

УДК 612.015.1; 577.15; 543.94

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА МОНООКСИГЕНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 3A4: ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

В.В. Шумянцева^{1}, Е.В. Ших², А.А. Махова², Т.В. Булко¹, В.Г. Кукуес²,
О.С. Сизова², Г.В. Раменская², С.А. Усанов³, А.И. Арчаков¹*

¹Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, ул. Погодинская, 10, 119121 Москва; тел.: 7 (499) 246-58-20, факс: 7 (499) 245-08-57;

эл. почта: viktorija.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова, Москва

³Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск

Показано, что нагрузочные дозы витаминов группы В позволяют при одновременном назначении снизить суточную дозу диклофенака не уменьшая его анальгетического эффекта. Во всех трёх схемах приема диклофенака - прием только диклофенака, прием препарата на фоне 2 таблеток "Гитагампа" (комплекса витаминов группы В) и прием препарата на фоне 4 таблеток "Гитагампа" - максимальное значение концентрации диклофенака в крови (C_{\max}) было достигнуто через 1 час после приема. В случае приема диклофенака без витаминов величина значения C_{\max} составила $1137,2 \pm 82,4$ нг/мл; при приёме на фоне 2 таблеток "Гитагампа" - $1326,7 \pm 122,5$ нг/мл, а при приёме 4 таблеток - $2200,4 \pm 111,3$ нг/мл. Таким образом, нагрузочные дозы витаминов группы В оказывают статистически значимое влияние на величину значения максимальной концентрации диклофенака. Показано положительное влияние витаминов группы В на уменьшение выраженности болевого синдрома. Фармакодинамические и фармакокинетические данные подтверждены в электрохимических экспериментах по исследованию электрокаталитической активности цитохрома P450 3A4 (CYP3A4). Для иммобилизации ферментов использовали графитовые печатные электроды, модифицированные наночастицами золота и синтетическим мембраноподобным веществом - бромидом дидодецилдиметиламмония (DDAB). По результатам электрохимического анализа можно сделать вывод о влиянии витаминов группы В на метаболизм нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака, катализируемого цитохромом P450 3A4. При сравнении эффекта 300 мкМ концентрации витаминов группы В (B_1 , B_2 , B_6), по данным электрохимического анализа, рибофлавин (витамин B_2) наиболее эффективно подавляет взаимодействие диклофенака с цитохромом P450 3A4. Полученные данные подтверждают возможность регуляции фармакокинетических параметров и выраженности фармакодинамического эффекта с помощью влияния нагрузочных доз витаминов на активность метаболизирующих ферментов системы цитохрома P450 3A4 (CYP3A4).

Ключевые слова: цитохром P450 3A4, фармакокинетика, диклофенак, витамины группы В, электрохимия, ферментные электроды.

ВВЕДЕНИЕ. Важнейшей задачей современной медицины является повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии. Эта задача может быть решена не только путём поиска новых лекарственных веществ, но также благодаря более рациональному использованию уже существующих лекарственных средств. Целенаправленное воздействие на процессы фармакокинетики является важным резервом повышения эффективности препаратов.

Боль - наиболее частая причина обращения пациентов за медицинской помощью. По оценке большинства исследователей, распространенность боли в общей популяции составляет от 7 до 64%, а распространенность хронической

* - адресат для переписки

боли - от 7,6 до 45%. Наибольшее распространение в лечении болевого синдрома получили препараты из группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС). Более 30 млн. людей в мире ежедневно принимают НПВС, около 20% больных в стационаре также получают НПВС. В то же время применение лекарственных средств из группы НПВС может сопровождаться развитием целого ряда нежелательных побочных реакций (НПР). Более чем у 10% пациентов, получающих НПВС, отмечается изменение агрегационных свойств тромбоцитов, в 1-10% случаев развиваются желудочное или тонкокишечное кровотечение, язвы ЖКТ и их перфорация, у ряда пациентов (менее 1%) выявляются побочные эффекты со стороны ЦНС, гепатотоксичность, сыпь, почечная недостаточность и бронхоспазм [1].

Важнейшим элементом фармакокинетики является биотрансформация, которая во многих случаях определяет выраженность фармакологического эффекта вещества и его токсичность, так как может привести как к образованию биологически неактивных метаболитов или активных и реакционноспособных метаболитов. Особенно большое значение имеют процессы биотрансформации для проявления эффекта ненаркотических анальгетиков, и в частности, диклофенака как широко распространенного НПВС [2-4].

В процессах биотрансформации ксенобиотиков могут участвовать витамины. Действие витаминов может осуществляться классическим путём (т.е. через коферментные функции), а также благодаря влиянию на структуру и функции мембран, на участки ферментативного сопряжения обмена витаминов и ксенобиотиков, таким образом, витамины и коферменты могут выступать в роли средств регуляции биотрансформации и фармакологического действия лекарственных веществ [5, 6].

Диклофенак или 2-(2,6-дихлоранилино)фенилацетоновая кислота является типичным представителем НПВС, и “стандартом” (или препаратом выбора) для лечения артритов, анкилозирующих спондилитов и острой мышечной боли [7]. Препарат является неселективным ингибитором циклооксигеназы (ЦОГ), его противовоспалительная активность связана с ингибированием изоформы ЦОГ-2, тогда как побочные эффекты (раздражение слизистой ЖКТ, язвы и кровотечения) связаны с ингибированием ЦОГ-1, которая функционирует как гастропротектор, регулирует кровоток в почках и поддерживает агрегацию тромбоцитов [8-10]. Один из путей метаболического превращения диклофенака - реакции гидроксилирования, которые приводят к образованию 4'-гидрокси- и 5-гидрокси-производных препарата. На основании исследований, проведенных с помощью селективных химических ингибиторов, моноклональных антител и рекомбинантных ферментов было показано, что эти реакции катализируют цитохромы CYP2C9 и CYP3A4 [11-13]. Поскольку метаболиты диклофенака практически лишены фармакологической активности, а лечебный эффект обусловлен лишь неизменной формой препарата, то любое изменение скорости его биотрансформации (ускорение, либо замедление) может менять терапевтическую активность диклофенака. Биотрансформация, таким образом, является тем звеном фармакокинетики, воздействуя на которое, можно влиять на эффективность проводимой терапии.

Недостаточность тиамин (витамина B₁) и его дополнительное введение оказывают значительное влияние на активность микросомальных ферментов метаболизма ксенобиотиков. Тиамин и его производные оказывают ингибирующее действие на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков, причём деметилазная и гидроксилазная активности угнетаются более значительно, чем другие ферменты. Дефицит тиамин сопровождается необычной реакцией со стороны микросомальных ферментов: активацией NADPH-редуктазы, реакций гидроксилирования и деметилирования, повышением количества цитохрома P-450. Дефицит тиамин активирует микросомальные монооксигеназы [14]. Дополнительное введение тиамин оказывает тормозящее действие на активность микросомальных монооксигеназ и редуктаз [15].

МЕТОДИКА.

Фармакокинетические исследования. Фармакокинетические исследования были проведены на базе городской клинической больницы № 23 им. Медсантруд (ГКБ № 23 им. Медсантруд) и на кафедре клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ГОУ ВПО Первом МГМУ им. И.М. Сеченова. В исследовании приняло участие 30 информированных добровольцев, 14 мужчин и 16 женщин, средний возраст $38,5 \pm 4,5$ лет и 36 информированных пациентов (16 мужчин и 20 женщин) с дорсопатией (L1-L5), сопровождающейся болевым и мышечно-тоническим синдромом, без тяжелой сопутствующей патологии, средний возраст $40,5 \pm 2,5$ лет.

В группе добровольцев были изучены фармакокинетические параметры диклофенака при приеме в дозе 100 мг однократно. Далее волонтеры были разделены в ходе исследования на две равные подгруппы по 15 человек. 1-ая подгруппа принимала 2 таблетки витаминного комплекса "Гитагамп" ежедневно перорально на протяжении 7 дней. 2-ая подгруппа принимала 4 таблетки "Гитагампа" ежедневно на протяжении 7 дней. (табл. 1 и 2) На 8-ой день в обеих группах волонтеров было проведено повторное фармакокинетическое исследование при приеме 100 мг диклофенака однократно. Забор образцов крови (5 мл) проводился непосредственно перед приемом препарата натощак через 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч и 12 ч после приема диклофенака. Пробы отбирали из кубитальной вены через катетер, установленный перед первым забором крови. Среди пациентов были сформированы 2 группы: 1-ая группа в виде монотерапии принимала диклофенак в дозе 100 мг в сутки в течение 7 дней (18 пациентов). На 8-ой день приема были изучены фармакокинетические параметры диклофенака; 2-ая группа пациентов из 18 человек принимала в течение 7 дней диклофенак в дозе 100 мг на фоне недельного приема препарата "Гитагамп" в дозе 4 таблетки в сутки, в этой группе пациентов так же на 8-ой день были изучены фармакокинетические параметры диклофенака. Диклофенак в плазме крови определялся методом ВЭЖХ. В качестве внутреннего стандарта была использована флуфенамовая кислота, детекция проводилась при длине волны 275 нм.

Таблица 1. Динамика концентрации диклофенака (100 мг перорально) при однократном разовом приеме и при однократном разовом приеме на фоне нагрузочных доз витаминов.

Условия опыта Время	Концентрация (нг/мл) при однократном разовом приеме диклофенака 100 мг перорально	Концентрация (нг/мл) при однократном разовом приеме диклофенака 100 мг перорально на фоне приема 2 таблеток Гитагампа 7 дней	Концентрация (нг/мл) при однократном разовом приеме диклофенака 100 мг перорально на фоне приема 4 таблеток Гитагампа 7 дней
исход	0	0	0
0,5 час	$626,5 \pm 23,5$	$689,4 \pm 18,9^*$	$832,5 \pm 20,1^*$
1 час	$1137 \pm 82,4$	$1327 \pm 122,5^*$	$2200 \pm 111,3^*$
1,5 час	$509,8 \pm 43,7$	$623,2 \pm 32,4^*$	$1023 \pm 84,9^*$
2 час	$479,7 \pm 25,6$	$547,5 \pm 34,5^*$	$897,4 \pm 47,7^*$
3 час	$150,4 \pm 9,6$	$185,2 \pm 12,2^*$	$645,5 \pm 44,4^*$
4 час	$142,7 \pm 58,1$	$230,8 \pm 87,6^*$	$423,4 \pm 39,7^*$
6 час	$47,5 \pm 7,3$	$66,4 \pm 6,1^*$	$302,5 \pm 19,5^*$
8 час	$35,4 \pm 5,8$	$59,7 \pm 8,7^*$	$189,2 \pm 22,4^*$
12 час	$17,4 \pm 4,1$	$32,5 \pm 3,5^*$	$89,6 \pm 7,8^*$

Примечание: * - статистически достоверно выше по отношению к значению полученному при приеме диклофенака без витаминов.

ЭЛЕКТРОАНАЛИЗ ЦИТОХРОМА P450 3A4

Таблица 2. Динамика концентрации диклофенака при однократном разовом приёме (100 мг перорально) на 8-й день курсового применения и при однократном разовом приёме на 8-й день курсового применения при приёме на фоне недельного применения нагрузочных доз витаминов.

Условия опыта Время	Концентрация (нг/мл) при разовом приеме диклофенака 100 мг перорально на 8-й день курсового применения	Концентрация (нг/мл) при разовом приеме диклофенака 100 мг перорально на фоне недельного приема нагрузочных доз витаминов (4 таблетки)
исход	0	0
0,5 час	683,7±38,9	909±100,6*
1 час	1301±125,6	2346±196,3*
1,5 час	534,7±45,1	1068±89,4*
2 час	491,2±36,5	904±90,7*
3 час	172,4±11,8	713±67,1*
4 час	156,4±14,5	503±48,9*
6 час	58,9±7,4	418±387,5*
8 час	58,9±7,4	224±16,7*
12 час	29,6±3,2	128±11,4*

Примечание: * - статистически достоверно выше по отношению к значению, полученному при приёме диклофенака без витаминов.

Электрохимические исследования. Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата AUTOLAB (“Eco Chemie” Нидерланды), снабженного программным обеспечением GPES. Все измерения проводили при комнатной температуре. Электрохимические исследования цитохрома P450 3A4 проводили в 0,1 М калий-фосфатном буфере, содержащем 0,05 М NaCl, pH 7,4. В работе использовали трехконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати (ООО НПП “ЭЛКОМ”, Россия); с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами (графит фирмы Achison), и хлорсеребряным электродом сравнения. Диаметр рабочего электрода 2 мм. Все потенциалы приведены относительно хлорсеребряного Ag/AgCl электрода сравнения.

Цикловольтамперограммы (ЦВА) регистрировали при скорости развёртки от 10 до 100 мВ/с. Параметры, используемые при исследовании квадратно-волновой вольтамперометрии: (КВВА, восстановление, аэробные условия) начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 5 мВ, амплитуда 20 мВ, частота от 10 до 100 Гц. Параметры, используемые при дифференциальной импульсной вольтамперометрии: (ДИВА) амплитуда импульса 25 мВ, начальный потенциал 100 мВ, конечный потенциал –600 мВ, шаг потенциала 1 мВ, продолжительность импульса 50 мс.

Реагенты. В работе использовали следующие реактивы: дидодецилдиметиламмоний бромид (DDAB), $\text{HAuCl}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$, боргидрид натрия - фирмы Sigma–Aldrich, диклофенак в таблетках и диклофенак (субстанция) (“Новартис АГ”), тиамин (витамин B₁) в ампулах (50мг/мл) “Мосхимфармпрепараты” им. Семашко

В электрохимических экспериментах использовали свежеприготовленные растворы 10 мМ диклофенака в воде, и 150 мМ тиамин.

Коллоидный раствор золота, стабилизированный DDAB в хлороформе, был охарактеризован спектрально: $\lambda_{\text{max}} = 520 \text{ нм}$ [16].

Концентрацию рекомбинантного цитохрома P450 3A4 (165 мкМ) определяли по образованию комплекса восстановленной формы с оксидом углерода, используя коэффициент экстинкции $\epsilon_{450} = 91 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

Приготовление электродов. На поверхность рабочего графитового электрода наносили 2 мкл 5 мМ коллоидного раствора золота в 0,1 М DDAB в хлороформе, после испарения хлороформа (10 мин.) наносили 1 мкл исследуемого гемопротейна. Электроды оставляли на 12 часов при +4°C во влажной камере, предотвращающей полное высыхание электродов.

Для экспериментов в анаэробных условиях аргон пропускали в буферный раствор электролита и анализируемый раствор фермента в течение 30 минут.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Основная цель фармакокинетической части исследования - изучение влияния нагрузочных доз витаминов группы В на основные фармакокинетические параметры диклофенака при однократном разовом применении у добровольцев и на фоне курсового применения у пациентов с дорсопатией.

Во всех трёх схемах приёма диклофенака (приём только диклофенака, приём препарата на фоне 2 таблеток "Гитагампа" и приём препарата на фоне 4 таблеток "Гитагампа") максимальное значение концентрации диклофенака в крови было достигнуто через 1 час после приема (рис. 1). В случае приёма диклофенака без витаминов величина значения C_{\max} составила $1137,2 \pm 82,4$ нг/мл; при приёме на фоне 2 таблеток "Гитагампа" - $1326,7 \pm 122,5$ нг/мл, а при приёме 4 таблеток - C_{\max} достигало $2200,4 \pm 111,3$ нг/мл. При этом величина значения максимальной концентрации (C_{\max}) диклофенака, при однократном разовом приёме статистически достоверно ниже величины значения максимальной концентрации при приёме диклофенака на фоне курсового применения как 2, так и 4 таблеток "Гитагампа" ($p < 0,001$). При курсовом приёме диклофенака на фоне комплексного витаминного препарата "Гитагамп", содержащего нагрузочные дозы витаминов группы В отмечается статистически достоверное ($p < 0,001$) более длительное удержание концентрации в районе субмаксимальных значений - до шести часов после приёма препарата против двух часов в случае курсового приёма диклофенака без витаминов (рис. 2).

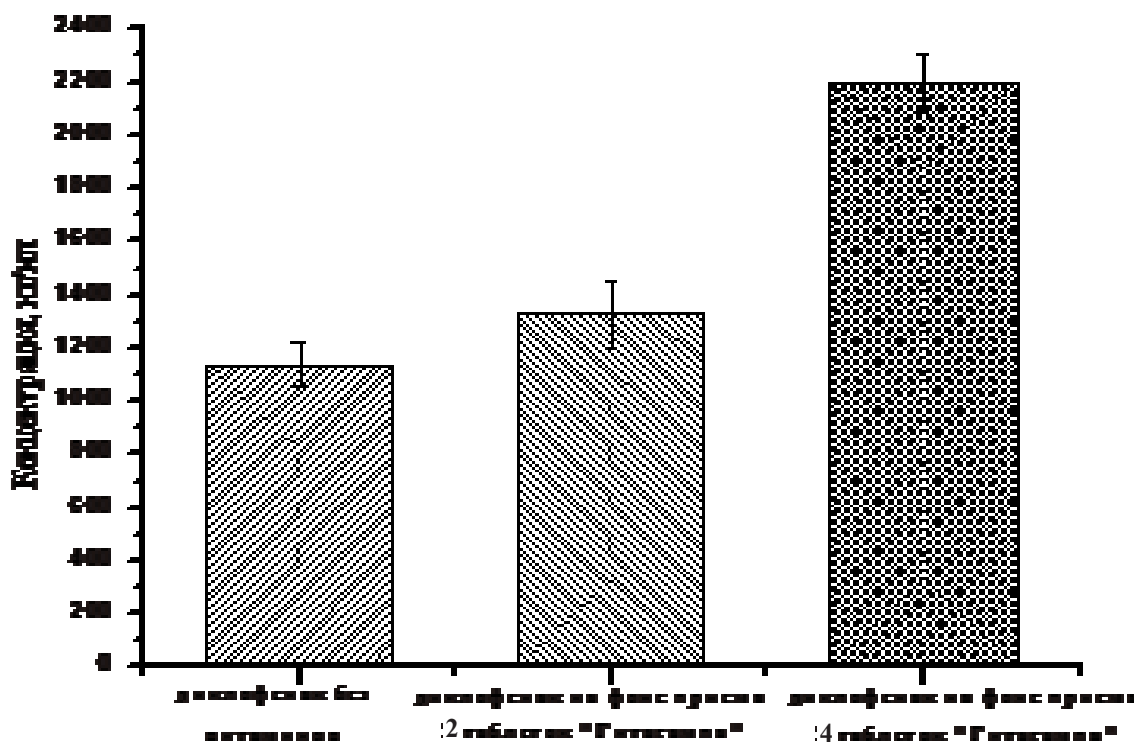


Рисунок 1.

Величина значения максимальной концентрации диклофенака в крови при однократном разовом приеме, на фоне приема 2 и 4 таблеток "Гитагампа".

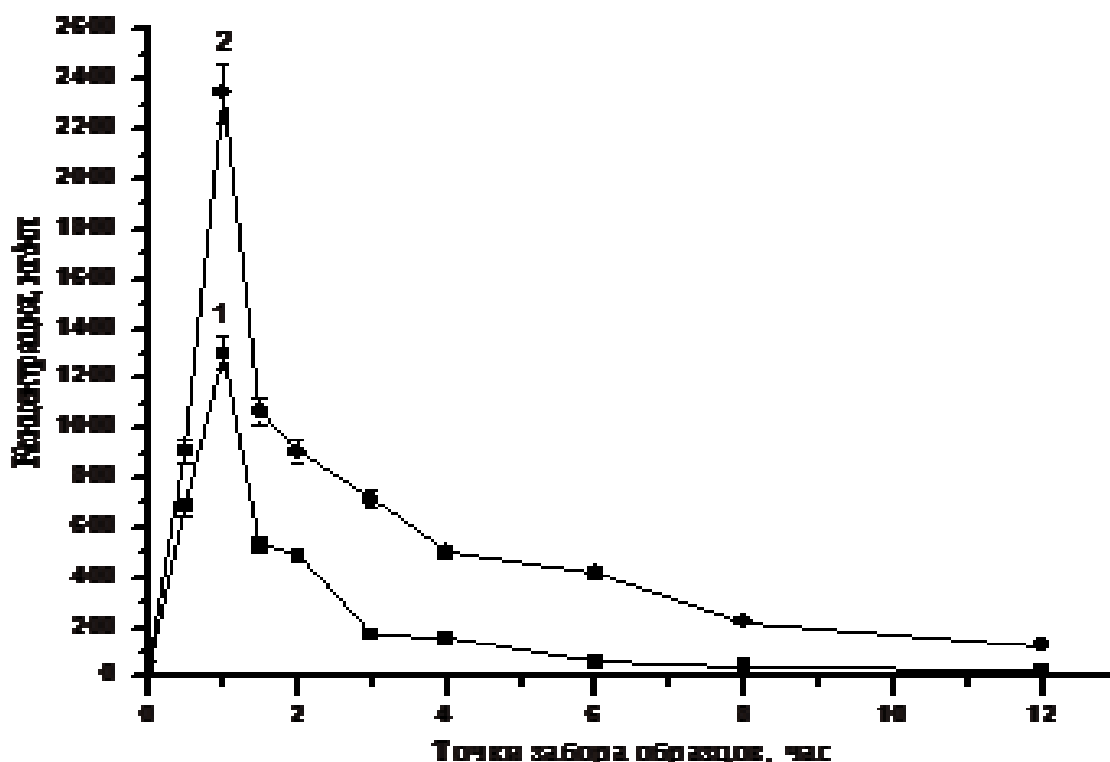


Рисунок 2.

Динамика концентрации диклофенака в крови без приема и на фоне приема 4 таблеток "Гитагампа" на 8-й день курсового применения. 1 - диклофенак без витаминов; 2 - диклофенак на фоне приема 4 таблеток "Гитагампа".

Таким образом, нагрузочные дозы витаминов группы В оказывают статистически значимое влияние на величину значения максимальной концентрации диклофенака.

С целью валидации влияния исследованных лекарственных препаратов на активность цитохрома P450 3A4 были проведены эксперименты в системах электрод/цитохром P450 3A4 [16, 17]. Электрохимические подходы перспективны для исследования фермент-субстратных взаимодействий вследствие высокой чувствительности. Особенностью электрохимических сенсоров на основе цитохромов P450 является использование наноструктурированных электродов для повышения чувствительности анализа.

Для исследования электроаналитических характеристик используют вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтамперометрического анализа (квадратно-волновой и дифференциальной импульсной вольтамперометрии). Субстраты соответствующих форм цитохромов P450 вызывают существенное повышение каталитического тока при контролируемом напряжении, а ингибиторы не изменяют или снижают максимальные амплитуды токов.

Наночастицы золота, стабилизированные синтетическим мембраноподобным веществом бромидом дидодецилдиметиламмония (DDAB), обеспечивают эффективный электронный транспорт между графитовым электродом и гемом цитохромов P450. Мембрана синтетического липида с коллоидным золотом DDAB/Au содержит достаточное количество воды для поддержания структуры гемопротеинов и обеспечивает фиксацию ферментов на графитовом печатном электроде. Ранее было показано [17-20], что DDAB/Au/P450 2B4,

DDAB/Au/P450 1A2, DDAB/Au/P450 51b1 электроды имеют стабильные электрохимические параметры, что позволяет использовать такие химически модифицированные электроды в качестве сенсоров при исследовании субстратов и/или ингибиторов этих форм цитохромов P450. Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450, т.к. метаболизирует 225 субстратов, из которых 191 вещество является лекарствами, а из 97 ингибиторов этой формы - 87 соединений являются лекарствами. Цитохром P450 3A4 участвует в метаболизме 34% применяемых лекарственных препаратов [21-24].

При модификации поверхности печатных графитовых электродов 0,1 М DDAB/Au в хлороформе с последующим включением в мембраноподобную матрицу цитохрома P450 3A4 наблюдается прямой безмедиаторный перенос электронов между электродом и гемом. DDAB/Au/P450 3A4 электроды электроактивны при нанесении пикомолярных количеств фермента на электрод. По данным цикловольтамперометрии, электроактивны 10-15% молекул цитохрома P450 3A4, что составляет 16-20 пмоль/электрод.

Для исследования электроаналитических характеристик использовали вольтамперные отклики электродов, регистрируемые с помощью цикловольтамперометрии и вольтаметрического анализа (квадратно-волновой КВВА и дифференциальной импульсной вольтамперометрии ДИВА). На рисунке 3 представлены квадратно-волновые вольтамперограммы DDAB/Au/P450 3A4 электрода до, и после прибавления диклофенака (100 мкМ). Каталитический ток, регистрируемый в присутствии этого лекарственного препарата, свидетельствует о протекании электрокаталитической реакции: диклофенак (ДК) проявляет субстратные свойства по отношению к цитохрому P450 3A4. Максимальные амплитуды токов КВВА, скорректированные по базовой линии, для ферментативных электродов без субстрата и в присутствии субстрата диклофенака приведены на рисунке 4. Необходимо отметить, что субстратные свойства проявляли как фармакологические препараты диклофенак в таблетках (100 мг/таблетка), так и субстанция диклофенак (рис. 4). Электрохимическая константа Михаэлиса, рассчитанная по данным КВВА, составила 40 ± 10 мкМ.

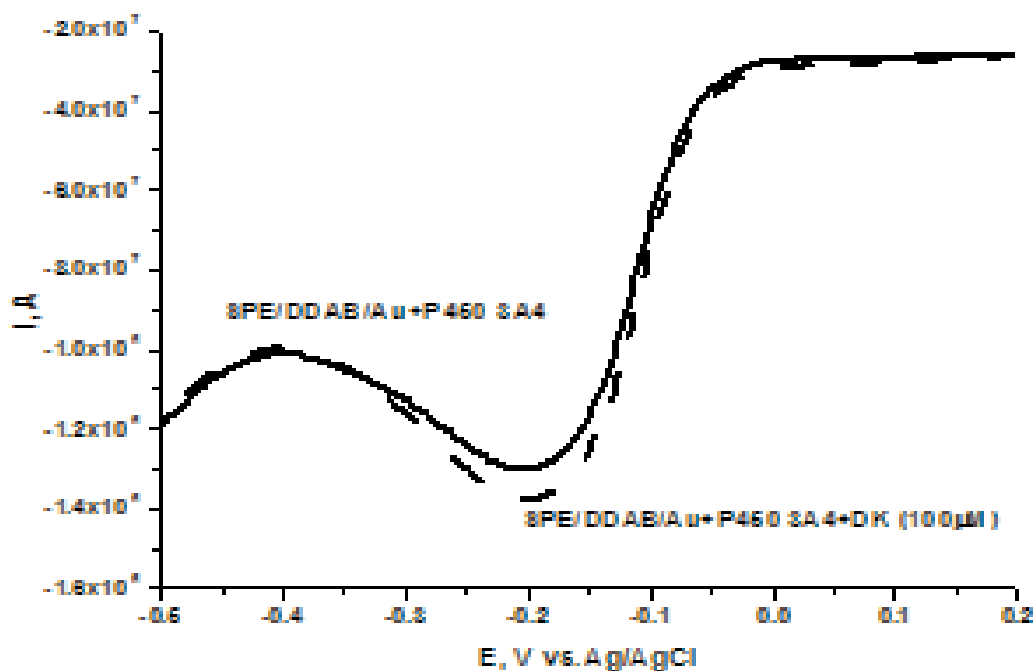


Рисунок 3.

Квадратно-волновые вольтамперограммы электродов:
DDAB/Au/P450 3A4 (—); DDAB/Au/P450 3A4+ДК (---) (100 мкМ).

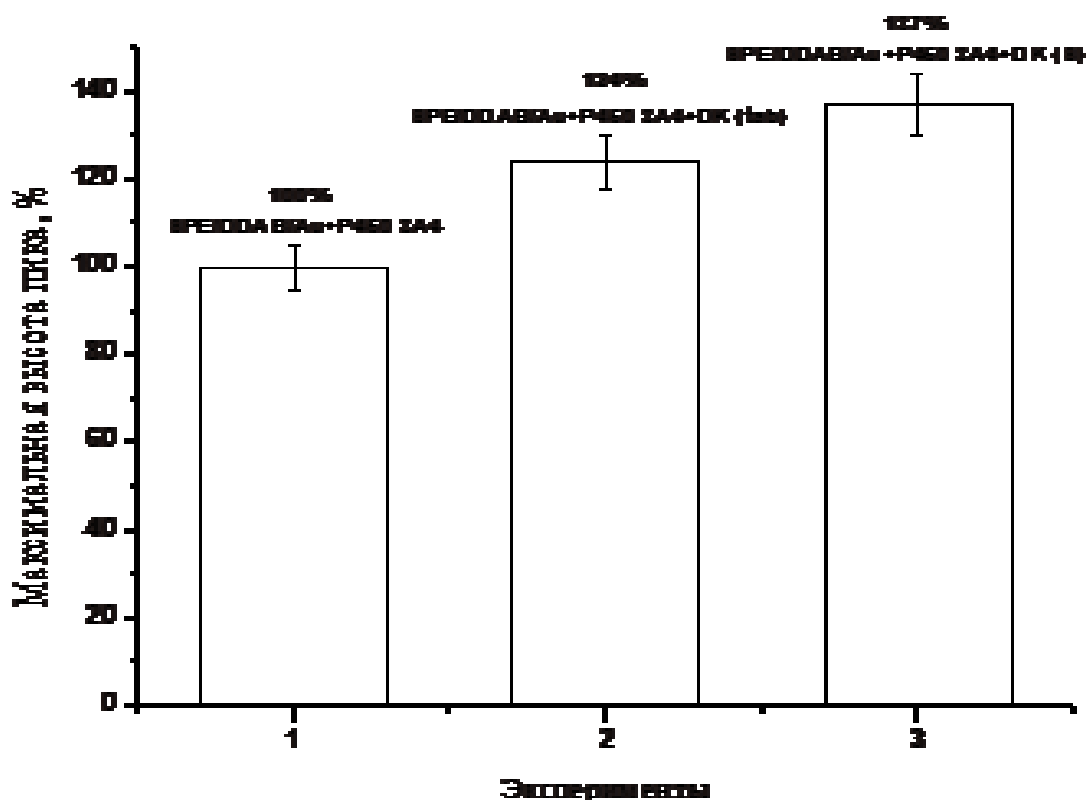


Рисунок 4.

Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1), DDAB/Au/P450 3A4+ ДК, таблетка (2), DDAB/Au/P450 3A4+ ДК (100 мкМ), субстанция (3). Значения амплитуд токов КВВА были скорректированы по базовой линии.

В связи с клинической значимостью использования витаминов группы В при лечении противовоспалительными препаратами (такими как диклофенак), было исследовано влияние тиамин (водорастворимого витамина В₁) на активность цитохрома P450 3A4. Тиамин (ТМ) не является субстратом этой формы цитохрома P450 и блокирует каталитические свойства цитохрома P450 3A4 по отношению к диклофенаку (рис. 5 и 6, опыты 2-3). Так как молекула тиамин содержит азот с неподеленной парой электронов в составе пиримидинового гетероцикла и серу в составе тиазола, можно предположить, что тиамин взаимодействует с железом гема, ингибируя связывание кислорода (аналогично известным азольным ингибиторам цитохромов P450: кетоконазолу, итраконазолу [23]). Кислород является косубстратом цитохрома P450, участвуя в реакции монооксигенирования, поэтому отсутствие кислорода ингибирует каталитический цикл, где кислород связывается с восстановленным железом гема.

Тиамин можно отнести к неконкурентным по отношению к органическому субстрату обратимым ингибиторам с константой ингибирования $K_i = 0,45$ мМ. Таким образом, ингибируя каталитическую активность цитохрома P450 3A4 по отношению к диклофенаку, тиамин замедляет метаболизм этого лекарственного препарата.

Было проведено сравнительное исследование влияния витаминов группы В (В₁, В₂ и В₆) в концентрации 300 мкМ на электрохимическую реакцию диклофенака с цитохромом P450 3A4 (рис. 6).

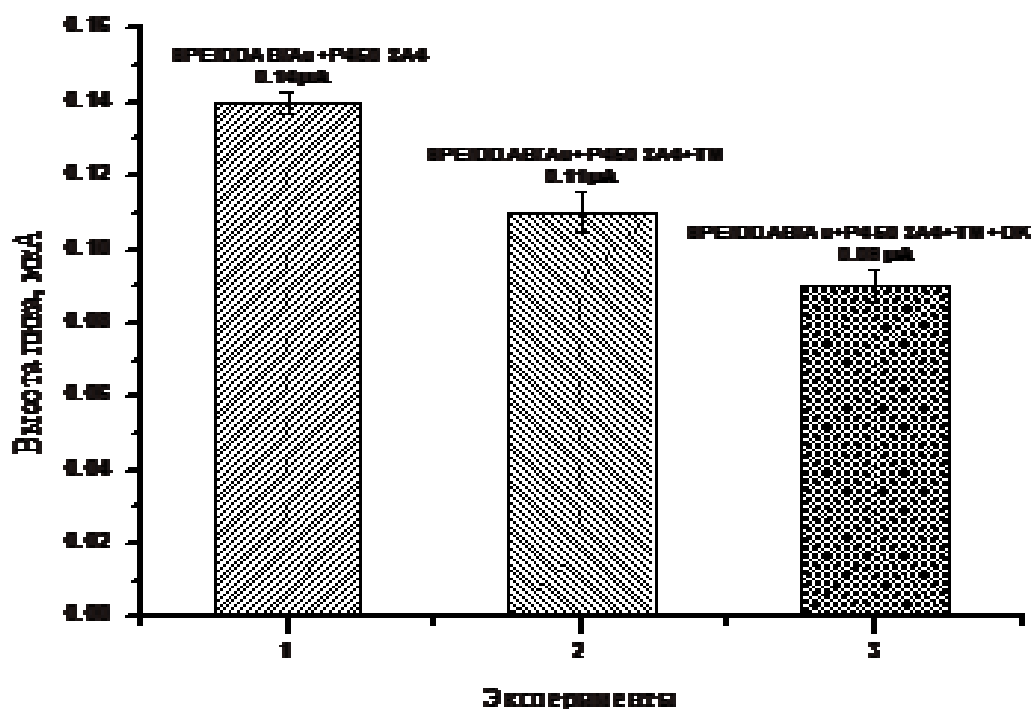


Рисунок 5.

Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1); DDAB/Au/P450 3A4+TM (1,5 mM) (2), DDAB/Au/P450 3A4+TM (1,5 mM), затем ДК (3). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии.

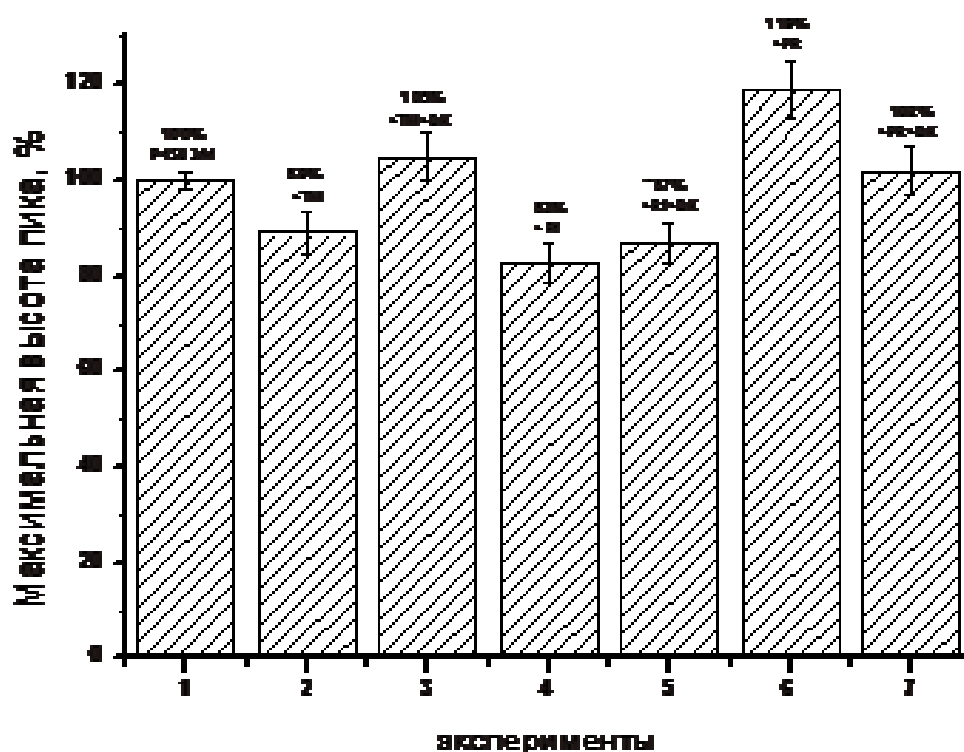


Рисунок 6.

Интенсивность пиков квадратно-волновых вольтамперограмм в аэробных условиях электродов: DDAB/Au/P450 3A4 (1); DDAB/Au/P450 3A4+TM (0,3 mM) (2), DDAB/Au/P450 3A4+TM (0,3 mM), затем ДК (3). DDAB/Au/P450 3A4+Rf (0,3 mM) (4), DDAB/Au/P450 3A4+Rf (0,3 mM)+затем ДК (5), DDAB/Au/P450 3A4+PR (0,3 mM) (6), DDAB/Au/P450 3A4+PR (0,3 mM)+затем ДК (7). Значения амплитуд токов KBBA были скорректированы по базовой линии.

Было исследовано влияние рибофлавина (витамина В₂) в реакции гидроксилирования диклофенака цитохромом P450 3A4. В концентрации 300 мкМ рибофлавин (Rf), по данным КВВА, ингибирует каталитическую активность цитохрома P450 3A4 по отношению к диклофенаку. Необходимо отметить, что рибофлавин был исследован ранее как ковалентный и диффузионный медиатор электронного транспорта в электрохимических системах цитохрома P450 2B4 [25-27]. Флавиновые нуклеотиды входят в состав NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы, белка редокс-партнера цитохрома P450. Если соотношение цитохром P450 2B4: рибофлавин превышает 1:50, то происходит ингибирование монооксигеназной активности цитохрома P450 2B4 по отношению к субстратам этой формы гемопротейна аминопирину, диметиланилину и анилину [24]. Возможно, в достаточно больших концентрациях (0,3 - 1,5 мМ) рибофлавин является неспецифическим ингибитором цитохрома P450, связываясь с белковой глобулой гемопротейна (рис. 6, опыты 4-5).

В опытах с диклофенаком в качестве субстрата и пиридоксином (витамин В₆) методом электрохимического анализа (КВВА) регистрируется увеличение каталитического тока в присутствии пиридоксина (PR), но отсутствие каталитической реакции с диклофенаком (рис. 6, опыты 6-7). Таким образом, по результатам электрохимического анализа можно сделать вывод о влиянии витаминов группы В на метаболизм нестероидного противовоспалительного препарата диклофенака, катализируемый цитохромом P450 3A4. При сравнении витаминов группы В (В₁, В₂, В₆) в одинаковой концентрации (300 мкМ) по данным КВВА, рибофлавин наиболее эффективно подавляет взаимодействие диклофенака с цитохромом P450 3A4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. При изучении фармакокинетических параметров диклофенака как у здоровых добровольцев, так и у пациентов с дорсопатиями при однократном разовом приеме и курсовом применении, установлено статистически значимое влияние комплекса витаминов группы В в нагрузочных дозах на величину значения максимальной концентрации и время поддержания в плазме крови субмаксимальных значений. Роль цитохрома P450 3A4 в метаболизме диклофенака подтверждена нами в электрохимических экспериментах с изучением электрокаталитической активности CYP3A4 по отношению к диклофенаку и витаминам группы В. **В эксперименте подтверждена возможность изменения активности P450 3A4 при взаимодействии с витаминами группы В.** Полученные данные подтверждают возможность регуляции фармакокинетических параметров и выраженности фармакодинамического эффекта с помощью влияния витаминов на активность метаболизирующих ферментов системы цитохрома CYP3A4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального Агентства по науке и инновациям Министерства образования и науки РФ (государственный контракт № 02.740.11.0306), Совета по грантам Президента РФ (НШ-439.2008.4) и Межведомственной Программы "Протеомика в медицине и биотехнологии".

ЛИТЕРАТУРА

1. Зырянов С.К., Нельга О.Н. (2006) Consilium-medicum, **8**(7), 69-74.
2. Большев В.Н. (1980) Фармакология и токсикология, **3**, 375-380.
3. Бушма М.И., Легонькова Л.Ф., Лукиенко П.И. (1987) Вопр. мед. химии, **33**, 93-95.
4. Головенко Н.Я. (1988) Экспериментальная и клиническая фармакокинетика, **8**, 86-92.
5. Богуш Т.А., Сыркин А.Б., Бухны А.Ф. (1981) Вестн. АМН СССР, **7**, 34-41.
6. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. (1981) Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Наука, 240.

7. *Small R.E.* (1989) Clin. Pharm., **8**, 545-558.
8. *Unsworth J., Shurman S., Lunec J., Blake D.R.* (1987) Ann. Rheum. Diseases, **6**, 233-236.
9. *Griswold D.E., Adams J.L.* (1996) Med. Res. Rev., **16**, 181-206.
10. *DeWitt D.L.* (1999) Mol. Pharmacol., **55**, 625-631.
11. *Leemann T., Transon C., Dayer P.* (1993) Life Sci., **52**, 29-34.
12. *Shen S., Marchick M.R., Davis M.R., Doss G.A., Pohl L.R.* (1999) Chem. Res. Toxicol., **12**, 214-222.
13. *Tang W.*, (2003) Current Drug Metabolism, **4**, 319-329.
14. *Wade A.E., Wu B., Lee J.* (1975) Biochem. Pharmacol., **24**(7), 785-789.
15. *Сушко Л.И., Лукиенко П.И.* (1981) Фармакология и токсикология, №1, 102-104.
16. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Rudakov Yu.O., Kuznetsova G.P., Samenkova N.F., Lisitsa A.V., Karuzina I.I., Archakov A.I.* (2007) J. Inorg. Biochem., **101**, 859-865.
17. *Шумянцева В.В., Сунрун Е.В., Булко Т.В., Добрынина О.В., Арчаков А.И.* (2010) Биомед. химия, **56**, 55-71.
18. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Арчаков А.И.* (2009) Биохимия, **74**, 542-549.
19. *Шумянцева В.В., Булко Т.В., Кузнецова Г.П., Саменкова Н.Ф., Лисица А.В., Пономаренко Е.А., Карузина И.И., Арчаков А.И.* (2007) Биохимия, **72**, 805-811.
20. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Archakov A.I.* (2005) J. Inorg. Biochem., **99**, 1051-1063.
21. *Archakov A.I., Bachmanova G.I.* (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen, Taylor and Francis, London.
22. *Ortiz de Montellano R.* (1995) Cytochrome P450, Plenum press, New York, Second addition.
23. *Lewis D.F.V.* (2001) Guide to Cytochrome P450. Structure and function, London and New York.
24. <http://cpd.ibmh.msk.su> (База данных по цитохрому P450).
25. *Shumyantseva V.V., Uvarov V.Yu., Byakova O.E., Archakov A.I.* (1998) Arch. Biochem. Biophys., **354**, 133-138.
26. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Alexandrova S.A., Sokolov N.N., Schmid R.D., Bachmann T., Archakov A.I.* (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun, **263**, 678-680.
27. *Shumyantseva V.V., Bulko T.V., Bachmann T., Bilitewski U., Schmid R.D., Archakov A.I.* (2000) Arch. Biochem. Biophys., **377**, 43-48.

Поступила: 17. 05. 2010.

THE INFLUENCE OF VITAMIN B GROUP ON MONOOXYGENASE ACTIVITY
OF CYTOCHROME P450 3A4: PHARMACOKINETICS AND ELECTRO ANALYSIS
OF CATALYTIC PROPERTIES

*V.V. Shumyantseva¹, E.V. Shich², A.A. Machova², T.V. Bulko¹, V.G. Kukes², O.S. Sizova²,
G.V. Ramenskaya², S.A. Usanov³, A.I. Archakov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10,
Moscow, 119121 Russia; tel.: +7 499-246 58 20; fax: +7 499-245 08 57;

e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Moscow Medical Academy, Moscow, Russia

³Institute of Bioorganic Chemistry NAS, Minsk, Belarus

It was shown that vitamin B group permit to shorten the longitude of diclofenak therapy and to reduce the daytime dose of this drug. All three schemes of diclofenac treatment - only diclofenac, diclofenac plus 2 tablets of Gitagamp (mixture of vitamin B group), and diclofenac plus 4 tablets of Gitagamp – gave maximum value of diclofenal in blood through 1 hour after treatment. In the case of diclofenak treatment without vitamins C_{max} corresponds to 1137.2 ± 82.4 ng/ml, with 2 tablets of Gitagamp – C_{max} 1326.7 ± 122.5 ng/ml, and with 4 tablets – C_{max} 2200.4 ± 111.3 ng/ml. Positive influence of vitamin B group on the decrease of pain syndrome was shown. Pharmacodynamics and pharmacokinetics data were confirmed in electrochemical experiments with cytochrome P450 3A4. For enzyme immobilization screen printed graphite electrodes modified with gold nanoparticles and synthetic membrane-like compound didodecyldimethylammonium bromide (DDAB/Au) were used. Electrochemical analysis reviled the influence of vitamin B group on metabolism of non steroid anti inflammation drug diclofenac catalyzed by cytochrome P450 3A4. Riboflavin was the most effective inhibitor of diclofenac hydroxylation by cytochrome P450 3A4 as was compared at 300 M concentration of vitamin B group (B_1 , B_2 , B_6). These data confirmed the opportunity of pharmacokinetic parameters regulation and the level of pharmacodynamic effects by the influence of vitamin B group on the catalytic activity of cytochrome P450 3A4.

Key words: cytochrome P450 3A4, pharmacokinetics, diclofenac, vitamin B group, electrochemistry, enzyme electrodes.