

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Факультет естественных наук**

Кафедра: химии окружающей среды

**ВЫПУСКНАЯ  
КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**Определение противотуберкулезных препаратов  
методом ВЭЖХ для оценки их фармакокинетики и  
анализ её соответствия генетическим предикторам у  
больных туберкулёзом лёгкого**

Полянская Елена Михайловна

Научные руководители

к.х.н., Кожанова Л.А.,

к.б.н., Макарова С.И.

Новосибирск – 2006

# Содержание

	Стр.
1. Введение.....	4
2. Литературный обзор.....	5
2.1. Туберкулёз.....	5
2.2. Классификация противотуберкулезных препаратов.....	5
2.3. Основные понятия фармакокинетики.....	7
2.4. Практические подходы к решению задачи оптимизации фармакотерапии.....	8
2.5. Изониазид.....	9
2.5.1. Фармакодинамика изониазида.....	9
2.5.2. Фармакокинетика изониазида.....	9
2.5.3. Метаболизм изониазида.....	10
2.6. Пиразинамид.....	10
2.7. Фенотип ацетилирования. Ариламин N-ацетилтрансфераза 2.....	12
2.8. Методы определения противотуберкулезных препаратов в сыворотке и плазме крови.....	16
2.8.1. Колориметрия и спектрофотометрия.....	16
2.8.2. Газовая хроматография, масс-спектрометрия, флуориметрия.....	17
2.8.3. Капиллярный электрофорез.....	17
2.8.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	18
2.8.4.1. Подготовка пробы для ВЭЖХ.....	18
2.8.4.2. Химическая дериватизация.....	20
2.8.4.3. Обзор ВЭЖХ методов определения изониазида и ацетилизониазида.....	21
2.8.4.4. Обзор ВЭЖХ методов определения пиразинамида и его производных.....	22
2.8.4.5. Одновременное определение нескольких лекарств в биологических жидкостях с помощью ВЭЖХ.....	23
2.9. Обработка полученных данных.....	24
3. Экспериментальная часть	
3.1. Реактивы.....	25
3.2. Оборудование.....	25
3.3. Приготовление и хранение растворов.....	26

3.4. Подготовка сыворотки крови для анализа.....	27
4. Результаты и обсуждение	
4.1. Исходные условия хроматографического разделения INH, AcINH и PZA с использованием системы с гидрофосфатом аммония.....	28
4.2. Оптимизация условий хроматографического разделения INH, AcINH и PZA с использованием системы с перхлоратом лития.....	29
4.3. Оптимизация хроматографических условий разделения с использованием октилсульфоната натрия.....	30
4.3.1. Схема работы ион-парного реагента.....	30
4.3.2. Выбор условий хроматографического разделения компонентов в системе с октилсульфонатом натрия.....	32
4.3.2.1. Выбор концентрации октилсульфоната натрия.....	32
4.3.2.2. Выбор концентрации трифторуксусной кислоты и расхода элюента.....	33
4.3.2.3. Выбор объема вводимой пробы.....	33
4.3.2.4. Окончательный выбор формы градиента и условий хроматографирования	35
4.4. Метрологические характеристики.....	37
4.4.1. Градуировочные графики. Пределы обнаружения.....	37
4.4.2. Правильность, сходимость, воспроизводимость.....	40
4.4.3. Оценка потерь при подготовке проб.....	40
4.4.4. Селективность определения.....	42
4.4.5. Идентификация лекарств.....	42
4.5. Зависимость концентрации INH, AcINH, PZA от времени хранения проб при температуре $-20^{\circ}\text{C}$ .....	45
4.6. Лекарственный мониторинг сывороток крови пациентов.....	47
4.7. Генотипирование пациентов.....	47
4.8. Корреляция между генотипом ариламин N-ацетилтрансферазы и фенотипом ацетилирования.....	49
5. Заключение.....	52
6. Выводы.....	52
7. Использованная литература.....	53

Приложения 1-3

# 1. Введение

Туберкулез легких в настоящее время остается одной из главных проблем здравоохранения во всем мире, от него ежегодно умирают около трех миллионов человек.

В комплексной терапии туберкулеза наиболее часто используют такие препараты, как изониазид, пиразинамид и рифампицин. Они обладают хорошей эффективностью, но оказывают значительное токсическое воздействие на организм.

Известно, что в присутствии пиразинамида наблюдается многократное увеличение токсических эффектов от других противотуберкулезных препаратов. Поэтому для оптимизации комплексной терапии туберкулеза легких необходимо контролировать концентрацию пиразинамида и его токсических метаболитов. Это позволит достигнуть максимальной терапевтической эффективности и минимизировать побочные эффекты.

Изониазид в основном метаболизируется ариламином N-ацетилтрансферазой типа 2 (*NAT2*) в печени. Для *NAT2* характерен генетический полиморфизм. В настоящее время известно 29 аллелей (вариантов гена) данного фермента, часть которых формируют фенотип медленного, а часть быстрого ацетилятора. В популяциях имеется бимодальное распределение индивидов по ацетилирующей способности. Определение типа ацетилирования важно для оптимизации терапии, так как у медленных ацетиляторов могут развиваться осложнения (периферическая невропатия и системная гепатотоксичность), а у быстрых ацетиляторов терапия может быть неэффективной. Успехи генетики в последние десятилетия породили надежду, что знание генотипа индивида, определенное однажды, позволит отказаться от дорогих и небезопасных методов установления фенотипа с помощью нагрузочных доз тестовых лекарств, требующихся при каждом обращении в клинику.

**Целью** работы было определение соответствия генотипа ариламином N-ацетилтрансферазы 2 фенотипу ацетилирования у больных туберкулезом лёгких.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработка нового метода ВЭЖХ, позволяющего одновременно определять как пиразинамид и изониазид, так и их основные метаболиты, отличающегося быстротой, экономичностью, простотой пробоподготовки, высокой чувствительностью, селективностью.
2. Апробировать этот метод на клиническом материале.
3. Определить фенотип ацетилирования больных по фармакокинетике изониазида (по фармакокинетическим параметрам).
4. Сопоставить фенотип ацетилирования INH с генотипом *NAT2*.

## 2. Литературный обзор

### 2.1. Туберкулёз.

Туберкулёз - хроническое рецидивирующее заболевание человека и животных, вызываемое туберкулезными микобактериями (*Mycobacterium tuberculosis*). На протяжении столетий он существует как повсеместно распространенное эпидемическое заболевание. В конце 1980-х и начале 1990-х годов произошло новое резкое увеличение заболеваемости туберкулезом в связи с распространением СПИДа, при котором возрастает восприимчивость к туберкулёзу, а также из-за притока иммигрантов, больных туберкулезом в момент въезда в страну. Высокий уровень заболеваемости туберкулёзом сохраняется во многих развивающихся странах, где труднодоступны современные противотуберкулёзные лекарственные препараты.

В год регистрируются 8 миллионов случаев лёгочного туберкулёза и три миллиона смертей. Не менее трети всего населения мира заражено микобактериями туберкулёза. Количество ежегодных смертей от туберкулеза в десять раз превышает количество смертей от СПИДа.

Заражение туберкулёзом происходит преимущественно ингаляционным путем, поэтому первичное поражение наблюдается главным образом в легких. Однако микобактерии туберкулёза могут проникать во все части тела – как правило, в результате вторичного распространения возбудителя из легких. Поэтому для общественного здравоохранения проблема борьбы с туберкулёзом сводится в основном к борьбе с туберкулёзом легких [1].

### 2.2. Классификация противотуберкулезных препаратов.

Химиотерапия — метод лечения инфекционных болезней с помощью химических агентов — основа терапии туберкулёза.

В учебнике инфекционных болезней США (1997 год) выделены следующие группы противотуберкулезных препаратов:

**I. Препараты первой линии** — изониазид, рифампицин, стрептомицин, пипразинамид и этамбутол;

**II. Препараты второй линии** — этионамид, циклосерин, капреомицин и канамицин;

**III. Альтернативные препараты** — рифабутин, амикацин, цiproфлоксацин и офлоксацин.

Классификация противотуберкулезных препаратов, принятая Международным противотуберкулезным союзом:

**I. Наиболее эффективные препараты** – синтетический препарат изониазид и антибиотик рифампицин.

**II. Препараты умеренной эффективности** – синтетические препараты: этамбутол, этионамид, протионамид, пиразинамид; антибиотики: стрептомицин, канамицин, флоримицин, циклосерин.

**III. Менее эффективные препараты** – синтетический препарат ПАСК (натриевая соль парааминосалициловой кислоты) [2].

Наиболее популярная схема лечения туберкулеза при комплексной терапии включает 4 препарата (изониазид, рифампицин, пиразинамид, этамбутол) в течение двух месяцев, затем 2 препарата (изониазид, рифампицин) в течение четырех месяцев. Препараты 2-го ряда, резервные (циклосерин, капреомицин, офлоксацин и другие) применяют главным образом для воздействия на микобактерии туберкулеза, ставшие устойчивыми к препаратам 1-го ряда, или при плохой переносимости основных препаратов [3].

Структурные формулы некоторых основных противотуберкулезных препаратов приведены на рис. 1.

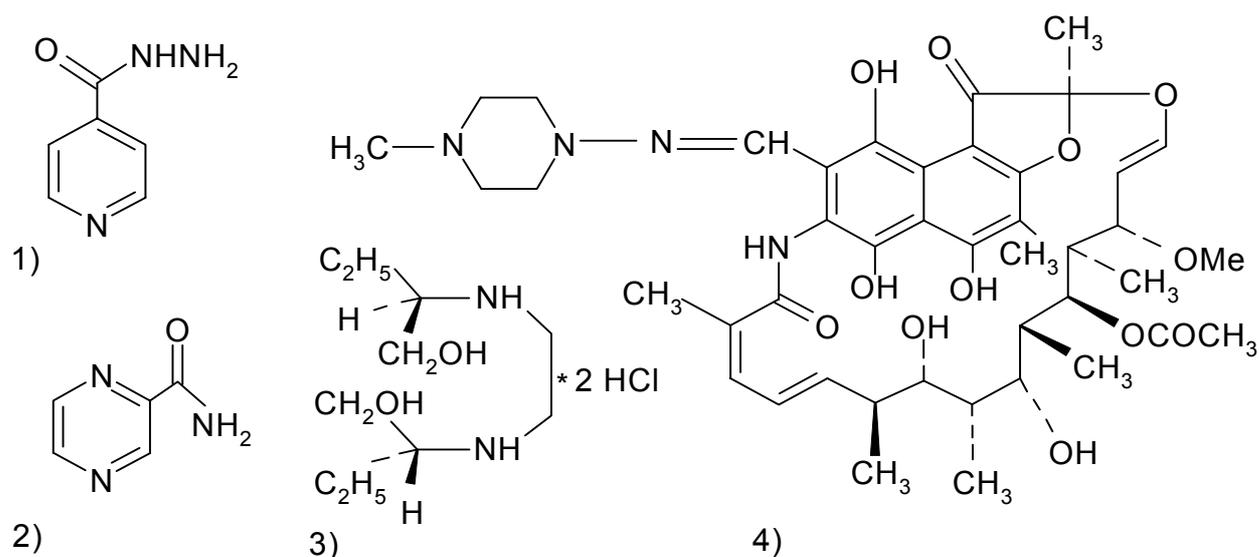


Рис. 1. Структурные формулы основных противотуберкулезных препаратов:

- 1)- изониазид (гидразид изоникотиновой кислоты);
- 2) пиразинамид (амид пиразинкарбоновой кислоты);
- 3) этамбутол (D-(R,R)-N,N'-этилен-бис (2-аминобутан-1-ол)) дигидрохлорид;
- 4) рифампицин.

### 2.3. Основные понятия фармакокинетики.

**Фармакокинетика** – наука, изучающая динамику процессов абсорбции, распределения и элиминации препаратов в организме.

Распространение препарата в организме обеспечивается системой кровоснабжения. В крови лекарственный препарат быстро распределяется между плазмой и эритроцитами, между белками плазмы и жидкой частью плазмы. Поскольку большинство лекарственных препаратов состоит из молекул относительно маленького размера, достаточно легко проходящих через стенку капилляров, они проникают во внеклеточную жидкость практически всех органов. Переход препарата из крови во внесосудистое пространство (внеклеточную и внутриклеточную жидкости, ткани) называется его **распределением**. Распределение препарата – это обычно быстрый и обратимый процесс.

Выделение препарата, или **элиминация**, обеспечивается экскрецией (из крови в мочу или другие экскреторные камеры, такие, как желчь, слюна, грудное молоко), а также биотрансформацией препарата в тканях или плазме. Количественную оценку элиминируемого препарата дает **клиренс препарата (Cl)** – объем крови (в общем виде тест-ткани), очищаемый от препарата за единицу времени (мл/мин, мл/(мин\*кг), мл/(мин\*1,73м<sup>2</sup>)).

Коэффициент пропорциональности между количеством введенного препарата и его концентрацией называется **кажущийся объём распределения (V)** ( $A=V \cdot C$ , где  $A$  – количество препарата в организме,  $C$  – концентрация его в плазме). Обычно объём распределения измеряется в литрах или нормируется на массу тела (л/кг), или площадь поверхности тела (л/1,73 м<sup>2</sup>). Нормирование фармакокинетических параметров в основном проводится для усреднения и сравнения индивидуальных значений в случае существенно отличающихся масс или размеров. Для большинства препаратов  $V$  не зависит от концентрации. Тогда увеличенная вдвое внутривенно введенная доза препарата приводит к увеличению вдвое концентрации препарата в плазме. Такая пропорциональная зависимость является индикатором линейной фармакокинетики.  $V$  обычно характеризует препарат в большей степени, чем биологическую систему, хотя некоторые патофизиологические и другие факторы могут приводить к изменениям этого объёма. Значения  $V$  могут быть от нескольких литров до нескольких сотен литров у “среднего” пациента массой 70 кг.

В фармакокинетики принято считать такие параметры, как  $Cl$  и  $V$  независимыми и имеющими физиологическое обоснование. Так,  $Cl$  напрямую отражает механизм элиминации препарата, а  $V$  – процесс установления равновесного распределения препарата в организме.

Сразу после быстрого внутривенного введения препарат становится объектом распределения и одного или нескольких способов элиминации. Большинство препаратов распределяются достаточно быстро. Элиминация препарата после достижения равновесного распределения для многих препаратов описывается в рамках кинетики первого порядка:

$$-dA/dt=K_{el}*A, \quad (1),$$

где  $A$  – количество препарата в организме в момент времени  $t$ ,  $K_{el}$  – **константа скорости элиминации**, которая представляет собой сумму соответствующих скоростных констант, относящихся к разным путям элиминации. Она измеряется в единицах обратного времени. После преобразования уравнения (1) имеем:  $\ln C = \ln C_0 - K_{el} * t$ , то есть  $K_{el}$  можно вычислить, исходя из соотношения  $K_{el} = \ln 2 / t_{1/2}$ , где  $t_{1/2}$  – **период полувыведения препарата** – промежуток времени, который требуется для снижения концентрации препарата на 50%. В рамках кинетики первого порядка  $t_{1/2}$  – величина постоянная, не зависит от дозы или начальной концентрации препарата в плазме.

$k_{el}$  определяется также как отношение  $Cl/V$ .

При внесосудистом способе введения может оказаться, что не весь препарат, а лишь какая-то его часть проникает в кровь. Степень всасывания препарата ( $F$ ) характеризует ту часть дозы, которая достигает кровотока. **Биодоступность** препарата определяется скоростью и степенью его всасывания. При расчетах биодоступности препарата для оценки степени всасывания сравнивают **площади под кривой “концентрация - время” (AUC)** после введения эквивалентных доз тестового препарата и стандарта:

$$F = AUC_{test} / AUC_{standart}$$

Биодоступность может оцениваться как относительная и абсолютная. Если в качестве стандарта используются данные о внутривенном введении препарата, а в качестве тестовых – фармакокинетические данные о внесосудистом введении этого препарата в той же дозе, то речь идет об абсолютной биодоступности. Скорость всасывания обычно оценивается по значениям таких параметров, как  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ , или  $C_{max}/AUC$ .

**Фармакодинамика** – наука, изучающая взаимодействие препарата с тканью- или органом-мишенью.

## 2.4. Практические подходы к решению задачи оптимизации фармакотерапии.

В широко применяемом в настоящее время программном обеспечении для практического расчета индивидуальных схем дозирования чаще всего решается

максимально упрощенная задача оптимизации на основе **линейной однокамерной** (в рамках предположения о практически мгновенном достижении равновесного распределения препарата весь организм может рассматриваться как одна камера) или **линейной двухкамерной** (центральная камера с достаточно быстрым распределением и периферическая, характеризующаяся более медленным достижением равновесного состояния). При этом в качестве целевой функции обычно выбирается поддержание стационарной концентрации на определенном уровне или создание определенной концентрации в камере к определенному моменту времени.

Точность прогноза с помощью упрощенной модели зависит в основном от двух обстоятельств:

- корректности аппроксимации сложного поведения препарата в организме с помощью упрощенной фармакокинетической модели;
- точности оценок фармакокинетических параметров выбранной математической модели по результатам имеющихся ограниченных измерений концентрации препарата в тест-ткани.

Несмотря на то, что фармакокинетические процессы в организме являются достаточно сложными и нелинейными, поведение большого числа препаратов при их получении в терапевтических дозах может быть достаточно хорошо приближено традиционной линейной однокамерной моделью простейшей структуры [4, 5].

## **2.5. Изониазид.**

Синонимы: INH, INAH, изониазидиум, гидразид изоникотиновой кислоты, тубазид.

### **2.5.1. Фармакодинамика изониазида.**

Вероятные механизмы действия — замена никотиновой кислоты на изоникотиновую в реакциях синтеза никотинамид-аденин-динуклеотида (изо-НАД вместо НАД), либо нарушение синтеза воска, входящего в состав клеточной стенки и определяющего кислотоустойчивость микобактерий туберкулёза [3]. А именно, изониазид ингибирует активность ферментов, отвечающих за синтез главного компонента клеточной стенки бактерий – миколовой кислоты. Кроме того, недавно показано, что окисление изониазида сопровождается образованием NO радикалов, которые участвуют в микробицидном действии [6]. Существуют и другие гипотезы.

### **2.5.2. Фармакокинетика изониазида.**

Изониазид хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, максимальной концентрации в крови достигает через 1-2 ч после приёма. При использовании терапевтических доз изониазида (уровень доз выше минимальной ингибирующей, но

ниже токсической концентрации) в крови создаётся концентрация 0,3-10,0 мкг/мл, а терапевтическая доза составляет 1,5 мкг/мл через 3 часа после орального введения. Бактериостатическая активность составляет 0,03 мкг/мл. Изониазид проникает во все физиологические жидкости — спинномозговую жидкость, плевральную, асцитическую, молоко у кормящих матерей, притом уровень его концентрации в этих жидкостях похож на его уровень в плазме [3].

Время полувыведения изониазида для людей с нормальной функцией печени и почек 1-4 ч. в зависимости от скорости метаболизма: 0,5-1,6 ч. для быстрых ацетиляторов и 2-5ч. для медленных ацетиляторов [7], по другому источнику классификации: быстрые ацетиляторы -  $t_{1/2} < 2,1$  ч. и медленные -  $t_{1/2} > 2,1$  ч. [8]. Увеличение  $t_{1/2}$  до 4,3 ч. может возникать вследствие дисфункции печени или острой почечной недостаточности. 70% дозы экскретируется с мочой за 24 часа, большая часть за первые 12 часов. Объем распределения примерно 0,6 л/кг, клиренс 2,5 и 7 мл/(мин\*кг) для медленных и быстрых ацетиляторов, соответственно, биодоступность 80-90% [9].

Точный механизм токсического действия изониазида не известен, но, возможно, он основан на ИН-индуцированном дефиците пиридоксина (витамин В<sub>6</sub>), в результате чего происходит инактивация пиридоксальсодержащих ферментов (аминотрансфераз), и, как следствие, возникает гепатотоксичность. Токсическое поражение центральной и периферической нервной системы – вторичное хроническое последствие дефицита пиридоксина и пиридоксальфосфата [7].

### **2.5.3. Метаболизм изониазида.**

Изониазид, главным образом, метаболизируется в печени до ацетилизониазида (AcINH) с помощью ариламинов N-ацетилтрансферазы второго типа (NAT2). AcINH не проявляет антитуберкулезную активность. Ацетилизониазид в дальнейшем гидролизуется до изоникотиновой кислоты и ацетилгидразина, оба экскретируются с мочой. Изоникотиновая кислота конъюгирует с глицином. Ацетилгидразин метаболизируется до диацетилгидразина и может быть конвертирован печеночными микросомальными ферментами до реакционно способного агента (вероятно гидразин), который вызывает ИН-индуцируемую гепатотоксичность (см. рис. 2).

## **2.6. Пиразинамид.**

Синонимы: кавизид, линамид, тибимид, тизамид.

Точный механизм действия пиразинамида не известен. Препарат транспортируется или проникает в наружную мембрану микобактерий туберкулеза [10]. Пиразинамид

хорошо абсорбируется после приема внутрь и легко проникает во все жидкости и ткани организма. После перорального введения (таблетки) 20 мг/кг –  $C_{\max} = 28,8$  мкг/мл,  $T_{\max} = 1,0$  ч., а  $t_{1/2} = 10,0$  ч. [11].

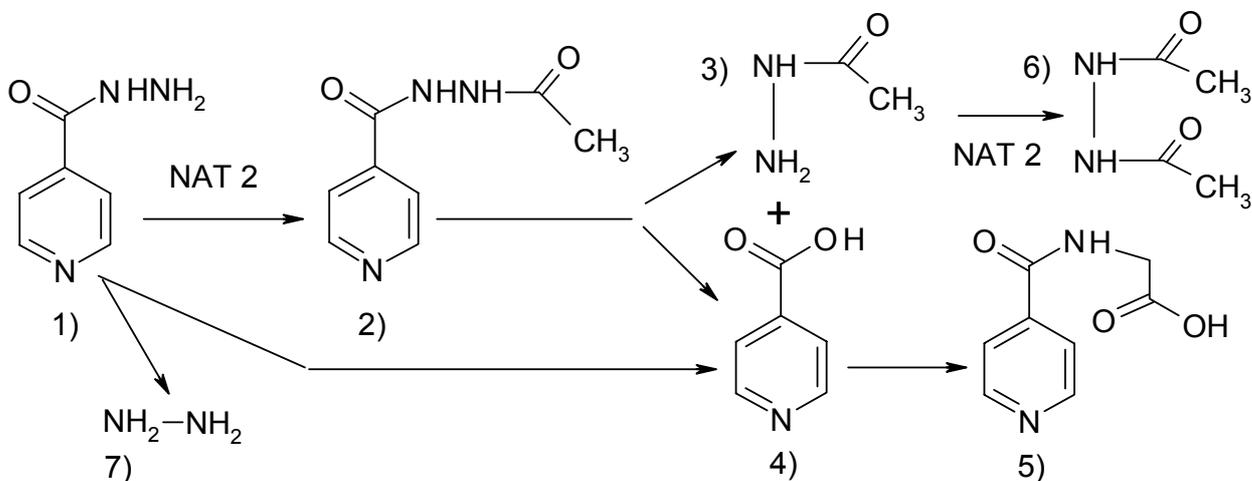


Рис.2. Метаболизм изониазида в организме.

- 1) изониазид; 2) ацетилизониазид; 3) ацетилгидразин; 4) изоникотиновая кислота;  
5) изоникотинил глицин; 6) диацетилизониазид; 7) гидразин.

In vivo (в организме) препарат интенсивно метаболизируется. Его производные - пиразиноевая кислота (РА), которая продуцируется под действием печеночных микросомальных деамидаз, 5-гидроксипиразиноевая кислота (5-ОН-РА), до которой гидроксилируется РА под действием ксантиноксидазы, 5-гидроксипроизводное пиразинамида (гидроксилирование осуществляется этим же ферментом). Минорная часть метаболитного пути PZA состоит в конъюгации РА с глицином, что дает N-(пиразинилкарбонил) глицин [12] (см. рисунок 3).

Поскольку пиразиноевая кислота ингибирует экскрецию мочевой кислоты, может возникать преходящая гиперурекия [13].

Наиболее часто при применении пиразинамида наблюдается гепатотоксичность. Частота появления лекарственно индуцированного гепатита при применении стандартной схемы лечения активной формы туберкулеза (INH, RIF, PZA и этамбутол) примерно 3 %. Тогда, как для комбинации пиразинамида и рифампицина, эта цифра увеличивается до 8-9 %, а для PZA и этамбутола составляет уже 50 % [14].

Хорошо известен факт увеличения токсичности при совместном применении рифампицина и изониазида, но лишь недавно показано, что PZA способен катализировать реакцию между INH и RIF с образованием изоникотинил гидразона. В

результате чего уменьшается биодоступность рифампицина и увеличивается нестабильность фиксированных дозовых комбинаций лекарств [15].

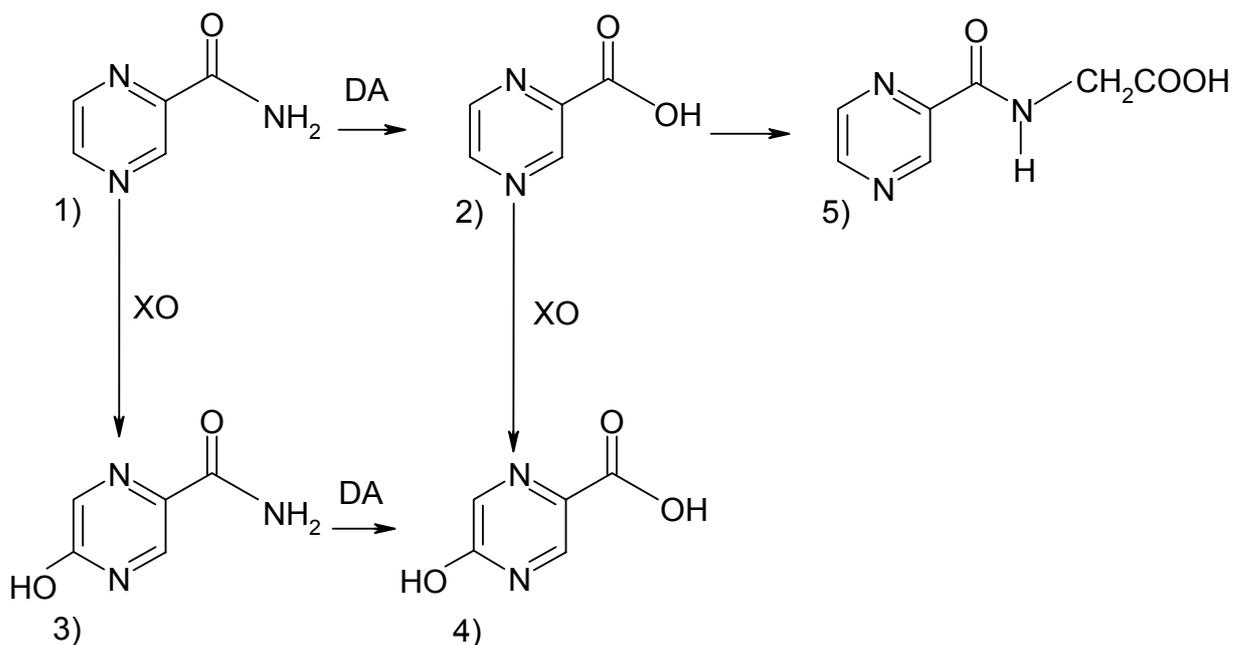


Рис. 3. Метаболизм пиразинамида:

- 1) пиразинамид (PZA); 2) пиразиновая кислота (PA); 3) 5-гидроксипиразинамид;  
 4) 5-гидроксипиразиновая кислота; 5) N-(пиразинилкарбонил) глицин; DA – деамидаза;  
 XO – ксантинооксидаза.

В отличие от изониазида пиразинамид остается все ещё относительно плохо изученным препаратом, но исследования последнего времени доказывают, что подобное упущение чревато, и данное направление надо активно развивать.

## 2.7. Фенотип ацетилирования. Ариламин N-ацетилтрансфераза 2.

Скорость ацетилирования изониазида контролируется генетическим полиморфизмом ариламин N-ацетилтрансферазы. Полиморфизм по наследственным признакам имеет адаптивный характер и поддерживается естественным отбором. Относительно причин полиморфизма человека по биохимическим признакам достоверных сведений почти не имеется. Можно предположить, однако, что среди главных причин возникновения этого полиморфизма должны быть заболевания и питание.

С участием NAT2 показана возможность протекания трех реакций: N-ацетилирования, O-ацетилирования и внутримолекулярного переноса ацетильного остатка от азота к кислороду. Субстратами NAT2 являются соединения, которые относятся к следующим классам химических соединений: ариламины, гидразины, аминобифенилы, гетероциклические амины. Эти классы вбирают в себя все многообразие эндогенных (с их различными биологическими функциями) и экзогенных (столь различных по своему

назначению) соединений. С учетом масштабов воздействия на человечество, среди последних особо отметим естественные компоненты пищи, лекарства и компоненты выхлопных газов дизельных двигателей. Некоторые представители субстратов NAT2 приведены в таблице 1.

Таблица 1. Субстраты ариламин-N-ацетилтрансферазы

Субстраты ариламин N-ацетилтрансферазы
<p>Лекарства:</p> <p>Антимикробные препараты (изониазид, сульфаниламидные препараты);</p> <p>Антигипертензивные и вазодилататоры (гидралазин, эндралазин, амрилон, новокаинамид);</p> <p>Стимуляторы (кофеин);</p> <p>Ингибиторы синтеза кортикостероидов (аминоглутетимид);</p> <p>Блокаторы <math>\beta</math>-адренорецепторов (призидилол).</p>
<p>Широко распространенные загрязнители окружающей среды:</p> <p>Бензидин, аминофлюорен, 4-аминобифенил,</p> <p><math>\beta</math>-нафтиламин (производство красок, резины, каменноугольного газа, табачный дым).</p> <p>Выхлопы дизелей, синтетические топливные материалы:</p> <p>Ароматические амины (2-аминофлюорен, 2-аминоантрацен)</p>
<p>Эндогенные соединения:</p> <p>Серотонин, гистамин, дофамин</p>

Сама история изучения ариламин-N-ацетилтрансферазы началась практически сразу после введения в медицинскую практику изониазида в 1952 году для лечения туберкулёза. Было обнаружено, что у 40% лиц, принимавших изониазид в дозе 20 мг/кг в сутки, в течение 3 - 8 недель развивался периферический неврит. Выяснилось, что это осложнение тесно связано с метаболизмом препарата и зависит от степени его ацетилирования. Высокая стабильность типа элиминации свободного изониазида, независимого от характера питания и состояния здоровья, и большой размах межиндивидуальной изменчивости по этому признаку дали основание для предположения, что обмен изониазида в сильной степени определяется наследственными задатками.

К настоящему времени известно существование одного гена *NAT\** у прокариот (доядерные - бактерии), у эукариот (формы, имеющие ядро) определено три локуса *NAT\** (*NAT1\**, *NAT2\**, *NAT3\**), нумерация их зависит от исторической последовательности изучения. У человека имеется только два функционально активных локуса: *NAT1\** и *NAT2\**. Человеческие *NAT1\** и *NAT2\** локализованы на 8 хромосоме. Авторы номенклатуры предложили корневой символ для генов ариламин N- ацетилтрансфераз

писать тремя латинскими заглавными наклонными буквами (*NAT*) [16]. В таблице 2 сгруппированы данные по аллелям *NAT\** (варианты гена) у человека. По последним данным известно 29 аллелей, кодирующих белки с разной степенью ацетилирующей способности. Каждый из 29 аллелей содержит комбинацию от 1 до 4 однонуклеотидных полиморфизмов в 13 сайтах внутри кодирующего региона длиной 870 пар нуклеотидов (первая буква – нуклеотид, который заменяется, цифра – положение в гене, вторая буква – нуклеотид, на который заменяется) [17].

Таблица 2. Современная классификация аллелей *NAT\*2* человека.

Аллель	Однонуклеотидные полиморфизмы
<i>NAT2*4</i>	нет
<i>NAT2*5A</i>	T341C, C481T
<i>NAT2*5B</i>	T341C, C481T, A803G
<i>NAT2*5C</i>	T341C, A803G
<i>NAT2*5D</i>	T341C
<i>NAT2*5E</i>	T341C, G590A
<i>NAT2*5F</i>	T341C, C481T, C 759T, A803G
<i>NAT2*6A</i>	C282T, G590A
<i>NAT2*6B</i>	G590A
<i>NAT2*6C</i>	C282T, G590A, A803G
<i>NAT2*6D</i>	T111C, C282T, G590A
<i>NAT2*7A</i>	G857A
<i>NAT2*7B</i>	C282T, G857A
<i>NAT2*10</i>	G499A
<i>NAT2*11</i>	C481T
<i>NAT2*12A</i>	A803G
<i>NAT2*12B</i>	C282T, A803G
<i>NAT2*12C</i>	C481T, A803G
<i>NAT2*13</i>	C282T
<i>NAT2*14A</i>	G191A
<i>NAT2*14B</i>	G191A, C282T
<i>NAT2*14C</i>	G191A, C481T, A803G
<i>NAT2*14D</i>	G191A, C282T, G590A
<i>NAT2*14E</i>	G191A, A803G
<i>NAT2*14F</i>	G191A, A803G
<i>NAT2*14G</i>	G191A, C282T, A803G
<i>NAT2*17</i>	A434C
<i>NAT2*18</i>	A845C
<i>NAT2*19</i>	C190T

Жирным шрифтом выделены аллели – быстрые ацетиляторы; С – цитозин, Т – тимин; А – аденин, G – гуанин.

Многие исследователи изучали частоту встречаемости тех или иных аллелей в различных популяциях. Эти работы важны, как в плане изучения расовых и национальных характеристик, так и в смысле перспективности поиска ассоциаций тех или иных аллелей с заболеваниями.

Все изученные популяции показывают бимодальное распределение ацетилирующей способности и индивиды могут быть классифицированы или как медленные, или как быстрые ацетиляторы. Соотношение быстрых и медленных ацетиляторов разное среди расовых популяций, например в США среди афроамериканцев быстрое ацетилирование отмечено в 52% случаев, среди представителей европеоидной расы — в 48%, но особенно часто у эскимосов — в 95% случаев. Среди японцев эта величина составляет 88%, у таитян — 72%, тогда как среди британцев — 38%, шведов — 32%, египтян — 18%. Большинство европейцев — медленные ацетиляторы.

Неодинаковая чувствительность к возникновению различного рода заболеваний носителей разных генотипов NAT наблюдается с самого начала истории изучения этого фермента. В течение всех прошедших десятилетий шло накопление данных о взаимосвязи ацетиляторного генотипа и каких-либо заболеваний. В первую очередь исследователей интересовали заболевания, обусловленные применением лекарственных препаратов или воздействием канцерогенов - субстратов NAT. В многочисленных работах, посвящённых поиску корреляций между заболеваемостью и фенотипом ацетилирования, акцентируются следующие аспекты: 1) эффективность терапии лекарственными препаратами, подвергающимися полиморфному ацетилированию; 2) побочные эффекты лекарственной терапии, связанные с полиморфным ацетилированием лекарственных препаратов; 3) ассоциация между фенотипом ацетилирования и спонтанными заболеваниями. Многие лекарственные препараты метаболизируются NAT2, и побочные эффекты их применения часто связывают именно с фенотипом ацетилирования.

Как было уже сказано, изониазид - лекарственный препарат, давший толчок исследованию полиморфизма NAT. Показано, что фенотип ацетилирования ассоциирован с риском гепатотоксичности при применении изониазида. У носителей медленного фенотипа ацетилирования, среди представителей европеоидной и негроидной рас, в отличие от монголоидов, вероятность возникновения заболеваний печени выше в 3 раза, чем у носителей быстрого фенотипа. Интересно, что у монголоидов, наоборот, большему риску подвержены носители быстрого фенотипа

ацетилирования. До сих пор этот феномен остался необъяснённым. Возможно, это обусловлено разными кинетическими параметрами в отношении одних и тех же субстратов у разных аллозимов NAT и теми большими различиями в частотах встречаемости аллелей, которые существуют между разными этносами.

При совместном использовании изониазида с рифампицином повреждающее действие изониазида возрастает вчетверо. Сейчас ясно, что это пример взаимодействия ферментов первой и второй фазы метаболизма ксенобиотиков (повреждающие жизнь). NAT осуществляет процесс детоксификации изониазида путём двухступенчатого ацетилирования его, а цитохром CYP3A4, индуцируемый рифампицином, осуществляет токсификацию ацетилгидразина. В случае фенотипа медленного ацетилятора при одновременном применении рифампицина мы наблюдаем снижение эффективности детоксификации и усиление токсификации, что приводит к возрастанию риска повреждения печени у пациентов, принимающих изониазид [18].

Из всего вышесказанного следует необходимость изучения фармакокинетики изониазида и его метаболитов в организме, а также их взаимосвязи с генотипическими предикторами.

## **2.8. Методы определения противотуберкулезных препаратов и их метаболитов в сыворотке, плазме крови и моче.**

### **2.8.1. Колориметрия и спектрофотометрия.**

Количественные колориметрические и спектрофотометрические методы определения изониазида в биологических жидкостях широко используются в клинической практике. Некоторые из этих методов позволяют также определять ацетилизониазид. Здесь мы приведем лишь часть из методов.

Описан метод колориметрического определения изониазида в плазме крови после дериватизации нитропруссидом натрия. Чувствительность метода 5 мг/л. Интерференция с пиразинамидом и ипрониазидом [7]. Спектрофотометрический метод, пригодный для измерения терапевтических концентраций изониазида в плазме, после дериватизации коричневым альдегидом. INH экстрагируется из 3 мл сыворотки. Наблюдается интерференция с пиразинамидом и ипрониазидом [19].

Основные недостатки вышеперечисленных методов следующие:

- большие объемы образца для анализа, что неприемлемо при рутинных клинических анализах, требующих отбора проб через малые промежутки времени для изучения фармакокинетических параметров;
- низкая специфичность.

### **2.8.2. Газовая хроматография, масс-спектрометрия, флуориметрия.**

Газовая хроматография обычно не используется для рутинного определения изониазида в клинических образцах. Плазменно-ионизационный детектор дает низкую чувствительность даже после дериватизации, азот-чувствительный детектор не дает лучшие результаты (в моче предел обнаружения 2 мг/л для INH и AcINH и 400 мг/л для гидразина, моноацетилгидразина и диацетилгидразина) [20]. Компоненты должны быть сначала экстрагированы полярным органическим растворителем, например, метиленхлоридом или этилацетатом. Позднейшие методы используют масс-спектрометрию, но часто требуют дейтерированных внутренних стандартов или использования утомительной дифференцирующей экстракции и двойной дериватизационной процедуры получения триметилсилильных производных, занимающего относительно много времени при анализе большого числа проб [12]. Этот метод имеет высокую специфичность и позволяет анализировать производные гидразина вместе с INH и AcINH, что используется для фармакокинетических исследований. Также есть статьи в которых используется ГХ-МС для определения пипразинамида и его производных, предел обнаружения 10 мкг/л для PZA.

Флуориметрический метод, разработанный Мисели и Олсоном [21], позволяет определять как сам INH, так и его ацетильное производное после гидролиза, на уровне 0,02 мг/л, но необходима крайне сложная и длительная пробоподготовка.

Суммируя все вышесказанное, можно сделать вывод, что основными недостатками вышеперечисленных методов являются:

- сложность и длительность пробоподготовки;
- высокая стоимость анализа.

### **2.8.3. Капиллярный электрофорез.**

Обычно считается, что дата возникновения капиллярного электрофореза (КЭ) - 1981 год, когда Джоргенсон и Лукас описали эффективное разделение пептидов, используя зонный электрофорез в стеклянном капилляре диаметром 75 мкм. Сейчас примерно 150 лекарств разных классов измеряются этим методом в биожидкостях для токсикологических, фармакокинетических и фармакогенетических целей [22]. Метод имеет ряд несомненных достоинств: малый объем анализируемой пробы и используемых дорогих растворителей, высокая разделяющая способность, быстрота, относительно низкая стоимость анализа. Поэтому в будущем этот метод имеет хорошие перспективы для использования в широкой клинической практике, но на данный момент вследствие таких недостатков, как относительно низкая чувствительность и воспроизводимость и недостаточная степень автоматизации, метод КЭ пока не находит широкого применения

для рутинного анализа [23]. Оганесяном с сотрудниками был разработан и охарактеризован метод определения рифампицина в плазме крови с помощью системы капиллярного электрофореза фирмы Хьюлетт-Паккард [24]. Предел обнаружения - 1 мкг/мл. Метод был с успехом использован для изучения биоэквивалентности капсул рифампицина.

#### **2.8.4. Высокоэффективная жидкостная хроматография.**

ВЭЖХ как высокочувствительный и универсальный метод анализа, которому во многих случаях нет альтернативы, позволяет одновременно следить за изменением концентрации несколько лекарственных веществ, отличается достаточной селективностью, точностью и воспроизводимостью. Поэтому, начиная с середины 70-х годов, он становится основным аналитическим методом для определения противотуберкулезных лекарств в сыворотке и плазме крови.

##### 2.8.4.1. Подготовка проб для ВЭЖХ.

Подготовка пробы в химическом анализе часто является длительной, трудоемкой и, вследствие этого, наиболее дорогостоящей частью аналитического процесса. Ее целью может быть удаление из пробы веществ, мешающих определению, перевод определяемого соединения в форму, удобную для анализа, концентрирование определяемого соединения. Обычно подготовка пробы состоит из нескольких стадий, каждая из которых требует определенного времени и является дополнительным источником погрешности.

Сыворотка крови содержит белки (70-80 мг/мл), минеральные соли (около 7,5 мг/мл), липиды (4-8 мг/мл). Кроме этого, в ней содержится большое количество низкомолекулярных органических веществ, которые потенциально могут мешать проведению анализа: гормоны, биогенные амины, витамины, креатин, креатинин, билирубин, мочевая кислота и др. Показано, что при прямом введении сыворотки крови в колонку с обращенной фазой (ОФ) присутствующие в ней белки, липиды и некоторые другие компоненты вызывают заметное уменьшение эффективности колонки, а осаждение этих веществ на поверхности сорбента и на фильтрах колонки резко повышает ее гидродинамическое сопротивление. Такой подход в настоящее время не используется.

Современные методы подготовки биологических проб направлены либо на удаление мешающих компонентов (осаждение белка) с последующим анализом супернатанта, либо на извлечение определяемого вещества из биологической матрицы (методы экстракции).

**Твердофазная экстракция (ТФЭ)** как метод подготовки пробы используется весьма широко [13, 25]. Эффективность колонок-картриджей для ТФЭ составляет всего 50-100 тт (теоретических тарелок), и их применение позволяет отделить только те компоненты, которые значительно отличаются по удерживанию от определяемого вещества. Но главным лимитирующим фактором является ограниченное время эксплуатации

экстракционной колонки, которое зависит от характера и объема инжестируемой пробы, а необходимость менять картридж сильно увеличивает стоимость анализа.

**Осаждение белка.** Метод осаждения белка используется или как самостоятельный метод подготовки пробы, или как промежуточная стадия для других методов. Эта процедура простая, быстрая и недорогая и поэтому довольно распространена при подготовке проб биологических жидкостей, содержащих белки. Белки осаждают добавлением к пробе органических растворителей (ацетонитрил, метанол), неорганических солей или сильных кислот с последующим центрифугированием. Для избежания потерь анализа важно, чтобы добавление любого из этих реагентов разрушало комплекс белок - лекарственное вещество. Кратность разбавления образца при добавлении осадителя варьируется от 1 до 5, чаще 2-3, а степень извлечения определяемого вещества обычно находится в интервале 90-100%.

Наиболее часто используемым реагентом для осаждения белков с последующим анализом супернатанта методом ВЭЖХ для противотуберкулезных препаратов является трихлоруксусная кислота (ТХУ) – она используется авторами в подавляющем большинстве работ по определению концентрации изониазида, пиразинамида и рифампицина, а также их производных [26,27,28,29]. Авторы используют различные концентрации ТХУ (10 % и 30 %), соотношение объемов плазмы и раствора ТХУ (водного или спиртового), а также способы нейтрализации буферными растворами [26].

Наиболее удобным реагентом для осаждения белков с последующим анализом супернатанта методом ВЭЖХ с УФ детектированием является ацетонитрил. Высокое содержание ацетонитрила в пробе после осаждения белков значительно уширяет хроматографические пики на колонках с обращенной фазой, что наиболее заметно при анализе гидрофильных веществ. Для решения этой проблемы применяют экстракцию ацетонитрила из супернатанта хлороформом или хлористым метиленом.

После осаждения белка в пробе остается довольно большое количество эндогенных компонентов, которые мешают при анализе проб с низкими концентрациями лекарственных веществ. Кроме этого, в пробе остаются высокогидрофобные компоненты сыворотки, которые поздно элюируются и, тем самым, удлиняют время анализа. Более того, они могут вообще не элюироваться и аккумулироваться в колонке при каждом введении пробы, постепенно снижая ее эффективность. Однако, несмотря на все вышеперечисленные недостатки, осаждение белка с последующим инжестированием супернатанта остается наиболее широко используемым методическим приемом.

**Жидко-жидкостная экстракция (ЖЖЭ)** – традиционный метод подготовки проб, требующих концентрирования определяемого вещества перед анализом. Экстракция

лекарственных веществ выполняется после осаждения белка [30] или напрямую из биологической матрицы [31,32,36]. Селективность экстракции зависит от различия коэффициентов распределения вещества-аналита и эндогенных компонентов. После экстракции неполярными экстрагентами целевой раствор наряду с определяемым веществом содержит большое количество липидных компонентов плазмы (сыворотки). Одним из способов дальнейшей очистки экстракта может быть реэкстракция определяемого вещества слабыми растворами кислот или оснований.

Недостаток ЖЖЭ – необходимость использования больших объемов высокочистых, дорогих и токсичных органических растворителей, а сама процедура экстракции трудоемка, длительна и требует упаривания экстрагента [33,36].

#### 2.8.4.2. Химическая дериватизация.

Вещества, которые не поглощают или слабо поглощают в УФ-области спектра, можно детектировать в виде УФ-поглощающих производных (дериватов), получаемых в результате специальных реакций.

Дериватизационными реагентами, используемыми для определения изониазида методом ВЭЖХ, являются 4-гидроксибензальдегид [34], коричный альдегид [27,28], салициловый альдегид [32], 5-метилфуран-2-карбоксияльдегид [34], пропионовый альдегид [8] и 2-флюоренкарбоксияльдегид [29], которые представлены на рис. 4.

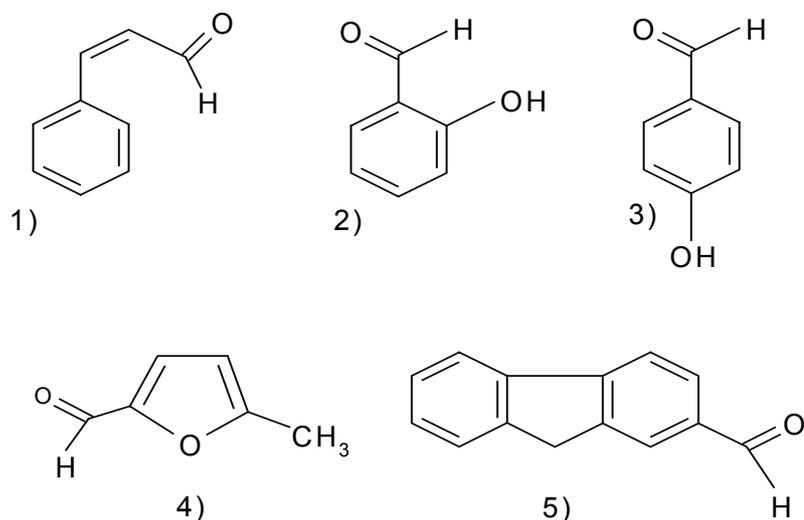


Рис. 4. Дериватизационные реагенты:

- 1) коричный альдегид; 2) салициловый альдегид; 3) 4-гидроксибензальдегид;
- 4) 5-метилфуран-2-карбоксияльдегид; 5) 2-флюоренкарбоксияльдегид.

Преимуществом введения данной стадии в процесс анализа является возможность увеличить молекулярную абсорбцию деривата относительно исходного соединения в 3-4

раза [33] и тем самым уменьшить предел обнаружения метода, а также это позволяет в некоторых случаях разделить вещество и его производные, например, INH и AcINH, который без предварительного гидролиза не вступает в реакцию дериватизации. Однако, если метод обладает достаточной чувствительностью и позволяет достигать приемлемого разделения без введения данной стадии, то от неё целесообразно отказаться, поскольку это сильно увеличивает время анализа.

#### 2.8.4.3. Обзор ВЭЖХ методов определения изониазида и ацетилизониазида.

Мирошниченко, Тюняев, Зуев [5] предложили метод определения INH в сыворотке крови с осаждением белков в две стадии: 10%  $Zn_2SO_4$  в воде, а затем метанолом. Определение проводили на колонке – Nucleosil  $C_{18}$ , 5 мкм, 150\*4 мм (Медикамент, Орел, Россия) с предколонкой того же зернения 10\*4 мм. Элюент состоял из смеси 0,05 М фосфатного буфера (pH 4,5) и метанола 9:1 по объему с добавлением октилсульфоната натрия 150 мг/л. Использовался УФ-детектор, длина волны 266 нм. Линейный диапазон 0,2-50 мг/л, предел обнаружения 0,2 мг/л. Время удерживания изониазида - 4,6 мин

Садег с сотрудниками [28] разработали метод определения изониазида в сыворотке крови с осаждением белков добавлением 30% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) 5:1 с последующей дериватизацией с коричневым альдегидом (0,1% раствор). Колонка Nova-pak  $C_{18}$ , 4 мкм, 125\*3,9 мм (Waters, Milford, США). Элюент: вода – ацетонитрил – триэтиламин - уксусная кислота (600:400:2:1), pH 5±1. Длина волны 340 нм. Линейный диапазон 0,2-10 мг/л. Предел обнаружения 0,02 мг/л. Время удерживания изониазида 1,95 мин

Далее представлены методики одновременного определения изониазида и ацетилизониазида в плазме и моче.

В своей работе Моусса с сотрудниками [26] предложили метод одновременного количественного определения как INH, так и AcINH в интервале концентраций 0,5 -8 мг/л и 1-16 мг/л, соответственно, после осаждение белков 10% ТХУ с последующей нейтрализацией аммоний ацетатным буфером (0,5 М, pH 8,2). В качестве внутреннего стандарта использовался никотинамид. Анализ проводился на колонке  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  (Waters), 300\*3,9 мм, изократическое элюирование: аммоний ацетатный буфер (pH 6,0) – ацетонитрил (99:1 по объему), детекция на 275 нм. Предел обнаружения для INH и AcINH 0,5 и 1 мг/л. В данной работе были показано существенное влияние компонентов плазмы на определение.

Свенсон, Мухтар и Эриксон [8] разработали метод одновременного определения INH, AcINH в плазме и моче человека. Пробоподготовка: осаждение белков ультрафильтрацией с последующей дериватизацией пропионовым альдегидом в

присутствии 25 % фосфорной кислоты - для плазмы, реакция с альдегидом в 0,1 М HCl и далее пропускание реакционной смеси через Sep-Pac C<sub>18</sub> картридж – для мочи. Колонка с обращенной фазой Ultrasphere, 5 мкм, 150\*4,6 мм, элюент: 10 мМ натрий дигидрофосфатный буфер (pH 3,0), 1 мМ додецил сульфат натрия и 25% ацетонитрил. Длина волны 270нм. Установлена линейная зависимость для изониазида в интервале 3-150 мкмоль/л в плазме, 12 мкмоль/л - 12 ммоль/л в моче, для ацетилизониазида 2,85-114,25 мкмоль/л в плазме и 11,4 мкмоль/л – 11,4 ммоль/л в моче. Предел обнаружения для INH и AcINH в плазме 1 мкмоль/л, а в моче 4 мкмоль/л. Время удерживания INH и AcINH 5,8 и 4,5 мин, соответственно.

Кита, Танигава и Чиказава [35] разработали метод для определения корреляции генотипа и фенотипа ацетилирования у туберкулезных больных. Образцы мочи после центрифугирования, фильтрования и разбавления анализировались на колонке с обращенной фазой Chemcobond 5-ODS-H, 5 мкм, 250\*4,6 мм, (Chemco, Япония). Элюент: 10 мМ раствор NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1мМ додецил сульфат натрия и 20% ацетонитрил. Детекция на 266нм. Калибровочные кривые были линейны в диапазоне 0,125-4,0 мкг/мл и 0,125-8,0 мкг/мл для INH и AcINH, соответственно. Время удерживания INH и AcINH 10,5 мин и 5,5 мин, соответственно.

#### 2.8.4.4. Обзор ВЭЖХ методов определения пипразинамида и его производных.

Мехмедагик с сотрудниками [12] предложили метод определения пипразинамида и его метаболитов в моче крыс. Перед введением в колонку Nucleosil 100-5, C<sub>18</sub>, 250\*4 мм (Macherey-Nagel, Германия), которая была защищена картриджем (11\*4 мм) из того же материала, образцы мочи разводились водой в 50-350 раз, а затем фильтровались. Мобильная фаза – 0,01 М KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,2). Линейный диапазон: 0,375 -7,5 мг/л, 0,416-3,33 мг/л, 0,83-6,64 мг/л и 2,83-22,6 мг/л для пипразинамида (PZA), пипразиноевой кислоты (PA), 5-гидроксипипразинамида (5-OH-PZA) и 5-гидроксипипразиноевой кислоты (5-OH-PA), соответственно. Пределы обнаружения 0,3 мг/л для PZA, 0,125 мг/л для PA, 0,09 мг/л для 5-OH- PZA, 0,07 для 5-OH- PA.

Метод, предложенный Краемером и др. [13], позволяет определять в плазме крови PZA, PA, 5-OH-PZA и 5-OH-PA с использованием ион-парного реагента. Образцы крови отбирались в гепариновые пробирки и центрифугировались. К плазме добавлялся KCl (pH 1,8) и внутренний стандарт (N-метил-пипразинамид), смесь экстрагировалась на колонке с привитыми фенильными группами, добавлялся фосфатный буфер, все перемешивалось и упаривалось в токе азота. Остаток растворялся в мобильной фазе, центрифугировался и анализировался. Разделение проводилось на колонке, состоящей из двух стальных колонок (15 см \*4,6 мм, Bischoff, Германия), заполненных ODS-Silica (3 мкм, Shandon).

Мобильная фаза – 0,02 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  буфер (pH 6), метанол (4 % по объему) и 6 мкМ тетрапентиламмоний бромид. Длина волны 268 нм. Диапазоны линейности и время выхода: PZA – 1-80 мг/л, 12,55 мин; PA – 1-40 мг/л, 4,31 мин; 5-ОН-PZA и 5-ОН-PA – 1-50 мг/л и 7,76 мин, 3,5 мин, соответственно. Предел обнаружения для всех аналитов - 0,3 мг/л.

#### 2.8.4.5. Одновременное определение нескольких лекарств в биологических жидкостях с помощью ВЭЖХ.

Гуиллаumont и др. разработали метод определения изониазида, ацетилизониазида, рифампицина и его производного дезацетилрифампицина [36]. Образцы отбирались через 3 часа после приема лекарств. Условия анализа для RIF и INH различались. 1) Для RIF: образец смешивается с ацетоном, центрифугируется, супернатант упаривается, а остаток растворяется в мобильной фазе I (МФИ) (метанол-0,05 М формиат аммония (65:35), pH 7,3), длина волны 254 нм, объем пробы 20 мкл. 2) Для INH и AcINH: остаток, приготовленный по вышеописанной схеме, растворялся в смеси МФI, бутанола и хлороформа. Далее следовало центрифугирование, упаривание органической фракции, растворение осадка в МФII (метанол-вода (5:95) и 5 мМ пентансульфоновая кислота, длина волны 280 нм, объем пробы 90 мкл. Колонка -  $\mu$ -Bondapak  $\text{C}_{18}$  (Waters) (300\*3,9 мм, 10 мкм). Пределы обнаружения и времена выхода: INH – 95 мкг/л, 6,3 мин; AcINH – 85 мкг/л, 5,2 мин; RIF – 17 мкг/л, 7 мин; дезацетилрифимпидин – 10 мкг/л, 4,2 мин

Кухавар и Ринд [29] одновременно определяли изониазид, пиразинамид и рифампицин. Образцы крови объемом 3 мл собирались через 4-5 часов после приема лекарства. Сыворотки смешивали с 2-флюоренкарбоксияльдегидом (0,3 % раствора в этаноле), 10% ТХУ в этаноле и HCL-KCl буфером с pH 2,5. После завершения реакции экстрагировали смесью этанола с хлороформом (2:1) и вводили в колонку YMC-ODS-H, 5 мкм, 150\*4,6 мм (YMC, USA). Элюировали смесью этанол-вода-хлороформ-ацетонитрил (55:40:4:1, по объёму). Длина волны 337 нм. Предел обнаружения для INH, PZA, RIF - 0,02, 0,04 и 2,6 мг/л, соответственно.

Одна из последних работ по определению противотуберкулезных лекарств предлагает способ одновременного анализа INH, PZA, этионамида, морфазинамида, р-аминосалициловой кислоты, никотиновой и изоникотиновой кислоты [37]. Подготовка проб: фильтрации через Millex Fg 13 0,20- $\mu\text{m}$  Millipore фильтр, разбавление 1:20 водой. Анализ проводился на колонке 5- $\mu\text{m}$  Merck-Lichrocart (250\*4,6 мм), защищенной 5- $\mu\text{m}$  Lichrospher 100 RP18 предколонкой. Альтернативно использовались водные растворы трех разных ион-парных реагентов: 1) 5,0 мМ октиламин (pH 3,0); 2) 5,0 мМ октиламин

(рН 8,0); 3) 5,0 мМ 1,6 диаминогексан (рН 6,0). Длина волны 264 нм. Линейность между площадью пика и концентрацией аналита для всех веществ была от 0,094 до 2,00 мг/л.

Кожанова [38] определяла изониазид, пиразинамид, протионамид, рифампицин в сыворотке крови на микроколоночном жидкостном хроматографе “Милихром А-02” (ЭкоНова, Новосибирск). Осаждение белков проводилось 10% ТХУ в случае INH, PZA, протеонамида (PNA) и ацетонитрилом в случае рифампицина. Анализ проводили на колонке ProntoSIL-120-5-C18 AQ, 5 мкм, 2x75мм ( Bishoff, Германия) в градиентном режиме. Элюент А - 0,01 М  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (рН 6,5), элюент Б – ацетонитрил. Многоволновое детектирование на длинах волн 254, 320, 336, 350 нм - для рифампицина, и длинах волн 254, 266, 280, 290, 310 нм -для INH, PZA, PNA. Линейный диапазон 0,5 - 45 мг/л для изониазида, протионамида и рифампицина, 0,5 - 60 мг/л для пиразинамида. Пределы обнаружения для INH, PZA, PNA и RIF - 0,3, 0,2, 0,3 и 0,5 мг/л, соответственно.

Из вышеизложенного можно сделать вывод, что метод высокоэффективной жидкостной хроматографии является наиболее удобным для рутинного определения противотуберкулезных препаратов в биологических средах, т.к. он отличается быстротой, экономичностью, селективностью, достаточной чувствительностью, доступностью приборной базы, возможностью одновременного определения нескольких препаратов при комплексной терапии туберкулеза легких.

Однако, в литературе нам не удалось найти ВЭЖХ метод, позволяющий одновременно определять изонизид, пиразинамид и их основные метаболиты без стадий экстракции или дериватизации, которые удлиняют и усложняют процедуру подготовки пробы и вносят дополнительные погрешности. Кроме того, почти все приведенные выше методы используют стандартные хроматографические колонки 250\*4 мм, тогда, как работа в режиме микроколоночной хроматографии позволяет значительно сократить количество используемых растворителей, время анализа, снизить стоимость анализа.

Все эти факторы обуславливают необходимость разработки нового ВЭЖХ метода с использованием микроколоночной хроматографии, отвечающего всем перечисленным выше требованиям.

## **2.9. Обработка полученных данных.**

Данные, полученные при анализе проб пациентов, обрабатывались в программе ASKID, позволяющей рассчитывать фармакокинетические параметры для разных моделей поведения вещества в организме [39]. Анализ рассчитанных параметров проводился с помощью программы Statistica 6.0 [40,41].

### 3. Экспериментальная часть

#### 3.1. Реактивы.

1. Ацетонитрил, 1 сорт (Криохром, Россия).
2. Перхлорат лития трехводный, х.ч. (Россия).
3. Ортофосфорная кислота, ч. (Россия).
4. Трихлоруксусная кислота, ч. (Россия).
5. Хлорная кислота, х.ч. (Россия).
6. Аммоний фосфорнокислый двузамещенный, ч.д.а. (Россия).
7. Дистиллированная вода ГОСТ 6709-72 (Россия).
8. Октилсульфонат натрия 98% (Sigma, США).
9. Трифторуксусная кислота (ISN, США).
10. Стандартные субстанции лекарственных веществ – изониазида (INH) ацетилизониазида (AcINH), пиразинамида (PZA), пиразиноевой кислоты (PA) - предоставлены Институтом молекулярной биологии и биофизики (ИМБиБ).

#### 3.2. Оборудование.

1. Хроматограф жидкостной микроколоночный "Милихром А-02" (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск).
2. Колонка хроматографическая стальная 2x75мм с сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 AQ (Bishoff, Германия).
3. Весы аналитические электронные "Adventurer" и весы технические электронные "Scout II" (Ohaus Europe, Швейцария).
4. *pH*-метр "Анион-4100" (НПП "Инфраспек-Аналит", Новосибирск), допускаемая погрешность при измерении  $pH \pm 0,03$ .
5. Микроцентрифуга "MiniSpin" (Eppendorf, Германия).
6. Пипетки переменного объема со сменными наконечниками (100 мкл $\pm$ 1,5%, 1000 мкл $\pm$ 1,0%) "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", С.-Петербург).
7. Пипетки со сменными наконечниками (20 мкл $\pm$ 2,0%, 200 мкл $\pm$ 1,5%) "Ленпипет Колор" (ЗАО "ТермоЛабсистемс", С.-Петербург).
8. Колбы мерные (250 мл $\pm$ 0,1%, 100 мл $\pm$ 0,1%).
9. Химические стаканы (50  $\pm$ 0,5 мл).
10. Фильтр "MILLIPORE", 0,22  $\mu$ m Filter Unit (Millipore Corp., США).

### 3.3. Приготовление и хранение растворов.

1. 2 М раствор  $\text{LiClO}_4$  (рН 5,6). 32,1 г  $\text{LiClO}_4$  растворили в 100 мл дистиллированной воды, профильтровали через фильтр с размером пор 0,22  $\mu\text{m}$  – исходный раствор. Хранили при + 4° С.

Растворы  $\text{LiClO}_4$  различной концентрации и с разными значениями рН готовили разбавлением исходного раствора дистиллированной водой, рН до нужного значения доводили 1 М  $\text{HClO}_4$  или 1,9 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

2. 1 М раствор  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (рН 8,6 и рН 6.5). Для приготовления раствора с рН 8,6 13,1 г  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Для приготовления раствора с рН 6,5 раствор с рН 8,5 доводили до рН 6,5 минимальным количеством 1,9 М  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Фильтровали через фильтр с размером пор 0,22  $\mu\text{m}$ . Хранили при + 4° С.

3. Раствор, содержащий 0,4 % октилсульфоната натрия (ОС), 0,1 % трифторуксусную кислоту (ТФУ). Навеску октилсульфоната натрия (0,4 г) помещали в мерную колбу на 100 мл, растворяли в дистиллированной воде, добавляли 100 мкл трифторуксусной кислоты, доводили до метки, перемешивали. Растворы с меньшей концентрацией октилсульфоната натрия и трифторуксусной кислоты готовили соответствующим разбавлением этого раствора дистиллированной водой.

4. 10% трихлоруксусная кислота (ТХУ). Навеску кислоты 10 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды.

5. Стандартный раствор изониазида (INH) и ацетилизоназида ( $\text{AcINH}$ ) по 1 г/л (раствор № 1). Навески INH и  $\text{AcINH}$  по 10 мг растворяли в 10 мл дистиллированной воды, хранили при – 20° С.

6. Стандартный раствор пиразинамида (PZA) 2 г/л (раствор № 2). 20 мг PZA растворяли в 10 мл дистиллированной воды и хранили при – 20° С.

7. Стандартный раствор пиразиноевой кислоты (РА) 1 г/л. 10 мг РА растворяли в 10 мл дистиллированной воды и хранили при – 20° С.

8. Стандартный раствор № 3. Смешивали по 1 мл растворов № 1 и №2. Хранили при – 20° С.

9. Стандартный раствор № 4. Разбавляли раствор № 3 в 20 раз дистиллированной водой для получения концентраций INH,  $\text{AcINH}$  и PZA 25мг/л, 25мг/л и 50 мг/л, соответственно. Хранили при – 20° С.

10. Разбавленные градуировочные смеси для определения INH, AcINH, PZA (калибровочные растворы) готовили из стандартного раствора № 3 методом последовательных разбавлений каждого предыдущего раствора дистиллированной водой в соотношении 1:1. Аналогично готовили разбавленные градуировочные растворы для определения РА. Значения концентраций калибровочных растворов INH, AcINH, PZA и РА представлены в приложении 1 (см. таблицы 1 и 2).

11. Градуировочные смеси (калибровочные растворы) на основе сливной сыворотки. К каждой аликвоте сливной сыворотки объемом 900 мкл, не содержащей определяемых веществ, добавляли 100 мкл стандартного раствора № 3, стандартного раствора РА 1 мг/мл или один из растворов из таблиц 1 и 2 (см. приложение 1). Значения концентраций калибровочных растворов на основе сливной сыворотки представлены в приложение 1 (см. таблицы 3 и 4).

12. Растворы для определения метрологических характеристик метода готовили из стандартного раствора № 3 и раствора РА 1 мг/мл аналогично калибровочным растворам методом последовательных разбавлений каждого предыдущего раствора дистиллированной водой в различных соотношениях. Затем к 100 мкл этих растворов добавляли 900 мкл сливной сыворотки, не содержащей определяемых веществ. Данные представлены в приложение 1 (см. таблицы 5 и 6).

### **3.4. Подготовка сыворотки крови для анализа.**

200 мкл сыворотки крови или любой градуировочной смеси из таблиц 3–6 помещали в полипропиленовую пробирку на 1,5 мл, добавляли 100 мкл 10% трихлоруксусной кислоты, интенсивно перемешивали, центрифугировали 5 минут при 12100 g, отбирали 100 мкл для анализа.

## 4. Результаты и обсуждение

### 4.1. Исходные условия хроматографического разделения INH, AcINH и PZA с использованием системы с гидрофосфатом аммония.

Отправной точкой исследований послужила ранее разработанная методика определения INH, PZA и рифампицина (RIF) в сыворотке крови с использованием микроколоночного жидкостного хроматографа "Милихром А-02" [38], отличающаяся простотой пробоподготовки и экспресностью. Преимуществом методики является также применение многоволнового детектирования, широкий диапазон определяемых концентраций. На рис.5 показана хроматограмма сыворотки крови с добавками INH, AcINH и PZA, выполненная по описанной в работе [38] методике, (градиентный режим элюции, элюент А – 0,01 М  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH 6,5, элюент Б – ацетонитрил). Из рис.5 видно, что в предложенных условиях изониазид и его ацетильное производное не разделяются.

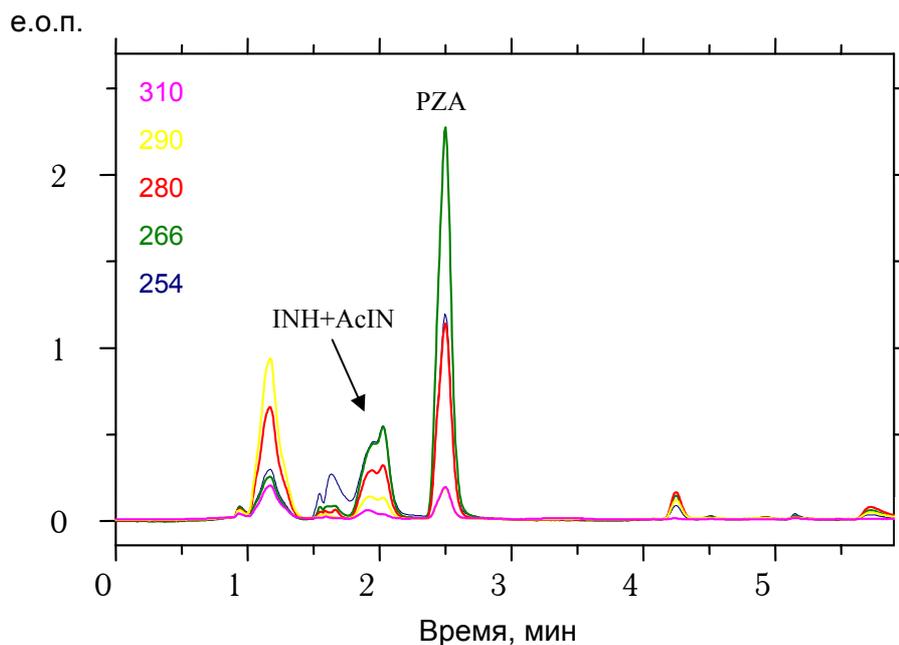


Рис. 5. Хроматограмма сыворотки крови с добавкой INH, AcINH и PZA с концентрациями 50, 50, 100 мг/л, соответственно. Условия хроматографирования приведены в [38].

В связи с этим возникла необходимость разработки новой методики, которая бы позволила решить задачу одновременного количественного определения изониазида, ацетилизониазида, пиразинамида, а также пиразиновой кислоты, сохраняя при этом все преимущества методики, описанной ранее.

## 4.2 Оптимизация условий хроматографического разделения INH, AcINH и PZA с использованием системы с перхлоратом лития.

В качестве исходной подвижной фазы для оптимизации хроматографических условий одновременного определения INH, AcINH и PZA были выбраны следующие компоненты: элюент А – раствор перхлората лития, элюент Б – ацетонитрил. Выбор перхлората лития обусловлен тем, что исследуемые соединения (INH и AcINH) являются гидрофильными веществами основного характера, положительно заряженными практически при всех рабочих значениях pH элюента, поэтому они плохо удерживаются на колонке с обращенной фазой. Перхлорат лития позволяет увеличить времена удерживания гидрофильных веществ за счет того, что анион  $\text{ClO}_4^-$ , являясь слабым ион-парным агентом, взаимодействует с положительно заряженными соединениями, способствуя увеличению гидрофобности образуемого комплекса; а катион  $\text{Li}^+$  экранирует остаточные силанолы неподвижной фазы колонки, чем способствует уменьшению размывания хроматографических пиков. К тому же, увеличение времен удерживания определяемых веществ позволит уменьшить влияние компонентов сыворотки, выходящих в свободном объеме колонки.

В качестве исходных условий элюирования для хроматографа "Милихром А-02" и колонки ProntoSIL-120-5-C18 AQ были выбраны условия, реализуемые для определения веществ с применением базы данных "ВЭЖХ-УФ" (градиент 5-100 % Б за 4000 мкл, скорость 150 мкл/мин) [42], поскольку эти условия являются оптимальными для большого числа лекарственных соединений, в том числе и гидрофильных.

Оптимизируемыми параметрами являлись:

- форма градиента;
- значение pH элюента А;
- ионная сила элюента А.

Критериями для определения наилучших условий разделения были разрешение (R) для пары INH и AcINH (R не ниже 1,5) и максимально большая разница между объемами удерживания этих лекарств и свободным объемом колонки.

Наилучшие хроматографические условия для системы с перхлоратом лития оказались следующие:

- элюент А – 0,01 М  $\text{LiClO}_4$  -  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , pH 2,3;
- элюент Б – ацетонитрил;
- градиент 0-2 % Б за 1200 мкл;
- расход элюента - 100 мкл;

- длины волн детектора - 250, 266, 280, 310 нм;
- постоянная времени детектора – 0,18 с;
- температура – 40<sup>0</sup>С;
- объем пробы - 10 мкл;
- предобразец – 1 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 8,6) 2 мкл.

На рисунке 6 приведены хроматограммы сливной сыворотки с добавками лекарств и без добавок, полученные в этих оптимизированных условиях. Рис. 6б иллюстрирует отсутствие веществ, мешающих определению INH, AcINH, PZA.

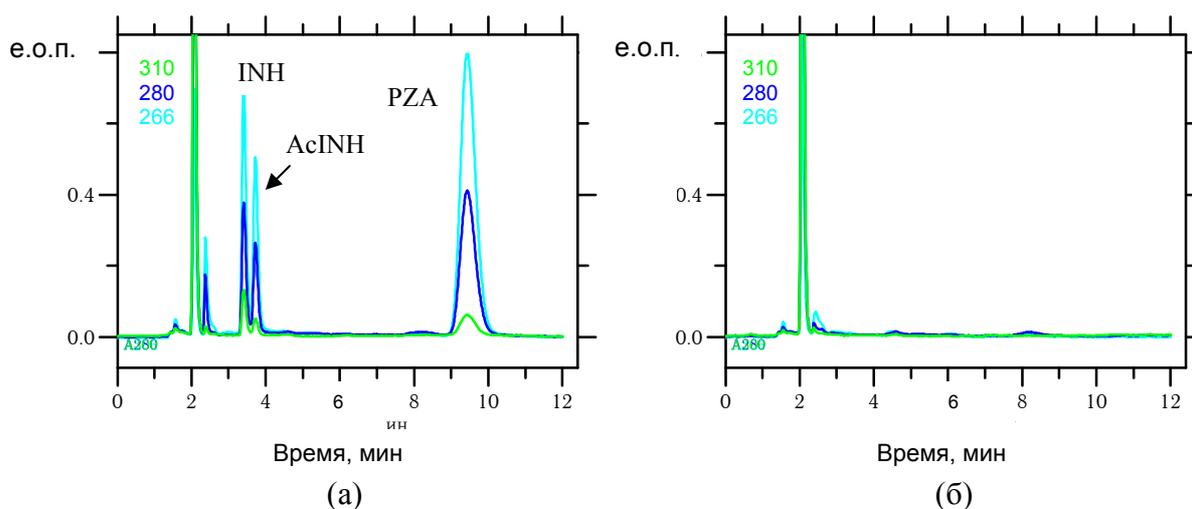


Рис. 6. Хроматограммы сыворотки крови с добавками лекарств (а) и без добавок (б) с концентрациями INH, AcINH, PZA - 25, 25, 50 мг/л, соответственно.

**Вывод:** достигнутое разрешение  $R= 1,2$  для пары INH и AcINH является достаточным для случая примерно равных концентраций INH и AcINH. Однако, в реальных образцах концентрации этих веществ могут меняться в более широких пределах, а все возможности улучшения условий разделения в системе с перхлоратом лития полностью исчерпаны. В связи с этим возникла необходимость перейти к подвижной фазе с использованием ион-парного реагента.

### 4.3 Оптимизация хроматографических условий разделения с использованием октилсульфоната натрия.

#### 4.3.1. Схема работы ион-парного реагента.

Распространенный прием для повышения удерживания гидрофильных ионов, слабо удерживаемых на обращенной фазе, - использование режима ион-парной хроматографии. Для этого в водно-органическую подвижную фазу вводят молекулы, имеющие гидрофобную органическую часть и заряженный ион. Гидрофобная часть молекулы

сорбируется материалом неподвижной фазы обращенно- фазовой колонки, а ионы служат для образования ионных пар с противоположно заряженными анализируемыми компонентами пробы в подвижной фазе по схеме, приведенной на рисунке 7.

Таким образом, удается значительно увеличить времена удерживания положительно заряженных компонентов пробы на обращенно-фазовой колонке, превращенной в динамический катионообменник.

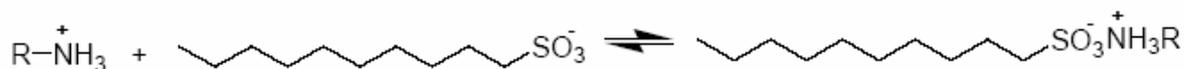


Рис. 7. Схема работы ион-парного реагента.

В качестве ион-парного реагента мы использовали октилсульфонат натрия, имеющий достаточно длинную гидрофобную часть для существенного увеличения времен удерживания INH и AcINH, положительно заряженных при pH 2 - 3 – типичном pH при работе с ион-парными реагентами – анионами. При этих значениях pH разделяемые вещества имеют разный заряд: INH – +2 (константы ионизации, pK<sub>a</sub> = 3,5; 10,8), AcINH - +1 (pK<sub>a</sub> около 3,5), PZA - не имеет заряда (pK<sub>a</sub> = 0,5).

Исходя из теоретических предпосылок, можно ожидать следующий порядок выхода лекарств: PZA выходит первым с практически таким же временем удерживания, как в системе с перхлоратом лития, AcINH выходит вторым со значительной задержкой во времени, INH выходит последним с еще большей задержкой. Справедливость этих предположений подтверждает рисунок 8, на котором представлена хроматограмма водных стандартов трех веществ с октилсульфонатом натрия (ОС) в подвижной фазе. Условия для градиента: элюент А – 0,2 % ОС, 0,02 % ТФУ (pH 2,7), элюент Б – ацетонитрил, градиент 2-80 % Б за 3000 мкл.

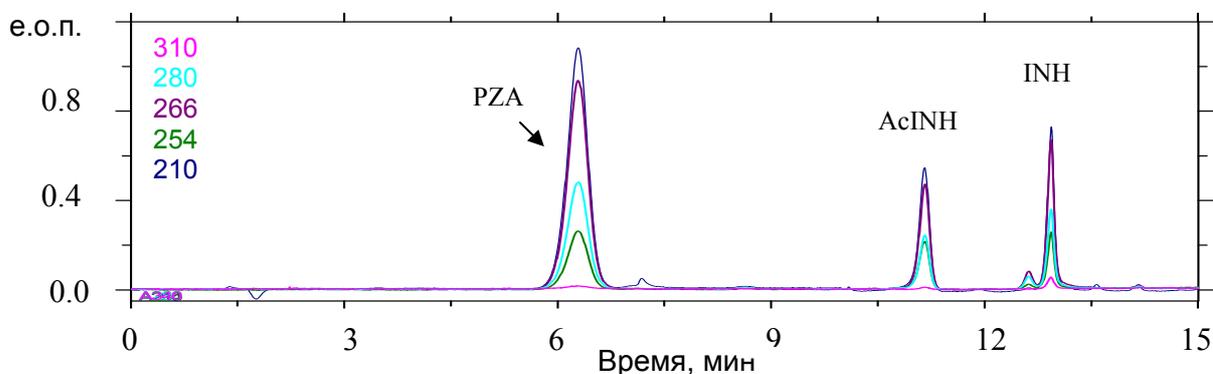


Рис. 8. Хроматограмма водных стандартов INH, AcINH, PZA с октилсульфонатом натрия в подвижной фазе с концентрациями INH, AcINH, PZA - 25, 25, 50 мг/л, соответственно.

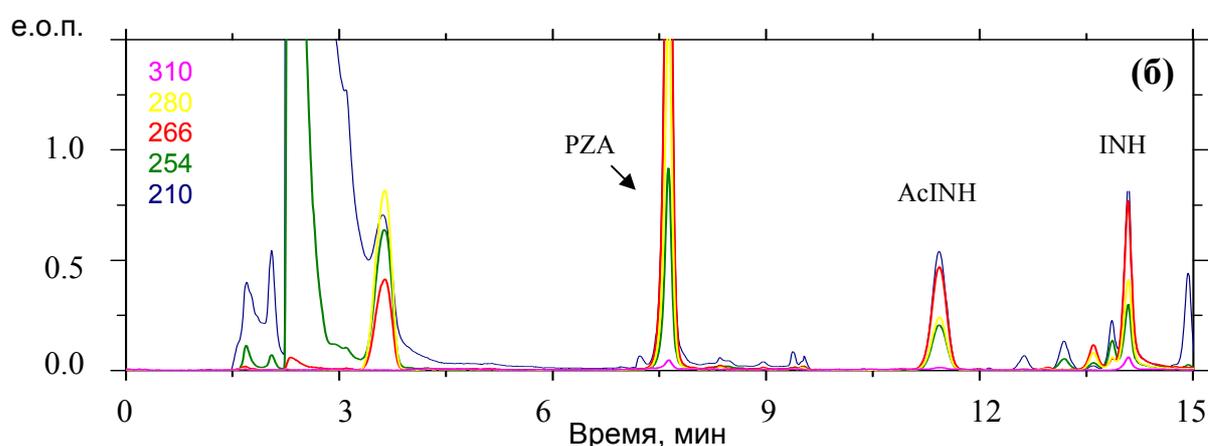
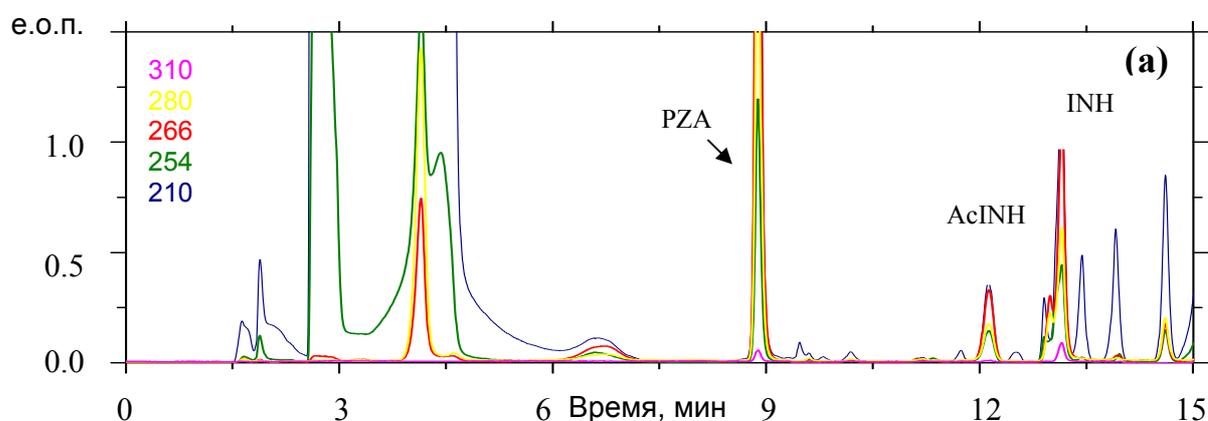
### 4.3.2. Выбор условий хроматографического разделения компонентов в системе с октилсульфонатом натрия.

#### 4.3.2.1. Выбор концентрации октилсульфоната натрия.

Выбор условий проводили на образцах сливной сыворотки крови, не содержащей анализируемых веществ, с добавками INH, AcINH, PZA в концентрациях 25, 25, 50 мг/л, соответственно, с проведением необходимой подготовки пробы для анализа, как описано в разделе 3.4.

Концентрацию октилсульфоната натрия (ОС) выбирали при следующих начальных условиях для градиента: элюент А – 0,02 % ТФУ(рН 2,7), элюент Б – ацетонитрил, градиент 0-40 % Б за 1500 мкл. Концентрация ОС изменялась в пределах 0,02 –1,0 %. Некоторые результаты представлены на рис. 9.

Как видно из рис. 9 а, при концентрации ОС 0,02 % разделение INH с соседними пиками из пробы недостаточное, увеличение концентрации ОС до 1 % (рис. 9 в) приводит к значительному уширению пика AcINH. При концентрации ОС 0,4% (рис. 8б) наблюдаются достаточно большие времена удерживания, незначительное уширение пика AcINH и приемлемое отделение изониазида от соседних пиков. Эта концентрация ОС и была выбрана для дальнейших экспериментов по оптимизации условий.



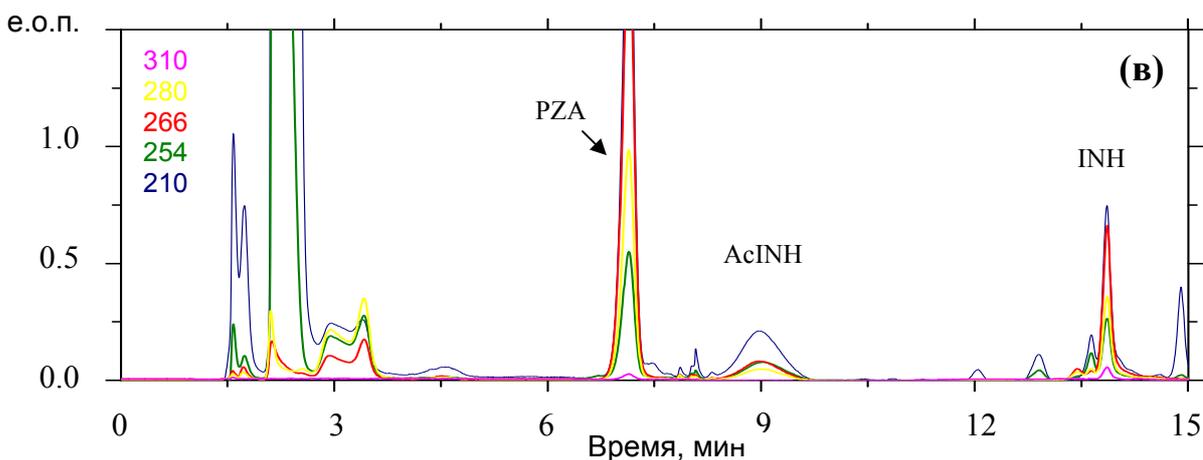


Рис. 9. Хроматограммы сыворотки крови с добавками лекарств при разных концентрациях ОС (концентрация ТФУ - 0,02 %): а) 0,02 % ОС; б) 0,4 % ОС; в) 1 % ОС.

#### 4.3.2.2. Выбор концентрации ТФУ и расхода элюента.

Дальнейшие усилия были направлены на выбор условий, позволяющих окончательно отделить интересующие нас пики от мешающих компонентов пробы. Для это варьировали количество ТФУ, добавляемой в элюент А, от 0,02 % до 0,2 %. Наилучшими оказались следующие условия: 0,1 % ТФУ 0,4 % ОС, градиент 0-50 % Б за 2000 мкл, расход элюента - 150 мкл/мин Скорость потока элюента была увеличена до 150 мкл/мин, что позволило в полтора раза уменьшить время анализа. Результирующая хроматограмма представлена на рис. 10.

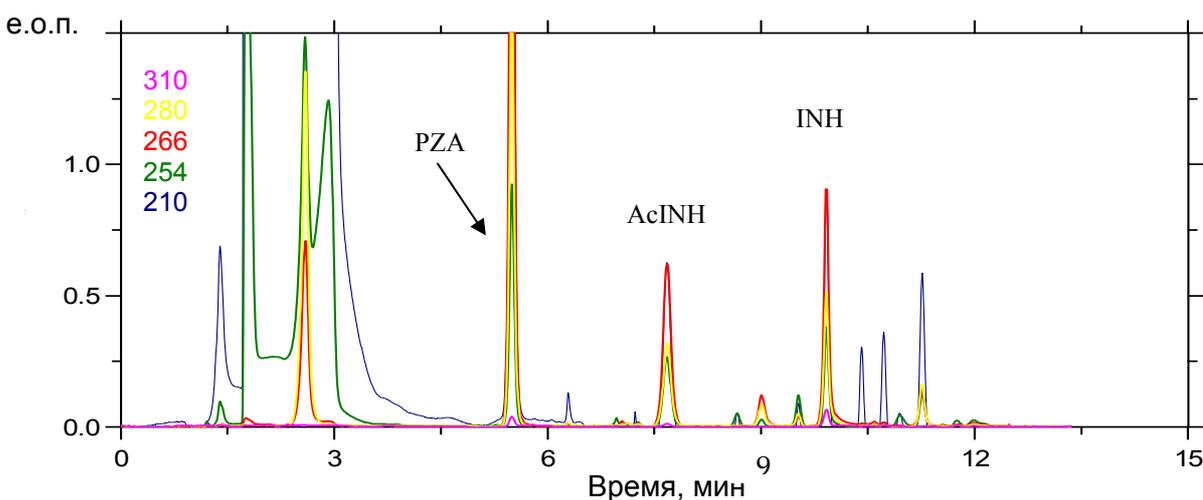


Рис.10. Хроматограмма сыворотки крови с добавками лекарств. Элюент А с 0,1%ТФУ.

#### 4.3.2.3. Выбор объема вводимой пробы.

Для увеличения чувствительности метода был определен максимальный объем пробы, не оказывающий значительного влияния на форму пиков. Результаты

представлены на рис. 11. Видно, что оптимальным объемом пробы как с точки зрения чувствительности, так и формы пиков является  $V_{\text{пробы}} = 20$  мкл.

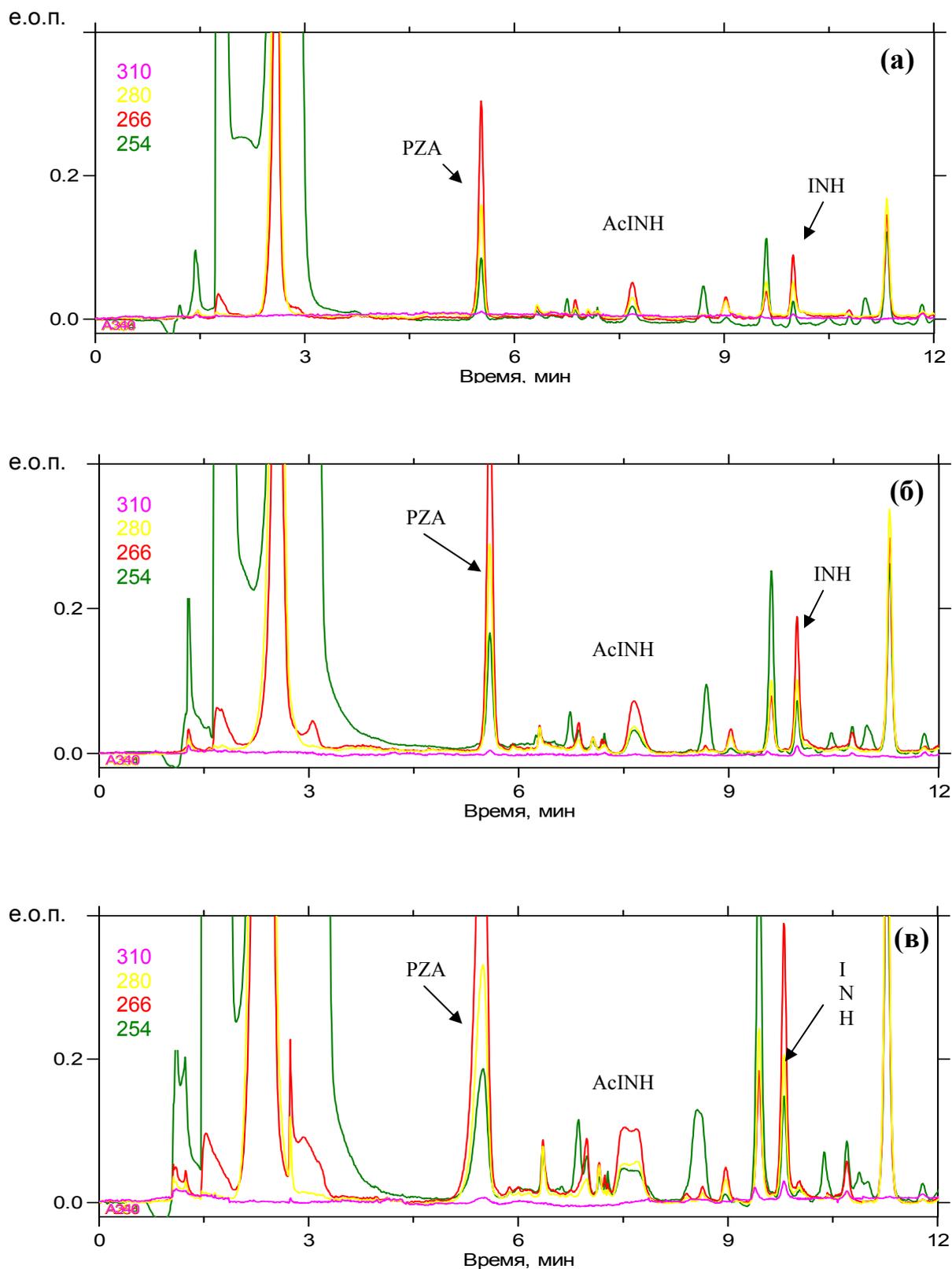
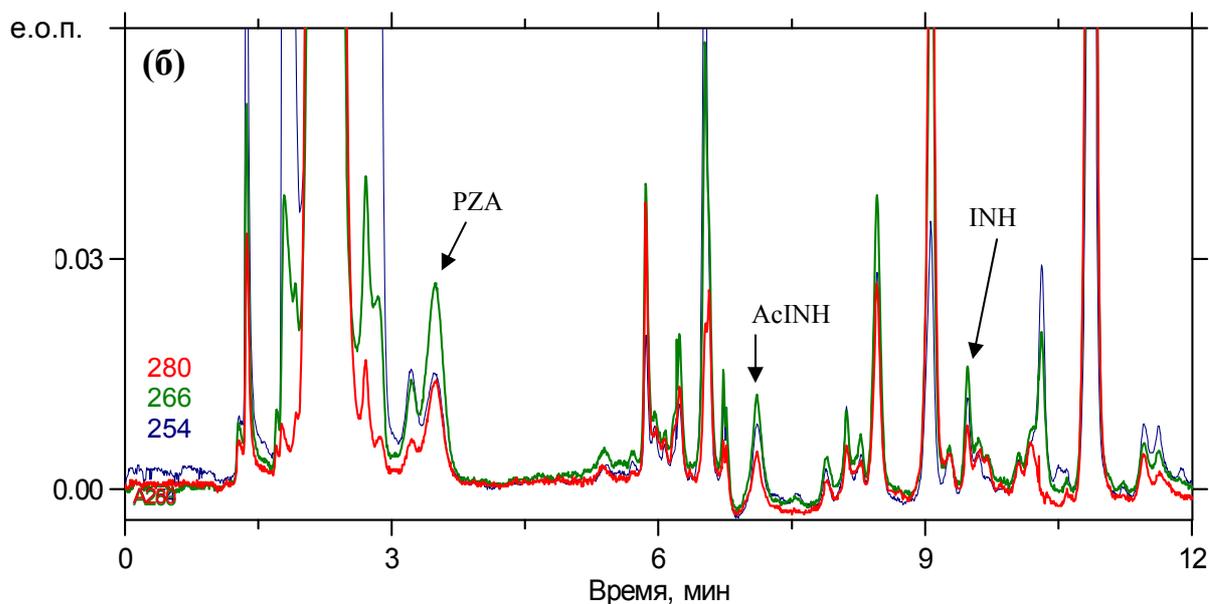
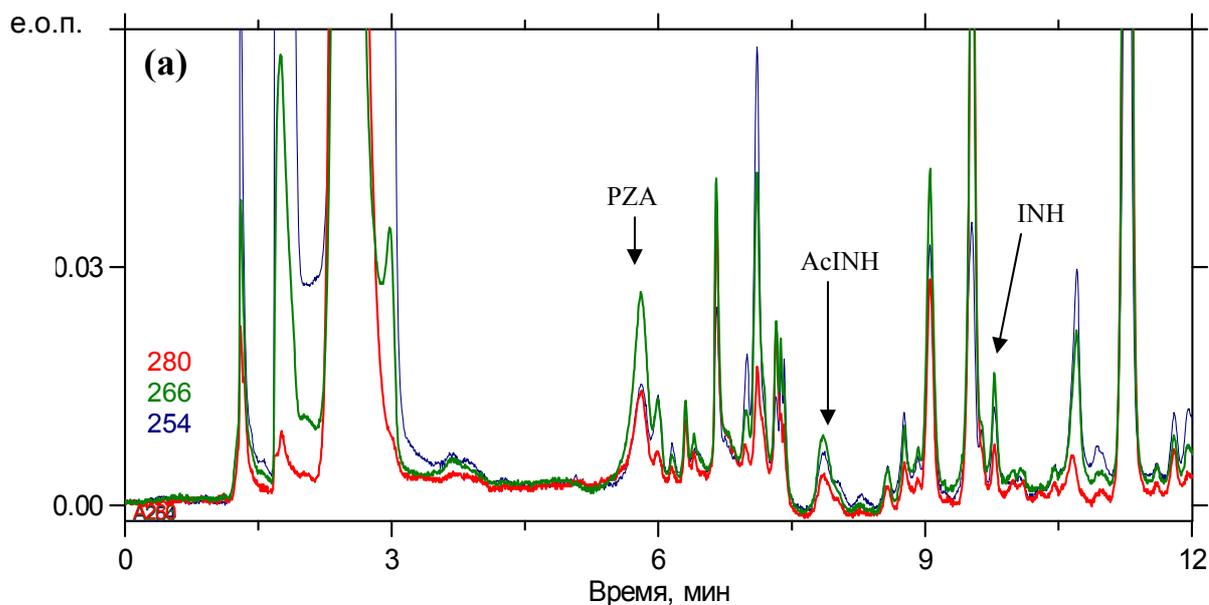


Рис. 11. Хроматограммы с разным объемом пробы:

а)  $V_{\text{пробы}} = 10$  мкл; б)  $V_{\text{пробы}} = 20$  мкл; в)  $V_{\text{пробы}} = 50$  мкл. (PZA - 10 мг/л, INH, AcINH - 5 мг/л).

#### 4.3.2.4. Окончательный выбор формы градиента и условий хроматографования.

При переходе к низким концентрациям (около 0,5 мг/л для INH, AcINH и 1 мг/л для PZA) мы столкнулись с ухудшением разделения определяемых лекарств с соседними пиками – компонентами пробы. Для исправления ситуации потребовалась более тонкая настройка градиента. Влияние небольших изменений в форме градиента на разделение пиков иллюстрирует рис. 12.



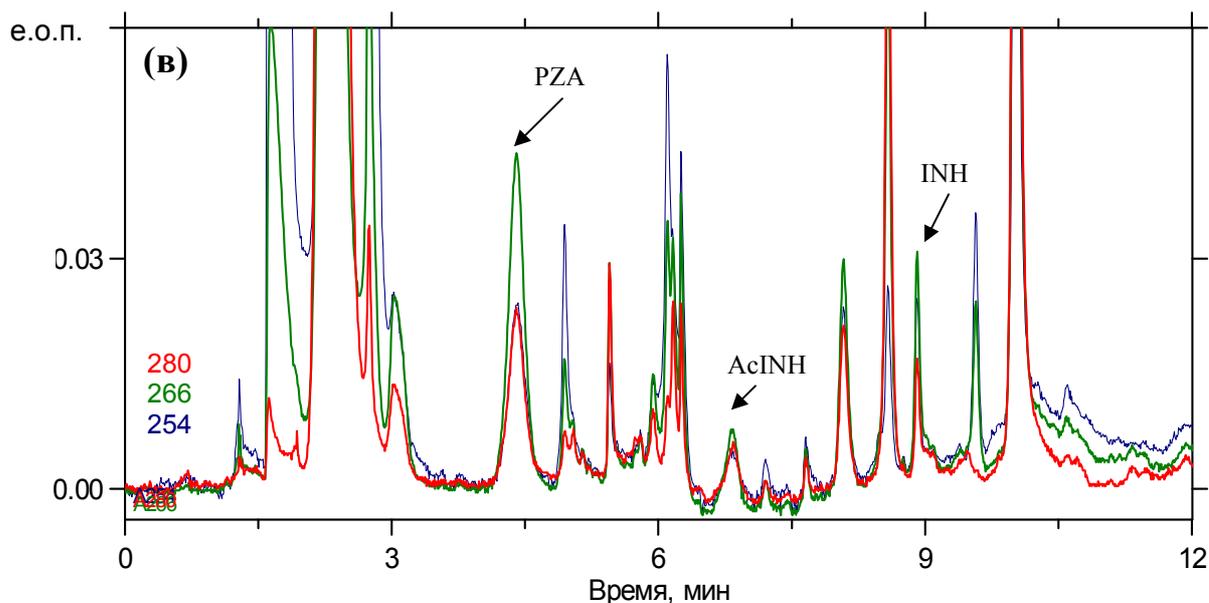


Рис. 12. Хроматограммы сыворотки крови с низкими концентрациями лекарств в градиенте разной формы:  
 а) Градиент 0-50 % Б за 2000 мкл; б) Градиент 3-50 % Б за 2000 мкл;  
 в) Градиент 1-60 % Б за 2000 мкл;

Как видно из рис. 12а и 12б, попытка уменьшить наклон градиента путем увеличения начальной концентрации ацетонитрила на 3%, приводит к существенному сдвигу времени выхода PZA к началу хроматограммы. Наилучший градиент, обеспечивающий отделение определяемых лекарств от мешающих компонентов пробы, показан на рис. 12в.

Добавление в конце хроматограммы дополнительной ступени элюции чистым ацетонитрилом, позволяет отмыть колонку от посторонних гидрофобных компонентов пробы.

Обоснование выбора аналитических длин волн для регистрации хроматограмм описано в разделе, посвященном идентификации веществ. Были выбраны следующие аналитические длины волн: 254, 266, 280 310 нм. Количественный расчет площадей пиков проводили на длине волны 266 нм.

Условия, приведенные на рис. 12 в, кроме INH, AcINH и PZA, позволяют успешно определять также и основной метаболит PZA – пиазиновую кислоту (PA), что показано на рис. 13 на примере хроматограммы сыворотки крови реального пациента.

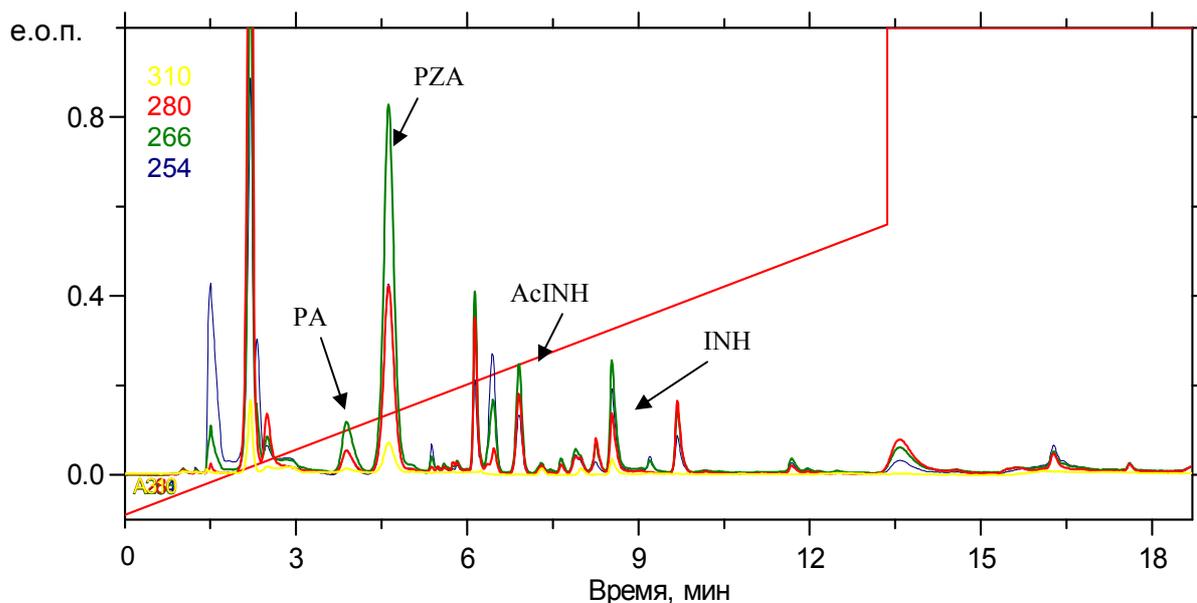


Рис. 13. Хроматограмма сыворотки крови реального пациента, содержащая INH, AcINH, PZA, PA. (PA - 3,94 мг/л, PZA - 31,74 мг/л, AcINH - 6,95 мг/л, INH - 10,12 мг/л). Градиент концентрации элюента Б показан красной линией со ступенькой.

Окончательные условия хроматографического определения INH, AcINH, PZA, PA представлены ниже:

- элюент А – 0,4 % октилсульфонат, 0,1 % ТФУ, рН 2,2;
- элюент Б – ацетонитрил;
- градиент: регенерация - 700 мкл 1 %Б, 1 ступень - 1- 60 % Б за 2000 мкл, 2 ступень - 100 % Б 2000- 2800 мкл;
- расход элюента - 150 мкл;
- длины волн детектора - 254, 266, 280, 310 нм;
- постоянная времени детектора – 0,18 с;
- температура – 40<sup>0</sup> С;
- давление – 2,5 - 5,5 МПа;
- объем пробы - 20 мкл.

#### 4.4 Метрологические характеристики метода.

##### 4.4.1. Градуировочные графики. Пределы обнаружения.

Градуировочные кривые были получены путем добавления известного количества определяемых веществ (INH, AcINH, PZA, PA) в сливную сыворотку крови интактных людей и построения зависимости площади пика от введенного количества компонента.

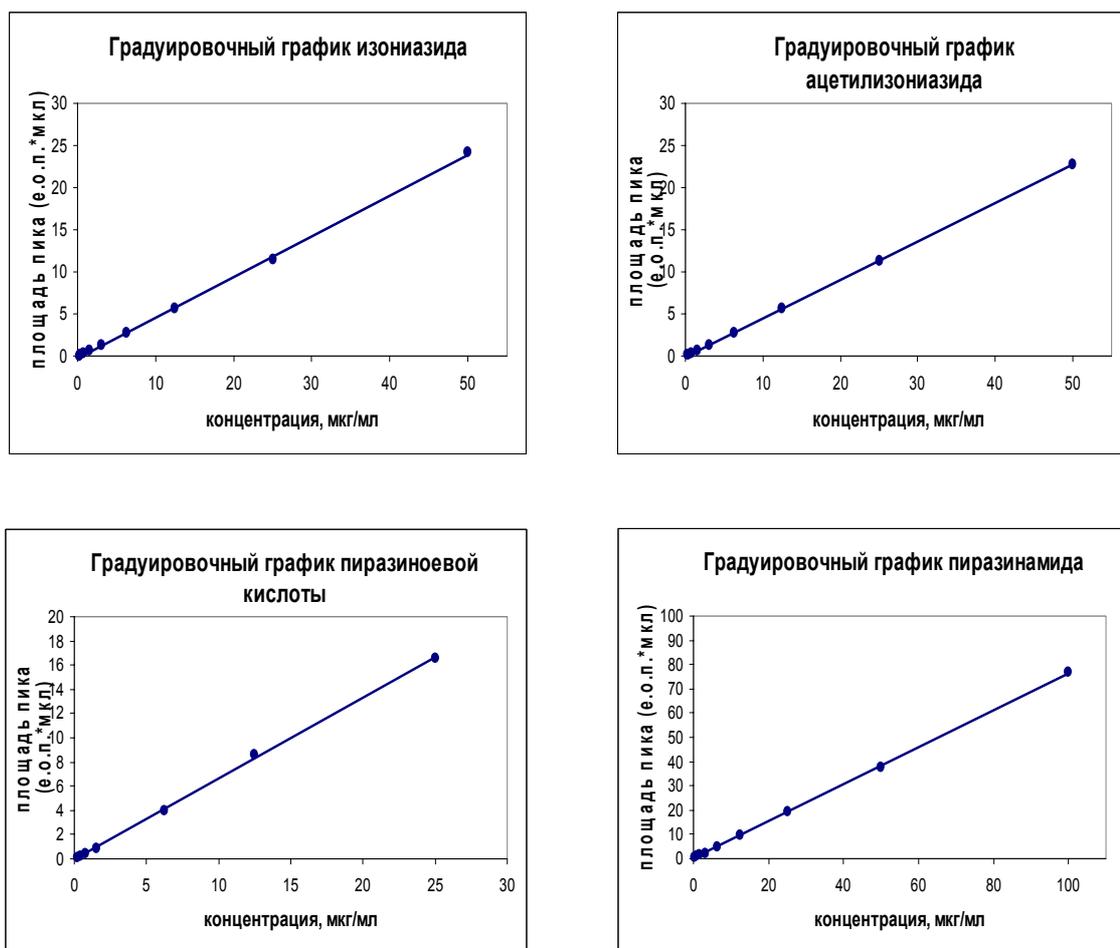


Рис. 14. Градуировочные графики для изониазида, ацетилизониазида, пиразинамида и пиразиновой кислоты.

Регрессионная статистика градуировочных кривых, а также пределы обнаружения и наименьшие определяемые концентрации представлены в таблице 3. Пределы обнаружения рассчитывали как тройное отношение сигнал/ шум. Для наименьшей определяемой концентрации отношение сигнал/ шум приняли равным 10.

Из рис. 14 и таблицы 3 видно, что градуировочные кривые линейны (коэффициенты корреляции составляют 0,9999 для всех определяемых веществ) в широком диапазоне концентраций и проходят через ноль. Низкие пределы обнаружения позволяют работать выше уровня терапевтических концентраций лекарств; для изониазида, например, нижний уровень терапевтической концентрации 1 мг/л, тогда как предел обнаружения вещества - 0,2 мг/л).

На рис. 15 приведены хроматограммы без добавок лекарств и с добавками на пределе обнаружения.

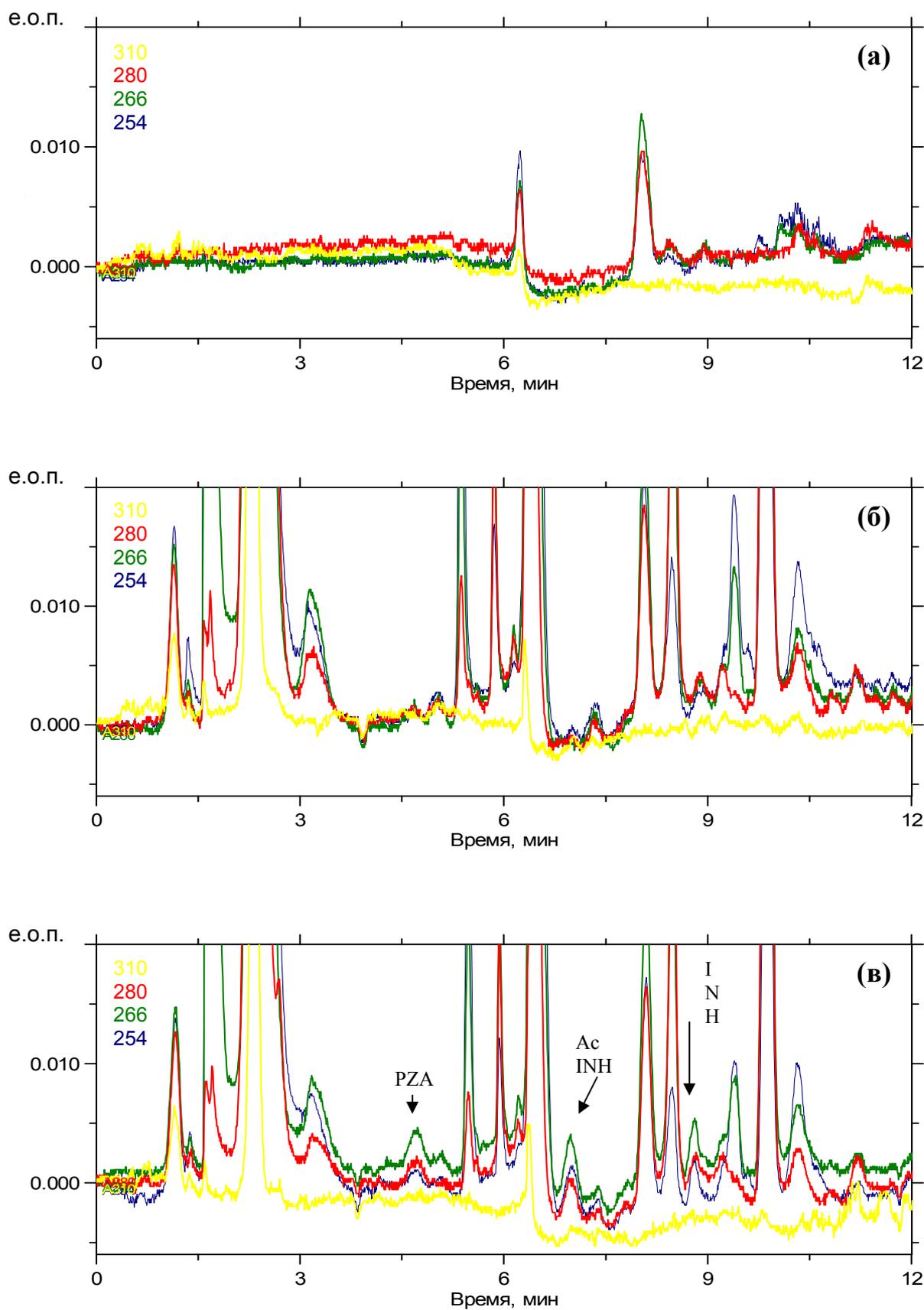


Рис. 15. Хроматограммы вблизи предела обнаружения:

а) холостой градиент; б) сыворотка крови без добавок лекарств; в) сыворотка крови с добавками лекарств на пределе обнаружения (0,06 мг/л PZA, 0,3 мг/л AcINH, 0,2 мг/л INH).

Как видно из рис. 15, на месте выхода изониазида, ацетилизониазида и пиразинамида на длине волны 266 нм, выбранной для количественных расчетов, нет заметно мешающих пиков, что позволяет надежно определять эти вещества в сыворотке крови даже на столь низких концентрациях.

Таблица 3. Регрессионная статистика градуировочных кривых  $y=A+Bx$  (x – концентрация компонента, мг/л, y – площадь пика, е.о.п.\*мкл). Пределы обнаружения и наименьшие определяемые концентрации.

Вещество	PZA	AcINH	INH	PA
Диапазон концентрации, мг/л	0,4-100	0,4-50	0,2-50	0,2-25
Отсечение, A	0,12	-0,04	-0,14	-0,08
$S_A$	0,06	0,02	0,05	0,09
Наклон, B	0,768	0,456	0,484	0,671
$S_B$	0,002	0,001	0,003	0,008
$S_0$	0,15	0,04	0,12	0,19
Коэффициент корреляции, $R^2$	0,99999	0,99999	0,99992	0,99962
СКО, %	1,1	0,8	2,8	4,1
Пределы обнаружения, мг/л	0,06	0,3	0,2	0,2
Наименьшая определяемая концентрация, мг/л	0,2	1,0	0,6	0,6
Количество точек на калибровочной кривой	9	8	7	7

#### 4.4.2. Правильность, сходимость и воспроизводимость метода.

Сходимость метода проверяли, анализируя стандартные растворы, приготовленные на сливной сыворотке, в течение дня. Вычисляли относительное стандартное отклонение для каждого вещества на четырех уровнях концентраций. Воспроизводимость метода оценивали, анализируя аналогичные стандартные растворы в течение 30 дней. Результаты представлены в таблице 4.

Правильность метода проверяли способом введено-найденно для всех веществ на четырех уровнях концентраций. Результаты представлены в таблице 5. Найденная концентрация во всех случаях составляла 98-104 % от введенной, за исключением самых низких концентрационных уровней, где разница достигала 108 %.

#### 4.4.3. Оценка потерь при подготовке пробы.

Оценка потерь лекарств в процессе подготовки пробы проводилась сравнением наклона градуировочных кривых для образцов, приготовленных на основе сыворотки крови, и приготовленных на дистиллированной воде (200 мкл водного раствора лекарств +100 мкл ТХУ). Были получены следующие показатели: процент открытия составлял 95%, 102% и 99 % для пиразинамида, ацетилизониазида и изониазида, соответственно.

Таблица 4. Сходимость и воспроизводимость метода.

Вещество	Уровень концентрации, мг/л	Сходимость: СКО, %	n	Воспроизводимость: СКО, %	n
Пиразиновая кислота	1	4,6	7		
	5	1,6	7		
	10	1,3	7		
Пиразинамид	2	1,9	7	4,8	7
	10	1,4	7	3,2	7
	20	1,1	7	2,1	7
	50	1,2	6	1,6	7
Ацетилизониазид	1	4,4	6		
	5	1,3	6		
	10	1,0	6		
	25	1,0	6		
Изониазид	1	4,8	7	6,2	6
	5	1,4	7	4,0	6
	10	1,2	6	2,3	6
	25	1,3	6	3,5	6

Таблица 5. Оценка правильности метода.

Вещество	Введено, мг/л	Найдено ( $X \pm tS/\sqrt{n}$ , $P=0,95$ ), мг/л	Найдено / введено, %	n
Пиразиновая кислота	1	1,03 ± 0,05	103	7
	5	4,9 ± 0,1	98	7
	10	10,2 ± 0,1	102	7
	25	25,8 ± 0,9	103	6
Пиразинамид	2	2,09 ± 0,04	105	7
	10	10,2 ± 0,1	102	7
	20	20,8 ± 0,2	104	7
	50	50,7 ± 0,7	101	6
Ацетилизониазид	1	1,07 ± 0,06	107	7
	5	5,05 ± 0,07	101	6
	10	10,1 ± 0,1	101	6
	25	25,2 ± 0,3	101	6
Изониазид	1	1,08 ± 0,05	108	7
	5	4,9 ± 0,1	98	7
	10	10,1 ± 0,1	101	6
	25	25,3 ± 0,4	101	6

#### 4.4.4. Селективность определения.

Для проверки отсутствия влияния на определяемые лекарства других применяемых в комбинированной терапии туберкулеза гидрофильных веществ с похожими характеристиками удерживания, были протестированы витамины, имеющие близкие времена удерживания: В<sub>1</sub> – тиамин хлорид, В<sub>3</sub> – никотиновая кислота, В<sub>6</sub> – пиридоксин хлорид. Результаты показаны на рис. 16.

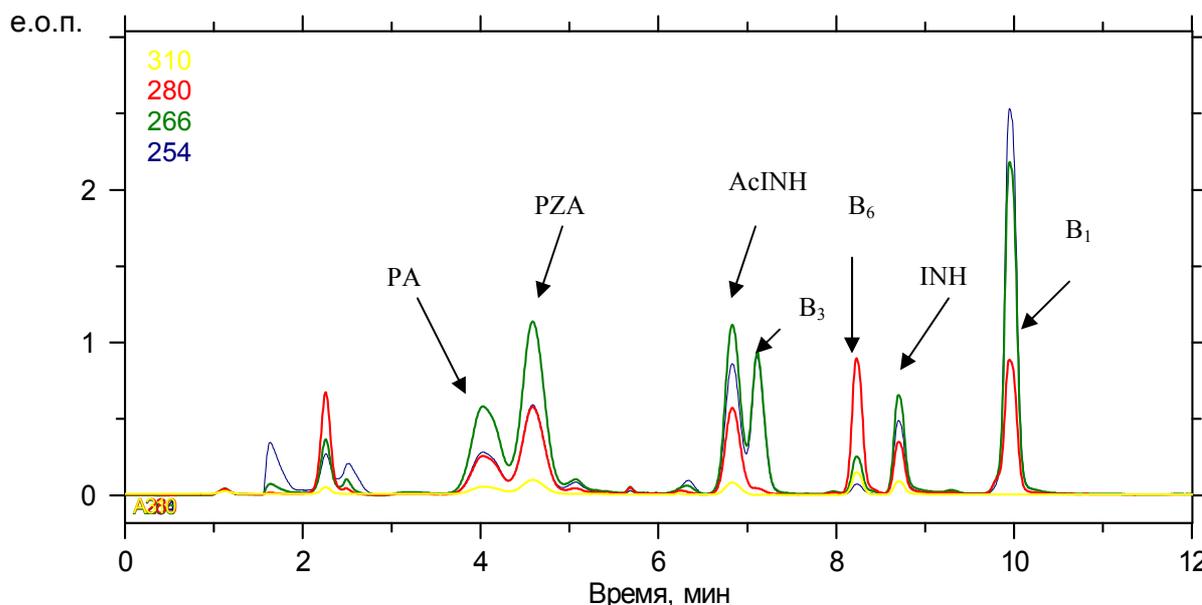


Рис.16. Хроматограмма сыворотки крови с добавками В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>, РА, INH по 50 мг/л и PZA, AcINH по 75 мг/л.

Из рис. 16 можно видеть, что имеется лишь небольшая интерференция между AcINH и никотиновой кислотой, однако, эти вещества имеют существенно разные спектральные характеристики, что позволяет их надежно идентифицировать. Из хроматограммы также видно, что можно проводить количественное определение витаминов данным методом после проведения соответствующей градуировки.

#### 4.4.5. Идентификация лекарств.

На рис. 17 приведены нормированные на длинноволновый максимум спектры поглощения лекарств и их метаболитов. Спектры были записаны в режиме остановленного потока относительно нулевой линии в условиях разработанного метода. Аналитические длины волн (254, 266, 280 и 310 нм) были выбраны вблизи спектрального максимума и на склонах спектра поглощения для каждого вещества таким образом, чтобы обеспечить наиболее точную идентификацию веществ по их спектрам.

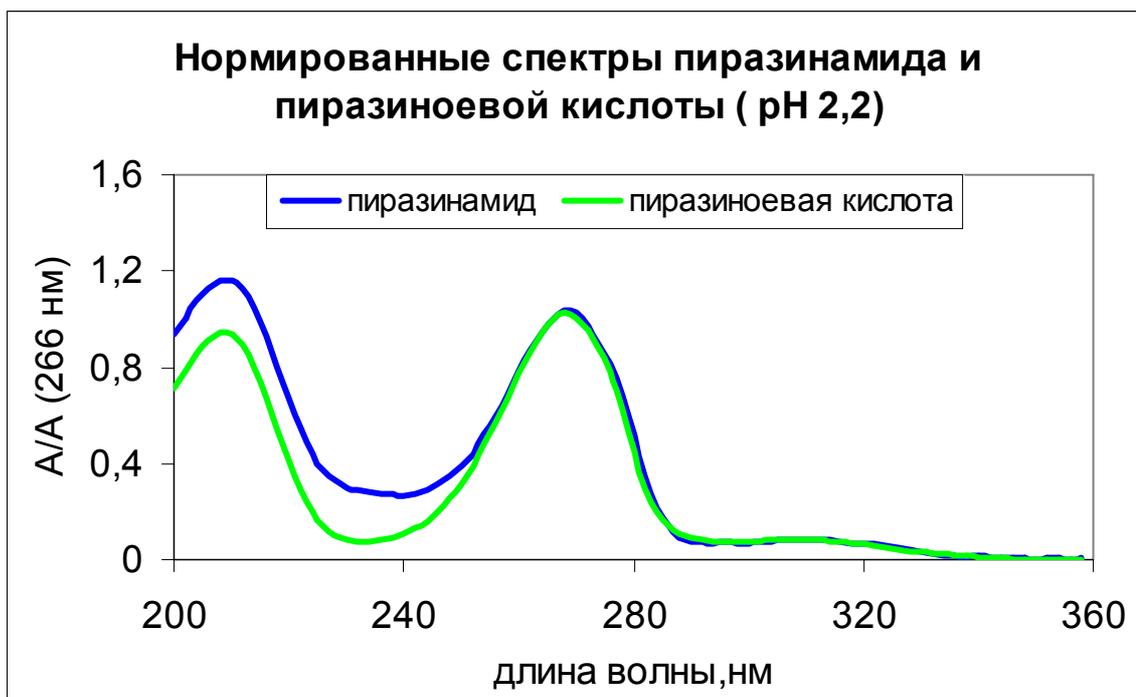
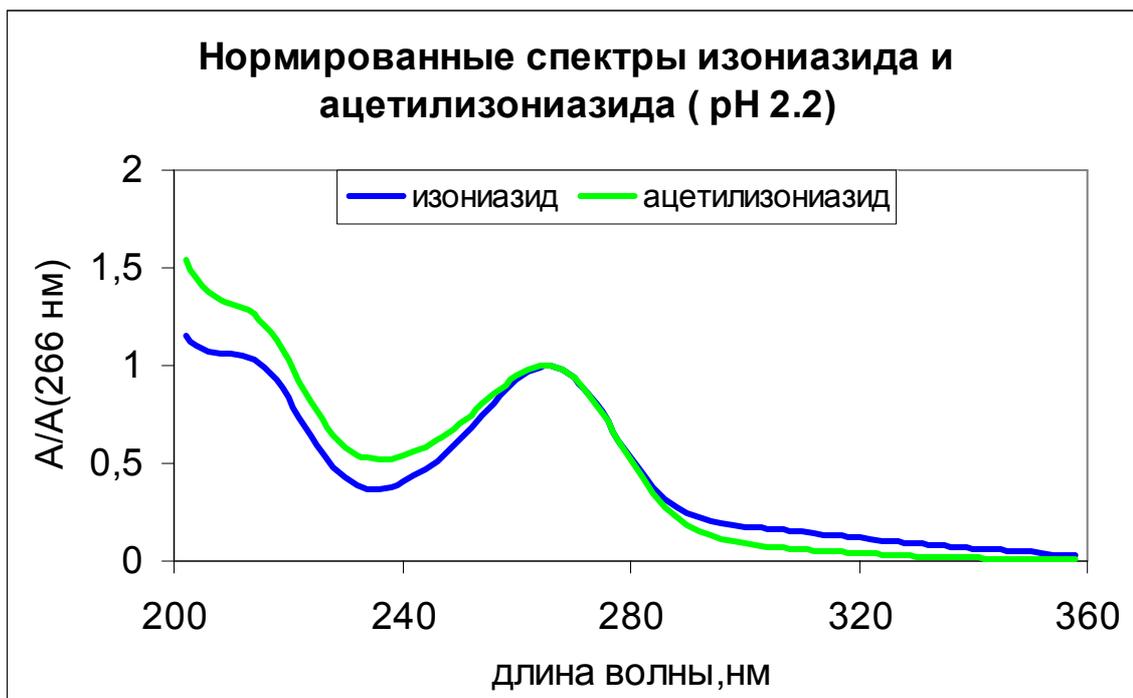


Рис. 17. Нормированные спектры поглощения лекарств и их метаболитов.

Идентификация лекарств на хроматограммах проводилась по спектральным отношениям и объемам удерживания. Спектральные отношения (R) – это отношения площадей пиков (S) на выбранных длинах волн к площади пика на опорной длине волны. Из приведенной ниже таблицы 6 видно, что R определяются с очень маленьким доверительным интервалом. Несмотря на близкие объемы удерживания и большие их вариации для пиразинамида и пиразиновой кислоты, различия в спектральных

отношения позволяют идентифицировать их с высокой степенью надежности. В случае изониазида и его производного спектральные отношения очень близки, но объемы удерживания отличаются значительно и имеют небольшой разброс.

Таблица 6. Спектральные отношения и объемы удерживания.

Вещество	Уровни концентрации, мг/л	Спектральные отношения ( $X \pm 2*S$ )			Объем удерживания ( $X \pm 2*S$ ), мкл
		$S_{254}/S_{266}$	$S_{280}/S_{266}$	$S_{310}/S_{266}$	
Пиразиновая кислота	1	$0,480 \pm 0,055$	$0,447 \pm 0,042$	$0,077 \pm 0,059$	$594 \pm 33$
	5	$0,481 \pm 0,013$	$0,447 \pm 0,023$	$0,083 \pm 0,026$	
	10	$0,487 \pm 0,009$	$0,450 \pm 0,012$	$0,083 \pm 0,012$	
	25	$0,483 \pm 0,003$	$0,450 \pm 0,005$	$0,083 \pm 0,004$	
Пиразинамид	2	$0,569 \pm 0,027$	$0,505 \pm 0,032$	$0,104 \pm 0,026$	$707 \pm 41$
	10	$0,527 \pm 0,007$	$0,514 \pm 0,006$	$0,087 \pm 0,006$	
	20	$0,522 \pm 0,003$	$0,515 \pm 0,004$	$0,084 \pm 0,005$	
	50	$0,518 \pm 0,003$	$0,510 \pm 0,004$	$0,083 \pm 0,001$	
Ацетил-изониазид	1	$0,738 \pm 0,070$	$0,542 \pm 0,079$	$0,082 \pm 0,090$	$1022 \pm 7$
	5	$0,769 \pm 0,021$	$0,524 \pm 0,017$	$0,080 \pm 0,015$	
	10	$0,769 \pm 0,015$	$0,519 \pm 0,007$	$0,078 \pm 0,012$	
	25	$0,770 \pm 0,004$	$0,517 \pm 0,004$	$0,075 \pm 0,003$	
Изониазид	1	$0,784 \pm 0,083$	$0,528 \pm 0,051$	$0,014 \pm 0,088$	$1336 \pm 8$
	5	$0,741 \pm 0,015$	$0,555 \pm 0,031$	$0,144 \pm 0,014$	
	10	$0,746 \pm 0,007$	$0,527 \pm 0,012$	$0,121 \pm 0,021$	
	25	$0,746 \pm 0,005$	$0,532 \pm 0,005$	$0,139 \pm 0,005$	

Подводя итог, перечислим основные преимущества разработанного метода:

- **Возможность определения в ходе одного анализа двух лекарств и двух их основных метаболитов.**
- **Воспроизводимость: СКО 1,6–6.2%.**
- **Правильность: 98 - 108%.**
- **Пределы обнаружения: 0.06 - 0.3 мкг/мл.**
- **Низкий расход элюентов (несколько мл на определение).**
- **Объем пробы: 20 мкл.**
- **Простая подготовка пробы (<10мин).**
- **Одновременная многоволновая детекция (4 длины волны).**

#### 4.5. Зависимость концентрации INH, AcINH, PZA от времени хранения проб при температуре - 20°C.

На завершающем этапе была проведена проверка стабильности при хранении проб сыворотки с добавками лекарств при температуре - 20°C, поскольку в литературе имеются данные о нестабильности препаратов [27,49,50]. Показано, что при - 20°C концентрация PZA в сыворотке остается постоянной в течение месяца (изменение концентрации меньше доверительного интервала). Но уже через 70 дней хранения PZA зарегистрировано достоверное уменьшение его концентрации на 7 % от начальной для уровней концентраций 10 и 50 мг/л, и на 4 % - для 20 мг/л.

Концентрация INH остается постоянной в течение 10 дней, но через 70 дней падает до 72-75 % от начальной величины на всех уровнях концентраций (рис. 18).

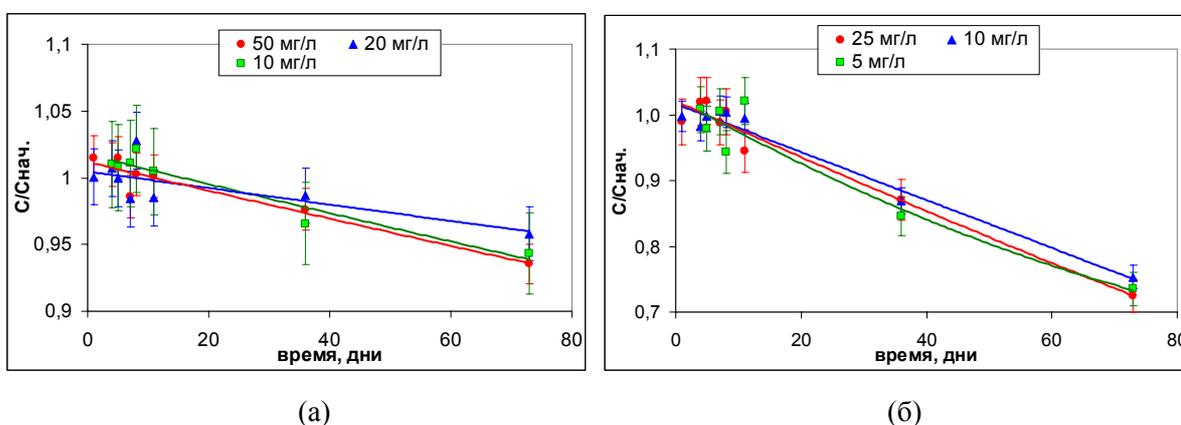


Рис. 18. Изменение концентрации препаратов при хранении проб (T = -20°C): а) PZA; б) INH.

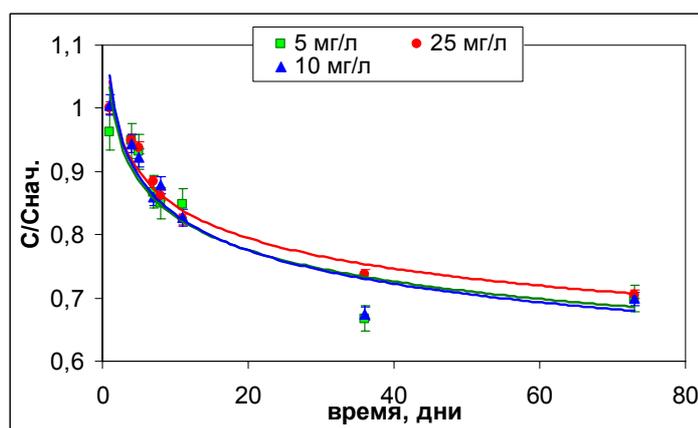


Рис. 19. Изменение концентрации ацетилизониазида при хранении проб (T = - 20°C).

Падение концентрации ацетилизониазида в пробах начинается на вторые сутки. Как видно из рис. 19, в течение первых 10 дней падение имеет экспоненциальный характер, на 36 сутки - достоверный минимум, тем больший, чем меньше концентрация, далее концентрация выходит на плато. На рис.20 показано изменение спектральных отношений R (254/266) и R (280/266) для AcINH при хранении проб.

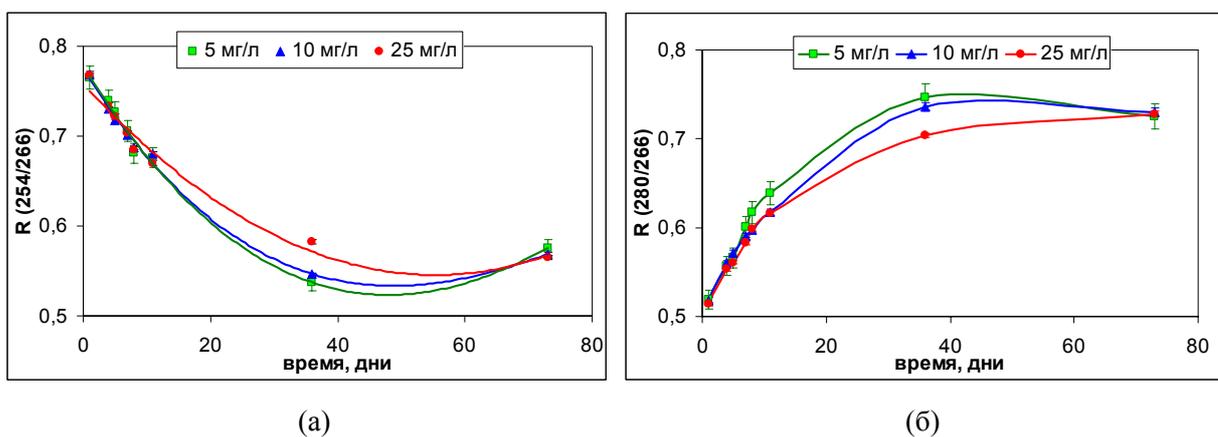


Рис. 20. Изменение спектральных отношений ацетилизониазида при хранении проб,  $T=-20^{\circ}\text{C}$ : а)  $R(254/266)$ ; б)  $R(280/266)$ .

Анализ изменения спектральных отношений позволил предположить, что в процессе хранения, возможно, происходит гидролиз ацетилизониазида до изоникотиновой кислоты, имеющей такое же время удерживания в условиях разработанного метода. Для подтверждения этой гипотезы был записан спектр неизвестного вещества из образца сыворотки крови после 73 дней хранения и спектр стандарта АсINH. Эти спектры сравнивали со спектром изоникотиновой кислоты в кислой среде, полученным из банка спектральной информации Института органической химии СО РАН (рис.21).

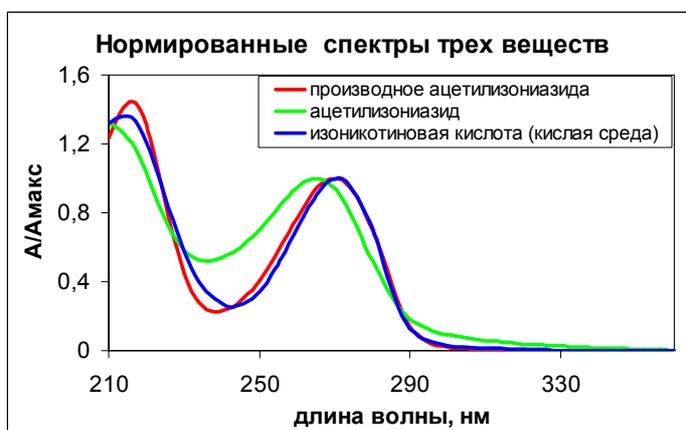


Рис. 21. Сопоставление спектров АсINH, изоникотиновой кислоты и производного АсINH.

Из рис.21 видно, что ацетилизониазид и новое вещество имеют существенно различные спектры, тогда как литературный спектр изоникотиновой кислоты (INA) в кислой среде близок к спектру идентифицируемого соединения. Разницу в спектрах можно объяснить влиянием растворителя (в метаноле, например, минимум поглощения INA находится на 234 нм, а не на 242 нм, как в кислой среде). Вопрос о продукте превращения АсINH при хранении требует дальнейшего исследования.

#### **4.6. Лекарственный мониторинг сывороток крови пациентов.**

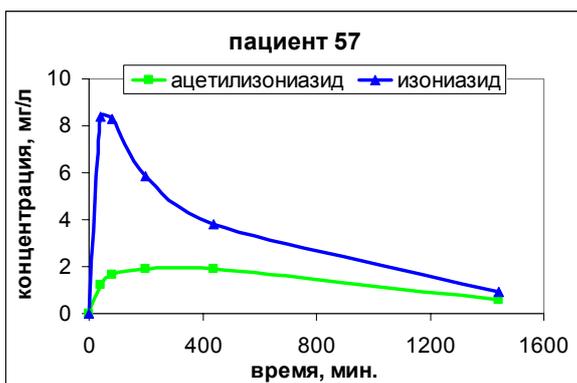
С помощью разработанного метода были проанализированы сыворотки крови 33 больных туберкулезом лёгкого, проходящих курс лекарственной терапии. Отбор проб проводился перед введением изониазида (контрольная точка), через 40, 80, 200, 440 и 1440 минут после внутривенного введения дозы 10 мг/кг. Пиразинамид давался в таблетках из расчета 20 мг/кг за час до взятия первой пробы. Отбор пациентов для апробации метода проводился случайно из группы больных, принимающих участие в широкомасштабном исследовании зависимости фенотипа ацетилирования от разных факторов (генотип, возраст, пол, ранее перенесенные болезни и др.) и его корреляции с разными заболеваниями. Проект был организован Федеральным Государственным учреждением "Новосибирский Научно-исследовательский институт туберкулеза Федерального Агентства по Здравоохранению и Социальному Развитию". Были проанализированы сыворотки крови, отобранные у 15 мужчин и 18 женщин (средний возраст 29 лет, диапазон 18 – 53 года). Более подробные данные приведены в приложении 2.

Были построены концентрационные профили - зависимости изменения концентрации лекарств и их производных от времени. На рис.22 а-б приведены типичные профили для быстрых и медленных ацетиляторов (в построение включена контрольная точка). В ходе проведения анализов выяснилось, что, возможно, некоторые из пациентов забывали вовремя принимать таблетки пиразинамида (см. рис. 22 в-г).

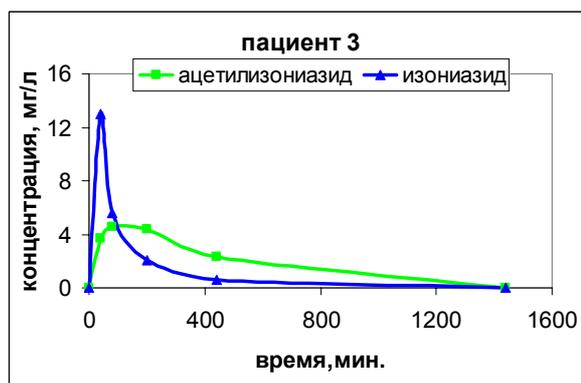
С помощью программы ASKID по полученным данным были рассчитаны основные фармакокинетические параметры элиминации изониазида для всех пациентов в приближении однокамерной модели без всасывания. Более подробные данные приведены в приложении 3.

#### **4.7. Генотипирование пациентов.**

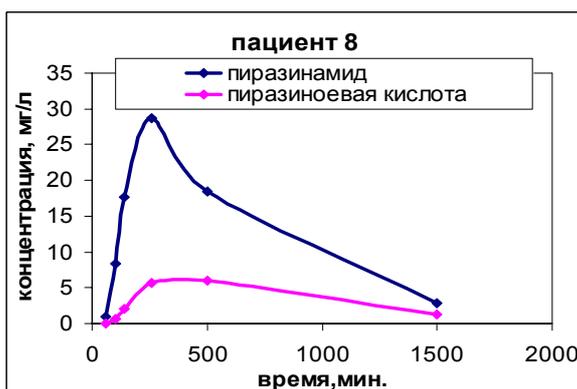
Определение генотипа ацетилирования проводилось по трем наиболее распространенным точечным полиморфизмам (SNP): C481T, G590A, G857A - методами полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов. Замены C481T, G590A, G857A выявляли при помощи эндонуклеаз рестрикции KpnI, TagI, BamHI. За данную работу мы признательны Никишиной Марине Владимировне.



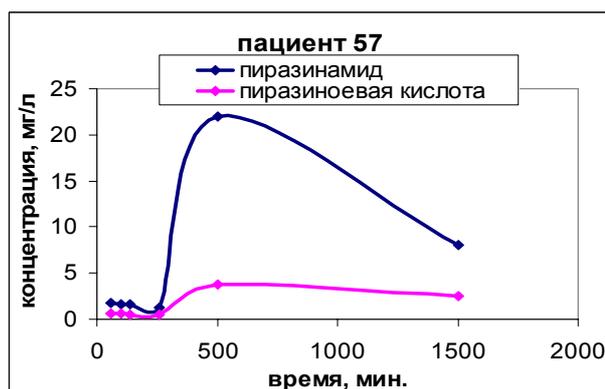
(а)



(б)



(в)



(г)

Рис.22. Концентрационные профили изониазида и ацетилизониазида:

а) медленный ацетилятор; б) быстрый ацетилятор;

в) своевременный прием лекарства; г) несвоевременный прием лекарства.

Дикий тип (без мутаций) – аллель *NAT2\*4* рассматривается как аллель быстрого ацелирования, тогда как *NAT2\*5*, *NAT2\*6*, *NAT2\*7* (дальнейшее разбиение на *NAT2\*5A*, *NAT2\*5B* и *NAT2\*5F*, *NAT2\*6A*, *NAT2\*6B*, *NAT2\*6C* и *NAT2\*6D*, *NAT2\*7A* и *NAT2\*7B* невозможно по трем полиморфизмам) – медленные аллели, содержащие по одному точечному полиморфизму в позициях С481Т, G590А, G857А, соответственно [43]. Исследуемая нами выборка содержала 8 различных генотипов, представленных в таблице 7. Если человек имеет два *NAT2\*4* аллеля – это быстрый ацетилятор (Б), *NAT2\*4/NAT2\*5,6,7* – средний (С), при наличии двух мутантных аллелей - медленный (М). Хотя недавние данные дали основание предполагать, что Б и С все же разные фенотипы, для простоты *NAT2* ацелирующий статус делят на М и Б/С группы [17]. Для упрощения работы с ними были введены коды генотипа от 1 до 8 в порядке увеличения количества мутантных аллелей (от 0 до 2), то есть уменьшения ацелирующей способности и увеличения вероятности проявления типа медленного ацелиатора.

Таблица 7. Коды генотипов.

Точечные полиморфизмы			Генотип	Код генотипа	Количество пациентов	Скорости ацетилирования
C481T	G590A	G857A				
0	0	0	<i>NAT2*4/NAT2*4</i>	1	4	Б
1	0	0	<i>NAT2*4/NAT2*5</i>	2	5	С
0	1	0	<i>NAT2*4/NAT2*6</i>	3	4	С
0	0	1	<i>NAT2*4/NAT2*7</i>	4	1	С
1	0	1	<i>NAT2*5/NAT2*7</i>	5	3	М
0	2	0	<i>NAT2*6/NAT2*6</i>	6	3	М
1	1	0	<i>NAT2*5/NAT2*6</i>	7	10	М
2	0	0	<i>NAT2*5/NAT2*5</i>	8	3	М

#### 4.8. Корреляция между генотипом ариламинов N-ацетилтрансферазы и фенотипом ацетилирования.

На данный момент нет устоявшейся схемы деления на быстрых и медленных ацетиляторов по фармакокинетическим параметрам. Традиционно данное деление производится по антимоду на гистограмме времени полувыведения в выборке пациентов. Варьирование границы между Б и М по  $t_{1/2}$  зависит от популяции: для французов – 1,8 ч. [44,45], для шведов - 2,1 ч.[8], в нашем исследовании - 2,6 ч. Медленные и быстрые ацетиляторы, детерминированные таким образом, имели медианное значение  $t_{1/2}$  3,7 и 1,4 ч. соответственно, что очень близко к литературным данным 3,3 и 1,2 ч. [11], 3-5 и 1 [9].

Для изониазида было произведено соотнесение таких характеристик скорости выведения лекарства из организма, как время полуэлиминации и клиренс с кодами генотипа. Из рис.23 можно видеть, что и в том, и в другом случае наблюдается бимодальное распределение и хорошая корреляция между фенотипом и генотипом - с уменьшением количества активных аллелей *NAT2\*4* увеличивается  $t_{1/2}$  и падает клиренс. Неоднозначная картина только с 7 и 8 группами, возможно, это связано с неточностью определения аллелей только по 3-м точечным полиморфизмам. Похожая работа была сделана немецкими учеными [46]: для генотипирования использовались 7 полиморфизмов - G191A, C282T, T341C, C481T, G590A, A803G и G857A, что позволяет выделить 99,9 % генотипов Центральной Европы, и показано тримодальное распределение по клиренсу, полностью соответствующее количеству аллелей *NAT2\*4*. По нашим результатам

определение трёх SNP (C481T, G590A, G857A) по крайней мере для 6 из 8 генотипов показывает четкое соответствие фенотипу.

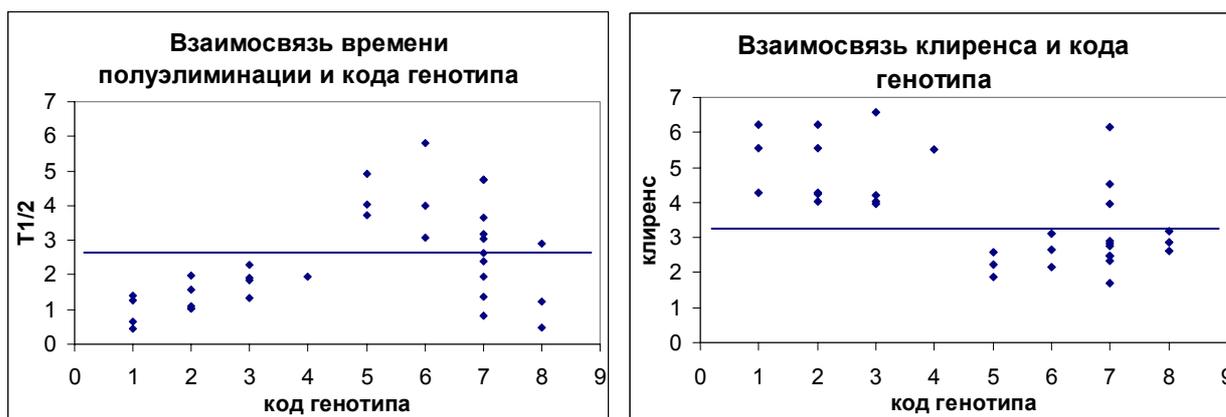


Рис.23. Корреляция между генотипом ацетилирования и фармакокинетическими параметрами.

Было проанализировано распределение еще одного фармакокинетического параметра, характеризующего индивида, - константы элиминации по кодам генотипа. Показано тримодальное распределение констант элиминации, исключая 2 точки в 7 и 8 группах, что может быть связано с сопутствующими заболеваниями или недостаточностью использования 3-х SNP. Определены  $K_{el}$  (среднее  $\pm$  стандартное отклонение): Б –  $0,92 \pm 0,20$ , С –  $0,47 \pm 0,15$ , М –  $0,25 \pm 0,12$ . Шаф, Паркин, Сейфарт и др. [48] проводили подобные исследования среди южноафриканцев. Обследовано 60 пациентов, которые были генотипированы (7 полиморфизмов) и фенотипированы: Б –  $K_{el} = 0,68 \pm 0,06$ , С -  $K_{el} = 0,43 \pm 0,08$ , М -  $K_{el} = 0,19 \pm 0,03$ . Из приведенных данных видно, что все константы для русских примерно на 30 % выше, тогда как концентрации ИНН через 3 часа после орального введения ниже и составляют 60-70 % при одинаковой дозе препарата (биодоступность изониазида 90% [5]).

Для определения фармакокинетических параметров необходимо за короткое время отобрать 5-6 образцов крови, что весьма сложно и болезненно для пациента. Поэтому для упрощения процедуры фенотипирования часто используют определение соотношения концентраций  $AcINH/INH$ , измеренное через 3 часа после приема / введения лекарства ( $R_m$ ) [26]. В работе французских коллег [45] показано по итогам анализов 109 человек (от 4 месяцев до 87 лет), что для быстрых ацетилаторов (время полувыведения меньше 1,8 ч.)  $R_m$  больше 0,77, а для медленных ( $t_{1/2} > 1,8$  ч.) ниже 0,48. Подобные данные получены и при обследовании 34 детей (0-196 месяцев) [44] и 13 взрослых [26].

Также, как и для фармакокинетических параметров, была оценена корреляция между генотипом и соотношением  $C(AcINH)/C(INH)$ , посчитанном через 3 часа ( $C(AcINH)_3/C(INH)_3$ ) и через 7 часов ( $C(AcINH)_7/C(INH)_7$ ), рис.24.

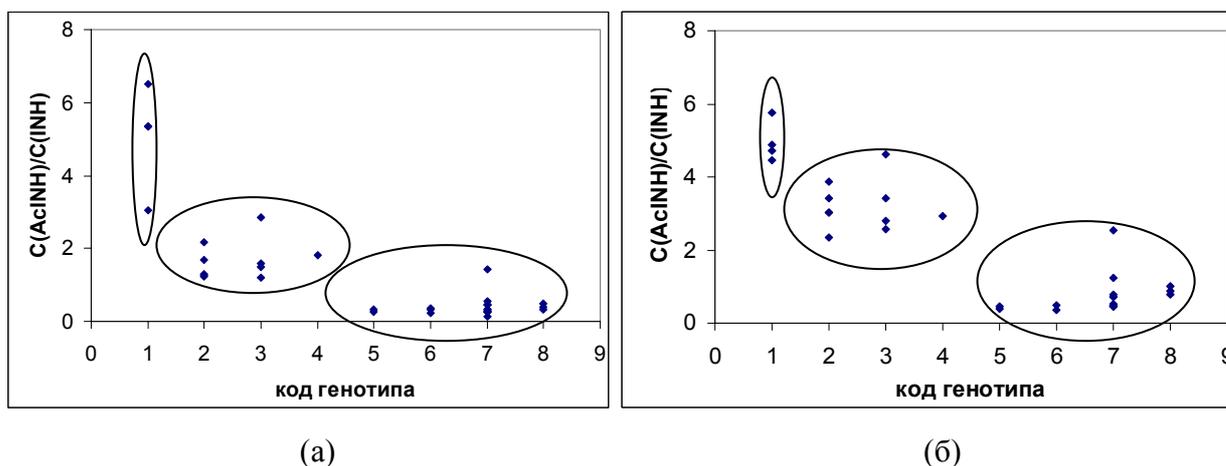


Рис. 24. Корреляция между генотипом и соотношением  $C(\text{AcINH})/C(\text{INH})$ :  
а) через 3,3 часа; б) через 7,3 часа.

Из рис. 24а видно, что в отличие от  $t_{1/2}$  и клиренса, имеющих бимодальное распределение, для  $C(\text{AcINH})_3/C(\text{INH})_3$  получено тримодальное распределение, полностью соответствующее генотипу. Для группы медленных ацетиляторов характерен диапазон отношений концентраций 0,13-0,55 (исключая одну точку), тогда, как для Б/С – 1,19-6,5. Пограничные значения - 0,6 и 2,9.

В статье [47] приводятся сведения, что, несмотря на тримодальное распределение отношений концентраций для 3 ч., данные, рассчитанные для 2 и 6 ч. показывали разные бимодальные комбинации фенотипических групп. В связи с этим мы рассчитали также отношение  $C(\text{AcINH})_7/C(\text{INH})_7$  и построили его зависимость от количества аллелей  $\text{NAT2}^*4$  в генотипе индивида (рис. 24б). Различий по сравнению  $C(\text{AcINH})_3/C(\text{INH})_3$  в типе распределения выявлено не было.

Исходя из предположения, что терапевтическая концентрация изониазида через 3 часа после введения должна быть 1,5 мг/л, можно рассчитать индивидуальную рекомендуемую дозу препарата по следующей формуле [28]:

$$\text{рекомендуемая доза} = 2,1 * \text{доза INH в мг/(кг*день)} / (0,6 + C(\text{INH})_3 \text{ в мг/л})$$

Средняя концентрация изониазида ( $X \pm S$ ) для разных типов ацетиляторов через 3 часа после введения составила: для Б –  $2,0 \pm 0,7$ , для С –  $3,4 \pm 0,8$ , для М –  $6,1 \pm 1,2$ ; то есть рекомендуемой дозой для них будет 8, 5 и 3 мг/кг, соответственно.

Таким образом, мы показали, что такие фармакокинетические параметры, как  $t_{1/2}$ ,  $K_{el}$ , клиренс и отношение концентраций изониазида и его производного имеют бимодальное или тримодальное распределение, что соответствует общепринятым представлениям, и прекрасно согласуются с генотипом N-ацетилтрансферазы. Наилучшая корреляция получена для  $C(\text{AcINH})_3/C(\text{INH})_3$ .

## 5. Заключение

Результатом дипломной работы явилась разработка простого и надежного метода одновременного определения изониазида, ацетилизоназида, пиразинамида и пиразиноевой кислоты в сыворотке крови человека с помощью ВЭЖХ, пригодного для проведения мониторинга лекарственных препаратов. По полученным данным был произведен расчет фармакокинетических характеристик препаратов, а также оценка ацетилирующей способности индивидов (фенотипа ацетилирования). Было проведено сопоставление фенотипа ацетилирования с генотипом индивида, определенным по трем наиболее распространенным полиморфизмам гена ариламин-N-ацетилтрансферазы 2.

## 6. Выводы

1. Разработан метод одновременного определения изониазида, ацетилизоназида, пиразинамида и пиразиноевой кислоты в сыворотке крови с помощью ВЭЖХ, пригодный для терапевтического лекарственного мониторинга.
2. Получены фармакокинетические кривые для этих четырех веществ в образцах сыворотки крови 33 пациентов.
3. Определены основные фармакокинетические параметры ( $t_{1/2}$ ,  $Cl$ ,  $K_{el}$ ,  $V$ ,  $AUC$ ) для изониазида.
4. Показано наличие корреляции между фармакокинетическими параметрами,  $C(AcINH)/C(INH)$  через 3 часа и генотипом.

## 7. Использованная литература

1. Давидсон. Туберкулез// Кругосвет: энциклопедия. – 2006. - Режим доступа: <http://www.krugosvet.ru>
2. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии/ Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – 2002. - Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru>
3. Страчунский, Л.С., Козлов, С.Н. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей. – М.: Боргес, 2002. - 432 с.
4. Сергеенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная Фармакокинетика: основные положения и клиническое применение.- М.: изд-во РАМН, 2003. - 208 с.
5. Мирошниченко, И. И., Тюняев, И.И., Зуев, А.П. Биодоступность лекарственных средств. - М.: Изд-во “Прометей”, 2003. – 91 с.
6. Краснов, В.А., Зенков, Н.К., Колпаков, А.Р. Активированные кислородные метаболиты при туберкулезе // Проблемы туберкулеза легких. – 2005. - № 9. – С. 9-17.
7. Isoniazid. International Programme on Chemical Safety. Poisons Information: Monograph 288. - Режим доступа: <http://www.inchem.org>
8. Svensson, J., Muchtar, A. and Ericsson. Ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of isoniazid and acetylisoniazid in plasma and urine // J. Chromatogr.- 1985.- V.341.- P.193-197.
9. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. Third edition / Edited by Anthony C. Moffat, M. David Osselton, Brian Widdop – Pharmaceutical Press, 2003. – 2136 p.
10. Чуканов, В.И.. Проблема излечения больных туберкулезом органов дыхания // РМЖ. - 2001. - Том 9. - № 21. Режим доступа: <http://www.rmj.ru/rmj/t9/n21/954.htm>
11. Peloquin, C.A., Jaresko, G.S. Population pharmacokinetic modeling of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide // Antimicrob.Agents Chemother. – 1997. – V.41. – P.2670-2676.
12. Mehmedagic, A., Verite, P., Menager, S. Determination of pyrazinamide and its main metabolites in rat urine by high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. B. – 1997. – V.695. – P. 365-372.
13. Kraemer, H., Feltkamp, U., Breithaupt, H. Quantification of pyrazinamide and its metabolites in plasma by ionic-pair high-performance liquid chromatography. Implications for the separation mechanism // J. Chromatogr. B. - 1998. – V.706. - P. 319–328.
14. Younossian, A.B., Roctat, T., Ketterer, J-P. High hepatotoxicity of pyrazinamide and ethambutol for treatment of latent tuberculosis // Eur. Respir. J. – 2005. – V.26. – P. 462-464.

15. Bhutani, H., Singh, S., Jindal, K.C. Mechanistic explanation to the catalysis by pyrazinamide and ethambutol of reaction between rifampicin and isoniazid in anti-TB FDCs // J. Pharm. and Biochem. Analysis. – 2005. – V.39. – P. 892-899.
16. Vatsis, K.P., Weber, W.W., Bell, D.A. Nomenclature for N-acetyltransferases // Pharmacogenetics. – 1995. – V.5. – P. 1-17.
17. Deitz, A.C., Rothman, N., Rebbeck, T.R. Impact of Misclassification in Genotype-Exposure Intarection Studies: Example of N-Acetyltransferase 2 (*NAT 2*), Smoking, and Bladder Cancer // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. – 2004. – V.13. - P. 1543-1546.
18. Макарова, С.И. Полиморфизм ариламин N-ацетилтрансферазы и его связь с некоторыми распространенными заболеваниями: Дисс. канд. биол. наук: 03.00.04 / С.И. Макарова. Институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН.- Н-ск., 2000.- 130 с.
19. Eidu, L., Harnanansingh, A. A more sensitive spectrophotometric method for determination of isoniazid in serum or plasma // Clin. Chem. - 1971. - V.17. – N 6. - P. 492-494.
20. Timbrell, J.A., Wright, J.M., Smith, S.M. Determination of hydrazine metabolites of isoniazid in human urine by gas chromatography // J. Chromatogr. – 1977. – V.138 - P. 165-172.
21. Olson, W., Dayton, P., Israili, Z., Pruitt, A. Spectrophotofluorimetric assay for isoniazid and acetylisoniazid in plasma adapted to paediatric studies // Clin Chem. – 1977. - V. 23/24. - P. 745-748.
22. Perrett, D. Capillary electrophoresis in clinical chemistry // Ann. Clin. Biochem. – 1999. – V.36. – p. 133-150.
23. Chen, S-H., Chen, Y-H. Pharmacokinetic applications of capillary electrophoresis // Electrophoresis. – 1999. – V.20. – P. 3259-3268.
24. Оганесян, А.С., Шаламай, А.С., Абрамян, А.Г. и др. Дослідження біоеквівалентності препаратів рифампицину з використанням системи вискоєфективного капілярного електрофорезу // Клінічна фармація. - 2005. - Т.9. –С.22.
25. Swart, K. J., Pappis, M. Automated high-performance liquid chromatographic method for the determination of rifampicin in plasma // J. Chromatogr. - 1992. – V. 593. – P. 21-24.
26. Moussa, L. A., Khassouani, C.E., Soulaymani, R. Therapeutic isoniazid monitoring using a simple high-performance liquid chromatographic method with ultraviolet detection // J. Chromatogr. – 2001. - V.766. – P. 181–187.
27. Seifart, H.I., Gent, W.L. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, acetylisoniazid and hydrazine in biological fluids // J. Chromatogr. – 1995. – V.674. – P. 269-275.

28. Sadeg, N., Pertat, N., Dutertre, H., Dumontet, M. Rapid, specific and sensitive method for isoniazid determination in serum // *J. Chromatogr.* – 1996. – V. 675. – P. 113-117.
29. Khuhawar, M.Y., Rind, M.A. Liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide and rifampicin from pharmaceutical preparations and blood // *J. Chromatogr.* – 2002. – V.766. – P. 357–363.
30. Calleja, I., Blanco-Práeto, M. J., Ruz, N. High-performance liquid–chromatographic determination of rifampicin in plasma and tissues // *J. Chromatogr.* – 2004. – V.1031. – P. 289–294.
31. Chenevier, P., Massias, L, Gueylard, D. Determination of ethambutol in plasma by high-performance liquid chromatography after pre-column derivatization // *J. Chromatogr.* – 1998. – V.708. – P. 310–315.
32. Walubo, A., Chan, K., Wong, C. L. Simultaneous assay for isoniazid and hydrazine metabolite in plasma and cerebrospinal fluid in the rabbit // *J. Chromatogr.* - 1991. - V. 567. – P.261- 266.
33. Федорова, Г. А. Оптимизация метода ВЭЖХ для терапевтического лекарственного мониторинга противосудорожных препаратов, метотрексана и циклоспорина А: Дисс. канд. хим. наук: 05.11.11/ Г. А. Федорова. Лимнологический институт СО РАН. – Иркутск, 2003. – 137 с.
34. Khuhawar, M. Y., Rind, M.A., Rajper, A.D.. High-performance liquid chromatographic determination of isoniazid, pyrazinamide, and indomethacin in pharmaceutical preparation // *Acta chromatographica.* – 2005. - N 15. – P. 269-275.
35. Kita, T., Tanigawara, Y., Chikazawa, S. N-acetyltransferase 2 Genotype Correlated with Isoniazid Acetylation in Japanese Tuberculous Patients // *Biol.Pharm. Bull.* - 2001. – V.24. – N5. – P. 544-549.
36. Guillaumont, M., Leclercq, M., Frobert, Y., Guise B. Determination of rifampitin, desacetilrifampitin, isoniasid and acetylisoniasid by high performance liquid chromatography: application to human serum extracts, polymorphonucleocytes and alveolar macrophages // *J. Chromatogr.* - 1982. - V. 232. – P.369- 376.
37. Gennaro, M.C., Calvino, R., Abrigo, C. Ion interaction reagent reversed-phase high-performance liquid chromatography determination of anti-tuberculosis drugs and metabolites in biological fluids // *J. Chromatogr. B.* - 2001. – V.754. - P. 477–486.
38. Kozhanova, L.A Determination of anti-tuberculosis drugs in human serum by HPLC // *Proceedings of 8-th Analytical Russian-German-Ukrainian Symposium (ARGUS): Monograph series of the international conferences on analytical chemistry. 31 August – 5 September 2003. - Hamburg, 2003. - P.79-83.*

39. Холодов, Л.Е., Яковлев, В.П. Клиническая фармакокинетика: руководство. – М.: Медицина, 1985. – 463 с.
40. Реброва, Ю.О. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: Медиа Сфера, 2002. – 312 с.
41. Платонов, А.Е. Статистический анализ в медицине и биологии: задачи, терминология, логика, компьютерные методы. – М.: Издательство Российской академии медицинских наук, 2001. – 52 с.
42. Барам, Г.И., Рейхард, В.Д., Гольдберг, Е.Д., Изотов, Б.Н. и др. Новые возможности высокоэффективной жидкостной хроматографии фармакопейном анализе // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. – Т. 135. - № 1. – С. 75-79.
43. Skrećkiewicz, K., Skrećkiewicz, J., Gawrońska-Szklarz, B. et al. Lack of association between arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and systemic sclerosis // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2005. – V.60. – P. 773-778.
44. Rey, E., Gendrel, D., Treluyer, J.M. et al. Isoniazid pharmacokinetics in children according to acetylator phenotype // Science Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2001. – V.15. – P. 355-359.
45. Miscoria, G., Leneveu, A., Walle, C., Roux, A. Application of a method of analysis using high performance liquid chromatography of isoniazid and acetylisoniazid to determine the phenotype of acetylation // Ann. Biol. Clin. – 1988. – V.46. – N 9. – P.734-740.
46. Kinzig-Schippers, M., Tomalik-Scharte, D., Jetter, A. et al. Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize doses? // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – V.49. – N 5. – P. 1733-1738.
47. Seifart, H.I., Parkin, D.P., Botha, F.J. et al. Population screening for isoniazid acetylator phenotype // Pharmacoepidemiol. Drug Saf. – 2001. – V.10. – N 2. – P. 127-134.
48. Schaaf, H.S., Parkin, D.P., Seifart, H.I. et al. Isoniazid pharmacokinetics in children treated for respiratory tuberculosis // Arch. Dis. Child. - 2005. - V. 90. – N 6. – P. 551-553.
49. Kircherr, H. Determination of hydrazine in human plasma by high-performance liquid chromatography // J.Chromatogr. – 1993. – V.617. – P. 157-162.
50. Hutchings, A., Monie, R.D., Spragg, B., Routledge, P.A. A method to prevent the loss of isoniazid and acetylisoniazid in human plasma // J. Clin. Pharmacol. – 1983. – V. 15. – N 2. – P. 263-266.

## Список сокращений

PZA – пиразинамид, амид пиразиновой кислоты

PA – пиразиновая кислота

5-OH-PA - 5-гидроксипиразиновая кислота

5-OH-PZA - 5-гидроксипиразинамид

INH – изониазид, гидразид изоникотиновой кислоты

AcINH – ацетилизониазид

RIF - рифампицин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

КЭ – капиллярный электрофорез

ОФ, RP – обращенная фаза

ТФЭ - твердофазная экстракция

ЖЖЭ - жидко-жидкостная экстракция

ТТ – теоретическая тарелка

ТХУ – трихлоруксусная кислота

ТФУ – трифторуксусная кислота

МФ – мобильная фаза

е.о.п. – единицы оптической плотности

R – спектральное отношение

S<sub>266</sub> – площадь пика на длине волны 266 нм

ОС – октилсульфонат натрия

СКО, S – стандартное квадратичное отклонение

NAT2 – ариламин N-ацетилтрансфераза 2

Cl – клиренс

V - кажущийся объем распределения

K<sub>el</sub> – константа скорости элиминации

t<sub>1/2</sub> - период полувыведения препарата

AUC - площадь под кривой “концентрация - время”

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

R<sub>m</sub>, C(AcINH)<sub>3</sub>/C(INH)<sub>3</sub> - отношение концентраций AcINH/INH, измеренное через 3 часа после приема / введения лекарства

C(AcINH)<sub>7</sub>/C(INH)<sub>7</sub> - отношение концентраций AcINH/INH, измеренное через 7 часов

Б – быстрые ацетиляторы

С – средние ацетиляторы

М – медленные ацетиляторы

## Приложение 1

Таблица 1. Приготовление водных калибровочных растворов INH, AcINH, PZA.

Разбавление смеси №3	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Концентрация INH, AcINH (мг/л)	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	
Концентрация PZA (мг/л)	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	

Таблица 2. Приготовление водных калибровочных растворов РА.

Разбавление станд. раствора РА 1 мг/л	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Концентрация РА (мг/л)	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95	

Таблица 3. Калибровочные растворы INH, AcINH, PZA на основе сливной сыворотки.

Концентрация INH, AcINH (мг/л) в табл. 1	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95
Концентрация INH, AcINH в сливной сыворотке (мг/л)	50,0	25,0	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20
Концентрация PZA (мг/л) в табл. 1	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91
Концентрация PZA в сливной сыворотке (мг/л)	100	50,0	25,0	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39

## Приложение 1

Таблица 4. Калибровочные растворы РА на основе сливной сыворотки.

Концентрация РА (мг/л) в табл. 2	250	125	62,5	31,25	15,63	7,81	3,91	1,95
Концентрация РА в сливной сыворотке (мг/л)	25,0	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20

Таблица 5. Приготовление растворов INH, AcINH, PZA для характеристики метода.

Последовательное разбавление смеси №3	1:1	2:3	1:1	1:4
Концентрация INH, AcINH в воде (мг/л)	250	100	50	10
Концентрация INH, AcINH в сливной сыворотке (мг/л)	25,0	10,0	5,0	1,0
Концентрация PZA в воде (мг/л)	500	200	100	20
Концентрация PZA в сливной сыворотке (мг/л)	50,0	20,0	10,0	2,0

Таблица 6. Приготовление растворов РА для характеристики метода.

Разбавление ст. р-ра РА 1 мг/л	1:3	2:3	1:1	1:4
Концентрация РА в воде (мг/л)	250	100	50	10
Концентрация РА в сливной сыворотке (мг/л)	25,0	10,0	5,0	1,0

## Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 2 (м., 27 лет)</b>									
60	M/M	2,10	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+ / +	- / -	- / -
100		7,26	0,54	2,65	11,45	0,23			
140		11,55	1,01	1,95	8,02	0,24			
260		28,47	4,73	2,40	6,04	0,40			
500		16,8	3,54	1,69	2,20	0,77			
1500		5,52	1,28	0,44	0,54	0,81			
<b>пациент № 3 (м., 28 лет)</b>									
60	C/C	< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+ / -	- / -	- / -
100		< 0,06	< 0,20	3,74	13,01	0,29			
140		< 0,06	< 0,20	4,55	5,6	0,81			
260		< 0,06	< 0,20	4,42	2,04	2,17			
500		< 0,06	< 0,20	2,29	0,56	3,88			
1500		< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20				
<b>пациент № 4 (м, 42 года)</b>									
60	M/M	3,15	< 0,20	< 0,30	0,50		+ / -	+ / -	- / -
100		22,26	1,39	2,26	9,67	0,23			
140		32,97	3,27	1,89	9,75	0,19			
260		29,55	5,41	2,58	5,71	0,45			
500		21,92	5,1	2,22	2,84	0,78			
1500		7,44	1,91	0,65	0,81	0,80			
<b>пациент № 5 (ж., 25 лет)</b>									
60	M/M	< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+ / -	+ / -	- / -
100		< 0,06	< 0,20	1,17	7,46	0,16			
140		< 0,06	< 0,20	1,59	6,85	0,23			
260		< 0,06	< 0,20	1,90	5,55	0,34			
500		< 0,06	< 0,20	1,33	2,50	0,53			
1500		< 0,06	< 0,20	0,32	0,54	0,59			
<b>пациент № 6 (ж, 19 лет)</b>									
60	C/C						+ / -	- / -	- / -
100		7,33	1,88	3,16	12,46	0,25			
140		13,01	2,62	4,62	10,08	0,46			
260		45,84	3,85	6,12	3,60	1,70			
500		31,93	3,06	2,86	0,84	3,4			
1500		7,83	1,14	< 0,30	< 0,20				
<b>пациент № 7 (ж., 21 год)</b>									
60	C/C	12,91	0,81	< 0,30	< 0,20		+ / -	- / -	- / -
100		25,11	1,88	3,00	10,42	0,28			
140		20,48	2,62	3,54	9,28	0,38			
260		19,69	3,85	4,92	4,03	1,22			
500		13,28	3,06	2,87	0,95	3,02			
1500		3,97	1,14	< 0,30	< 0,20				

## Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 8 (ж., 40 года)</b>									
60	C/C	0,93	< 0,20	< 0,30	< 0,20		-/-	+/-	-/-
100		8,38	0,62	4,35	15,32	0,28			
140		17,72	2,03	5,75	11,05	0,52			
260		28,63	5,68	5,48	3,47	1,58			
500		18,42	6,06	2,75	0,98	2,81			
1500		2,81	1,25	0,30	0,38	0,78			
<b>пациент № 9 (ж., 30 лет)</b>									
60	M/M	14,34	1,23	< 0,30	< 0,20		+/-	+/-	-/-
100		39,27	4,89	1,79	13,62	0,13			
140		38,17	6,75	1,97	11,12	0,32			
260		32,93	9,97	2,10	6,81	0,31			
500		22,86	9,00	1,51	3,35	0,45			
1500		5,67	2,7	0,32	0,65	0,49			
<b>пациент № 10 (ж., 25 лет)</b>									
60	M/M	< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+/-	-/-	+/-
100		< 0,06	< 0,20	1,71	13,23	0,13			
140		< 0,06	< 0,20	2,12	12,97	0,16			
260		< 0,06	< 0,20	2,66	8,07	0,33			
500		< 0,06	< 0,20	1,98	4,34	0,46			
1500		< 0,06	< 0,20	0,50	1,33	0,38			
<b>пациент № 12 (ж., 40 лет)</b>									
60	M/M	< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+/>+	-/-	-/-
100		< 0,06	< 0,20	2,13	24,50	0,09			
260		< 0,06	< 0,20	1,63	5,22	0,31			
500		< 0,06	< 0,20	1,40	1,60	0,88			
1500		< 0,06	< 0,20	0,36	0,71	0,51			
<b>пациент № 13 (м., 34 года)</b>									
60	C/C	10,28	0,66	< 0,30	< 0,20		-/-	-/-	+/-
100		10,31	0,89	2,94	8,62	0,34			
260		8,23	1,87	5,44	3,00	1,81			
500		6,61	1,83	3,70	1,26	2,94			
1500		2,40	0,56	0,40	0,59	0,68			
<b>пациент № 14 (м., 30 лет)</b>									
60	M/M	15,13	1,03	< 0,30	< 0,20		+/-	+/-	-/-
100		26,2	2,13	1,56	8,07	0,19			
140		35,87	3,82	2,02	6,70	0,30			
260		28,19	5,50	1,89	4,41	0,13			
500		18,44	3,45	1,35	1,89	0,71			
1500		7,26	1,71	0,41	0,66	0,62			

## Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 21 (м, 53 года)</b>									
60	C/C	14,05	1,02	< 0,3	< 0,2		-/-	+/-	-/-
100		28,83	1,90	4,05	6,17	0,66			
140		30,66	2,79	5,48	5,23	1,05			
260		37,54	8,13	7,82	2,74	2,85			
500		22,25	7,11	3,92	0,85	4,61			
1500		5,89	1,95	0,51	< 0,2				
<b>пациент № 26 (ж., 26 лет)</b>									
60	Б/Б	5,47	0,62	< 0,3	< 0,2		-/-	-/-	-/-
100		19,73	1,93	5,35	5,11	1,05			
140		23,01	2,50	5,93	4,10	1,45			
260		35,93	3,90	5,45	0,84	6,50			
500		23,17	3,97	1,87	0,42	4,45			
1500		5,13	1,84	< 0,3	< 0,2				
<b>пациент № 33 (ж., 27 лет)</b>									
60	М/Б	< 0,06	< 0,2	1,01	0,60	1,69	+/-	-/-	+/-
100		< 0,06	< 0,2	13,07	11,08	1,18			
140		< 0,06	< 0,2	15,25	8,56	1,78			
260		< 0,06	< 0,2	22,54	7,12	3,16			
500		34,23	6,64	24,29	2,69	9,05			
1500		14,18	4,40	1,32	0,80	1,64			
<b>пациент № 34 (м., 19 лет)</b>									
60	М/М	26,47	2,03	< 0,30	< 0,20		+/-	+/-	-/-
100		31,61	2,80	1,55	7,00	0,22			
140		30,30	3,83	2,05	8,10	0,25			
260		26,09	4,90	2,40	5,51	0,44			
500		19,11	4,16	1,72	2,44	0,70			
1500		4,67	1,51	0,43	0,73	0,59			
<b>пациент № 35 (м., 27 лет)</b>									
60	М/С	4,83	0,45	< 0,3	0,60		+/-	+/-	-/-
100		18,20	2,20	10,05	7,67	1,31			
140		18,72	2,57	4,29	6,00	0,71			
260		20,72	3,26	3,34	2,36	1,41			
500		14,79	2,87	2,08	1,66	1,25			
1500		4,47	1,01	0,46	0,70	0,66			
<b>пациент № 37 (ж., 37 лет)</b>									
60	Б/Б	17,47	1,21	< 0,30	< 0,20		-/-	-/-	-/-
100		31,47	3,76	6,95	9,94	0,70			
140		34,62	5,85	9,66	9,13	0,97			
260		27,35	8,53	9,43	1,76	5,36			
500		20,30	7,22	4,37	0,76	5,75			
1500		5,09	2,26	0,45	< 0,20				

Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 42 (ж., 27 лет)</b>									
60	Б/Б	4,88	0,44	< 0,30	< 0,20		-/-	-/-	-/-
100		15,37	1,47	6,16	14,03	0,14			
140		24,13	3,09	8,47	6,76	1,25			
260		19,83	3,87	6,34	1,19	5,33			
500		15,31	2,69	2,49	0,51	4,88			
1500		3,56	0,98	< 0,30	< 0,20				
<b>пациент № 44 (ж., 35 лет)</b>									
60	M/M	< 0,06	< 0,2	< 0,3	< 0,2		+/-	-/-	+/-
100		< 0,06	< 0,2	0,78	8,59	0,09			
140		< 0,06	< 0,2	1,31	10,34	0,13			
260		< 0,06	< 0,2	1,67	6,46	0,26			
500		< 0,06	< 0,2	1,34	3,40	0,39			
1500		< 0,06	< 0,2	0,54	0,91	0,59			
<b>пациент № 45 (ж., 21 год)</b>									
60	M/M	0,13	< 0,2	< 0,3	< 0,2		-/-	+/+	-/-
100		3,73	< 0,2	0,90	11,79	0,08			
140		5,28	0,36	1,56	7,13	0,22			
260		20,56	1,41	1,32	5,80	0,23			
500		17,96	2,25	0,99	2,84	0,35			
1500		6,22	1,81	0,32	0,79	0,41			
<b>пациент № 47 (м., 28 лет)</b>									
60	M/M	2,60	< 0,2	< 0,3	< 0,2		-/-	+/+	-/-
100		28,08	3,26	1,54	9,21	0,17			
140		30,40	4,49	1,88	9,57	0,20			
260		25,51	6,26	2,05	5,69	0,36			
1500		4,68	< 0,2	0,37	0,73	0,51			
<b>пациент № 56 (м., 18 лет)</b>									
60	M/M	34,70	2,78	< 0,30	0,61		+/-	+/-	-/-
100		30,62	3,09	2,64	35,58	0,07			
140		28,76	4,04	4,28	9,48	0,45			
260		25,52	5,38	2,16	8,24	0,26			
500		19,93	5,31	2,01	4,22	0,47			
1500		10,68	2,71	0,82	0,78	1,05			
<b>пациент № 57 (м., 32 года)</b>									
60	M/M	1,73	0,61	< 0,3	< 0,2		-/-	+/+	-/-
100		1,64	0,65	1,22	8,41	0,15			
140		1,63	0,59	1,67	8,30	0,20			
260		1,31	0,47	1,91	5,85	0,33			
500		21,94	3,76	1,88	3,82	0,49			
1500		8,04	2,51	0,60	0,92	0,64			

Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 58 (ж., 30 лет)</b>									
60	M/M	15,22	1,16	< 0,3	< 0,2		+/-	+/-	-/-
100		29,70	3,53	1,46	17,33	0,08			
140		27,44	4,10	1,34	11,58	0,26			
260		22,78	6,75	1,96	7,68	0,26			
500		15,82	6,16	1,48	3,00	0,49			
1500		4,57	1,22	< 0,3	1,08				
<b>пациент № 59 (ж., 19 лет)</b>									
60	C/C	29,38	1,61	< 0,3	< 0,2		-/-	+/-	-/-
100		0,96	< 0,2	1,81	11,81	0,15			
140		36,77	2,82	3,50	8,58	0,41			
260		34,98	5,94	5,23	4,38	1,19			
500		26,07	4,01	3,76	1,11	3,40			
1500		4,04	1,10	0,36	< 0,2				
<b>пациент № 60 (ж., 28 лет)</b>									
60	C/C	< 0,06	< 0,20	< 0,30	< 0,20		+/-	-/-	-/-
100		35,23	3,96	2,44	11,59	0,21			
140		0,59	< 0,20	3,09	6,50	0,48			
260		0,30	< 0,20	3,44	2,68	1,28			
500		29,57	5,93	1,74	0,74	2,35			
1500		5,147	3,07	< 0,30	< 0,20				
<b>пациент № 61 (ж., 22 года)</b>									
60	C/C	10,23	0,71	< 0,3	< 0,2		+/-	-/-	-/-
100		21,66	1,16	2,27	18,20	0,12			
140		26,15	1,96	3,37	10,70	0,31			
260		39,06	3,34	4,32	3,41	1,26			
500		38,63	4,45	3,34	1,10	3,04			
1500		9,95	1,70	< 0,3	< 0,2				
<b>пациент № 62 (ж, 30 лет)</b>									
60	Б/Б	5,18	< 0,2	1,40	20,68	0,07	-/-	-/-	-/-
100		22,90	2,53	4,76	21,47	0,22			
140		29,19	4,05	6,99	7,30	0,96			
260		24,46	5,15	6,99	2,30	3,04			
500		17,99	4,40	3,57	0,81	4,70			
1500		2,94	1,16	0,30	< 0,2				
<b>пациент № 63 (м., 33 года)</b>									
60	M/M	< 0,06	< 0,2	< 0,3	< 0,2		+/+	-/-	-/-
100		< 0,06	< 0,2	2,68	32,41	0,08			
140		< 0,06	< 0,2	2,29	11,55	0,20			
260		< 0,06	< 0,2	2,54	5,21	0,49			
500		22,56	4,80	2,27	2,22	1,02			
1500		6,17	2,17	0,31	0,49	0,63			

## Приложение 2

Вре- мя введе- ния PZA, мин.	Тип ацетиля тора: генотип / фено- тип	C <sub>PZA</sub>	C <sub>PA</sub>	C <sub>AcINH</sub>	C <sub>INH</sub>	C <sub>AcINH</sub> / C <sub>INH</sub>	Полиморфизмы		
							C481 T	G590 A	G857 A
<b>пациент № 64 (м, 27 лет)</b>									
60	M/M	18,52	5,91	2,70	6,00	0,45	+/-	+/-	-/-
100		16,31	5,27	9,09	18,66	0,49			
140		16,98	5,79	4,06	7,62	0,53			
260		13,56	4,35	2,79	5,06	0,55			
500		10,54	2,38	3,52	1,38	2,54			
1500		24,52	8,36	0,60	0,54	1,10			
<b>пациент № 71 (ж, 22 года)</b>									
60	M/M	25,75	1,34	< 0,3	< 0,2		+/-	+/-	-/-
100		33,76	2,30	1,57	17,61	0,09			
140		44,79	4,13	2,25	13,67	0,15			
260		34,68	4,16	2,08	8,46	0,25			
500		22,65	3,09	1,51	3,23	0,46			
1500		6,51	1,17	< 0,3	0,61				
<b>пациент № 40 (м, 25 года)</b>									
100	C/C	9,60	0,54	3,43	12,51	0,27	-/-	+/-	-/-
140		21,18	1,55	4,74	8,57	0,55			
260		28,36	4,15	7,03	4,71	1,49			
500		18,62	3,08	3,98	1,54	2,58			
1500		5,52	1,27	0,41	0,50	0,82			

"+" — наличие полиморфизма

"-" — отсутствие полиморфизма

Приложение 3

Фармакокинетические параметры пациентов

Фармако- кинетический параметр  Номер пациента	C(AcINH)/ C(INH) T = 3,3 ч.	C(AcINH)/ C(INH) T = 7,3 ч.	T <sub>1/2</sub> , ч.	Cl, мл/ (мин*кг)	K <sub>el</sub> , 1/ч	V, л/кг	AUC, мг*ч/л
2	0,40	0,77	2,89	3,18	0,24	0,795	52,4
3	2,17	3,88	1,01	5,54	0,68	0,486	31,1
4	0,45	0,78	3,64	2,76	0,19	0,868	60,5
5	0,34	0,53	4,76	2,91	0,15	1,200	57,4
6	1,70	3,40	1,58	4,27	0,44	0,585	39,1
7	1,22	3,02	1,99	4,24	0,35	0,731	39,3
8	1,58	2,81	1,32	4,02	0,53	0,460	41,4
9	0,31	0,45	3,03	2,47	0,23	0,600	67,5
10	0,33	0,46	4,04	1,87	0,17	0,654	89,0
12	0,31	0,88	1,23	2,63	0,56	0,281	63,4
13	1,81	2,94	1,93	5,50	0,36	0,919	30,3
14	0,13	0,71	3,18	3,96	0,22	1,090	42,1
21	2,85	4,61	2,30	6,58	0,30	1,310	25,3
26	6,50	4,45	1,26	12,00	0,55	1,300	13,9
33	3,16	9,05	3,73	2,58	0,19	0,830	64,7
34	0,44	0,70	4,74	2,82	0,15	1,160	59,1
35	1,41	1,25	1,96	6,16	0,35	1,050	27,1
37	5,36	5,75	1,39	5,56	0,50	0,670	30,0
40	1,49	2,58	1,91	3,96	0,36	0,657	42,0
42	5,33	4,88	0,66	6,22	1,06	0,352	26,8
44	0,26	0,39	4,92	2,21	0,14	0,940	75,6
45	0,23	0,35	3,06	3,12	0,23	0,830	53,4
47	0,36		4,00	2,64	0,17	0,915	63,1
56	0,26	0,47	1,37	1,69	0,51	0,201	98,3
57	0,33	0,49	5,81	2,15	0,12	1,080	77,5
58	0,26	0,49	2,39	2,47	0,29	0,511	67,5
59	1,19	3,40	1,84	4,22	0,38	0,674	39,5
60	1,28	2,35	1,08	6,23	0,64	0,582	26,8
61	1,26	3,04	1,01	4,03	0,68	0,354	41,3
62	3,04	4,70	0,45	4,28	1,56	0,162	39,0
63	0,49	1,02	0,49	2,85	1,41	0,121	58,5
64	0,55	2,54	0,82	4,54	0,84	0,320	36,7
71	0,25	0,46	2,62	2,34	0,27	0,530	71,3