

2 Ahire B. R., Rane B. R., Bakliwal S. R., Pawar S. P. (2010), "Solubility enhancement of poorly water soluble drug by solid dispersion techniques", *Int. J. Pharm. Tech. Res.* 2(3), pp 2007-2015

3 Anshu S., Jain C. P. (2011), "Solid dispersion: A promising technique to enhance solubility of poorly

water soluble drug", *International Journal of Drug Delivery*, 3, pp 149-170.

4 Lee CR, Fauld D. (1995), "Altremin: a pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cancer chemotherapy". *Drugs*, Vol 49, pp. 932-953

(Ngày nhận bài: 15/03/2015 - Ngày duyệt đăng: 04/05/2015)

Xây dựng phương pháp đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên enzym cytochrom P450 3A4 thông qua chuyển hoá nifedipin

Phạm Thị Thanh Hà^{2*}, Nguyễn Thị Thanh Nhài¹

¹Trường Đại học Dược Hà Nội

² Trường Cao đẳng Dược Trung ương Hải Dương

*E-mail: thanhha.pharm.com

Summary

A method for investigating the inhibition of drugs on CYP3A4 activity was developed by following up the metabolism of nifedipine by human CYP3A4 recombinant in the presence and absence of other drugs. Nifedipine was determined by HPLC. With incubation time of 20 minutes and concentration of CYP at 250 nM, over the substrate concentration of 1 to 50 μ M, the enzyme kinetic parameters K_m and V_{max} of nifedipine was found at 6.92 μ M and 469 nmol/min/nmol, respectively. Nifedipine was then incubated with CYP3A4 in the presence of 50 nM ketoconazole or 250 μ M erythromycin, and K_i was found at 31.4 nM for ketoconazole and 97.5 μ M for erythromycin. These findings showed the feasibility of the method in evaluating inhibitory effects of drugs on CYP3A4 with nifedipine as a substrate.

Keywords: Nifedipine, dehydronifedipine, HPLC, metabolism, CYP3A4, inhibition.

Đặt vấn đề

Tương tác thuốc không chỉ có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả điều trị bệnh mà có thể gây ra tác dụng không mong muốn nguy hiểm, trong đó, tương tác do thay đổi chuyển hóa thuốc tại gan đóng vai trò quan trọng. Hệ enzym cytochrom P450 tham gia chuyển hoá hầu hết các thuốc tại gan, trong đó, những isoenzym quan trọng nhất là CYP1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6 và đặc biệt là CYP3A4^[1]. Do vậy, việc nghiên cứu ảnh hưởng trực tiếp lên isoenzym này được quan tâm khá nhiều. Phương pháp nghiên cứu ảnh hưởng lên CYP3A4 bằng cách theo dõi mức độ và tốc độ chuyển hoá của một cơ chất điển hình qua CYP3A4 người tài tổ hợp là một cách tiếp cận *in vitro* khá đơn giản, chi phí hợp lý, vì chi cần thiết bị phân tích thông thường để xác định

nồng độ cơ chất trong hỗn hợp phản ứng chuyển hoá. Vì vậy, phương pháp này được sử dụng khá phổ biến trên thế giới^[2]; nhưng lại chưa phổ biến ở Việt Nam. Hầu hết các nghiên cứu trong nước sử dụng cách tiếp cận *in vivo* trên động vật thí nghiệm, tức là cho động vật dùng thuốc kéo dài, sau đó cô lập gan và định lượng CYP trong microsome gan^[1,2]. Phương pháp này khá tốn kém thời gian và chi phí, hơn nữa sự cảm ứng hay ức chế CYP trên động vật chưa chắc đã phản ánh đúng với CYP của người. Với CYP3A4, một số cơ chất đã được sử dụng từ rất lâu như erythromycin, nifedipin, midazolam, diazepam, steroids, terfenadin và cyclosporin, trong đó nifedipin, midazolam và testosterone được sử dụng phổ biến nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xây dựng một phương pháp đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên CYP3A4 với cơ chất

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

nifedipin (NIF). Nifedipin được chuyển hoá mạnh qua CYP3A4 cho sản phẩm chuyển hoá duy nhất là dehydronifedipin, do đó độ tin cậy tốt^(*). Tính khả thi của phương pháp được đánh giá thông qua việc nghiên cứu chuyển hoá của nifedipin qua CYP3A4 và so sánh với các số liệu trong y văn, và sau đó, được thử nghiệm ứng dụng để đánh giá ảnh hưởng của hai thuốc là ketoconazol và erythromycin lên CYP3A4.

Nguyên liệu và phương pháp

Hóa chất, chất chuẩn

Các chất chuẩn

Imipramin.HCl (hàm lượng 99,64 %, chất chuẩn VKN thuốc TW); nifedipin (hàm lượng 99,42 %, Sigma - Aldrich, Mỹ); dehydronifedipin (hàm lượng $\geq 98,78$ %, Sigma - Aldrich, Mỹ)

Hóa chất, dung môi

Natri hydrophosphat, kali dihydrophosphat, natri hydroxyd, amoni acetat, acid phosphoric, acid trifloroacetic, triethylamin dạng tinh khiết phân tích (Merck, Đức) và methanol, acetonitril là dung môi dùng cho HPLC (Merck, Đức).

Nguyên liệu khác

NADPH (β -nicotinamid adenin dinucleotid-2'-phosphat khử, dạng muối tetranatri hydrat) ≥ 95 % được mua từ Sigma-Aldrich, là coenzym cho phản ứng oxy hoá NIF. Chế phẩm enzym CYP3A4 Supersomes™ (hệ baculovirus tái tổ hợp mang gen CYP3A4 người, có mặt đồng thời P450 reductase người, không có cytochrom b5) được mua từ BD Gentest (Woburn, MA, Mỹ).

Thiết bị

Hệ thống HPLC Agilent 1200 (Agilent, USA) với detector PDA, cột sắc ký Cosmosil 5C-18-MS-II (4,6 x 150 mm, 5 μ m) (Nacalai, Nhật).

Phương pháp

Phương pháp định lượng NIF và DNIF bằng HPLC

Nifedipin và dehydronifedipin được định lượng đồng thời bằng HPLC, với phương pháp được nhóm nghiên cứu xây dựng và kiểm tra tính khả thi để định lượng trong hỗn hợp phản ứng chuyển hoá. Điều kiện sắc ký như sau: Cột C18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) ở nhiệt độ phòng; pha động methanol-acetonitril-amoniacetat 0,04M-triethylamin 10 % (2,5:1:2:0,05); tốc độ dòng

1,2 mL/phút; bước sóng phát hiện 236 nm; chất chuẩn nội imipramin μ M; thể tích mẫu tiêm 20 μ L.

Chuẩn bị hỗn hợp phản ứng

- **Gốc enzym:** CYP3A4 được pha loãng với đệm phosphat pH 7,4 tới nồng độ 1 nmol/mL, chia nhỏ trong ống Eppendorf và bảo quản trong tủ đá lạnh sâu (-80 °C) cho đến khi dùng. Khi thực hiện phản ứng, enzym được rã đông trong bình cách thủy 37 °C rồi giữ lạnh trong nước đá cho đến khi trộn với hỗn hợp phản ứng.

- **Gốc cơ chất:** Dung dịch NIF 2 mM được pha trong methanol, rồi pha loãng bằng đệm pH 7,4 đến nồng độ cần thiết (gấp 4 lần nồng độ dự kiến trong hỗn hợp phản ứng).

- **Gốc NADPH:** Dung dịch 1 mM NADPH trong đệm pH 7,4.

- **Gốc chuẩn nội:** Dung dịch IMI 100 μ M trong đệm pH 7,4 chỉ dùng cho định lượng.

- **Gốc DNIF:** Dung dịch DNIF 1 mM pha trong methanol được bảo quản trong tủ đá, dùng làm đường chuẩn định lượng trong ngày, hoặc thêm vào mẫu chuẩn NIF để kiểm tra phương pháp hàng ngày.

- **Gốc KETO:** Dung dịch ketoconazol 1 μ M trong hỗn hợp 1:4 methanol-đệm pH 7,4.

- **Gốc ERY:** Dung dịch erythromycin 2 mM trong hỗn hợp 1:4 methanol-đệm pH 7,4.

- **Đệm phosphat pH 7,4** (được dùng làm dung môi pha loãng): Dung dịch KH_2PO_4 0,02 M, được điều chỉnh đến pH 7,4 bằng dung dịch NaOH 0,1 M.

Hỗn hợp phản ứng được thực hiện như sau: 50 μ L dung dịch gốc cơ chất được trộn với 50 μ L gốc enzym trong ống Eppendorf 0,5 mL, làm ấm ở 37 °C trong 5 phút. Phản ứng được bắt đầu khi 50 μ L dung dịch gốc NADPH được thêm vào, cùng với 50 μ L đệm phosphat (thể tích hỗn hợp phản ứng là 200 μ L), và được ủ ở 37 °C trong suốt thời gian phản ứng. Dừng phản ứng bằng cách thêm 200 μ L acetonitril.

Xử lý mẫu và định lượng

Hỗn hợp phản ứng sau khi dừng được thêm 50 μ L gốc chuẩn nội (nồng độ cuối cùng 10 μ M), lắc đều, lọc và tiêm sắc ký. NIF được định lượng theo đường chuẩn xây dựng trong ngày từ dung dịch gốc cơ chất. Dung dịch DNIF được thêm vào dung dịch chuẩn kiểm tra hệ thống, và để

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

định lượng tùy theo yêu cầu của từng thí nghiệm.

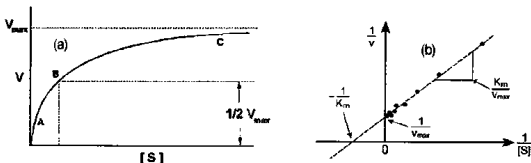
Xác định thông số chuyển hoá

Mối quan hệ giữa tốc độ phản ứng tức thời (V) và nồng độ cơ chất $[S]$ có thể được mô tả bằng phương trình Michaelis-Menten (a), trong đó, $V_{\max}$ là tốc độ phản ứng tức thời tối đa, và K_m

là hằng số Michaelis, là nồng độ cơ chất ở $\frac{1}{2}$ tốc độ tối đa (hình 1). Nghịch đảo phương trình (a), ta có phương trình Lineweaver - Burk (b), cho mối quan hệ tuyến tính giữa $1/V$ và $1/[S]$. Theo phương trình (b), có thể dễ dàng tính được $V_{\max}$ và K_m (hình 1).

$$V = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (a)$$

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (b)$$

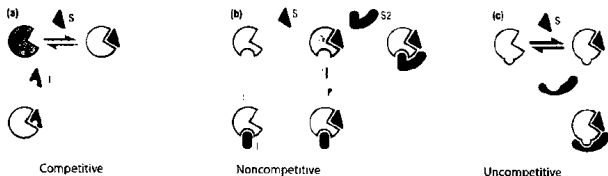


Hình 1: Đồ thị Michaelis-Menten (a) và Lineweaver-Burk (b)

Xác định hằng số ức chế

Hình 2 minh họa 3 kiểu cơ chế kim hãm (ức chế) điển hình hay gặp với CYP3A4: kiểu (a) cạnh tranh (competitive), (b) không cạnh tranh (noncompetitive) và (c) phi cạnh tranh

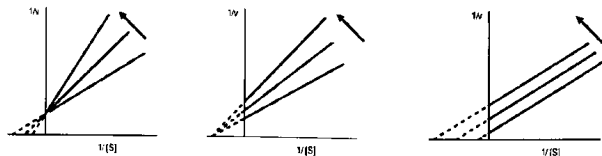
(uncompetitive). Những chất có nhiều hơn 1 cơ chế được xếp vào nhóm hỗn hợp. Cách xác định hằng số ức chế K_i trong mỗi trường hợp được mô tả trong phương trình Lineweaver-Burk tương ứng.



$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1 + \frac{[I]}{K_i}}{V_{\max}}$$



Hình 2: Các kiểu ức chế (a) cạnh tranh, (b) không cạnh tranh và (c) phi cạnh tranh

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

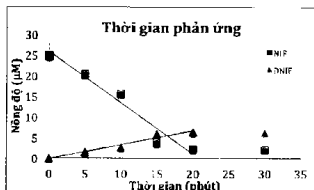
Kết quả và bàn luận

Nghiên cứu chuyển hóa của nifedipin với CYP3A4

Tuyến tính theo thời gian phân tích

Chuẩn bị các hỗn hợp phản ứng gồm: 50 μL gốc enzym + 50 μL gốc cơ chất nồng độ 100 μM + 50 μL gốc NADPH + 50 μL đệm phosphate pH 7,4. Hỗn hợp phản ứng này chứa 25 μM NIF, 0,25 mM NADPH, 250 pmol/mL CYP3A4.

Tiến hành ủ các mẫu phân tích ở 37°C trong các khoảng thời gian 5–10–15–20–30 phút; bất hoạt enzym bằng 200 μL acetonitril, thêm 50 μL dung dịch gốc chuẩn nội, đem định lượng ngay. Tính toán kết quả theo đường chuẩn NIF và DNIF được thiết lập trong ngày, xây dựng đường tuyến tính giữa nồng độ cơ chất/sản phẩm và thời gian phản ứng (hình 3).



Hình 3: Tương quan nồng độ NIF và DNIF theo thời gian phản ứng

Nhận xét: Kết quả cho thấy nồng độ NIF giảm đi và nồng độ DNIF tạo thành đều tuyến tính đến 20 phút, và bão hòa sau 30 phút. Theo kết quả này, có thể lựa chọn thời gian phản ứng từ 10 đến 20 phút cho các nghiên cứu chuyển hóa tiếp theo. Tuy nhiên, chúng tôi chọn thời gian ủ là 20 phút, vì mức độ chuyển hóa là cao nhất sẽ cho phép thực hiện nghiên cứu với nồng độ CYP3A4 thấp, tiết kiệm chi phí.

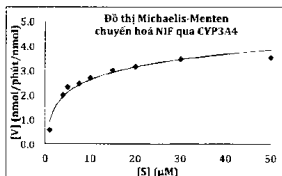
Xác định thông số chuyển hóa V_{max} và K_m của nifedipin

Để việc xác định thông số Michaelis-Menten của NIF đáng tin cậy, khoảng nồng độ cơ chất khảo sát ít nhất phải bao phủ từ $1/3 K_m$ đến $3 K_m$ với 6 nồng độ khác nhau, hoặc tốt nhất là 9–12 nồng độ từ $1/10 K_m$ đến $10 K_m$ [5]. Chuẩn bị các hỗn hợp phản ứng gồm: 50 μL gốc enzym + 50 μL gốc cơ chất ở 9 nồng độ + 50 μL gốc NADPH

+ 50 μL đệm phosphate pH 7,4. Nồng độ cuối cùng trong hỗn hợp phản ứng là: 0,25 mM NADPH, 0,25 nmol/mL CYP3A4, và 1,0–50 μM NIF.

Tiến hành ủ các mẫu phân tích trên ở 37 °C trong thời gian 20 phút, bất hoạt enzym bằng 200 μL acetonitril, thêm 50 μL gốc chuẩn nội (MI). Tiến hành sắc ký các mẫu phân tích trên. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 3 lần, lấy giá trị trung bình.

Từ nồng độ NIF, tính tốc độ phản ứng (bảng 1), vẽ đồ thị Michaelis-Menten (hình 4). Tính nghịch đảo nồng độ NIF $1/[S]$ và nghịch đảo tốc độ phản ứng $1/V$ (bảng 1).



Hình 4: Đồ thị Michaelis-Menten của NIF chuyển hóa qua CYP3A4

Nhận xét. Kết quả cho thấy nồng độ cơ chất bão hòa là $\geq 30 \mu\text{M}$. Như vậy, các thông số động học của CYP3A4 có thể được xác định khi thay đổi khoảng nồng độ cơ chất $\leq 20 \mu\text{M}$. Khoảng nồng độ NIF cho các thí nghiệm tiếp theo được chọn là 0 – 20 μM .

Bảng 1: Kết quả xác định tốc độ chuyển hóa của CYP3A4 theo nồng độ

[S] (μM)	[V] (nmol/phút/nmolCYP)	1/[S] (μM^{-1})	1/[V] (nmol/phút/nmolCYP) $^{-1}$
1,0	0,58	1,00	1,720
4,0	2,02	0,25	0,496
5,0	2,32	0,20	0,431
7,5	2,46	0,13	0,406
10	2,70	0,10	0,371
15	3,00	0,067	0,333
20	3,14	0,050	0,313
30	3,45	0,033	0,290
50	3,50	0,020	0,285
Phương trình Lineweaver - Burk		$y = 1,4754x + 0,2134$ ($r = 0,9952$)	
Thông số chuyển hóa của NIF		$K_m = 6,92 \mu\text{M}$ $V_{max} = 4,69 \text{ nmol/phút/nmol}$	

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Kết quả giá trị $K_m = 6,92 \mu\text{M}$ và $V_{\text{max}} = 4,69 \text{ nmol/phút/nmol CYP3A4}$, như vậy, là đạt yêu cầu về khoảng nồng độ (1–20 μM tương ứng 1/7 K_m đến 3 K_m). Các kết quả này cũng phù hợp với dữ liệu thực nghiệm trong một số nghiên cứu trước^[3,9]. Như vậy, có thể dùng NIF làm cơ chất đại diện cho hoạt tính của CYP3A4.

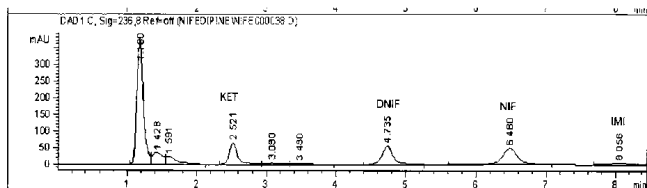
Khảo sát ảnh hưởng của thuốc khác tới CYP3A4

Sau khi đã xác định được thông số chuyển

hoá của NIF và các điều kiện tiến hành thí nghiệm với CYP3A4, chúng tôi ứng dụng mô hình để khảo sát ảnh hưởng của hai thuốc đã được biết đến là chất ức chế CYP3A4, là ketoconazol và erythromycin^[6].

Ảnh hưởng của ketoconazol (KET)

Tiến hành phản ứng chuyển hóa với dây nồng độ 1–20 μM NIF khi có mặt 50 nM KET (10 μL gốc KET/ 200 μL hỗn hợp phản ứng). KET được tách tốt khỏi pic cần phân tích (hình 5).



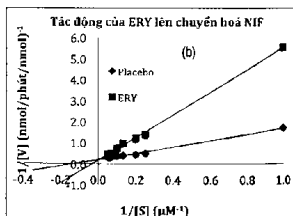
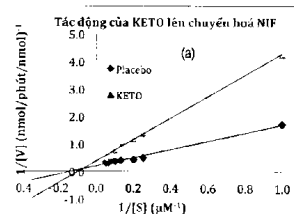
Hình 5: Sắc đồ của mẫu phân tích khi ủ 20 μM NIF cùng 50 nM KET

So sánh tốc độ phản ứng tại từng thời điểm khi có và không có KET, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,05$). Xây dựng đường cong Lineweaver-Burk của NIF khi có mặt KET so với khi không có KET. Kết quả trong hình 6 cho phép xác định KET là loại ức chế không cạnh tranh, với $K_i = 31,4 \text{ nM}$.

Ảnh hưởng của erythromycin

Tiến hành phản ứng chuyển hóa với dây nồng

độ 1–20 μM NIF khi có mặt 250 μM ERY (10 μL gốc ERY/ 200 μL hỗn hợp phản ứng). ERY hấp thụ UV kém nên không ảnh hưởng đến định lượng của các thành phần trong mẫu. So sánh tốc độ phản ứng tại từng thời điểm khi có và không có ERY, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p = 0,05$). Xây dựng đường cong Lineweaver-Burk của NIF khi có mặt ERY so với khi không có ERY. Kết quả trong hình 6 cho phép xác định ERY là loại ức chế cạnh tranh, với $K_i = 97,5 \mu\text{M}$.



Hình 6: Ảnh hưởng của (a) KET và (b) ERY lên chuyển hoá NIF qua CYP3A4

Kết quả trên hình 6 cho thấy KET là một chất ức chế kiểu không cạnh tranh (noncompetitive)

điển hình, điều này cũng thống nhất với một số tài liệu đã nghiên cứu về ketoconazol^[4,6-7]. Giá trị K_i

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

thu được cũng phù hợp với các giá trị tham khảo trong các nghiên cứu trên. Với ERY, cơ chế được xác định là loại ức chế cạnh tranh (competitive), và giá trị Km thu được cũng phù hợp với các tài liệu trước đây^[10].

Kết luận

Một phương pháp đánh giá ảnh hưởng của thuốc lên CYP3A4 *in vitro* đã được xây dựng. Phương pháp này dựa trên việc theo dõi chuyển hoá của NIF, một cơ chất điển hình của CYP3A4. Chuyển hoá của NIF có thể được theo dõi qua sự giảm nồng độ cơ chất NIF hoặc qua nồng độ sản phẩm chuyển hoá DNIF. Phương pháp này đã được ứng dụng để thử nghiệm đánh giá khả năng ức chế CYP3A4 của hai chất là ketoconazol và erythromycin. Các thông số chuyển hoá K_m , V_{max} của NIF cũng như hệ số ức chế K của KET và ERY xác định được khá thống nhất với các tài liệu đã công bố. Tuy loại hình nghiên cứu chuyển hoá *in vitro* này đã được ứng dụng nhiều ở nước ngoài, nhưng ở Việt Nam, đây là một trong những nghiên cứu đầu tiên ứng dụng mô hình này, đặc biệt là với nguồn CYP3A4 của microsome gan

người tài tổ hợp, một nguồn enzyme có thể cho kết quả dự đoán tốt cho tương tác thuốc *in vivo*.

Tài liệu tham khảo

1. Đào Thị Mai Anh (2003), "Nghiên cứu ảnh hưởng của asalem trên hệ thống enzyme cytochrome P450 ở gan của động vật thí nghiệm", *Luận văn Thạc sĩ dược học*, Trường Đại học Dược Hà Nội.
2. Đỗ Thị Tuyền, Nguyễn Thị Ngọc Dao, Nguyễn Thái Bình (2005), *Tạp chí Sinh học*, 27 (2): 82-88
3. Galetin A, Clarke SE, Houston JB (2003), *Drug Metab Dispos*, 31: 1108-1116
4. Gibbs MA, Thummel KE, Shen DD, Kunze KL (1999), *Drug Metab Dispos*, 27(2), 180-187
5. Ioannides C (2008), "Cytochromes P450: Role in the metabolism and toxicity of drugs and other xenobiotics", *RSC Publishing, Cambridge, UK*
6. Isoherranen N., Kunze KL., Allen KE., Nelson WL. and Thummel KE (2004), *Drug Metab Dispos*, 32(10), 1121-1131
7. Ito K., Brown HS. and Houston JB (2004), *Br. J Clin Pharmacol.*, 57(4), 473-486
8. Kenworthy KE., Bloomer JC., Clarke SE., Houston JB. (1999), *Br J Clin Pharmacol*, 48 716-727
9. Patki KC., Von Moltke LL., Greenblatt DJ (2003), *Drug Metab Dispos*, 31 938-944
10. Zhang X., Jones DR. and Hall SD. (2009), *Drug Metab Dispos*, 37(1), 150-160

(Ngày nhận bài: 10/03/2015 - Ngày duyệt đăng: 04/05/2015)

✓ Đánh giá tác dụng kháng khuẩn của viên C.T.K. đối với một số chủng vi khuẩn gây viêm đường sinh dục dưới

Hoàng Thị Diệp¹, Nguyễn Tuấn Bình¹
Trần Trọng Dương²

¹Bệnh viện Y học cổ truyền, Bộ Công an
²Cục Y tế, Tổng cục Hậu cần - Kỹ thuật, Bộ Công an
*E-mail: tuanbinh58@gmail.com

Summary

CTK pills were evaluated for antibacterial activity *in vitro* against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and some bacterial strains causing inflammation of the lower genital tract isolated from female patients. CTK pills inhibited completely *S. aureus* ATCC 25923 at the dilution 1/150 and *E. coli* ATCC 25922 at the dilution 1/100. On the *S. aureus* strains isolated from female patients, CTK pills showed antibacterial activity 100% at the dilution 1/50; 96.7% at the dilution 1/75; 80 % at the dilution 1/100; 63.3 % at the dilution 1/150, and were inactive at the dilution 1/200. CTK pills inhibited the isolated *E. coli* strains by 90 % at the dilution 1/50; 76.7 % at the dilution 1/75; 66.7 % at the dilution