

Методики фенотипирования изофермента CYP3A4, применяемые для персонализации фармакотерапии

Е. А. Егоренков², В. В. Смирнов^{1,2}, В. Н. Кузина², С. П. Дементьев², Г. В. Раменская^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127051, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, 119991, Москва, Россия

Статья поступила 07.07.2017 г. Принята к печати 01.03.2017 г.

Резюме: Проведен обзор существующих методов фенотипического определения активности изофермента CYP3A4, а также оценены актуальность проблемы оценки активности данного изофермента и возможность использования данных методов в клинической практике для корректировки доз назначаемых препаратов с целью минимизации риска возникновения нежелательных реакций. Показана возможность разработки методики совместного определения нескольких субстратов CYP3A4, которая необходима для нивелирования ошибки, которая может возникнуть при включении прочих изоферментов цитохрома P450 в метаболизм какого-либо эндогенного субстрата. Предложено исключить использование крови в качестве биообъекта исследования с целью снижения инвазивности метода.

Ключевые слова: цитохром P450; CYP3A4; фенотипирование; персонализированная медицина; рациональная фармакотерапия.

Библиографическое описание: Егоренков ЕА, Смирнов ВВ, Кузина ВН, Дементьев СП, Раменская ГВ. Методики фенотипирования изофермента CYP3A4, применяемые для персонализации фармакотерапии. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(1): 20–24.

ВВЕДЕНИЕ

Система цитохрома P450 (CYP) играет важнейшую роль в метаболизме как ксенобиотиков, так и эндогенных веществ. В последние годы был доказан значительный вклад этой системы в метаболизм канцерогенных веществ. Важную роль CYP играет в развитии нежелательных реакций вследствие применения лекарственных препаратов (ЛП). В частности, к возникновению таких реакций ведет взаимодействие лекарственных средств (ЛС), проявляющееся при совместном приеме препаратов, которые могут перекрестно влиять на активность отдельных ферментов системы метаболизма. Помимо этого, на активность системы CYP могут влиять и другие факторы: пол, возраст, сопутствующие заболевания, пищевой рацион, общее состояние организма и прочие факторы. Существуют два основных метода определения активности изоферментов цитохрома P450 *in vivo*: генотипирование и фенотипирование. Генотипический метод предполагает метод определения активности того или иного фермента метаболизма ЛС на основании изучения его гена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Фенотипический метод, в свою очередь, полностью учитывает воздействия окружающей среды на организм, и в результате возможно получить данные о реальной активности метаболизма в данный момент времени. Метод заключается в прямом определении активности того или иного фермента метаболизма ЛС по фармакокинетике его специфического субстрата («маркерного» субстрата) и его метаболита [1]. Существует множество методик определения активности различных изоферментов CYP *in vivo*, с использованием различных веществ в качестве субстратов-маркеров. Одним из самых со-

временных и перспективных аналитических методов, используемых для количественного определения концентрации субстратов-маркеров и их метаболитов в биожидкостях организма при фенотипировании, является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Данный метод отличается наибольшей специфичностью, точностью, чувствительностью и воспроизводимостью по сравнению с другими аналитическими методами.

ИЗОФЕРМЕНТ CYP3A4

Цитохром P450 имеет множество изоформ — изоферментов, которых на данный момент выделено более 1000. Изоферменты цитохрома P450 по классификации Nebert (1987) принято разделять по близости (гомологии) нуклеотид/аминокислотной последовательности на семейства, а последние, в свою очередь, на подсемейства. Изоферменты цитохрома P450 с идентичностью аминокислотного состава более 40 % объединены в семейства, которых выделено 36; 12 из них обнаружены у млекопитающих [1]. У каждого из изоферментов CYP своя специфическая функция в метаболических процессах и свой специфический субстрат. Несмотря на все изобилие изоферментов, лишь несколько из них делают основной вклад в метаболизм ксенобиотиков. Одним из таких изоферментов является изофермент CYP3A4, отвечающий за метаболизм многих веществ как эндогенного происхождения (стероидные гормоны, липиды, желчные кислоты), так и ксенобиотиков, включая лекарственные вещества, токсичные вещества окружающей среды и природные соединения, содержащиеся в продуктах питания [1, 2]. Данный изофер-

мент считается основным из всех изоферментов CYP, поскольку его доля в организме составляет около 80 % от всего количества изоферментов CYP, при этом он обнаруживается не только в печени, но и в простате, молочных железах, клетках эпителия тонкого и толстого кишечника, и даже в клетках головного мозга [3, 4]. CYP3A4 метаболизирует более половины используемых на сегодняшний день лекарственных препаратов, включая противоопухолевые, иммунодепрессанты, противогрибковые, макролиды, трициклические антидепрессанты и многие другие. Так как данный изофермент содержит большое количество субстратов, равно как ингибиторов и индукторов, зачастую происходит изменение активности CYP3A4, вызванное как взаимодействием ЛС, так и воздействием ксенобиотиков из окружающей среды и продуктов питания (например, природные соединения грейпфрутового сока подавляют активность CYP3A4) [6–8].

МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ CYP3A4

Первым из широко применяемых в клинической практике методов определения активности CYP3A4 является эритромицин-дыхательный тест (erythromycin breath test, ERMVT). В основе метода лежит количественное определение в выдыхаемом воздухе $^{14}\text{CO}_2$, образующегося в результате биотрансформации введенного [^{14}C –N–метил]–эритромицина. Пациентам внутривенно вводится доза меченого эритромицина, соответствующая 4 микроюри (около 100 мг), и через 20 мин испытуемым предлагается надуть воздушный шарик, после чего проводится количественное определение $^{14}\text{CO}_2$ в объеме выделенного воздуха радиометрическим методом [9]. По полученным данным рассчитывается метаболическое отношение количества выделенного метаболита к количеству введенного субстрата, по значению которого оценивается активность CYP3A4. Недостатками данного метода являются необходимость использования вещества с изотопной меткой, инвазивность метода и необходимость проведения анализа в стационаре ввиду внутривенного введения субстрата-маркера, сравнительная сложность проведения радиометрического анализа ввиду малой распространенности данного метода в лабораторной практике, а также недостаточная точность определения активности по сравнению с разработанными в последующем методиками фенотипирования CYP3A4 [10, 11].

Для определения активности CYP3A4 также разработаны методики с использованием различных лекарственных веществ в качестве субстратов-маркеров. Такими субстратами являются хинин и мидазолам. Разработано множество методик, использующих данные вещества в качестве субстратов, но несмотря на их различия между собой, основной принцип проведения исследования остается одним и тем же. Пациенту перорально или внутривенно однократно вводится доза субстрата, после чего с учетом данных о периоде полувыведения используемых веществ производится отбор биообъекта для определения концентраций субстрата и метаболита с последующим расчетом метаболического индекса. В качестве биообъекта зачастую используется кровь для более точного определения концентраций исследуемых веществ. Биообъект может отбираться как однократно, так и многократно в течение 48–96 ч для оценки изменения значения метаболического отношения во

времени. Ниже приведены обобщенные схемы проведения исследований по оценке активности CYP3A4 с использованием мидазолама и хинина [12–18].

Хинин представляет собой алкалоид, содержащийся в коре хинного дерева, обладающий ярко выраженным противомаларийным действием. После попадания в организм хинин метаболизируется CYP3A4 с образованием специфического метаболита 3-гидроксихинина [17]. Для проведения исследования пациенту однократно вводится 500 мг хинина гидрохлорида, и через 4–6 ч после приема хинина производится взятие образца крови для определения концентраций хинина и его метаболита в плазме крови. Количественное определение исследуемых веществ производится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. По полученным данным рассчитывается значение метаболического отношения и оценивается активность изофермента CYP3A4 у пациента.

Мидазолам — производное бензодиазепина, снотворный препарат короткого действия, применяющийся для лечения острых эпилептических приступов и умеренно тяжелой бессонницы. В процессе реакции биотрансформации, катализируемой изоферментом CYP3A4, мидазолам окисляется до 1'-гидроксимидазолама [18]. Пациенту однократно вводится 2 мг мидазолама, и через 4 ч после введения отбирается кровь для проведения количественного определения мидазолама и его метаболита в плазме крови. Количественное определение также проводится методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Приведенные выше методики определения активности CYP3A4 имеют ряд недостатков. К таковым можно отнести использование веществ с радиоактивной меткой [19], а также использование фармакологически активных веществ. К тому же, при внутривенном введении субстратов-маркеров оценивается активность фермента CYP3A4, находящегося в гепатоцитах, но не оценивается активность CYP3A4 в тонком кишечнике. Наконец, данные методы сравнительно дороги и длительны [20]. В дальнейшем были разработаны методики, использующие в качестве субстрата-маркеров эндогенные вещества, метаболизирующиеся изоферментом CYP3A4. Так, данный изофермент преимущественно катализирует реакцию гидроксилирования кортизола, в результате чего образуется 6 β -гидроксикортизол [21]. Данный метаболит выделяется с мочой и может быть использован как специфический маркер для определения активности CYP3A4. Также в качестве пары субстрат/метаболит могут быть использованы холестерин/4 β -гидроксистерин [22, 23]. В качестве биообъекта используется моча, собранная в период с 8 до 12 часов утра. Количественное определение субстрата и метаболита может быть проведено как иммунохимическим методом анализа, так и методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [24]. Методы, использующие эндогенные вещества в качестве специфических маркеров, обладают рядом преимуществ. Они позволяют определить активность фермента во всем организме, а не только лишь в печени; данные методы позволяют определить искомые вещества в моче, что снижает инвазивность метода и облегчает процедуру сбора биоматериала; в процессе определения активности изофермента не используются какие-либо экзогенные вещества, что сводит к

минимуму риск возникновения различных нежелательных реакций ЛС в процессе исследования [25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на то, что существуют различные методики определения активности изофермента CYP3A4, многие из них обладают рядом недостатков. Для уменьшения риска возникновения нежелательных реакций ЛС и инвазивности метода следует отказаться от использования экзогенных субстратов. Усовершенствование методик определения активности CYP3A4 заключается в использовании эндогенных маркеров (кортизол, холестерин).

Для более точной оценки активности данного изофермента возможна разработка методики совместного определения нескольких субстратов CYP3A4 с целью нивелирования ошибки, которая может возникнуть при включении прочих изоферментов CYP в метаболизм какого-либо эндогенного субстрата.

С целью снижения инвазивности метода следует отказаться от использования крови в качестве биообъекта исследования. Многие субстраты CYP3A4 и их метаболиты определяются в моче, что позволит снизить инвазивность и повысить безопасность метода, при условии использования мочи в качестве биообъекта.

ЛИТЕРАТУРА

- Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* 2005; 105(6): 2253–77.
- Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q, Halpert JR. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. *Biochemistry* 2001; 40(34): 10150–60.
- Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* 2013; 138(1): 103–41.
- Ferguson CS, Tyndale RF. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(12): 708–14.
- Qui H, Mathas M, Nestler S, Bengel C, Nem D, Godtel-Armbrust U, et al. The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability. *Pharmacogenetics and Genomics* 2010; 20(3): 167–78.
- Ratajowski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, Dastych J. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *Toxicological Letters* 2011; 205(2): 146–53.
- Ainslie GR, Wolf KK, Li Y, Wolf KK, Li Y, Connolly EA, Scarlett YV, Hull JH, Paine MF. Assessment of a candidate marker constituent predictive of a dietary substance-drug interaction: case study with grapefruit juice and CYP3A4 drug substrates. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2014; 351(3): 576–84.
- De Kesel PM, Lambert WE, Stove CP. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping. *Clin Pharmacokinet*. 2016; 55(2): 169–84.
- Elens L, Nieuweboer AJ, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, van Gelder T, Mathijssen RH, van Schaik RH. Impact of POR²⁸ on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23(3): 148–55.
- Kivistö KT, Kroemer HK. Use of Probe Drugs as Predictors of Drug Metabolism in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 37(1 Suppl): 40–8.
- Rivory LP, Slaviero K, Seale JP, Hoskins JM, Boyer M, Beale PJ, et al. Optimizing the erythromycin breath test for use in cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2000; 6(9): 3480–5.
- Christensen M, Andersson K, Dalen P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2003; 73: 517–28.
- Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the «Coopers-town 5 + 1 cocktail». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2003; 74: 437–47.
- Yin QQ, Lam SS, Lo CM, Chow MS. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004; 18: 2921–33.
- Zgheib NK, Frye RF, Tracy TS, Romkes M, Branch RA. Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2006; 80: 257–63.
- Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ, et al. Development of the «Inje cocktail» for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms *in vivo*. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2007; 82: 531–40.
- Mirghani RA, Ericsson O, Tybring G, Gustafsson LL, Bertilsson L. Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 59(1): 23–8.
- Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, Brian WR, Loi CM, Dobrinska MR, et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001; 11(9): 781–91.
- El Desoky ES, Mohamed HO, Farghaly WM, Hamed SA, Hedaya MA, Siest JP. Study of urinary 6 beta-hydroxycortisol/cortisol ratio in spot urine sample as a biomarker of 3A4 enzyme activity in healthy and epileptic subjects of Egyptian population. *Pharmacological Research* 2005; 51(6): 575–80.
- Shibasaki H, Hosoda K, Goto M, Suzuki A, Yokokawa A, Ishii K, et al. Intraindividual and interindividual variabilities in endogenous cortisol 6β-hydroxylation clearance as an index for *in vivo* CYP3A phenotyping in humans. *Drug Metab Dispos*. 2013; 41(2): 475–9.
- Shibasaki H, Kuroiwa M, Uchikura S, Tsuboyama S, Yokokawa A, Kume M, et al. Use of endogenous cortisol 6β-hydroxylation clearance for phenotyping *in vivo* CYP3A activity in women after sequential administration of an oral contraceptive (OC) containing ethinylestradiol and levonorgestrel as weak CYP3A inhibitors. *Steroids* 2014; 87: 137–44.
- De Graan AJ, Sparreboom A, de Bruijn P, de Jonge E, van der Holt B, Wiemer EAC, et al. 4β-hydroxycholesterol as an endogenous CYP3A marker in cancer patients treated with taxanes. *British Journal of clinical pharmacology* 2015; 80(3): 560–8.
- Tomalik-Scharte D, Lütjohann D, Doroshenko O, Frank D, Jetter A, Fuhr U. Plasma 4beta-hydroxycholesterol: an endogenous CYP3A metric? *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2009; 86(2): 147–53.
- Смирнов ВВ. Разработка методики определения кортизола и 6-бета-гидроксикортизола в моче с целью установления активности изофермента CYP3A4: дис. ... канд. фарм. наук. М.; 2011.
- Смирнов ВВ, Савченко АЮ, Раменская ГВ. Разработка и валидация методики количественного определения эндогенного кортизола и 6-β-гидроксикортизола в моче с целью определения активности изофермента CYP3A4. *Биомедицина* 2010; 1(4): 56–60.

ОБ АВТОРАХ

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 127051, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
Смирнов Валерий Валерьевич. Ведущий научный сотрудник отдела клинической фармакокинетики Центра клинической фармакологии, канд. фарм. наук.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. Российская Федерация, 119991, Москва, Трубецкая улица, 8, стр. 2.

Егоренков Евгений Андреевич. Аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии.

Кузина Вера Николаевна. Доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, канд. фарм. наук.

Дементьев Сергей Петрович. Доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии, канд. фарм. наук.

Раменская Галина Владиславовна. Заведующая кафедрой фармацевтической и токсикологической химии, д-р фарм. наук, проф.

АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Егоренков Евгений Андреевич; egorenkov.eugene@gmail.com

CYP3A4 ISOENZYME PHENOTYPING FOR PERSONALISATION OF PHARMACOTHERAPY

E. A. Egorenkov², V. V. Smirnov^{1,2}, V. N. Kuzina², S. P. Dementiev², G. V. Ramenskaya^{1,2}

¹ Federal State Budgetary Institution

«Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products»
of the Ministry of Health of the Russian Federation, 127051, Moscow, Russia

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, 119991, Moscow, Russia

Abstract: The article reviews existing methods of determining CYP3A4 isoenzyme activity. The authors assess the significance of CYP3A4 activity determination and the applicability of these methods in clinical practice to adjust drugs doses and minimize risks of adverse reactions. The article demonstrates the possibility of developing a method for simultaneous determination of several CYP3A4 substrates which is necessary to rule out potential errors arising upon introduction of other P450 cytochrome enzymes into metabolism of some endogenous substrate. It is suggested that blood should no longer be used as a biological object in the study in order to decrease the method's invasiveness.

Key words: P450 cytochrome; CYP3A4; phenotyping; personalized medicine; rational pharmacotherapy.

For citation: Egorenkov EA, Smirnov VV, Kuzina VN, Dementiev SP, Ramenskaya GV. CYP3A4 isoenzyme phenotyping for personalization of pharmacotherapy. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2017; 7(1): 20–24.

REFERENCES

1. Denisov IG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chemical Reviews* 2005; 105(6): 2253–77.
2. Domanski TL, He YA, Khan KK, Roussel F, Wang Q, Halpert JR. Phenylalanine and tryptophan scanning mutagenesis of CYP3A4 substrate recognition site residues and effect on substrate oxidation and cooperativity. *Biochemistry* 2001; 40(34): 10150–60.
3. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology and Therapeutics* 2013; 138(1): 103–41.
4. Ferguson CS, Tyndale RF. Cytochrome P450 enzymes in the brain: emerging evidence of biological significance. *Trends in Pharmacological Sciences* 2011; 32(12): 708–14.
5. Qui H, Mathas M, Nestler S, Bengel C, Nem D, Godtel-Armbrust U, et al. The unique complexity of the CYP3A4 upstream region suggests a nongenetic explanation of its expression variability. *Pharmacogenetics and Genomics* 2010; 20(3): 167–78.
6. Ratajowski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, Dastych J. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *Toxicological Letters* 2011; 205(2): 146–53.
7. Ainslie GR, Wolf KK, Li Y, Wolf KK, Li Y, Connolly EA, Scarlett YV, Hull JH, Paine MF. Assessment of a candidate marker constituent predictive of a dietary substance-drug interaction: case study with grapefruit juice and CYP3A4 drug substrates. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2014; 351(3): 576–84.
8. De Kesel PM, Lambert WE, Stove CP. Alternative Sampling Strategies for Cytochrome P450 Phenotyping. *Clin Pharmacokinet.* 2016; 55(2): 169–84.
9. Elens L, Nieuweboer AJ, Clarke SJ, Charles KA, de Graan AJ, Haufroid V, van Gelder T, Mathijssen RH, van Schaik RH. Impact of POR²⁸ on the clinical pharmacokinetics of CYP3A phenotyping probes midazolam and erythromycin. *Pharmacogenet Genomics* 2013; 23(3): 148–55.
10. Kivistö KT, Kroemer HK. Use of Probe Drugs as Predictors of Drug Metabolism in Humans. *The Journal of Clinical Pharmacology* 1997; 37(1 Suppl): 40–8.
11. Rivory LP, Slaviero K, Seale JP, Hoskins JM, Boyer M, Beale PJ, et al. Optimizing the erythromycin breath test for use in cancer patients. *Clinical Cancer Research* 2000; 6(9): 3480–5.
12. Christensen M, Andersson K, Dalen P, Mirghani RA, Muirhead GJ, Nordmark A, et al. The Karolinska cocktail for phenotyping of five human cytochrome P450 enzymes. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2003; 73: 517–28.
13. Chainuvati S, Nafziger AN, Leeder JS, Gaedigk A, Kearns GL, Sellers E, et al. Combined phenotypic assessment of cytochrome P450 1A2, 2C9, 2C19, 2D6, and 3A, N-acetyltransferase-2, and xanthine oxidase activities with the «Coopers-town 5 + 1 cocktail». *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2003; 74: 437–47.
14. Yin QQ, Lam SS, Lo CM, Chow MS. Rapid determination of five probe drugs and their metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to cytochrome P450 phenotyping studies. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004; 18: 2921–33.
15. Zgheib NK, Frye RF, Tracy TS, Romkes M, Branch RA. Validation of incorporating flurbiprofen into the Pittsburgh cocktail. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2006; 80: 257–63.
16. Ryu JY, Song IS, Sunwoo YE, Shon JH, Liu KH, Cha IJ, et al. Development of the «Inje cocktail» for high-throughput evaluation of five human cytochrome P450 isoforms *in vivo*. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2007; 82: 531–40.
17. Mirghani RA, Ericsson O, Tybring G, Gustafsson LL, Bertilsson L. Quinine 3-hydroxylation as a biomarker reaction for the activity of CYP3A4 in man. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2003; 59(1): 23–8.
18. Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, Brian WR, Loi CM, Dobrinska MR, et al. In-vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001; 11(9): 781–91.
19. El Desoky ES, Mohamed HO, Farghaly WM, Hamed SA, Hedaya MA, Siest JP. Study of urinary 6 beta-hydroxycortisol/cortisol ratio in spot urine sample as a biomarker of 3A4 enzyme activity in healthy

- and epileptic subjects of Egyptian population. *Pharmacological Research* 2005; 51(6): 575–80.
20. Shibasaki H, Hosoda K, Goto M, Suzuki A, Yokokawa A, Ishii K, et al. Intraindividual and interindividual variabilities in endogenous cortisol 6 β -hydroxylation clearance as an index for *in vivo* CYP3A phenotyping in humans. *Drug Metab Dispos.* 2013; 41(2): 475–9.
 21. Shibasaki H, Kuroiwa M, Uchikura S, Tsuboyama S, Yokokawa A, Kume M, et al. Use of endogenous cortisol 6 β -hydroxylation clearance for phenotyping *in vivo* CYP3A activity in women after sequential administration of an oral contraceptive (OC) containing ethinylestradiol and levonorgestrel as weak CYP3A inhibitors. *Steroids* 2014; 87: 137–44.
 22. De Graan AJ, Sparreboom A, de Bruijn P, de Jonge E, van der Holt B, Wiemer EAC, et al. 4 β -hydroxycholesterol as an endogenous CYP3A marker in cancer patients treated with taxanes. *British Journal of clinical pharmacology* 2015; 80(3): 560–8.
 23. Tomalik-Scharte D, Lütjohann D, Doroshenko O, Frank D, Jetter A, Fuhr U. Plasma 4 β -hydroxycholesterol: an endogenous CYP3A metric? *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2009; 86(2): 147–53.
 24. Smirnov VV. Development of methods for determining cortisol and 6- β -hydroxycortisol in the urine in order to determine the activity of CYP3A4. *Cand. Pharm. Sci [dissertation]. Moscow; 2011 (in Russian).*
 25. Smirnov VV, Savchenko AY, Ramenskaya GV. Development and validation of methods of quantitative determination of endogenous cortisol and 6- β -hydroxycortisol in the urine in order to determine the activity of the isoenzyme CYP3A4. *Biomeditsina* 2010; 1(4): 56–60 (in Russian).

AUTHORS

Federal State Budgetary Institution «Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Petrovsky boulevard 8, bld. 2, Moscow 127051, Russian Federation.

Smirnov VV. Leading research associate of the Department of Clinical Pharmacokinetics of Clinical Pharmacology Centre. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Trubetskaya street 8, bld. 2, Moscow 119991, Russian Federation.

Egorenkov EA. Postgraduate of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry.

Kuzina VN. Assistant professor of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Dementiev SP. Assistant professor of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry. Candidate of Pharmaceutical Sciences.

Ramenskaya GV. Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry. Doctor of Pharmaceutical Sciences, professor.