

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛРУСЬ

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**
(инструкция по применению)

Гомель, 2011

УДК 616.15:612.015.1(083.133)

ББК 52.817.176:54.11

С 21

Авторы-разработчики:

Т.В.Сатырова, Н.А.Алексеев, Е.И.Михайлова

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор
заведующий кафедрой терапии №2 ФПК и ПК УО «ВГМУ»,

С.И.Пиманов

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник отдела токсикологии ГУ «РНПЦ гигиены»,

А.М.Войтович

С 21 Метод определения активности N-ацетилтрансферазы 2 в сыворотке крови/ авт.-разраб. Т.В.Сатырова, Н.А.Алексеев, Е.И.Михайлова – Гомель: Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет», 2011. — 17 с.

Инструкция предназначена для выявления фенотипа ацетилятора в клинической фармакологии, терапии, кардиологии, фтизиопульмонологии и других областях практической медицины при назначении лекарственных средств, активное вещество которых подвергается метаболизму с помощью реакций ацетилирования.

Метод может быть использован в учебном процессе при подготовке студентов, а также врачей терапевтического и хирургического профиля.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра



В.А. Ходжаев

2010 г.

Регистрационный № 094-0710

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

Сатырова Т.В.

кандидат фармацевтических наук Алексеев Н.А.

кандидат медицинских наук, доцент Михайлова Е.И.

Гомель, 2010

Скорость ацетилирования некоторых лекарственных средств контролируется генетическим полиморфизмом фермента N-ацетилтрансферазы-2 (NAT2). К субстратам NAT2 следует отнести такие лекарственные препараты, как сульфаниламиды, изониазид, прокаинамид, гидралазин (апрессин), нитразепам, призидилол (прекапиллярный вазодилататор, бета-адреноблокатор), амринон (инотроп), эндралазин, аминоглутетимид (ингибитор синтеза стероидов в надпочечниках и периферической ароматизации надпочечниковых андрогенов), клоназепам и кофеин.

Полиморфизм N – ацетилтрансферазы 2 в большинстве случаев показывает бимодальное распределение ацетилирующей способности и проявляется наличием в популяции быстрых и медленных ацетиляторов. При изучении ацетиляторного статуса наиболее важными вопросами являются исследование эффективности терапии лекарственными препаратами, подвергающимися полиморфному ацетилированию; выявление побочных эффектов лекарственной терапии, связанных с полиморфным ацетилированием лекарственных средств.

Определение типа ацетилирования важно для оптимизации терапии, так как у медленных ацетиляторов могут развиваться осложнения, а у быстрых ацетиляторов фармакотерапия может оказаться неэффективной. Например, при применении сульфасалазина у медленных метаболитов значительно чаще проявляются побочные эффекты в виде тошноты, головной боли, гастроинтестинальных и гематологических расстройств. Исследования изониазида показали, что при стандартном дозировании у лиц с медленным фенотипом имеется большое число побочных реакций в виде периферических невритов и гепатотоксичности.

Важной современной тенденцией в развитии фармакотерапии является подбор лекарственного средства каждому конкретному пациенту с учетом его биохимических особенностей. Получение и анализ фармакогенетических

данных, касающихся особенностей метаболического статуса процессов ацетилирования, позволяет адекватно оценить реакцию организма на проводимое лечение и найти баланс между эффективностью и безопасностью фармакотерапии.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является современным высокочувствительным и универсальным методом анализа. Во многих случаях в настоящее время ему сложно найти какую-либо альтернативу. ВЭЖХ позволяет не только одновременно определять концентрации нескольких лекарственных веществ, но и отличается достаточной селективностью, точностью и воспроизводимостью. По этой причине, начиная с середины 70-х годов прошлого столетия, он стал основным аналитическим методом для определения не только самих лекарственных средств, но и их метаболитов как в сыворотке, так и в плазме крови.

Мы предлагаем метод определения ацетиляторного фенотипа, который осуществляется с помощью одновременного измерения концентрации изониазида (INH) и его ацетилированного метаболита (AcINH). В качестве лабораторных образцов рекомендуется использовать сыворотку крови. Анализирующим методом является высокоэффективная жидкостная хроматография.

Результаты исследования показали, что данный метод обладает высокой чувствительностью и измеряет низкие концентрации как самого изониазида, так и его ацетилированного метаболита.

Перечень необходимого оборудования и материалов

Лабораторное оборудование, применяемое при определении активности N-ацетилтрансферазы-2, должно позволять выполнение всех необходимых этапов, начиная с подготовки пациента к исследованию и забора лабораторных образцов до измерения концентрации изониазида и его ацетилированного метаболита.

Перечень основного оборудования и материалов:

1. Колонка хроматографическая стальная, длиной 150 мм, внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная неподвижной фазой - октилсилиликагелем с размером частиц 3,5 – 5,0 мкм.
2. Одноразовые полипропиленовые конические центрифужные пробирки с плотнозакрывающимися крышками объемом 10-15 мл.
3. Одноразовые микроцентрифужные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл.
4. Виалы хроматографические стеклянные объемом 2,0 см³.
5. Дозаторы автоматические с переменным объемом дозирования (от 0,1 до 1,0 см³).
6. Наконечники для дозаторов автоматических одноразовые до 200, 1000 мкл.
7. Шприцы инъекционные однократного применения объемом 10 мл.
8. Изониазид в таблетках по 0,1 г и 0,3 г.

Перечень реактивов:

1. Ацетонитрил для хроматографии (Государственная фармакопея Республики Беларусь, т.1, с.352).
2. Вода для хроматографии (Государственная фармакопея Республики Беларусь, т.1, с.359).

3. Аммония ацетат (Государственная фармакопея Республики Беларусь, т.1, с.347).

4. Трихлоруксусная кислота (Государственная фармакопея Республики Беларусь, т.1, с.429).

5. Рабочий стандартный образец изониазида, содержание действующего вещества не менее 99,0%.

Перечень дополнительного медицинского и аналитического оборудования:

1. Жидкостный хроматограф с детектором на основе диодной матрицы или спектрофотометрический с переменной длиной волны.

2. Центрифуга лабораторная, типа ОПС-8 или аналогичная.

3. Аналитические весы с пределом допускаемой абсолютной погрешности не более ± 0.001 г.

Набор расходных материалов и лабораторных аксессуаров:

1. Штативы для пробирок.

2. Стеклохимическая посуда.

Показания к применению

Метод, предложенный в инструкции, является простым, доступным и достаточно чувствительным способом одновременного измерения концентрации изониазида (INH) и его ацетилированного метаболита (AcINH). Установление активности фермента N-ацетилтрансферазы-2 позволяет установить скорость ацетилирования, которая определяет генетически детерминированные особенности индивидуума в метаболизме ряда лекарственных веществ. Лекарственные вещества, биотрансформация которых осуществляется путем реакции ацетилирования, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Лекарственные вещества, метаболизирующиеся путем реакции ацетилирования

№	Наименование лекарственного средства	Фармакологическая группа
1	Бисептол, сульфасалазин и др.	Сульфаниламиды
2	Прокаинамид	Антиаритмик, класс IA
3	Гидралазин (апрессин), эндралазин	Прямые периферические вазодилататоры
4	ДДС (дапсон)	Противолепозное средство
5	Нитразепам	Транквилизатор
6	Призидилол	Прекапиллярный вазодилататор, бета-адреноблокатор
7	Амринон	Негликозидный кардиотоник
8	Анальгин (дипирон)	Анальгезирующее, жаропонижающее средство
9	Аминоглутетимид	Ингибитор биосинтеза гормонов надпочечников
10	Клоназепам	Противосудорожное средство
11	Кофеин	Психостимулятор
12	Фенелзин	Психотропное средство (антидепрессант)
13	Натрия пара-аминосалицилат	Противотуберкулезное средство
14	Изониазид	Противотуберкулезное средство

Фенотип ацетилятора способствует подбору оптимальной дозы лекарственного препарата пациентам с быстрым типом ацетилирования и определению безопасной дозы лекарственного препарата больным с медленным типом ацетилирования.

Противопоказания к применению

Осложнения, возникающие при применении изониазида.

Описание технологии использования способа

1. Приготовление реактивов и образцов

1.1. Подготовка пациента, забор крови, получение и хранение сыворотки крови

После 12-часового периода голодания пациент должен принять изониазид в дозе 10 мг на каждый кг массы тела. Через 3 часа после приема изониазида из локтевой вены необходимо забрать инъекционным шприцом в центрифужную пробирку 10 мл венозной крови. Образец выдержать при комнатной температуре в течение 30 минут. Пробирку не позже через 1 час после взятия крови в течение 10 минут центрифугировать при скорости 1500g. Сыворотку перенести автоматическим дозатором с наконечником 1 000 мкл в две полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf». Образцы поместить в морозильную камеру, заморозить до -20 С и хранить при данной температуре до 1 месяца вплоть до проведения количественного анализа содержания ацетизониазида и изониазида. Температуру в морозильной камере контролировать с помощью термометра.

1.2. Подготовка образцов сыворотки крови

Подготовку проб сыворотки крови проводить методом осаждения белка. К 1 мл образца сыворотки крови добавить 0,5 мл 10% трихлоруксусной кислоты. Смесь тщательно перемешать в течение 1 минуты, поместить в центрифугу и центрифугировать в течение 10 минут при 3000 оборотов в минуту. После этого для нейтрализации избытка трихлоруксусной кислоты к 0,5 мл надосадочной жидкости добавить 0,5 мл 0,5 М (рН 8,20) раствора ацетата аммония. Объем вводимой пробы должен составить 10 мм³. Для каждого образца выполнить три инъекции.

Исходный раствор изониазида готовить путем растворения точной навески стандартного образца изониазида, составляющей 100,0 мг, в мерной колбе вместимостью 100 мл. В качестве растворителя использовать воду для хроматографии. Концентрация исходного раствора должна составить 1000 мкг/мл.

Рабочий раствор приготовить из исходного раствора изониазида. Концентрация рабочего раствора должна составить 50 мкг/мл. Градуировочные растворы различных концентраций изониазида сделать из рабочего раствора путем разведения сывороткой крови, свободной от лекарственных веществ. Примерная концентрация градуировочных растворов изониазида должна составить 0,5-1,0-2,0-5,0-12,0 мкг/мл.

2. Подготовка хроматографа и проведение анализа

2.1 Условия хроматографического разделения

Разделение проводить в градиентном режиме. Мобильная фаза и условия изменения ее состава указаны в таблице 2.

Таблица 2 – Мобильная фаза и условия изменения ее состава

Время, мин	Компонент		
	Ацетонитрил	Вода для хроматографии	0,1 М раствор ацетата аммония (pH 6,8)
0-2	1	69	30
2-10	10	59	30
10-12	1	69	30

Установить следующие параметры хроматографического разделения:

- скорость потока 1,2 мл/мин,
- давление 100-120 бар,
- длина волны детектора 275 нм,

- температура термостата колонки $20 \pm 1^\circ\text{C}$,
- температура устройства для ввода образцов $+4^\circ\text{C}$
- время хроматографирования: 3-кратное время удерживания основного пика на хроматограмме испытуемого раствора.

2.2 Проведение хроматографического анализа

Убедиться в стабильности скорости потока подвижной фазы и температуре колонки. Впрыснуть по 10 мм^3 испытуемого раствора. Получить хроматографические кривые. Примерная хроматограмма сыворотки крови пациента на фоне приема изониазида указана на рисунке 1.

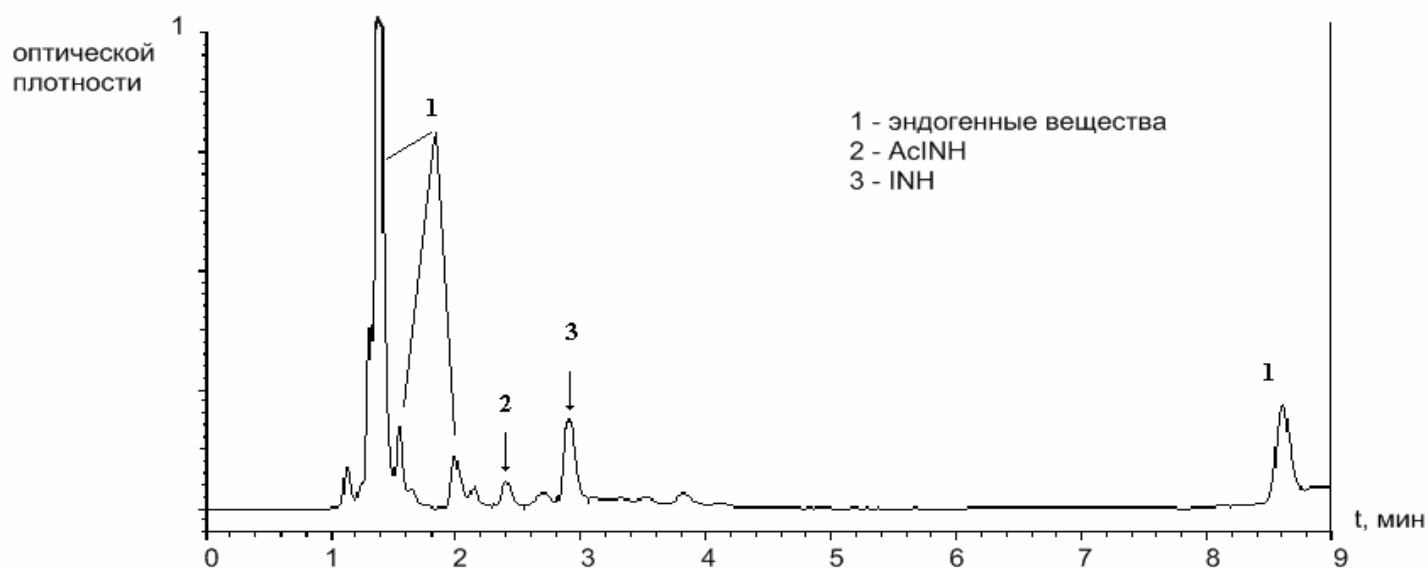


Рис. 1 - Хроматограмма сыворотки крови пациента, содержащая изониазид (t около 2,9 мин) и его метаболит - ацетизониазид (t около 2,4 мин)

Время выхода изониазида должно составить $2,8 \pm 0,1$ мин., ацетизониазида - $2,3 \pm 0,1$ мин. Соотношение времени выхода ацетизониазида к времени выхода изониазида должно колебаться от $0,83 \pm 0,03$.

3. Определение фенотипа ацетилирования

Фенотип ацетилирования определять как скорость ацетилирования изониазида и рассчитывать как отношение концентраций ацетизониазида к изониазиду (отношение R).

В зависимости от интервала отношения R: [0 - 0.28]; [0.28 - 0.37]; [0.37 - 1) – выделять медленный, промежуточный и быстрый фенотип ацетилятора. Левый интервал отнести к достоверно медленным, правый интервал – к достоверно быстрым, а средний - к промежуточным или предбыстрым ацетиляторам.

Возможные осложнения и ошибки, пути их устранения

При строгом соблюдении условий метода значимые осложнения и ошибки мало вероятны.

Область применения метода

Результаты анализа применяются для выявления фенотипа ацетилятора в клинической фармакологии, терапии, кардиологии, фтизиопульмонологии и других областях практической медицины при назначении лекарственных средств, активное вещество которых подвергается метаболизму с помощью реакций ацетилирования (изониазид, прокаинамид, гидралазин (апрессин), нитразепам, призидилол, амринон (инотроп), эндралазин, аминоклутетимид, клоназепам и кофеин).

Метод может быть использован в учебном процессе при подготовке студентов, а также врачей терапевтического и хирургического профиля.

ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛЯТОРНОГО ФЕНОТИПА ПО АКТИВНОСТИ N- АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

Скорость ацетилирования некоторых лекарственных средств контролируется генетическим полиморфизмом фермента N-ацетилтрансферазы-2 (NAT2). К субстратам NAT2 следует отнести такие лекарственные препараты, как сульфаниламиды, изониазид, прокаинамид, гидралазин (апрессин), нитразепам, призидилол (прекапиллярный вазодилататор, бета-адреноблокатор), амрион (инотроп), эндралазин, аминоклутетимид (ингибитор синтеза стероидов в надпочечниках и периферической ароматизации надпочечниковых андрогенов), клоназепам и кофеин [1].

Полиморфизм N – ацетилтрансферазы 2 в большинстве случаев показывает бимодальное распределение ацетилирующей способности и проявляется наличием в популяции быстрых и медленных ацетиляторов [1,2]. При изучении ацетиляторного статуса наиболее важными вопросами являются исследование эффективности терапии лекарственными препаратами, подвергающимися полиморфному ацетилированию; выявление побочных эффектов лекарственной терапии, связанных с полиморфным ацетилированием лекарственных средств.

Определение типа ацетилирования важно для оптимизации терапии, так как у медленных ацетиляторов могут развиваться осложнения, а у быстрых ацетиляторов фармакотерапия может оказаться неэффективной. Например, при применении сульфасалазина у медленных метаболитов значительно чаще проявляются побочные эффекты в виде тошноты, головной боли, гастроинтестинальных и гематологических расстройств [3]. Исследования изониазида показали, что при стандартном дозировании у лиц

с медленным фенотипом имеется большое число побочных реакций в виде периферических невритов и гепатотоксичности [4].

Важной современной тенденцией в развитии фармакотерапии является подбор лекарственного средства каждому конкретному пациенту с учетом его биохимических особенностей. Получение и анализ фармакогенетических данных, касающихся особенностей метаболического статуса процессов ацетилирования, позволяет адекватно оценить реакцию организма на проводимое лечение и найти баланс между эффективностью и безопасностью фармакотерапии [5].

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) является современным высокочувствительным и универсальным методом анализа. Во многих случаях в настоящее время ему сложно найти какую-либо альтернативу. ВЭЖХ позволяет не только одновременно определять концентрации нескольких лекарственных веществ, но и отличается достаточной селективностью, точностью и воспроизводимостью. По этой причине, начиная с середины 70-х годов прошлого столетия, он стал основным аналитическим методом для определения не только самих лекарственных средств, но и их метаболитов как в сыворотке, так и в плазме крови.

Мы предлагаем способ определения ацетиляторного фенотипа, который осуществляется с помощью одновременного измерения концентрации изониазида (INH) и его ацетилированного метаболита (AcINH). В качестве лабораторных образцов рекомендуется использовать сыворотку крови. Анализирующим методом является высокоэффективная жидкостная хроматография.

Результаты исследования показали, что данный метод обладает высокой чувствительностью и измеряет низкие концентрации как самого изониазида, так и его ацетилированного метаболита.

Инструкция по применению разработана в рамках выполнения научной темы БРФФИ «Изучить влияние ацетиляторного фенотипа на эффективность лекарственной терапии язвенного колита», утвержденной ГУ «БелИСА», № гос. регистрации 20091630 от 30.07.2009.

Литература:

1. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике / С.Б. Середенин. – М.: Медицинское информационное агенство, 2004. – 303 с.
2. Meyer, U.A. Polymorphism of human acetyltransferases / U.A. Meyer // *Environmental Health Perspectives*. – 1994. – Vol. 102, № 6. – P. 213-216.
3. Azad Khan, A.K. The disposition and metabolism of sulfasalazine (salicylazosulphapyridine) in man / A.K. Azad Khan, S.C. Truelove, R. Aranson // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1982. – Vol. 13. – P. 523-528.
4. Snider, D.E. Jr. Pyridoxine supplementation during isoniazid therapy / D. E. Jr. Snider // *Tubercle*. – 1980. – Vol. 61. – P. 191–196.
5. Кукес, В.Г. Клиническая фармакология и фармакотерапия / под ред. В.Г. Кукеса, А.К. Стародубцева. – 2-е изд., испр. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. – С. 77-78.

УТВЕРЖДАЮ

(инициалы, фамилия)
«__» _____ 20__ г.

АКТ
о практическом использовании результатов исследования

В _____
(сфера, в которой нашли практическое применение результаты исследования)

Комиссия в составе _____

_____ настоящим подтверждает,
что _____
(название структурного подразделения организации)

Осуществлено внедрение в _____

материалов Инструкции по применению «Метод определения активности
N-ацетилтрансферазы 2 в сыворотке крови»
_____ (указываются конкретные научные результаты, которые нашли применение)

полученных Сатыровой Т.В., Алексеевым Н.А., Михайловой Е.И.
_____ (фамилия, имя, отчество автора (авторов) исследования)

при выполнении темы БРФФИ «Изучить влияние ацетиляторного фенотипа
_____ (название программы, проекта, темы НИР)

на эффективность лекарственной терапии язвенного колита» (№ГР 20091630
от 30.07.2009)

для _____
(указываются решаемые практические задачи)

на основании чего материалы инструкции «Метод определения активности
_____ (приводятся конкретные результаты практического использования)

N-ацетилтрансферазы 2 в сыворотке крови» используются для

Члены комиссии: _____ (подпись) _____ (инициалы, фамилия)

_____ (дата)

Научное издание

Сатырова Татьяна Викторовна
Алексеев Николай Александрович
Михайлова Елена Ивановна

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
N-АЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ 2 В СЫВОРОТКЕ КРОВИ**

Инструкции по применению