

ИССЛЕДОВАНИЕ ВРЕМЯ-ЗАВИСИМОГО ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМОВ

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 время –зависимого ингибирования цитохромов

Изоформы CYP450	1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2C8, 3A4 (по требованию панель изоформ может быть расширена)
Концентрация соединения Число повторов/концентрацию	0,019-10 мкМ (6 концентраций, шаг 3,5) 1
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
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, фурафилин (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 соединений в плашке	6 + 6 контролей

Изоформа СУР	Субстрат	Концентрация субстрата, мкМ	Ингибитор	Метаболит
1A2	Фенацетин	50	Фурафинин	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	Дезэтиламиодарон	N-десетил амодиахин
2C19	S-мефенитоин	50	Тиклопидин	4-ОН-мефенитоин
2D6	Декстрометорфан	5	Пароксетин	Декстрофан

Подробнее: <https://chemrar.ru/invitro-metabolizm-adme/>

По вопросам проведения исследований:
Кони́на Дарья Олеговна
Менеджер по развитию исследовательских сервисов,
ООО «НИИ ХимРар»
E-mail: konina@chemrar.ru
Тел.: +7 (495) 925-30-74 +доб.(521)