещества в концентрации 0,005-10 мкМ инкубируются с рекомбинантными ферментами, субстратами и системой регенерации НАДФН в 384-луночных планшетах. Измеряется флуоресценция продукта реакции, пропорциональная активности цитохрома, в результате определяют значения ИК50. В качестве контролей применяются известные специфические ингибиторы.

Протокол исследования ингибирования цитохромов (флуоресцентный метод)

Наборы	Vivid® CYP450 Screening Kits (Invitrogen)
Изоформы CYP450	1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 (по требованию панель изоформ может быть расширена 2C8, 2E1, 2B6 и др)
Концентрация соединения Число повторов	0,005-10 мкМ (8 концентраций) 2 на концентрацию
Концентрация ДМСО Кофактор	1 % НАДФН
Флуоресцентные субстраты	ЕОМСС, ВОМСС, DBOMF, BOMF (любые из тест-систем Invitrogen)
Метод анализа	Флуориметрия
Контроли	Мин - 100% ингибирования (без ферментов); Макс - 0% ингибирования (смесь фермента, субстрата и кофакторов в буфере с 1% ДМСО); Специфические ингибиторы (8 концентраций): кетоконазол (3A4), хинидин (2D6), α -нафтофлаван (1A2), миконазол (2C19, 2B6), сульфафеназол (2C9), 4-метилпиразол (2E1).
Анализируемые параметры	% ингибирования; ИК50 - концентрация, при которой активность фермента снижается на 50%
Число тестируемых соединений в одной партии	1) 8 соединений в 8 концентрациях, включая контрольный ингибитор; 2) 14 соединений в 4 концентрациях плюс контрольный ингибитор в 8 концентрациях.

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

По вопросам заказа и проведения исследований:

Ирина Титкова

Биоаналитическая лаборатория

ЗАО «ИИХР», ЦВТ "ХимПар"

тел. раб.: +7 (495) 925-30-74 +доб.(557)

E-mail: tira@iibr.ru