

## ФАРМАКОЛОГИЯ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2020-83-2-34-37

### ВЛИЯНИЕ ТАУРИНА И L-КАРНИТИНА НА АКТИВНОСТЬ ЦИТОХРОМА P450 3A4 У ДОБРОВОЛЬЦЕВ

А. А. Махова<sup>1\*</sup>, Е. В. Ших<sup>1</sup>, Т. В. Булко<sup>2</sup>, И. А. Комиссаренко<sup>3</sup>,  
Ж. М. Сизова<sup>1</sup>, В. В. Шумянцева<sup>2</sup>

Проведено сравнительное исследование соотношения  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол в моче у добровольцев с целью выяснения влияния таурина и L-карнитина на активность цитохрома P450 3A4. Выявлено, что соотношение  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи добровольцев до начала применения таурина составило ( $2,7 \pm 0,2$ ). Через 3 дня введения внутрь таурина (500 мг 2 раза в сутки) соотношение  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол в утренней порции мочи было ( $3,02 \pm 0,2$ ), что свидетельствует о стимулирующем действии таурина на каталитическую активность цитохрома P450 3A4 ( $p < 0,05$ ). Результаты оценки соотношения  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол в моче у добровольцев на фоне приема L-карнитина (750 мг 3 раза в день внутрь) в течение 14 дней не показали каких-либо значимых изменений. Результаты, полученные при исследовании у добровольцев, подтверждают отсутствие влияния L-карнитина на активность цитохрома P450 3A4. Полученные результаты позволяют прогнозировать отсутствие межлекарственного взаимодействия на уровне цитохрома P450 3A4 при применении L-карнитина в составе комбинированной терапии одновременно с другими лекарственными средствами, субстратами этого фермента.

**Ключевые слова:** цитохром P450 3A4; соотношение  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол; таурин; L-карнитин; моча; добровольцы.

## ВВЕДЕНИЕ

Как известно, основным направлением персонализированной медицины является повышение эффективности и безопасности лекарственной терапии за счет ее индивидуализации, в том числе и за счет учета персональных особенностей биотрансформации лекарственных препаратов [15]. Становится важным не только поиск новых препаратов, но и более детальное изучение метаболизма и межлекарственных взаимодействий уже существующих лекарственных средств [1, 3, 10, 23].

Суперсемейство цитохромов P450 принимает участие в метаболических превращениях различных классов ксенобиотиков. Цитохром P450 3A4 участвует в метаболизме более 50 % применяемых лекарственных препаратов и является наиболее функционально значимым среди цитохромов P450 [7, 8]. Для сравнительного анализа каталитической активности цитохрома P450 3A4 в экспериментах *in vivo* используются тесты

с применением маркерных субстратов, таких как эритромицин [4, 22], мидазолам, омепразол [16]. Такой подход требует приема пациентами или добровольцами этих лекарственных препаратов внутрь. Кроме того, анализ на основе эритромицина (эритромициновый дыхательный тест, Erythromycin breath test, E) предполагает использование  $^{13}\text{C}$  или  $^{14}\text{C}$  N-метил-эритромицина для измерения образовавшегося  $^{13}\text{C}$ - или  $^{14}\text{C}$ - $\text{CO}_2$  [22]. Цитохром P450 3A4 метаболизирует эндогенный кортизол в  $\beta$ -гидрооксикортизол [14]. Неинвазивный тест на основе измерения соотношения  $\beta$ -гидрооксикортизол/кортизол в моче является наиболее достоверным, доступным и часто используемым в практике для оценки ферментативной активности цитохрома P450 3A4 с целью выявления как межлекарственных взаимодействий, так и для фенотипирования этого изофермента [9, 11]. Использованная методика валидирована [21] по показателям линейности, специфичности, точности и воспроизводимости. Диапазон линейности определения был доказан в диапазоне от 0,1 до 100,0 нг/мл. Уравнение имело вид прямой, коэффициент корреляции  $R = 0,99982$ .

**Специфичность метода.** У пиков кортизола и  $\beta$ -гидрооксикортизола в определяемых образцах не имелось наслоений с другими субстанциями. По времени удерживания пики исследуемых образцов совпадали с пиками стандартного раствора.

Врачи разных специальностей часто назначают витамины как в качестве монотерапии, так и в составе

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Минздрава РФ, Россия, 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2.

<sup>2</sup> ФГБНУ “Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича” (ИБМХ), Россия, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10; факс: +7(495)245-0857.

<sup>3</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Едвокимова, Россия, Москва, Делегатская улица, 20, стр.1, +7 (495) 609-67-00

\* e-mail: annabramova@gmail.ru

комплексной терапии в дополнение к основному лечению. Таурин (“Дибикор”) и L-карнитин (“Элькар”) широко используются в клинической практике, однако данные о возможных межлекарственных взаимодействиях этих соединений на уровне системы цитохрома P450 3A4 [1, 3, 7, 8, 10, 15, 23] в литературе не обнаружены.

Ранее было исследовано влияние витаминов-антиоксидантов на активность цитохрома P450 3A4 методом электроанализа [19, 20]. Таурин (2-аминоэтансульфоновая кислота) является наиболее распространенной из свободных аминокислот в организме человека, влияющей на состояние клеточного иммунитета, уровень антиоксидантной защиты, детоксикационных возможностей организма. Таурин играет важную роль в таких биологических процессах как конъюгация желчных кислот, поддержание гомеостаза кальция, осморегуляция и стабилизация мембран [5]. Таурин в 2 раза усиливал индукцию мРНК CYP3A4 под влиянием рифампицина, но сам по себе не влиял на экспрессию [13]. Однако необходимо отметить отсутствие индуцирующего влияния таурина на уровень мРНК в отсутствие рифампицина. Исследователи пришли к выводу, что таурин является активатором индукции CYP3A4, вызываемой рифампицином [13]. Таурин проявляет выраженные гепатопротекторные свойства, а также ингибирует апоптоз гепатоцитов [24]. В результате наших исследований были получены экспериментальные данные о модулирующем действии таурина на каталитическую активность цитохрома P450 3A4. Таурин в диапазоне концентраций 10 – 70 мкМ стимулировал электрохимическое восстановление цитохрома P450 3A4, причем при концентрации 50 мкМ электровосстановление было максимальным —  $(115 \pm 3) \%$ . Таурин нивелировал ингибирующий эффект противогрибкового препарата итраконазола у добровольцев и пациентов [18].

L-карнитин активно применяют для коррекции различных патологических состояний. Доказана эффективность L-карнитина в увеличении толерантности организма человека к стрессам и повышении адаптационных возможностей [6].

Цель нашего исследования состояла в изучении влияния таурина и L-карнитина на активность изофермента цитохрома P450 3A4 с помощью неинвазивного теста определения соотношения  $6\beta$ -гидроксикортизол/кортизол в моче у добровольцев и сопоставлении полученных результатов с экспериментальными данными по исследованию влияния данных препаратов на электрокаталитическую активность цитохрома P450 3A4.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании участвовала группа добровольцев, в которую вошли 18 практически здоровых лиц (мужчины) в возрасте 18 – 35 лет, средний возраст

( $26,4 \pm 5,7$ ) лет, с индексом массы тела, отличавшимся от нормальных величин не более чем на 20 %. Все добровольцы подписали форму информированного согласия на участие в исследовании, были способны выполнять процедуры, предусмотренные в исследовании, и не находились в служебной или иной зависимости от лиц, имеющих отношение к проведению исследования и заинтересованных в его результатах. Перед включением в исследование был проведен скрининг, в который входили общий и биохимический анализ крови, электрокардиография, эхокардиография, ультразвуковое исследование органов брюшной полости. Ни один из добровольцев, выключенных в исследование, не имел хронических заболеваний сердечно-сосудистой, бронхо-легочной, эндокринной, мочевыделительной систем, органов кроветворения и желудочно-кишечного тракта, хирургических вмешательств на органах ЖКТ, туберкулеза, положительной реакции Вассермана, положительных анализов крови на антитела к вирусу иммунодефицита человека, на поверхностный антиген вируса гепатита В или антиген вируса гепатита С, острых инфекционных заболеваний менее чем за 4 недели до начала исследования, злокачественных новообразований, аутоиммунных, аллергических заболеваний и/или реакций (в том числе в анамнезе), клинически значимых изменений лабораторных показателей. Ни один из добровольцев не был донором крови и не имел какой-либо существенной потери крови в течение 3 мес до начала исследования, не принимал никаких лекарственных препаратов и биологически активных добавок, не подвергался каким-либо медицинским манипуляциям во время участия в исследовании, не участвовал в другом клиническом исследовании в течение 8 недель до назначения исследуемого препарата.

Добровольцам назначали таурин (препарат “Дибикор”, таблетки по 250 мг, ПИК-ФАРМА ПРО, Россия) внутрь. Добровольцы принимали внутрь препарат “Дибикор” в дозе 500 мг 2 раза в сутки за 20 мин до приема пищи, длительность применения составляла 14 дней. Забор биоматериала (моча) у добровольцев для определения активности изоферментов цитохрома P450 3A4 неинвазивным методом проводили до начала и после приема препарата “Дибикор”, через 3, 7, 10 и 14 дней.

У этой же группы добровольцев через 1 мес после приема дибикора (“отмывочный период”) была изучена активность изоферментов цитохрома P450 3A4 неинвазивным методом на фоне приема L-карнитина.

Добровольцы получали L-карнитин (препарат “Элькар”, раствор для приема внутрь, 300 мг/мл 100 мл, ПИК-ФАРМА ПРО, Россия) внутрь по 2,5 мл 3 раза в сутки в течение 14 дней. Забор биоматериала (моча) у добровольцев для определения активности изоферментов цитохрома P450 3A4 производили до начала и после приема L-карнитина, через 3, 7, 10 и 14 дней.

Активность цитохрома P450 3A4 оценивали по соотношению концентраций  $\beta$ -гидрокортизола и кортизола (соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол) [21]. Для экстракции данных стероидов из мочи использовали метод жидко-жидкостной экстракции смесью этилацетата и изопропанола (85/15 по объему). Экстракцию проводили дважды из 2 мл мочи, используя 4 мл экстрагента. После центрифугирования в течение 5 мин при скорости 300 об/мин органический слой отделяли и объединяли. Для улучшения экстракции к органическому слою добавляли 2 мл 1 н. раствора NaOH и центрифугировали 5 мин при скорости 300 об/мин. Объединенный органический слой упаривали на вакуумном испарителе. Для построения калибровочного графика были приготовлены образцы добавлением растворов кортизола и  $\beta$ -гидрокортизола известных концентраций к моче здоровых добровольцев. Определение кортизола и  $\beta$ -гидрокортизола в моче проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent G1978B Multimode-Sourcefor 6410 TripleQuade LC/MS (Agilent Technologies, Inc., США). Объем вкола составлял 10 мкл. Состав подвижной фазы: 55 % 0,1 % муравьиной кислоты и 45 % ацетонитрила. Скорость потока подвижной фазы — 0,5 мл/мин. Колонка — обращеннофазная Waters (5 мкм; 4,6 × 150 мм), температура колонки 35° С. Регистрацию проводили при длине волны ультрафиолетового детектора, равной 246 нм. Масс-детектор работал в режиме сканирования в позитивной полярности с типом ионизации MM-ES + APCI. Была проведена валидация метода. Метод показал высокую чувствительность, точность и воспроизводимость [21].

Исучаемые количественные признаки, имеющие нормальное распределение, в работе представлены в виде средних арифметических значений и стандартного отклонения. Для проверки гипотезы о равенстве средних для 2 групп использовали критерий Стьюдента. Результат расценивали как достоверный при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены значения соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче у добровольцев на фоне приема таурина в течение 14 дней.

В среднем по группе добровольцев соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в утренней порции

**Влияние таурина на соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче у добровольцев  $M \pm m$**

Срок исследования						
исходно	3 дня		10 дней		14 дней	
			$\Delta(\%)$		$\Delta(\%)$	
2,71 ± 0,2	3,02 ± 0,2	3,35* ± 0,2	23,6	3,4* ± 0,3	25,4	

\*  $p < 0,05$ , различие достоверно по сравнению с исходным значением.

мочи до начала применения таурина в дозе 500 мг 2 раза в сутки составило 2,71. Через 3 дня приема препарата соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи составило 3,02, что достоверно не отличалось от показателя в утренней порции мочи у пациентов до начала лечения (таблица).

Через 7 дней выявлено статистически значимое увеличение соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи до 3. Дальнейший анализ уровня соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи на 10 и 14 день применения таурина не продемонстрировал каких-либо значимых изменений. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными о проявлении активирующего влияния таурина по отношению к цитохрому P450 3A4 по электрохимической оценке [18].

Для оценки влияния L-карнитина на активность цитохрома P450 3A4 была исследована динамика соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче у добровольцев на фоне приема L-карнитина в течение 14 дней.

В среднем по группе добровольцев соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в утренней порции мочи до начала применения L-карнитина составило 2,65, применение L-карнитина не продемонстрировало каких-либо эффектов.

Количественная оценка изменений соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в первой утренней моче в качестве проверочных образцов имеет практическое значение в качестве биомаркера активности CYP3A4 для индивидуальной комплексной фармакотерапии [21]. Метаболическое соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол отражает изменения каталитической активности ферментов CYPs [2, 6]. Таурин повышает соотношение концентраций  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в условиях *in vivo*, тогда как L-карнитин не вызывал статистически значимых различий. Прием корректоров/модуляторов функциональной активности ферментов CYP может изменить диапазон терапевтических концентраций лекарственного средства.

Результаты, полученные при исследовании у добровольцев, согласуются с полученными нами ранее экспериментальными данными по исследованию каталитической активности цитохрома P450 3A4 и подтверждают отсутствие влияния L-карнитина на активность изофермента CYP3A4 [12, 17]. Полученные результаты позволяют прогнозировать отсутствие межлекарственного взаимодействия на уровне цитохрома P450 3A4 при применении L-карнитина в составе комбинированной терапии одновременно с другими лекарственными средствами, метаболизирующимися этой изоформой цитохрома P450.

Выявленные изменения профиля соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче при изучении *in vivo* влияния витаминopodobных веществ на активность изофермента цитохрома P450 3A4 имеет практи-

ческое значение при планировании проведения комбинированной фармакотерапии. С точки зрения межлекарственных взаимодействий наиболее безопасны препараты, не влияющие на активность цитохрома P450 3A4, такие как L-карнитин.

## ВЫВОДЫ

1. Таурин (500 мг внутрь 2 раза в день в течение 14 дней) вызывает повышение соотношения  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в среднем на 24,5  $\Delta\%$  ( $p < 0,05$ ) в моче у здоровых добровольцев, что отражает повышение активности цитохрома P450 3A4.

2. L-карнитин в дозе 750 мг внутрь 3 раза в день в течение 14 дней не влияет на соотношение  $\beta$ -гидрокортизол/кортизол в моче у здоровых добровольцев, что косвенно свидетельствует об отсутствии влияния препарата на активность цитохрома P450 3A4.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-04-00374).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Д. А. Сычев, *Полипрагмазия в клинической практике: проблема и решения*, Д. А. Сычев (ред.); ЦОП "Профессия", Санкт-Петербург (2016).
2. Y. Barrett, B. Akinsanya, S. Chang, O. Vesterqvist, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*; **821**, 159 – 165 (2005); doi: 10.1016/j.jchromb.2005.04.030.
3. T. Brody, *Drug — Drug Interactions: Part One (Small Molecule Drugs)*, Chapter 7, Book chapter, FDA's Drug Review Process and the Package Label (2018), pp. 255 – 335; doi: 10.1016/B978-0-12-814647-7.00007-5.
4. W. Chiou, H. Jeong, T. Wu, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **70**(4), 305 – 310 (2001).
5. J. Das, J. Ghosh, P. Manna, P. C. Sil, *Toxicology*, **269**, 24 – 34 (2010); doi: 10.1016/j.tox.2010.01.003.
6. M. Galteau, F. Shamsa, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **59**(10), 713 – 733 (2003); doi: 10.1007/s00228-003-0690-3.
7. P. Guengerich, M. Waterman, M. Egli, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **37**(8), 625 – 640(2016); doi: 10.1016/j.tips.2016.05.006.
8. A. Hisaka, Y. Ohno, T. Yamamoto, H. Suzuki, *Pharmacol. Therap.*, **125**(2), 230 – 248 (2010); doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.10.011.
9. Z. Hong, F. Yu, L. Ying, L. Aibin, *J. Med. Colleges of PLA*, **25**, 75 – 83 (2010).
10. C. Kennedy, L. Brewer, D. Williams, *Clin. Pharmacol., Med.*, **44**(7), 422 – 426 (2016).
11. U. Lutz, N. Bittner, M. Ufer, W. Lutz, *J. Chromatogr. B*, **878**, 97 – 101 (2010); doi: 10.1016/j.jchromb.2009.11.023.
12. A. Makhova, V. Shumyantseva, E. Shikh, et al., *Molec. Med. (in Russian)*, **5**, 49 – 53 (2013).
13. H. Matsuda, K. Kinoshita, A. Sumida, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1593**(1), 93 – 98 (2002); doi: 10.1016/S0167-4889(02)00345-2.
14. N. Mochizuki, K. Matsumoto, K. Ohno, et al., *Transplant. Proc.*, **38**(10), 3649 – 3650(2006); doi: 10.1016/j.transproceed.2006.10.146.
15. D. Nebert, D. Russel, *Lancet*, **360** (9340), 1155 – 1162 (2002); doi: 10.1016/S0140-6736(02)11203-7.
16. A. Rocha, E. Coelho, S. Moussa, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **64**(9), 901 – 919 (2008); doi: 10.1007/s00228-008-0510-x.
17. V. Shumyantseva, T. Bulko, G. Kuznetsova, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 438 – 444 (2009).
18. V. Shumyantseva, A. Makhova, T. Bulko, et al., *Biochemistry (Moscow)*, **80**(3), 366 – 373 (2015); doi: 10.1134/S0006297915030116.
19. V. Shumyantseva, A. Makhova, T. Bulko, et al., *RSC Advances*, **5**(87), 71306 – 71313 (2015); doi: 10.1039 / C5RA09998F.
20. V. Shumyantseva, A. Makhova, E. Shikh, et al., *BioNanoScience*, 1 – 8 (2018); doi: 10.1007/s12668-018-0567-7.
21. V. Smirnov, A. Savchenko, G. Ramenskaya, *Biomedicine (Russian)*, **4**, 56 – 60 (2010).
22. E. Sugiyama, A. Kikuchi, M. Inada, H. Sato, *J. Pharm. Sci.*, **100**(9), 3995 – 4005 (2011); doi: 10.1002/jps.22616.
23. L. Zhang, K. Reynolds, P. Zhao, S.- M. Huang, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **243**(2), 134 – 145 (2010); doi: 10.1016/j.taap.2009.12.016.
24. G. Wu, J. Yang, H. Lv, et al., *Amino Acids*, **50**(7), 863 – 875 (2018); doi: 10.1007/s00726-018-2561-3.

Поступила 28.01.20

## EFFECTS OF TAURINE AND L-CARNITINE ON THE ACTIVITY OF CYTOCHROME P450 3A4 IN VOLUNTEERS

A. A. Makhova<sup>1</sup>, E. V. Shikh<sup>1</sup>, T. V. Bulko<sup>2</sup>, I. A. Komissarenko<sup>3</sup>, Zh. M. Sizova<sup>1</sup>, and V. V. Shumyantseva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

<sup>2</sup> V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, ul. Pogodinskaya 10, Moscow 119121, Russia

<sup>3</sup> A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, ul. Delegatskaya 20/1, Moscow, 127473 Russia

A comparative study of the  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in urine in volunteers was conducted to determine the effect of taurine and L-carnitine on the activity of cytochrome P450 3A4. It was established that the  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in the morning portion of urine in volunteers before the start of therapy with taurine was  $2.7 \pm 0.2$ . After 3 days of taurine ingestion at a dose of 500 mg two times a day, the  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in the morning portion of urine increased to  $3.02 \pm 0.2$ , which indicated the stimulating effect of taurine on catalytic activity of P450 3A4 ( $<RTI$  ID = 0.0 4 cyto 05). Results of determination of the  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio in urine of volunteers on the background of taking L-carnitine (750 mg, 3 times a day, p.o.) for 14 days did not show any significant changes, thus indicating the absence of L-carnitine effect on the activity of cytochrome P450 3A4. These results suggest the absence of drug-drug interaction on the level of cytochrome P450 3A4 when L-carnitine is used in combination with other medicinal preparations and substrates of this enzyme.

**Keywords:** cytochrome P450 3A4;  $\beta$ -hydroxycortisol/cortisol ratio; taurine; L-carnitine; urine; volunteers.