

©Коллектив авторов

МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕЖЛЕКАРСТВЕННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ОМЕПРАЗОЛА И ЭРИТРОМИЦИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИТОХРОМ P450-ЗАВИСИМОЙ СИСТЕМЫ *IN VITRO*

П.И. Королева¹, А.В. Кузиков^{1,2}, Р.А. Масамрех^{1,2}, Д.А. Филимонов¹, А.В. Дмитриев¹, М.Г. Завьялова¹,
С.М. Рыкова³, Е.В. Ших³, А.А. Махова³, Т.В. Булко¹, А.А. Гилеп⁴, В.В. Шумянцева^{1,2*}

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

³Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова
(Сеченовский Университет), Москва

⁴Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

На основе рекомбинантного цитохрома P450 3A4 разработана система электроанализа для исследования межлекарственных взаимодействий препаратов, применяемых в комплексной терапии при лечении заболеваний ЖКТ, обусловленных инфицированием *Helicobacter pylori*. Показано межлекарственное взаимодействие ингибитора протонного насоса омепразола и макролидного бактериостатического антибиотика эритромицина на уровне цитохрома P450 3A4. Взаимное влияние этих лекарственных средств на цитохром P450 3A4 выражается в снижении скорости реакции N-деметилирования эритромицина (регистрируемой по образованию низкомолекулярного продукта формальдегида) в присутствии омепразола; при этом эритромицин не влиял на метаболические превращения омепразола, регистрируемые методом масс-спектрометрии по образованию продукта — омепразол сульфона. Такие межлекарственные взаимодействия могут быть связаны с более высоким сродством омепразола к цитохрому P450 3A4 (спектральная константа диссоциации $K_d = 18 \pm 2$ мкМ) по сравнению с эритромицином ($K_d = 52$ мкМ). Разработанная модельная система позволяет анализировать межлекарственные взаимодействия на уровне цитохрома P450 3A4. Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, полностью согласуются с результатами *in silico* моделирования, произведённого с использованием программы PASS и дескрипторов PoSMNA, которое также показало возможность межлекарственного взаимодействия омепразола и эритромицина на уровне биотрансформации, осуществляемой цитохромом P450 3A4.

Ключевые слова: цитохром P450 3A4; межлекарственные взаимодействия; электрохимический анализ; омепразол; эритромицин; масс-спектрометрия

DOI: 10.18097/PBMC20206603241

ВВЕДЕНИЕ

При одновременном приёме нескольких лекарственных препаратов в организме человека может возникнуть феномен их межлекарственного взаимодействия (МЛВ), проявляющийся, в частности, во взаимном влиянии лекарств на биотрансформацию (её замедление или ускорение), что приводит к изменению фармакологического действия препарата или препаратов.

Проведение исследований МЛВ с привлечением здоровых добровольцев или пациентов является длительной процедурой, требующей продолжительного наблюдения для достижения терапевтического эффекта, длительного “отмывочного” периода, аналитических методов регистрации метаболитов и/или остаточной концентрации лекарств в крови или моче. Такие эксперименты не всегда безопасны, могут вызвать нежелательные реакции у испытуемых. В связи с этим адекватные модельные системы на основе ферментов, метаболизирующих лекарственные препараты, для проведения исследований потенциальных МЛВ на уровне биотрансформации являются актуальными и востребованными. Разработка алгоритма экспериментальных исследований в модельных

цитохром P450-системах для оценки МЛВ при приёме разных групп медицинских препаратов является важной задачей.

Helicobacter pylori (*H. pylori*) является микроаэрофильной грамотрицательной бактерией, которая колонизирует желудок человека, способствуя развитию гастрита, язвенной болезни и злокачественных заболеваний (рак желудка) [1]. Следовательно, быстрое и эффективное уничтожение *H. pylori* может излечить незлокачественные состояния и предупредить развитие опухолевых заболеваний. Уреаза является наиболее важным ферментом этой бактерии, поскольку она позволяет колонизировать желудок *H. pylori*, разлагая мочевину на диоксид углерода и аммиак, противодействующий кислотной среде ниже слоя нейтральных муцинов, которые покрывают стенку желудка [2]. Таким образом, выживание и рост *H. pylori* строго зависит от влияния уреазы на внутрижелудочный pH в среде обитания. Действительно, было замечено, что только бактерии в репликативной вегетативной фазе восприимчивы к антибиотикам [3-6]. *H. pylori* входит в репликативную фазу при почти нейтральном pH (6-7), а при кислотном (3-6) превращается в кокковидную форму, устойчивую к антибиотикам [3-7]. Исходя из этого, важно повысить

внутрижелудочный pH с помощью ингибиторов протонной помпы (ИПП), когда необходимо применять эрадикационную терапию на основе антибиотиков, поскольку неадекватное подавление кислоты может удерживать некоторые бактерии в нерепликативных формах, невосприимчивых к антибиотикам. С другой стороны, этот механизм объясняет некоторые случаи неэффективности лечения, не связанные с бактериальной генотипической устойчивостью [8]. Ещё одним важным свойством ИПП является способность снижать внутрижелудочную бактериальную нагрузку, что повышает вероятность успеха антибиотиков. Этот важный аспект подтверждается наблюдением, что пациенты с очень высокой бактериальной нагрузкой наиболее устойчивы к стандартной эрадикационной терапии [9, 10].

Таким образом, при проведении антихеликобактерной терапии широко используется совместное назначение терапевтических препаратов — ИПП и антибиотиков класса макролидов, в частности, в составе терапии такими парами лекарственных веществ, как кларитромицин и омепразол [11], а также в составе терапии с использованием трёх лекарственных веществ [12]. Несмотря на доказанную эффективность, такая комбинация лекарственных средств может приводить к различного рода МЛВ. Ранее было показано, что при проведении фармакокинетических исследований с привлечением добровольцев, влияние макролидного антибиотика кларитромицина на метаболизм омепразола существенно [13]. При одновременном приёме омепразола и кларитромицина образование 5-гидроксиомепразола — метаболита омепразола — в плазме крови снижается на 60%. Такие исследования были проведены в течение двух периодов по 7 дней с 14-дневным отмывочным периодом, что не позволяет анализировать МЛВ в более динамичном режиме. Кроме того, в исследовании были задействованы 8 добровольцев, что также не позволяет сделать более обобщённые выводы о МЛВ при проведении антихеликобактерной терапии. Изучение фармакокинетических взаимодействий на добровольцах не позволяет учесть вклад отдельных изоформ цитохромов P450 в МЛВ. Так, омепразол метаболизируется цитохромом P450 3A4 (CYP3A4) и цитохромом P450 2C19 [13]. В связи с этим необходимы тест-системы для исследования терапевтически значимых комбинаций лекарственных препаратов на уровне их метаболизма.

В связи с большим практическим интересом к комбинированной терапии инфекций, связанных с *H. pylori*, в данной работе были разработаны модельные системы на основе электрохимических цитохром P450 3A4-содержащих систем для анализа таких лекарственных комбинаций.

Цитохром P450 3A4 является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450; он метаболизирует большое количество субстратов и участвует в метаболизме 50% применяемых лекарственных препаратов [14, 15]. Для исследования

каталитической активности цитохромов P450 могут быть применены различные системы и подходы [16]. Использование электрода как источника электронов для восстановления иона железа гема цитохрома P450 позволяет инициировать катализ и избежать использования белков редокс-партнеров. Электрохимические методы являются современными и высокочувствительными при поиске новых субстратов и ингибиторов цитохромов P450, а также при исследовании влияния метаболических лекарственных препаратов с антиоксидантными свойствами и анализе межлекарственных взаимодействий [17-22].

В нашем исследовании предложена неинвазивная модель на основе цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на электроде как источнике электронов, для исследования межлекарственных взаимодействий при проведении комплексной антихеликобактерной терапии. С помощью данной модели проведён анализ возможного межлекарственного взаимодействия ИПП — омепразола — с антибиотиком класса макролидов — эритромицином — на уровне цитохрома P450 3A4.

МЕТОДИКА

Реагенты и материалы

В работе использовали трёхконтактные электроды, полученные методом трафаретной печати с графитовыми рабочим и вспомогательным электродами и хлорсеребряным электродом сравнения (“КолорЭлектроникс”, Россия). Диаметр рабочего электрода 0,2 см (площадь 0,0314 см²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (Ag/AgCl).

Рекомбинантный цитохром P450 3A4 человека (182 мкМ) в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объёму), получен и выделен по методике, представленной в работе [23]. Концентрацию фермента определяли спектрофотометрически по образованию комплекса восстановленной формы с монооксидом углерода; коэффициент поглощения $\epsilon_{450-490} = 91 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [24].

В работе были использованы следующие реактивы: ацетат аммония (“Sigma-Aldrich”, США), ацетилацетон (“Sigma-Aldrich”), гидроксид калия (“Спектр-Хим”, Россия) дигидрофосфат калия (“Спектр-Хим”), дидодецилдиметиламмония бромид (“Sigma-Aldrich”), кетоконазол (“Sigma-Aldrich”), уксусная кислота (“Fisher Scientific”, США), хлорид натрия (“Спектр-Хим”), хлористый метилен (“ЭКОС-1”, Россия), хлороформ (“Sigma-Aldrich”), эритромицин (“Sigma-Aldrich”), омепразол (“AstraZeneca”, Великобритания).

Оборудование

Электрохимические исследования проводили с помощью потенциостата Autolab302N (“Metrohm Autolab”, Нидерланды), снабжённого программным обеспечением NOVA (версия 2.0).

Спектральные исследования проводили с помощью спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis ("Agilent", Нидерланды) и программного обеспечения Cary Win UV.

Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью масс-спектрометра ионно-циклотронного резонанса с преобразованием Фурье FTICR MS ApexUltra ("Bruker", Германия) с ионизацией электроспреем (ESI).

Приготовление ферментных электродов

На поверхность рабочего графитового электрода наносили 1 мкл 0,1 М раствора дидодецилдиметиламмония бромида (ДДАБ) в хлороформе. После испарения хлороформа (10 мин) наносили 1 мкл 182 мкМ цитохрома P450 3A4 в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объёму). Электроды выдерживали при температуре 4°C 12 ч во влажной камере.

Перед началом всех электрохимических измерений электроды инкубировали в электролитном буфере (0,1 М калий-фосфатный буфер, pH 7,4, содержащий 0,05 М NaCl) в течение 5 мин при комнатной температуре. Параметры регистрации циклических вольтамперограмм (ЦВА): диапазон потенциалов от 0 до -0,8 В (отн. Ag/AgCl), скорости развертки потенциала от 10 до 100 мВ/с.

Для анализа взаимного влияния омепазола на N-деметилазную активность цитохрома P450 3A4 по отношению к эритромицину и эритромицина на P450 3A4-зависимое окисление омепазола электрокаталитические реакции проводили в электролитном буфере с помощью ферментного электрода в присутствии 100 мкМ эритромицина и 50 мкМ омепазола при контролируемом потенциале рабочего электрода -0,5 В (отн. Ag/AgCl) в течении 30 мин. Анализ скорости реакции N-деметилирования эритромицина проводили путём регистрации образования формальдегида в соответствии с методикой [25, 26]. Для экстракции продуктов цитохром P450 3A4-зависимого окисления омепазола инкубационную смесь после проведения электрокаталитической реакции смешивали с двойным объёмом хлористого метилена, перемешивали и центрифугировали при 12100 g в течение 5 мин. После центрифугирования органическую фазу отбирали и упаривали при 40°C под потоком аргона. Упаренные образцы растворяли в 500 мкл смеси вода-ацетонитрил (1:1) с 0,1% муравьиной кислотой непосредственно перед масс-спектрометрическим анализом. Растворённый образец вводили в электроспрейный источник ионизации (ESI) со скоростью 1,5 мкл/мин и потоком распыляющего газа 1,5 л/мин. Температура входного капилляра масс-спектрометра — 200°C, скорость осушающего газа — 3 л/мин. Потенциал ионизации составлял 3,6 кВ. Масс-спектры измеряли в режиме положительных ионов в диапазоне 150-600 m/z с усреднением по 200 сканам. После каждого измерения капилляр электроспрея промывали смесью вода-ацетонитрил (1:4) по 30 мин для исключения

переноса анализируемых веществ. Масс-спектры были визуализированы с помощью приложения DataAnalysis 3.4 ("Bruker Daltonics", Германия).

Для определения электрокаталитической активности цитохрома P450 3A4 по отношению к омепазолу в отсутствии и в присутствии 100 мкМ эритромицина ферментный электрод помещали в электрохимическую ячейку с 1 мл электролитного буфера, pH 7,4. Электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4 проводили при постоянном перемешивании до выхода тока на стационарное значение при фиксированном потенциале рабочего электрода -0,5 В (отн. Ag/AgCl), после чего добавляли аликвоты 50 мМ омепазола в этаноле.

Математическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью программы OriginPro 8.1.

Спектральный анализ

Спектральные исследования были выполнены с использованием двулучевого спектрофотометра Cary 100 Scan UV-Vis ("Agilent") с программным обеспечением Cary Win. Раствор 182 мкМ цитохрома P450 3A4 в 550 мМ калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,2% CHAPS, 1 мМ дитиотреитол и 20% глицерин (по объёму), был разведён 50 мМ калий-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 20% глицерин (по объёму), до концентрации гемопротейна, равной 5 мкМ. Полученный раствор фермента был внесён в 50 мкл кварцевые кюветы (опытная и контрольная), и базовая линия была зарегистрирована в диапазоне длин волн 350-500 нм. Затем аликвоты омепазола (0,1 мкл 6,25 мМ омепазол в этаноле) были внесены в экспериментальную кювету, а соответствующие объёмы растворителя (этанола) были внесены в контрольную кювету с последующей регистрацией дифференциального спектра через 5 мин. Конечная концентрация этанола в экспериментальной и контрольной кюветках не превышала 3% (по объёму). Параметры связывания омепазола с цитохромом P450 3A4 были определены путём нелинейной регрессии гиперболической зависимости разности поглощения гемопротейна между максимумом и минимумом от концентрации омепазола с помощью программного обеспечения OriginPro 8.1.

In silico модель для предсказания МЛВ

Создание *in silico* модели для предсказания МЛВ с учётом метаболизма лекарств различными изоформами цитохрома P450 было продолжением наших работ по прогнозу тяжести проявления МЛВ в организме человека, реализованного с использованием программы PASS и PoSMNA дескрипторов [27, 28]. Алгоритм программы PASS основан на наивном байесовском подходе, результат прогноза представлен в виде оценок вероятностей принадлежности к определённому классу (вероятности проявления активности) P_a и вероятности принадлежности к какому-то иному классу (вероятности отсутствия данной активности) P_i . Наиболее вероятными считаются активности, предсказанные

с максимальным значением $\Delta P = P_a - P_i$. Оценка точности прогноза выполняется методом скользящего контроля с использованием в качестве критерия инвариантной точности прогноза IAP (Invariant Accuracy of Prediction), эквивалентного AUC ROC (Area Under Curve of the Receiver Operating Characteristic). Для описания структур пар молекул нами предложены дескрипторы PoSMNA (Pairs of Substances Multilevel Neighbourhoods of Atoms). Для получения из дескрипторов MNA дескрипторов PoSMNA используется бесповторное множество всех возможных пар дескрипторов MNA каждой из молекул.

Для создания обучающей выборки модели мы использовали данные о парных МЛВ на уровне биотрансформации, осуществляемой цитохромами P450 1A2 (70 пар лекарств), 2C9 (126 пар лекарств), 2D6 (329 пар лекарств) и цитохрома P450 3A4 (2117 пар лекарств). Данные для обучения были извлечены из справочника по МЛВ [29]. Средняя точность прогноза данной модели МЛВ для четырёх цитохромов P450, рассчитанная в ходе процедуры скользящего контроля с исключением по одному, составила 0,98. Модель свободно доступна через Интернет и размещена на веб-сервисе <http://way2drug.com/ddi/>, позволяющем предсказывать различные параметры МЛВ. Прогноз потенциальных МЛВ для омепразола и эритромицина был осуществлён с использованием данного веб-сервиса (см. рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе *in silico* моделирования, представлены в таблице и соответствуют значениям прогноза, отображаемым в блоке “Prediction of DDI mediated by P450 (PASS double mol)”, на веб-сервисе <http://way2drug.com/ddi/> (см. рис. 1).

Как видно из таблицы, максимальное значение ΔP рассчитано для цитохрома P450 3A4, из чего следует, что наиболее вероятно межлекарственное взаимодействие омепразола и эритромицина на уровне биотрансформации, осуществляемой цитохромом P450 3A4. Отрицательные значения ΔP для остальных трёх изоформ цитохрома P450 свидетельствуют о том, что данные ферменты, очевидно, не участвуют в МЛВ на уровне биотрансформации.

Для подтверждения данных прогноза МЛВ, полученных *in silico*, мы использовали разработанную нами электрохимическую систему на основе иммобилизованного на электроде цитохрома P450 3A4 [30].

Таблица. Прогноз МЛВ омепразола и эритромицина с учётом метаболизма различными цитохромами P450

Цитохром P450	P_a	P_i	ΔP
3A4	0,238	0,058	0,180
2C9	0,003	0,882	-0,879
2D6	0,000	0,923	-0,923
1A2	0,004	0,976	-0,972

Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

DDI-Pred: web-service for drug-drug interaction prediction
Supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20250)

» Home | » Training Sets | » Products/Services | » Interpretation | » Contacts

Input SMILES
Input drug name
Draw Structure
View/Hide result

Marvin JS

Add structure

Clear data

#1 Delete Select ☒ #2 Delete Select ☒

Get DDI data

You have selected compounds: 1;2

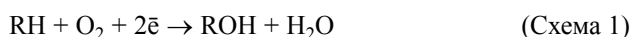
Prediction of DDI mediated by P450 (PASS double mol)

0.238 0.058 Interaction CYP3A4
0.003 0.882 Interaction CYP2C9
0.000 0.923 Interaction CYP2D6
0.004 0.976 Interaction CYP1A2

Рисунок 1. Прогноз МЛВ для омепразола и эритромицина с использованием веб сервиса <http://way2drug.com/ddi/>. Показан прогноз МЛВ для омепразола и эритромицина.

Электрохимические характеристики цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на графитовом электроде, модифицированном синтетическим липидоподобным соединением дидецилдиметиламмония бромидом (ДДАБ), были подробно исследованы как в анаэробных, так и аэробных условиях ранее [19-21]. Анализ электрокаталитической активности цитохрома P450 3A4 в присутствии омепразола продемонстрировал концентрационно-зависимое увеличение восстановительного тока цитохрома P450 3A4 (каталитический ток), что характерно для типичных субстратов этого класса гемопротеинов (рис. 2).

Механизм появления каталитического тока может быть объяснён исходя из общей схемы каталитического цикла цитохрома P450 при окислении субстратов [14-19]:



В результате цитохром P450-зависимого катализа происходит включение одного атома кислорода в молекулу субстрата (RH) с образованием продукта ROH (схема 1). В электрохимической реакции электроны поступают с электрода. При возрастающей концентрации субстрата поток электронов растёт, что можно зарегистрировать по увеличению восстановительного тока цитохрома P450 (каталитический ток). Эритромицин проявляет субстратные свойства по отношению к цитохрому P450 3A4 и является маркерным субстратом этого фермента. В присутствии 100 мкМ эритромицина восстановительный ток цитохрома P450 3A4 увеличивается до $123 \pm 20\%$ (рис. 3), потенциал начала катализа (E_{onset}) в присутствии ЭР составляет $-0,27$ В, восстановительный потенциал (E_{red}) смещается с $-0,41 \pm 0,01$ В до $-0,391 \pm 0,006$ В. Омепразол при концентрации 100 мкМ увеличивает значение восстановительного тока цитохрома P450 3A4

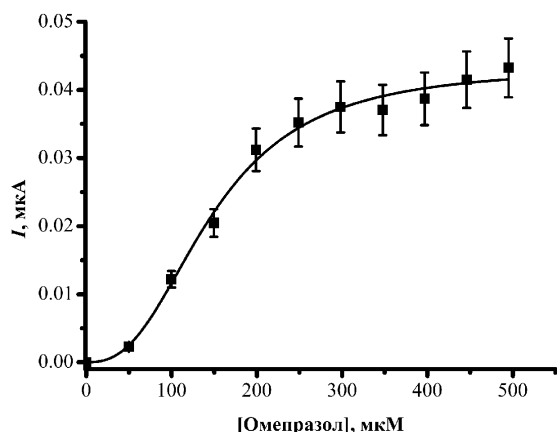


Рисунок 2. Зависимость каталитического тока цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ, от концентрации омепразола, регистрируемая амперометрическим методом. Титрование P450 3A4 проводили 50 мМ раствором омепразола в этаноле. Концентрация этанола в ячейке не превышала 1% по объёму. Измерения проводили в 1 мл калий-фосфатного буфера при фиксированном потенциале рабочего электрода $-0,5$ В (отн. Ag/AgCl).

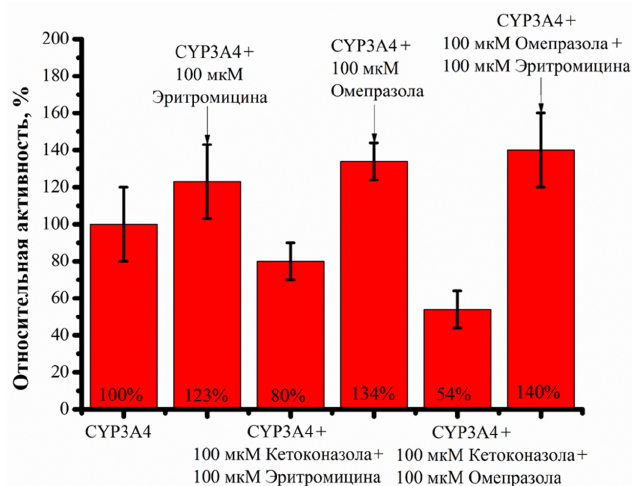


Рисунок 3. Относительная интенсивность восстановительных пиков циклических вольтамперограмм цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ, в аэробных условиях.

до $134 \pm 10\%$ (рис. 3), E_{onset} в присутствии омепразола составляет $-0,20$ В, при этом E_{red} смещается до $-0,315 \pm 0,011$ В. Таким образом, оба препарата проявляют типичные свойства субстратов цитохрома P450 3A4. В присутствии одновременно двух субстратов (100 мкМ омепразола и 100 мкМ эритромицина) восстановительный ток цитохрома P450 возрастает и составляет $140 \pm 20\%$ (рис. 3). Такой синергетический эффект доказывает субстратные свойства омепразола и эритромицина при одновременном взаимодействии лекарственных препаратов с цитохромом P450 3A4. Внесение в систему 100 мкМ эритромицина или 100 мкМ омепразола в присутствии ингибитора цитохрома P450 3A4 — кетоназола — снижает амплитуду восстановительного тока (рис. 3). Широкая субстратная специфичность и большой активный центр цитохрома P450 3A4 обуславливают способность этого гемопротеина связывать одновременно несколько субстратов, что было продемонстрировано ранее [31, 32].

Регистрируемая амперометрическим методом зависимость каталитического тока цитохрома P450 3A4 от концентрации омепразола, представленная на рисунке 2, имеет сигмоидный характер, указывающий на возможность одновременного связывания нескольких молекул омепразола в активном центре фермента. Данная зависимость была проанализирована с помощью модели Хилла для взаимодействия более чем одной молекулы субстрата с ферментом (уравнение 1) [33]:

$$I_{\text{cat}} = \frac{I_{\text{cat max}}[S]^n}{K_{0,5}^n + [S]^n} \quad (1),$$

где I_{cat} — каталитический ток (А), $I_{\text{cat max}}$ — максимальный каталитический ток при насыщающей концентрации субстрата (А), $[S]$ — концентрация субстрата (М), $K_{0,5}$ — концентрация субстрата, при которой значение каталитического тока равно $1/2 I_{\text{cat max}}$ (М), n — коэффициент Хилла.

Значения $I_{\text{cat max}}$ и $K_{0,5}$ составили $0,043 \pm 0,002$ мкА и 148 ± 7 мкМ соответственно, а коэффициент Хилла n — $2,6 \pm 0,3$, что свидетельствует о кооперативном эффекте взаимодействия лиганда с цитохромом P450 3A4 [31, 32, 34, 35]. В присутствии 100 мкМ эритромицина зависимость каталитического тока цитохрома P450 3A4 от концентрации омепразола также сохраняет сигмоидный характер (рис. 4); при этом рассчитанные значения $I_{\text{cat max}}$ и $K_{0,5}$ составили $0,22 \pm 0,12$ мкА и 369 ± 20 мкМ соответственно, а коэффициент Хилла n — $1,2 \pm 0,4$. Увеличение значения $I_{\text{cat max}}$ может быть объяснено одновременным присутствием двух субстратов цитохрома P450 и синергическим влиянием на каталитический ток. Увеличение значения $K_{0,5}$ указывает на конкуренцию двух субстратов за взаимодействие с активным центром фермента. Снижение величины коэффициента Хилла свидетельствует об уменьшении кооперативного эффекта взаимодействия омепразола с ферментом в присутствии эритромицина, поскольку связывание последнего может препятствовать связыванию дополнительных молекул омепразола с активным центром цитохрома P450 3A4.

В присутствии 100 мкМ кетоконазола — ингибитора смешанного типа для цитохрома P450 3A4 [36, 37] — регистрируется снижение как амплитуды восстановительного тока эритромицина (рис. 3), так и уменьшение каталитической константы k_{cat} , рассчитанных по накоплению формальдегида как продукта цитохром P450 3A4-зависимой реакции N-деметилирования эритромицина [25]. Кетоконазол снижает каталитический ток, регистрируемый в присутствии эритромицина (рис. 3), а каталитическая константа k_{cat} реакции N-деметилирования уменьшается с $13,8 \text{ мин}^{-1}$ до $2,2 \text{ мин}^{-1}$. В присутствии кетоконазола также регистрировали снижение амплитуды восстановительного тока омепразола, что характерно для разработанного алгоритма электрохимического анализа межлекарственных взаимодействий

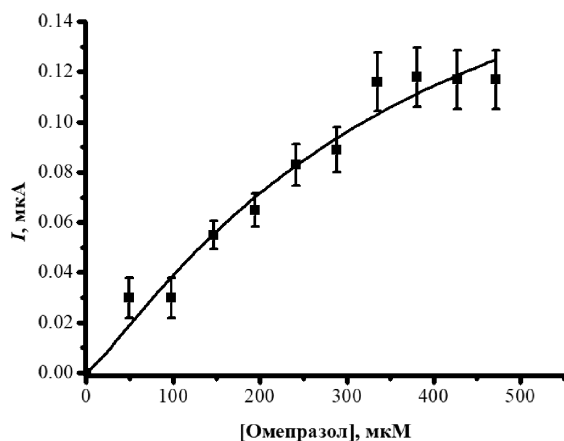


Рисунок 4. Зависимость каталитического тока цитохрома P450 3A4, иммобилизованного на печатном графитовом электроде, модифицированном ДДАБ, от концентрации омепразола в присутствии эритромицина. Титрование P450 3A4 проводили 50 мМ раствором омепразола в этаноле в присутствии 100 мкМ эритромицина. Измерения проводили в 1 мл калий-фосфатного буфера при фиксированном потенциале рабочего электрода $-0,5 \text{ В}$ (отн. Ag/AgCl).

типа субстрат + ингибитор [17-19, 21, 32]. В присутствии омепразола каталитическая константа реакции N-деметилирования эритромицина также снижается и составляет $4,7 \text{ мин}^{-1}$. Такое поведение двух лекарственных препаратов — субстратов цитохрома P450 3A4 — подтверждает взаимную конкуренцию этих субстратов при одновременном связывании в объёмном активном центре фермента [31, 32].

При анализе продуктов метаболизма омепразола под воздействием различных изоформ цитохрома P450 было показано, что основным метаболитом цитохром P450 3A4-зависимой реакции является омепразол сульфен (рис. 5) [38, 39].

Анализ продуктов каталитических превращений 50 мкМ омепразола в отсутствие и в присутствии 100 мкМ эритромицина в системе с иммобилизованным на электроде цитохромом P450 3A4 при фиксированном потенциале рабочего электрода $-0,5 \text{ В}$ был проведён с помощью масс-спектрометрии. Как в отсутствие, так и в присутствии эритромицина масс-спектрометрический анализ выявил наличие пика с величиной m/z 346,4245, соответствующей расчётному значению m/z для омепразола, и пик со значением m/z 362,1162, соответствующий расчётному значению m/z продукта цитохром P450-зависимого окисления омепразола — омепразол сульфена. Отношение интенсивности пика с m/z 362,1162 к интенсивности пика с m/z 346,4245 в отсутствие эритромицина составило 0,062; при этом данное отношение интенсивностей пиков в присутствии 100 мкМ эритромицина составило 0,06. Таким образом, можно заключить, что в данных условиях эритромицин не оказывает влияния на цитохром P450 3A4-зависимую биотрансформацию омепразола.

Для объяснения отсутствия влияния эритромицина на метаболизм омепразола нами было определено значение спектральной константы диссоциации (K_d) комплекса цитохрома P450 3A4 с омепразолом из зависимости спектральных изменений гемопroteина от концентрации лиганда, регистрируемых дифференциальной абсорбционной спектроскопией (рис. 6). Омепразол индуцировал спектральные изменения цитохрома P450 3A4, характеризующиеся появлением максимума поглощения в области 380 нм и минимума — в области 417 нм. Таким образом, омепразол является лигандом I (субстратного) типа по отношению к цитохрому P450 3A4. Из зависимости разности поглощений цитохрома P450 3A4 между максимумом и минимумом от концентрации омепразола значение K_d было определено как 18 ± 2 мкМ. Ранее было показано, что эритромицин проявляет I субстратный тип связывания с цитохромом P450 3A4 с константой диссоциации $K_d = 52 \text{ мкМ}$ [40]. Так как значение K_d комплекса цитохрома P450 3A4 с омепразолом примерно в 3 раза меньше, чем значение K_d комплекса данного фермента с эритромицином, можно говорить о том, что более прочное связывание омепразола с ферментом обуславливает отсутствие существенного влияния эритромицина на метаболизм омепразола.

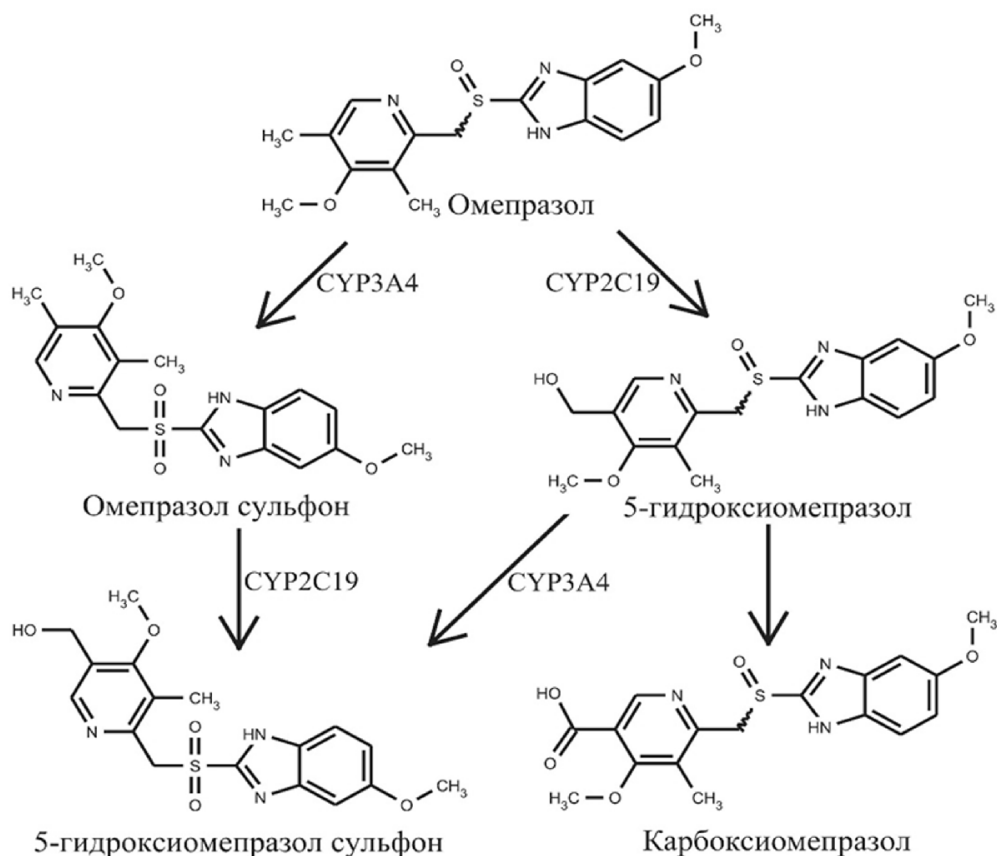


Рисунок 5. Схема метаболитических превращений омепразола. Адаптировано из [38, 39].

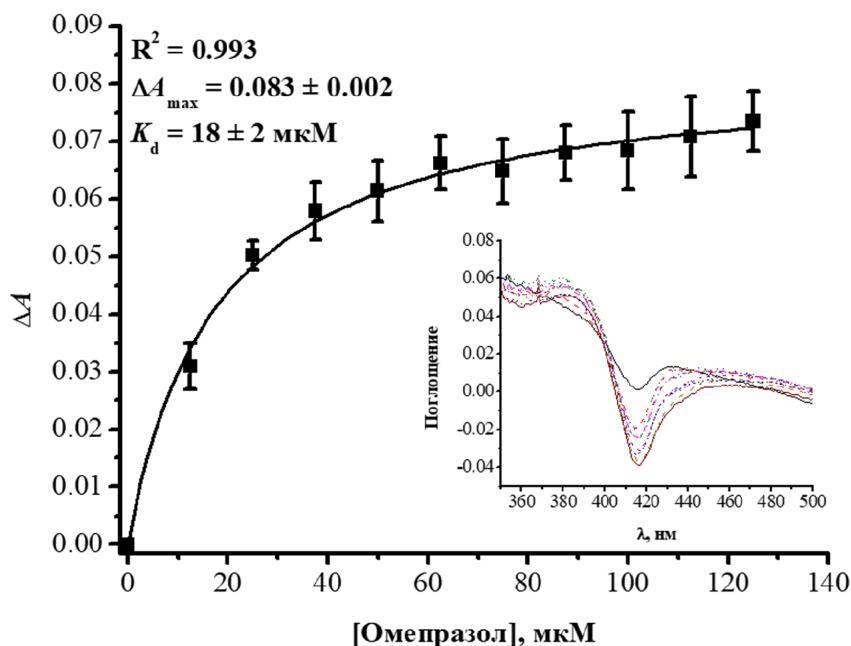


Рисунок 6. Зависимость разности поглощений цитохрома Р450 3А4 между максимумом и минимумом (ΔA) от концентрации омепразола. Вставка: дифференциальные спектры поглощения цитохрома Р450 3А4 при титровании омепразолом.

Суммируя полученные данные, можно заключить, что при совместном приёме омепразола и эритромицина в ходе проведения антихеликобактерной терапии может наблюдаться снижение метаболизма эритромицина без изменения метаболизма

омепразола. Разработанная электрохимическая система на основе цитохрома Р450 3А4 может в дальнейшем применяться при разработке новых подходов комплексной антихеликобактерной терапии с использованием ИПП и антибиотиков.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полипрагматизация (одновременное назначение нескольких лекарственных препаратов) при проведении комплексной терапии связана с большим риском проявления МЛВ и их нежелательных последствий. Разработка экспериментальных моделей для оценки МЛВ при приёме разных групп медицинских препаратов является важной задачей. В настоящем исследовании предложен подход для проведения такого “согласованного” анализа при проведении антихеликобактерной терапии. В экспериментах *in vitro* с использованием электрохимической системы на основе цитохрома P450 3A4 нами показано, что ИПП омепразол и макролидный бактериостатический антибиотик эритромицин метаболизируются цитохромом P450 3A4. Взаимное влияние этих лекарственных средств на цитохром P450 3A4 выражается в снижении скорости реакции N-деметилирования эритромицина в присутствии омепразола без изменения метаболических превращений омепразола в присутствии эритромицина.

Результаты, полученные в экспериментах *in vitro*, полностью согласуются с результатами *in silico* моделирования, также показавшего наиболее вероятное МЛВ омепразола и эритромицина на уровне их биотрансформации, осуществляемой цитохромом P450 3A4.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект №17-75-20250).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ierardi E., Goni E., Losurdo G., Di Mario F. (2014) *Helicobacter*, **19**(Suppl 1), 27-31.
2. Marshall B.J. (1991) *J. Gastroenterol. Hepatol.*, **6**, 121-124.
3. Keren I., Kaldalu N., Spoering A., Wang Y., Lewis K. (2004) *FEMS Microbiol. Lett.*, **230**, 13-18.
4. Graham D.Y., Shiotani A. (2008) *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, **5**, 321-331.
5. Mizoguchi H., Fujioka T., Nasu M. (1999) *J. Gastroenterol.*, **34**(Suppl 11), 32-36.
6. Reshetnyak V.I., Reshetnyak T.M. (2017) *World J. Gastroenterol.*, **23**, 4867-4878.
7. Graham D.Y., Fischbach L. (2010) *Gut*, **59**, 1143-1153.
8. Scott D., Weeks D., Melchers K., Sachs G. (1998) *Gut*, **43**(Suppl 1), S56-S60.
9. de Francesco V., Zullo A., Perna F., Giorgio F., Hassan C., Vannella L., Cristofari F., Panella C., Vaira D., Ierardi E. (2010) *J. Med. Microbiol.*, **59**, 588-591.
10. Macconi G., Parente F., Russo A., Vago L., Imbesi V., Bianchi Porro G. (2001) *Am. J. Gastroenterol.*, **96**, 359-366.
11. Markham A., McTavish D. (1996) *Drugs*, **51**(1), 161-178.
12. Attia T.Z., Yamashita T., Tsujino H., Derayea S.M., Tsutsumi Y., Uno T. (2019) *Chem. Pharmacol. Bull.*, **67**(8), 810-815.
13. Calabresi L., Pazzucconi F., Ferrara S., di Paolo A., del Tacca M., Sirtori C. (2004) *Pharmacol. Res.*, **49**, 493-499.
14. Ortiz de Montellano P.R. (ed.) (2015) *Cytochrome P450 Structure, Mechanism, and Biochemistry*, Springer, New York, 912 p. DOI: 10.1007/978-3-319-12108-6
15. Guengerich F.P. (2015) in: *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Ortiz de Montellano P.R., ed.), Springer, New York, pp. 523-785.
16. Кузиков А.В., Масамрех Р.А., Арчаков А.И., Шумянцева В.В. (2018) *Биомедицинская химия*, **64**(2), 149-168. [Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2018) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **64**(2), 149-168.]
17. Schneider E., Clark D.S. (2013) *Biosens. Bioelectron.*, **39**, 1-13.
18. Krishnan S. (2020) *Curr. Opin. Electrochem.*, **19**, 20-26.
19. Shumyantseva V.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Bulko T.V., Archakov A.I. (2018) *Biosens. Bioelectron.*, **121**, 192-204.
20. Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. (2019) *Talanta*, **196**, 231-236.
21. Кузиков А.В., Булко Т.В., Королева П.И., Масамрех Р.А., Бабкина С.С., Гилеп А.А., Шумянцева В.В. (2020) *Биомедицинская химия*, **66**(1), 64-70. [Kuzikov A.V., Bulko T.V., Koroleva P.I., Masamrekh R.A., Babkina S.S., Gilep A.A., Shumyantseva V.V. (2020) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **66**(1), 64-70.]
22. Lu J., Cui D., Li H., Zhang Y., Liu S. (2015) *Electrochimica Acta*, **165**, 36-44.
23. Pechurskaya T.A., Lukashevich O.P., Gilep A.A., Usanov S.A. (2008) *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 806-811.
24. Omura T., Sato R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2379-2385.
25. Masamrekh R.A., Kuzikov A.V., Haurychenka Y.I., Shcherbakov K.A., Veselovsky A.V., Filimonov D.A., Dmitriev A.V., Zavialova M.G., Gilep A.A., Shkel T.V., Strushkevich N.V., Usanov S.A., Archakov A.I., Shumyantseva V.V. (2020) *Fundamental Clinical Pharmacol.*, **34**, 120-130.
26. Nash T. (1953) *Biochem. J.*, **55**, 416-421.
27. Dmitriev A.V., Filimonov D.A., Rudik A.V., Pogodin P.V., Karasev D.A., Lagunin A.A., Poroikov V.V. (2019) *SAR QSAR Environ. Res.*, **30**, 1-10.
28. Dmitriev A., Filimonov D., Lagunin A., Karasev D., Pogodin P., Rudik A., Poroikov V. (2019) *Molecules*, **24**(21), 3955-3962.
29. Hansten P.D., Horn J.R. (2010) *The Top 100 Drug Interactions 2010: A Guide to Patient Management*. H&H Publications, 195 p.
30. Shumyantseva V.V., Makhova A.A., Shich E.V., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Shkel T., Usanov S.A., Gilep A.A., Archakov A.I. (2019) *BioNanoScience*, **9**, 79-86.
31. Denisov I.G., Frank D.J., Sligar S.G. (2009) *Pharmacology & Therapeutics*, **124**(2), 151-167.
32. Sadeghi S.J., Ferrero S., di Nardo G., Gilardi G. (2012) *Bioelectrochemistry*, **86**, 87-91.
33. Masamrekh R., Kuzikov A., Veselovsky A., Toropygin I., Shkel T., Strushkevich N., Gilep A., Usanov S., Archakov A., Shumyantseva V. (2018) *J. Inorg. Biochem.*, **186**, 24-33.

34. Korzekwa K.R., Krishnamachary N., Shou M., Ogai A., Parise R.A., Rettie A.E., Gonzalez F.J., Tracey T.S. (1998) *Biochemistry*, **37**, 4137-4147.
35. Shou M., Dai R., Korzekwa K.R., Baillie T.A., Rushmore T.H. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 2256-2262.
36. Zhao L., Sun N., Tian L., Zhao S., Sun B., Sun Y., Zhao D. (2019) *Bioorganic Medicinal Chemistry Letts.*, **29**, 2016-2024.
37. Greenblatt D.J., Zhao Y., Venkatakrishnan K., Duan S.X., Harmatz J.S., Parent S.J., Court M.H., von Moltke L.L. (2011) *J. Pharmacy Pharmacol.*, **63**(2), 214-221.
38. Lewis D.F.V., Lake B.G. (1998) *Toxicology*, **125**, 31-44.
39. Lutz J.D., Isoherranen N. (2012) *Drug Metab. Dispos.*, **40**, 159-168.
40. McConn D.J., Lin Y.S., Allen K., Kunze K.L., Thummel K.E. (2004) *Drug Metab. Dispos.*, **32**, 1083-1091.

Поступила в редакцию: 17. 04. 2020.
После доработки: 29. 04. 2020.
Принята к печати: 18. 05. 2020.

MODELING OF DRUG-DRUG INTERACTIONS BETWEEN OMEPRAZOLE AND ERYTHROMYCIN WITH CYTOCHROME P450 3A4 *IN VITRO* ASSAY

P.I. Koroleva¹, A.V. Kuzikov^{1,2}, R.A. Masamrekh^{1,2}, D.A. Filimonov¹, A.V. Dmitriev¹, M.G. Zaviyalova¹, S.M. Rikova³, E.V. Shich³, A.A. Makhova³, T.V. Bulko¹, A.A. Gilep⁴, V.V. Shumyantseva^{1,2,}*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: viktoria.shumyantseva@ibmc.msk.ru

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³Sechenov First Moscow Medical State University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁴Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

In the present study the electrochemical system based on recombinant cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) was used for the investigation of potential drug-drug interaction between medicinal preparations employed for *Helicobacter pylori* eradication therapy. Drug interactions were demonstrated in association of omeprazole as a proton pump inhibitor (PPI) and macrolide antibiotic erythromycin during cytochrome P450 3A4-mediated metabolism. It was shown that in the presence of omeprazole the rate of N-demethylase activity of CYP3A4 to erythromycin measured by means of product (formaldehyde) formation decreased. Mass-spectrometry analysis of omeprazole sulfone as a CYP3A4-mediated metabolite demonstrated the absence of erythromycin influence on CYP3A4-dependent omeprazole metabolism. This phenomenon may be explained by lower spectral dissociation constant of CYP3A4-omeprazole complex ($K_d = 18 \pm 2 \mu\text{M}$) than that of CYP3A4-erythromycin complex ($K_d = 52 \mu\text{M}$). Using the electrochemical model of electrochemically-driven drug metabolism it is possible to register CYP3A4-mediated catalytic conversion of certain drugs. *In vitro* experiments of potential CYP3A4-mediated drug-drug interactions are in accordance with *in silico* modeling with program PASS and PoSMNA descriptors in the case of omeprazole/erythromycin combinations.

Key words: cytochrome P450 3A4; drug-drug interactions; electrochemical analysis; omeprazole; erythromycin; mass-spectrometry

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation (project no. 17-75-20250).

Received: 17.04.2020, revised: 29.04.2020, accepted: 18.05.2020.