

## Влияние генов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков на течение муковисцидоза и ответ при проведении антибактериальной терапии\*

Петрова Н.В.<sup>1</sup>, Новоселова О.Г.<sup>1</sup>, Кондратьева Е.И.<sup>1</sup>,  
Биканов Р.А.<sup>1</sup>, Зинченко Р.А.<sup>1,2</sup>, Шерман В.Д.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», факс: 324-07-02; e-mail: npetrova63@mail.ru

<sup>2</sup> — Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, e-mail: renazinchenko@mail.ru

В статье представлены результаты исследования ассоциаций генов первой фазы системы биотрансформации ксенобиотиков с муковисцидозом (МВ), его тяжестью и развитием побочных реакций и резистентности на внутривенную антибактериальную терапию у детей, больных МВ. Численность обследованных детей с МВ составила 118 человек, выборка здоровых — 70 индивидов. Все обследованные дети проживают на территории Европейской части РФ. Исследование 6 полиморфизмов 4 генов первой фазы системы биотрансформации ксенобиотиков — *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, проведено методом ПДРФ-анализа. Не выявлено достоверных различий частот аллелей и генотипов изученных полиморфизмов между группами здоровых и детей с МВ, кроме более высокой частоты аллеля *CYP2D6\*4* в общей группе больных МВ ( $p = 0,023$ ), а также между группами больных МВ, имеющих резистентную к антибактериальной терапии микрофлору дыхательного тракта, и не имеющих таковую, и группами пациентов, получающих 3 и более курса внутривенной терапии в год и получающих антибактериальную терапию менее 2 раз в течение года. Наблюдается тенденция к повышению частоты аллеля *CYP2C9\*3* и гетерозиготного генотипа *CYP2C9\*3/CYP2C9\*1* в группе детей, получающих внутривенную антибактериальную терапию спорадически либо не получающих вовсе по сравнению с получающими внутривенную антибактериальную терапию более 3 раз в год ( $p < 0,1$ ). Выявлена ассоциация аллеля *CYP3A4\*1B* и генотипа *CYP3A4\*1B/\*1A* с развитием неблагоприятных побочных реакций на антибактериальные препараты ( $p = 0,023$  и  $p = 0,025$ ). Носительство гетерозиготного генотипа *CYP3A4\*1B/\*1A* и носительство комбинированного генотипа *CYP3A4\*1B/\*1A(-392C/T) x CYP2D6\*1/\*1(1846G/G)* можно рассматривать, как маркеры повышенного риска развития побочных реакций на внутривенную антибактериальную терапию у больных МВ ( $OR = 8,50$  (95%CI 1,64–44,04) и  $OR = 35,00$  (95%CI 3,29–372,14) соответственно).

**Ключевые слова:** муковисцидоз, гены первой фазы системы биотрансформации, цитохромы P450, антибиотикорезистентность, нежелательные побочные реакции на антибиотикотерапию у детей с муковисцидозом

### Введение

МВ (кистозный фиброз поджелудочной железы) — это системное наследственное заболевание, обусловленное мутацией гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (*CFTR*) и характеризующееся поражением желез внешней секреции, тяжёлыми нарушениями функций органов дыхания и желудочно-кишечного тракта. В связи с этим терапия муковисцидоза носит комплексный характер и направлена на разжижение и удаление вязкой мокроты из бронхов, борьбу с инфекцией в легких, на замещение недостающих ферментов поджелудочной железы, коррекцию поливитаминовой недостаточности, разжижение желчи [1].

Хроническая инфекция лёгких является следствием нарушения процесса мукоцилиарного очищения при МВ, к доминирующим возбудителям относят *S.aureus*,

*P.aeruginosa* (в том числе мукоидная форма), представителей неферментирующих микроорганизмов, MRSA, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia*. Больные МВ при хронической инфекции дыхательных путей получают несколько раз в год длительные курсы антибактериальной терапии в повышенных дозах, в связи с чем часто наблюдаются нежелательные побочные реакции и развитие антибактериальной резистентности [2]. Исследование причин антибактериальной резистентности и нежелательных побочных явлений у данной категории больных является перспективным. Восприимчивость бактерии к антибиотику может широко варьировать, и зависит как от патогенных свойств микробного агента, так и от особенностей конкретного организма человека [3, 4, 5].

Эффективность и безопасность лекарственного средства (ЛС) в большинстве случаев зависит от его концент-

\* Работа выполнена при финансировании по теме «Совершенствование программ диагностики, лечения и медико-социальной адаптации больных муковисцидозом (2012—2019 гг.)» и частичном финансировании гранта РФФИ — Беларусь «Изучение полиморфных вариантов генов биотрансформации ксенобиотиков для оптимизации алгоритма подбора противомикробной химиотерапии при муковисцидозе» №16-54-00196.

рации в области молекул-мишеней, которая чаще всего связана с концентрацией ЛС в плазме крови. Большинство ксенобиотиков, попав в организм, не оказывают прямого биологического эффекта и, подвергаясь биотрансформации, выделяются в виде метаболитов. Гены биотрансформации определяют индивидуальные реакции организма на различные неблагоприятные воздействия внешних факторов, в том числе ЛС. Их участие может ускорять и усугублять патологический процесс, а также провоцировать развитие осложнений. В то же время, ускоренная биотрансформация ЛС может приводить к неэффективности проводимой терапии. В зависимости от особенностей генома человек может сохранять устойчивость или, напротив, обнаруживать повышенную чувствительность к тем или иным повреждающим агентам [6, 7]. Биотрансформация представляет собой процесс, в котором участвуют многие ферменты детоксикации и условно подразделяется на три фазы: 1 — активация, 2 — детоксикация и 3 — выведение [8].

К ключевым ферментам первой фазы биотрансформации ксенобиотиков относятся цитохромы P450. Белки семейства цитохрома P450 участвуют в метаболизме многих ЛС. Для некоторых из них выявлены «функционально значимые» полиморфизмы и показана связь между определенными полиморфными аллелями цитохромов и гиперчувствительностью пациентов к различным препаратам. Большинство этих полиморфизмов представляют собой однонуклеотидные замены [8, 9].

В настоящей работе изучены полиморфизмы генов ферментов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков (*CYP2C9\*3* (rs1057910; c.1075A>C; I359L), *CYP2C9\*2* (rs1799853; c.430C>T; R144C), *CYP2C19\*2* (rs4244285; c.681G>A), *CYP2C19\*3* (rs4986893; c.636G>A; W212X), *CYP2D6\*4* (rs3892097; c.1846G>A), *CYP3A4\*3* (rs4986910; M445T; c.1334T>C), *CYP3A4\*1B* (rs2740574; c.-392C>T)) потенциально влияющих на ответ больных МВ на антибактериальную терапию.

### Материалы и методы

В обследование включены 118 детей с установленным диагнозом *муковисцидоз* и 70 практически здоровых индивидов. Все пациенты проходили обследование в детском отделении КДЦ поликлиник ЦКБ РАН — клинической базе научно-клинического отдела муковисцидоза ФГБНУ «МГНЦ». Диагноз *муковисцидоз* устанавливался согласно Европейским и отечественным рекомендациям МЗ РФ [1, 10, 11]. Антибактериальная терапия назначалась на основе рекомендаций европейских и российских консенсусов [2, 4, 10]. Нежелательные побочные реакции (НПР) регистрировались согласно рекомендациям МЗ РФ и Федеральному закону от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [12].

Проанализированы записи амбулаторных карт пациентов и данные Национального регистра РФ 2010—2015 г. Соотношение по полу 0,48 лица мужского

пола; 0,52 лица женского пола. Средний возраст детей составил — 7,32; Std 4,58 лет (от 8,5 мес. до 18 лет). 87,7% детей проживают в Московском регионе.

Возможное влияние полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков на течение заболевания и неблагоприятный ответ на антибактериальные средства исследовано при сравнении следующих групп:

**Дизайн 1.** Группа из 30 пациентов, имеющих резистентную к антибактериальной терапии микрофлору дыхательного тракта (мукоидная форма *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, MRSA) (группа 1.1), и группа из 88 пациентов со *Staphylococcus aureus* (MSSA) и без значимой микрофлоры (группа 1.2)

**Дизайн 2.** Группа из 12 пациентов с неблагоприятными побочными реакциями (НПР) на антибактериальные препараты (группа 2.1.) в сравнении с группой из 106 детей без побочных реакций (группа 2.2) и здоровым контролем (70 чел.).

**Дизайн 3.** Группа из 38 пациентов, получающих в год 3 и более курса внутривенной терапии (группа 3.1.) хронической инфекции дыхательного тракта и группа из 80 детей аналогичного возраста, которые в течение года получают антибактериальную терапию менее 2 раз или не получают (группа 3.2).

Контрольную группу составили индивиды, не имеющие хронической соматической патологии, соответствующие по полу, возрасту и национальной принадлежности группе пациентов с МВ, проживающие в Московском регионе.

Молекулярно-генетические исследования выполнены в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ». Материалом исследования являлась ДНК, выделенная из лейкоцитов периферической крови, стандартным методом с использованием наборов для выделения ДНК «Wizard Genomic DNA Purification Kit» фирмы «Promega» (USA) в соответствии с рекомендациями производителя.

Изучение полиморфизма генов биотрансформации проводили методом ПЦР и последующего ПДРФ анализа с использованием праймеров, разработанных в лаборатории генетической эпидемиологии ФГБНУ «МГНЦ» (табл. 1, 2). Для исследования полиморфизмов генов *CYP2C9* (rs1057910; c.1075A>C; I359L), *CYP2C19* (rs4986893; c.636G>A; W212X), *CYP2D6* (c.1846G>A), *CYP3A4* (rs4986910; c.1334T>C; M445T) последовательность праймеров была изменена для создания сайта рестрикции для соответствующих эндонуклеаз (табл. 1, 2). Наличие природных сайтов рестрикции для соответствующих эндонуклеаз позволило исследовать полиморфизмы генов *CYP2C9* (rs1799853; c.430C>T; R144C), *CYP2C19* (rs4244285; c.681G>A), *CYP2D6* (rs3892097; 1846G>A), *CYP3A4\*1B* (rs2740574; c.-392C>T) (табл. 1, 2).

### Статистический анализ

Для оценки соответствия распределения генотипов ДНК-маркеров ожидаемым значениям при равновесии

Харди–Вайнберга (PXB) использовали критерий  $\chi^2$  Пирсона, для сравнения распределений частот аллелей и генотипов в выборках больных и здоровых — точный критерий Фишера. Об ассоциации генотипов с предрасположенностью к осложнению судили по величине отношения шансов (OR — odds rate). Для расчетов использовали программы «Калькулятор для расчета статистики в исследованиях «случай-контроль»» ([http://test.tapotili.ru/calculator\\_or.php](http://test.tapotili.ru/calculator_or.php)) и InStat3. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

При анализе межгенных взаимодействий методом редукции мультифакторных размерностей — Multifactor Dimensionality Reduction (MDR) ([mdr-2.0\\_beta\\_8.3](http://www.multifactor dimensionality reduction.org/); <http://www.multifactor dimensionality reduction.org/>) ис-

пользован алгоритм всестороннего поиска (exhaustive search algorithm). Метод позволяет оценить все возможные  $n$  — факторные модели ( $n < m$ ;  $m$  — число изучаемых ДНК-локусов). Уровень значимости ( $p$ ) для выбранной  $n$ -локусной модели межгенных взаимодействий оценивается процедурой Монте-Карло (1000 перестановок).

### Результаты и обсуждение

Система цитохрома P-450 печени ответственна за первую фазу метаболизма большинства эндогенных и экзогенных молекул. Ферменты цитохрома P-450 превращают эти вещества в промежуточные электрофиль-

Таблица 1

#### Последовательности праймеров

Ген	Полиморфизм	Последовательность праймеров	Т отжига, °C
<i>CYP2C9</i>	rs1057910; c.1075A>C; I359L	F 5' TGCACGAGGTCCAGAGATAT R 5' ACCCGGTGATGGTAGAGGTT	60
<i>CYP2C9</i>	rs1799853; c.430C>T; R144C	F 5' GCATGTGCCTGTTTCAGCAT R 5' TATGGCCACCCCTGAAATGT	60
<i>CYP2C19</i>	rs4244285; c.681G>A	F 5' TCAAAGCAGGTATAAGTCTAGGAA R 5' CCTTGACCTGTAAACATCCGT	60
<i>CYP2C19</i>	rs4986893; c.636G>A; W212X	F 5' CAGGATTGTAAGCACCCCAT R 5' CCAGATATTCACCCCATGGCT	60
<i>CYP3A4</i>	rs4986910; c.1334T>C; M445T	F 5' GGACACATCACCCCTGAAT R 5' TGTTCAGGAGAGCAAACCTC	60
<i>CYP3A4</i>	rs2740574; c.-392C>T	F 5' CAGCCATAGAGACAAGGGCC R 5' ACACACACCACTCACTGACC	62
<i>CYP2D6</i>	rs3892097; c.1846G>A	F 5' AGAAGGGCACAAAGCGGGAA R 5' AGAGACTCCTCGTCTCTCGC	60

Таблица 2

#### Анализ полиморфизмов

Ген (полиморфизм)	Продукт амплификации (п.н.)	Эндонуклеаза	Аллели	Продукты рестрикции (п.н.)
<i>CYP2C9</i> (rs1057910; c.1075A>C; I359L)	183	EcoRV	1075A	183
			1075C	165 + 18
<i>CYP2C9</i> (rs1799853; c.430C>T; R144C)	400	AspS9 I	430C	81 + 177 + 142
			430T	81 + 319
<i>CYP2C19</i> (rs4244285; c.681G>A)	512	MspI	681G	277 + 235
			681A	512
<i>CYP2C19</i> (rs4986893; c.636G>A; W212X)	169	NcoI	636G	18 + 151
			636A	169
<i>CYP3A4</i> (-392C>T) rs2740574	173	MspI	-392C	19 + 154
			-392T	173
<i>CYP3A4</i> (M445T; c.1334T>C) rs4986910;	395	FaeI	1334T	233 + 139 + 23
			1334C	233 + 162
<i>CYP2D6</i> (rs3892097; c.1846G>A)	264	MvaI	1846G	73 + 191
			1846A	264

ные производные, которые затем соединяются с гидрофильными дериватами посредством ферментов второй фазы и выводятся из организма. У человека обнаружено около 60 разных генов системы цитохрома P-450, но лишь некоторые из них участвуют в метаболизме большинства широко известных и используемых лекарственных средств [13, 14].

В настоящей работе исследованы пять полиморфных вариантов генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, снижающие ферментативную активность соответствующих цитохромов, носительство которых приводит к фенотипу «медленный метаболизатор», и один полиморфизм в гене *CYP3A4*, приводящий к повышению активности фермента, обусловленной более высоким уровнем транскрипции [14], в выборках 70 здоровых индивидов и 118 больных МВ. Во всех выборках, как больных МВ, так и здоровых наблюдается соответствие распределения частот генотипов всех изученных полиморфизмов равновесному распределению Харди—Вайнберга.

Субстратами цитохрома *CYP2C9* являются более 100 современных лекарственных средств, составляющих около 10—20% часто используемых препаратов. Среди них и различные нестероидные противовоспалительные препараты (ибупрофен, диклофенак, пироксикам, флурбипрофен, целекоксиб). Известны более 50 различных однонуклеотидных полиморфизмов, затрагивающих как промоторную, так и кодирующую области гена *CYP2C9* [14]. Изучены наиболее частые полиморфизмы — *CYP2C9\*2* (rs1799853; с.430С>Т, R144С) и *CYP2C9\*3* (rs1057910; с.1075А>С, I359L). Частоты аллелей *CYP2C9\*2* (с.430С>Т, R144С) и *CYP2C9\*3* (с.1075А>С, I359L) в выборке здоровых составили 0,1232 и 0,0678, соответственно, а в выборке больных МВ — 0,0763 и 0,0929 соответственно (табл. 3). Различия частот между группами не достоверны. Выявлен один пациент и четыре здоровых индивида, являющихся гетерозиготными компаундами *CYP2C9\*2/CYP2C9\*3* (но различие частот не достигает уровня значимости;  $p = 0,065$ ).

Цитохром *CYP2C19* участвует в метаболизме многих клинически важных препаратов, таких, как ингибиторы протонной помпы (омепразол, лансопразол, рабепразол, пантопразол), антималярийный прогуанил, анксиолитический диазепам). Идентифицировано около 20 полиморфизмов гена *CYP2C19*. Часто встречаемые варианты: *CYP2C19\*2* (rs4244285; с.681G>А) и *CYP2C19\*3* (rs4986893; с.636G>А, W212X) [9, 14]. В исследованных выборках частота аллеля *CYP2C19\*2* у здоровых индивидов составила 0,1286, а аллеля *CYP2C19\*3* — 0,0071. У больных МВ частота аллеля *CYP2C19\*2* равна 0,1059, тогда как аллель *CYP2C19\*3* не обнаружен (табл. 3). В группе здорового контроля обнаружено два гомозиготных носителя аллеля *CYP2C19\*2* и один гетерозиготный компаунд *CYP2C19\*2/CYP2C19\*3*, среди больных МВ — только один индивид, имеющий гомозиготный

генотип *CYP2C19\*2/CYP2C19\*2* (различия не достоверны;  $p = 0,1242$ ).

Цитохром *CYP2D6* метаболизирует около 20% всех известных лекарственных средств. Описано около 40 аллелей, снижающих активность или специфичность к субстрату данного фермента. Их распределение характеризуется этноспецифичностью. Около 6—10% европейского населения являются «медленными метаболизаторами» по этому ферменту [9, 15]. Частота аллеля *CYP2D6\*4* (rs3892097; с.1846G>А) составляет 0,150 в контрольной выборке и 0,250 у больных МВ (различия достоверны;  $p = 0,026$ ) (табл. 3).

Цитохром *CYP3A4* отвечает за окислительный метаболизм до 60% используемых лекарственных препаратов. Наибольший уровень экспрессии *CYP3A4* у человека наблюдается в печени. Он индуцируется различными агентами, включая глюкокортикоиды и фенобарбитал. По-видимому, нарушение активности или уровня экспрессии *CYP3A4* является ключом для предсказания нежелательной ответной реакции на лекарственный препарат или его токсичность [14]. Вероятно, *CYP3A4* играет центральную роль в метаболизме иммуносупрессорного циклического пептида, циклоспорина А, а также макролидов, таких, как эритромицин. Он также катализирует 6-бета-гидроксилирование ряда стероидов, включая тестостерон, прогестерон и кортизол. Показано, что полиморфизм с.-392С>Т в промоторной области гена *CYP3A4* ускоряет метаболизм лекарственных препаратов [14]. В настоящей работе изучены два аллеля *CYP3A4\*1B* (rs2740574; с.-392С>Т) и *CYP3A4\*3* (rs4986910; с.1334Т>С; M445Т). В контроле частота аллеля *CYP3A4\*1B* составила 0,0429, аллеля *CYP3A4\*3* — 0,0071. В выборке больных МВ аллель *CYP3A4\*1B* обнаружен с частотой 0,0297; аллель *CYP3A4\*3* не выявлен (но различия не достоверны;  $p > 0,05$ ) (табл. 3).

Анализ частот генотипов полиморфизма генов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков не выявил статистически значимых различий между сравниваемыми группами: 118 больных МВ и 70 здоровых индивидов, ( $p > 0,05$ ; табл. 3).

В контрольной выборке 70 здоровых индивидов частоты изученных аллелей генов биотрансформации ксенобиотиков первой фазы соответствуют данным литературы по распределению частот аллелей в европейских популяциях [14], а также в исследованной русской популяции из Воронежа [15] (табл. 4).

При сравнении двух групп больных МВ: 30 детей, имеющих резистентную к антибактериальной терапии микрофлору дыхательного тракта (мукоидная форма *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, MRSA) (группа 1.1), и 88 детей, имеющих в высеве *Staphylococcus aureus* (MSSA) или без значимой микрофлоры (группа 1.2); не выявлены достоверные различий в распределении частот аллелей и генотипов изученных генов цитохромов P450 (табл. 3).

Частоты аллелей и генотипов генов цитохромов P450  
в группе здоровых и группах больных МВ

Аллели и генотипы	Здоровые (контроль)		Больные МВ (все)		Группы в зависимости от резистентности к АБТ				Группы в зависимости от наличия НГР				Группы в зависимости от количества курсов АБТ			
					1.1		1.2		2.1.		2.2.		3.1.		3.2.	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>CYP2C9*3</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
AA	57	81,43	100	84,75	26	86,67	74	82,50	12	100,00	88	83,02	36	94,74	64	80,00
AC	13	18,57	18	15,25	4	13,33	14	17,50	0	0,00	18	16,98	2	5,26	16	20,00
CC	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	p = 0,55				p = 0,77				p = 0,21				p = 0,053			
A	127	90,71	218	92,37	56	93,33	162	92,05	24	100,00	194	91,51	74	97,37	144	90,00
C	13	9,29	18	7,63	4	6,67	14	7,95	0	0,00	18	8,49	2	2,63	16	10,00
	p = 0,57				p = 1,00				p = 0,23				p = 0,064			
<i>CYP2C9*2</i>	69		118		30		88		12		106		38		80	
CC	52	75,46	102	86,44	26	86,67	76	86,36	9	75,00	93	87,74	33	86,84	69	86,25
TC	17	24,64	16	13,56	4	13,33	12	13,64	3	25,00	13	12,26	5	13,16	11	13,75
TT	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	p = 0,073				p = 0,76				p = 0,21				p = 0,93			
C	121	87,68	220	93,22	56	93,33	164	93,18	21	87,50	199	93,87	71	93,42	149	93,13
T	17	12,32	16	6,78	4	6,67	12	6,82	3	12,5	13	6,13	5	6,58	11	6,87
	p = 0,088				p = 1,00				p = 0,21				p = 1,00			
<i>CYP2C19*2</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
AA	2	2,86	1	0,85	1	3,33	0	0,00	0	0,00	1	0,94	1	2,63	0	0,00
AG	14	20,00	23	19,49	8	26,67	15	17,05	3	25,00	20	18,87	8	21,05	15	18,75
GG	54	77,14	94	79,66	21	70,00	73	82,95	9	75,00	85	80,19	29	76,32	65	81,25
	p = 0,71				p = 0,19				p = 0,71				p = 0,62			
A	18	12,86	25	10,59	10	16,67	15	8,52	3	12,50	22	10,38	10	13,16	15	9,37
G	122	87,14	211	89,41	50	83,33	161	91,48	21	87,50	190	89,62	66	86,84	145	90,63
	p = 0,51				p = 0,09				p = 0,73				p = 0,37			
<i>CYP2C19*3</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
AA	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
AG	1	1,43	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
GG	69	98,57	118	100,00	30	100,00	88	100,00	12	100,00	106	100,00	38	100,00	80	100,00
	p = 0,37															
A	1	0,71	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
G	139	99,29	236	100,00	60	100,00	176	100,00	24	100,00	212	100,00	76	100,00	160	100,00
	p = 0,37															
<i>CYP2D6*4</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
AA	1	1,43	8	6,78	1	3,23	6	8,05	1	8,33	7	6,60	2	5,26	6	7,50
AG	19	27,14	43	36,44	10	35,48	34	36,78	3	25,00	40	37,74	14	36,84	29	36,25
GG	50	71,43	67	56,78	19	61,29	48	55,17	8	66,67	59	55,66	22	57,89	45	56,25
	p = 0,071				p = 0,67				p = 0,58				p = 0,90			
A	21	15,00	59	25,00	12	20,00	46	26,14	5	20,83	54	25,47	18	23,68	41	25,62
G	119	85,00	177	75,00	48	80,00	130	73,86	19	79,17	158	74,53	58	76,32	119	74,38
	p = 0,026				p = 0,39				p = 0,80				p = 0,87			

Таблица 3 (окончание)

Аллели и генотипы	Здоровые (контроль)		Больные МВ (все)		Группы в зависимости от резистентности к АБТ				Группы в зависимости от наличия НПР				Группы в зависимости от количества курсов АБТ			
					1.1		1.2		2.1.		2.2.		3.1.		3.2.	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>CYP3A4*3</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
ТТ	69	98,57	118	100,00	30	100,00	88	100,00	12	100,00	106	100,00	38	100,00	80	100,00
СТ	1	1,43	0	0,00	0	0,00	0	0,00%	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
СС	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00
	p = 0,37															
Т	139	99,29	236	100,00	60	100,00	176	100,00	24	100,00	212	100,00	76	100,00	160	76
С	1	0,71	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0
	p = 0,37															
<i>CYP3A4*1B</i>	70		118		30		88		12		106		38		80	
ТТ	64	91,43	111	94,07	27	90,32	84	95,40	9	75,00	102	96,23	34	89,47	77	96,25
СТ	6	8,57	7	5,93	3	9,68	4	4,60	3	25,00	4	3,77	4	10,53	3	3,75
СС	0		0		0	0,00	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00	0	0,00
	p = 0,56				p = 0,39				p = 0,023				p = 0,21			
Т	134	95,71	229	97,03	57	95,00	172	97,73	21	87,50	208	98,11	72	94,74	157	98,13
С	6	4,29	7	2,97	3	5,00	4	2,27	3	12,50	4	1,89	4	5,26	3	1,87
	p = 0,56				p = 0,37				p = 0,025				p = 0,22			

Примечание. Группа 1.1. — пациенты, имеющие резистентную к антибактериальной терапии микрофлору дыхательного тракта (мукоидная форма *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, MRSA); группа 1.2 — группа пациентов со *Staphylococcus aureus* (MSSA) и без значимой микрофлоры; группа пациентов 2.1. — дети с неблагоприятными побочными реакциями (НПР) на антибактериальные препараты; группа 2.2. пациенты без побочных реакций; группа 3.1. — группа пациентов, получающих в год 3 и более курса внутривенной терапии при терапии хронической инфекции дыхательного тракта; группа 3.2 — группа детей, которые в течение года получали антибактериальную терапию менее 2 раз или не получали.

Таблица 4

## Частота аллелей цитохромов в европейских популяциях

Аллели	Русские* (Москва)	Русские** (Воронеж)	Европейцы ***
<i>CYP2C9*2</i>	0,1232	0,105	До 0,20
<i>CYP2C9*3</i>	0,0929	0,067	0,09
<i>CYP2C19*2</i>	0,1286	0,114	0,16
<i>CYP2C19*3</i>	0,0071	0,003	<0,005
<i>CYP2D6*4</i>	0,1500	0,182	0,207
<i>CYP3A4*1B</i>	0,0429	—	0,17-0,23
<i>CYP3A4*3</i>	0,0071	—	<0,005

Примечание. \* — результаты настоящего исследования (табл. 3); \*\* — по данным [11]; \*\*\* — по данным [10].

При сравнении двух групп больных МВ: 12 детей с НПР на препараты (антибиотики) (группа 2.1) и 106 пациентов, не имеющих побочных реакций (группа 2.2), выявлены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфизма -392С>Т гена *CYP3A4* (табл. 3). При сравнении каждой из групп больных МВ с группой здорового контроля не выявлено различий в частотах аллелей и генотипов по изученным

полиморфизмам. Наблюдаются достоверно более высокие частоты аллеля *CYP3A4\*1B* и гетерозиготного генотипа *CYP3A4\*1B/\*1A* в группе детей с НПР на антибиотики по сравнению с детьми, у которых таких реакций не отмечено ( $p < 0,05$ ; табл. 3). Носительство гетерозиготного генотипа *CYP3A4\*1B/CYP3A4\*1A* можно рассматривать, как маркер повышенного риска развития побочных реакций при применении внутривенной ан-

тибактериальной терапии у больных МВ (OR = 8,50 (95%CI 1,64–44,04); (табл. 5). Следует отметить, что при МВ дозы препаратов назначаются выше, чем у людей без данного заболевания, что обусловлено особенностями заболевания [2]. Возможно, что НПР выявляются при назначении высоких доз антибактериальных препаратов, что отсутствует у здоровых лиц. В то же время, размер группы с НПР был невелик.

При сравнении двух групп больных муковисцидозом: 38 детей с высокой частотой бронхолегочных обострений хронического инфекционного процесса дыхательного тракта, получающих внутривенную антибактериальную терапию более 3 раз в год (группа 3.1) и 80 детей, получающих внутривенную антибактериальную терапию спорадически либо не получающих вовсе (группа 3.2) не выявлены достоверные различия в распределении частот аллелей и генотипов генов цитохромов P450. Наблюдается тенденция к повышению частоты аллеля *CYP2C9\*3* и гетерозиготного генотипа *CYP2C9\*3/CYP2C9\*1* в группе детей, получающих внутривенную антибактериальную терапию спорадически либо не получающих вовсе, по сравнению с получающими внутривенную антибактериальную терапию более 3 раз в год ( $p < 0,1$ ; табл.3). Данное наблюдение согласуется с утверждением, что при фенотипе «медленный метаболизатор» терапевтический эффект может быть достигнут при более низких дозах лекарственного средства [15, 16].

Для оценки межгенных взаимодействий методом MDR [17] использован алгоритм всестороннего поиска (exhaustive search algorithm), при котором оцениваются все возможные комбинации изучаемых ДНК-маркеров. При сравнении групп здоровых и больных МВ, а также групп больных МВ 1.1 с 1.2 и 3.1 с 3.2 не выявлено значимых моделей взаимодействия полиморфных генов. Только при сравнении групп больных 2.1 и 2.2 подтверждена значимость локуса *CYP3A4* при развитии неблагоприятных побочных реакций при внутривенной антибактериальной терапии: генотип *CYP3A4\*1B/\*1A* является маркером повышенного риска развития

НПР у детей больных МВ. Кроме того, выявлена ассоциация комбинированного генотипа по двум генам *CYP3A4\*1B/\*1A* × *CYP2D6\*1/\*1* с риском развития НПР у детей, больных МВ ( $p = 0,0031$ ; табл. 5).

В процессе реакций первой фазы биотрансформации, среди ферментов которой ведущее место занимает система цитохрома P450, лекарственные средства переходят в более полярные и водорастворимые (гидрофильные) соединения, чем исходное вещество, за счет присоединения или высвобождения активных функциональных групп. Нередко промежуточные продукты, образующиеся в результате биотрансформации первой фазы, могут быть более токсичными, обладать более выраженной мутагенной, канцерогенной и даже тератогенной активностью, чем исходные соединения, и, вследствие этого, быть причиной различных патологических состояний и болезней [8].

Аллель *CYP3A4\*1B* характеризуется повышенной экспрессией гена соответствующего цитохрома и, вероятно, более высоким уровнем метаболизма ксенобиотика (лекарственного средства) [15]. Следует ожидать, при этом и более высокую скорость образования промежуточных метаболитов, которые и могут вызывать нежелательные побочные реакции у пациентов с МВ, получающих высокие дозы внутривенной антибиотикотерапии, в случае носительства аллеля *CYP3A4\*1B*. Носительство комбинированного двугенного генотипа *CYP3A4\*1B/\*1A* (-392C/T) × *CYP2D6\*1/\*1* (1846G/G) не противоречит данной гипотезе, поскольку гомозиготный генотип *CYP2D6\*1/\*1* (1846G/G) соответствует фенотипу «экстенсивного метаболизатора» и приводит как к высокому уровню метаболизма лекарственных средств, так и к высокому уровню продукции промежуточных метаболитов. В то же время размер группы с НПР был невелик, и для окончательного вывода о значении *CYP3A4\*1B* в риске развития побочных реакций при антибиотикотерапии следует проанализировать большую по объему выборку.

Таблица 5

**Отношение шансов, чувствительность и специфичность оценки повышенного риска развития побочных реакций при муковисцидозе при тестировании полиморфизмов в генах *CYP3A4* и *CYP2D6***

Показатель	<i>CYP3A4*1B/*1A</i> (-392C/T)	<i>CYP3A4*1B/*1A</i> (-392C/T) × <i>CYP2D6*1/*1</i> (1846G/G)
Отношение шансов (OR)	8,50 (95%CI 1,64–44,04)	35,00 (95%CI 3,29–372,14)
Чувствительность	0,2500 (95%CI 0,05484–0,5717)	0,2500 (95%CI 0,05484–0,5717)
Специфичность	0,9623 (95%CI 0,9061–0,9896)	0,9906 (95%CI 0,9485–0,9998)
Положительная предсказательная оценка	0,4286 (95%CI 0,09895–0,8158)	0,7500 (95%CI 0,1942–0,9937)
Отрицательная предсказательная оценка	0,9189 (95%CI 0,8516–0,9623)	0,9211 (95%CI 0,855–0,9632)
Отношение вероятности	6,625	26,500
Показатель	<i>CYP3A4*1B</i> – (-392C)	–
Отношение шансов (OR)	7,43 (95%CI 1,56–35,46)	–

## Список литературы

1. Муковисцидоз. Под редакцией Н.И. Капранова, Н.Ю. Каширской. — М.: ИД «Медпрактика-М», 2014. 682 с.
2. Амелина ЕЛ, Ашерова ИК, Волков ИК и др. Проект национального консенсуса «муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия» раздел «антимикробная терапия» (координаторы: Капранов Н.И., Кондратьева Е.И., Каширская Н.Ю.). Педиатрия 2014 Том 93 №4 107-123
3. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Oct 15; 168(8):918-51.
4. Downes KJ, Hahn A, Wiles J, Courter JD, Vinks AA. Dose optimisation of antibiotics in children: application of pharmacokinetics/pharmacodynamics in paediatrics. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;43(3):223-230. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.11.006.
5. Кондратьева Е И, Новоселова ОГ, Петрова НВ, Зинченко РА, Чакова НИ, Бобровничий ВИ Возможности клинической фармакогенетики в персонализированном применении антибактериальных лекарственных средств Медицинская генетика 2015 Том 14 №12(162) 11-20
6. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты // М.: Изд-во Реафарм, 2004. — 144 с. 4
7. Баранов В.С. Генетический паспорт — основа индивидуальной и предиктивной медицины // СПб.: издательство Н-Л, 2009.- 528 с.
8. Чурносоев МИ, Полякова ИС, Пахомов СП, Орлова ВС Молекулярные и генетические механизмы биотрансформации ксенобиотиков Научные ведомости БелГУ. Серия: Медицина. Фармация. 2011. №16 (111). С.223-228.
9. Кукес В., Сычев Д., Бруслик Т., Чилова Р., Гасанов Н., Сереброва С., Савельева М., Игнатъев И. Изучение транспортеров лекарственных средств как новая возможность персонализации фармакотерапии. // Врач. — 2007. -№5.- с. 2-5.
10. Smyth AR, Bell SC, Bojcin S, et al. European Cystic Fibrosis Society Standards of Care: Best Practice guidelines *Journal of Cystic Fibrosis* 13 (2014) S23-S42
11. Recommendations for the classification of diseases as CFTR-related disorders. *Journal of Cystic Fibrosis Volume 10 Suppl 2 (2011) S86-S102*
12. Определение степени достоверности причинно-следственной связи «неблагоприятная побочная реакция — лекарственное средство» (Классификация и методы). Методические рекомендации (Утв. РОСЗДРАВНАДЗОРМ 02.10.2008)
13. Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, et al Cytochrome P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42, 1996.
14. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiss A, S Preissner polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy *PLOS ONE* www.plosone.org December 2013 Volume 8 Issue 12 e82562
15. Gaikovitch EA, Cascorbi, Mrozikiewicz PM, Brockmoller J, Frotschl R, Kopke K, Gerloff T, Chernov JN, Roots I. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003 Aug;59(4):303-12.
16. Сычев Д.А., Игнатъев И.В., Раменская Г.В., Кропачева Е.С., Михеева Ю.А., Панченко Е.П., Белолипецкая В.Г., Белолипецкий Н.А., Казаков Р.Е., Гасанов Н.А., Кукес В.Г. Фармакогенетические исследования системы биотрансформации и транспортеров для персонализации фармакотерапии в кардиологии (российский опыт): фармакогенетические исследования CYP2C9. // Клиническая фармакология и терапия. -2007. -№3. — с. 44-48.
17. Hahn L.W., Ritchie M.D., Moore J.H. Multifactor dimentionality reduction software for gene-gene and gene-environment interactions // *Bioinformatics*. — 2003. — V.19. — No.3. — P.376-382.

## The role of genes of the first phase of xenobiotic metabolism on the cystic fibrosis severity and response during antibiotic treatment in cystic fibrosis

Petrova N.V.<sup>1</sup>, Novoselova O.G.<sup>1</sup>, Kondratyeva E.I.<sup>1</sup>, Bikanov R.A.<sup>1</sup>, Zinchenko R.A.<sup>1,2</sup>, Sherman V.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> — Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» Moscow, e-mail: npetrova63@mail.ru

<sup>2</sup> — Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, e-mail: renazinchenko@mail.ru

Associations of the first phase xenobiotic biotransformation system genes with the severity of cystic fibrosis (CF), adverse side effects and antibiotic resistance to intravenous antibiotic therapy in CF children were studied in the presented survey. The number of examined CF children amounted to 118, healthy sample of 70 individuals. All surveyed children reside in the European part of Russia. Study of 6 polymorphisms in 4 genes of the first phase biotransformation system of xenobiotics, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 was carried out by RFLP analysis. There were no significant differences in the frequency of alleles and genotypes of the studied polymorphisms between the groups of healthy and children with CF, excluding the higher allele frequency of CYP2D6\*4 in the total group of MV patients ( $p = 0,023$ ), as well as between groups of CF patients that have the resistant to antibiotic therapy microflora of the respiratory tract, and not having such, and in groups of patients receiving 3 or more course of intravenous therapy for a year and receiving antibiotic therapy at least 2 times during the year. There is a tendency to increase the frequencies of CYP2C9\*3 allele and heterozygous CYP2C9\*3/CYP2C9\*1 genotype in the group of children receiving intravenous antibiotic therapy sporadically or not receiving at all compared to receiving intravenous antibiotic therapy for more than 3 times a year ( $p < 0,1$ ). Association of CYP3A4\*1B allele and CYP3A4\*1B/\*1A genotype with the adverse side effects to antibacterial drugs was identified ( $p = 0,023$  and  $p = 0,025$ ). The carrier state of the heterozygous genotype CYP3A4\*1B/\*1A and the carrier state of the CYP3A4\*1B/\*1A(-392C/T) Ч CYP2D6\*1/\*1(1846G/G) combined genotype can be regarded as markers for increased risk of adverse response to intravenous antibiotic therapy in CF patients (OR = 8,50 (95%CI of 1.64—44,04) and OR = 35,00 (95%CI 3,29—372,14), respectively).

**Key words:** Cystic Fibrosis, genes of the first phase biotransformation of xenobiotics, cytochrome P450 system, antibiotic resistance, adverse response to antibiotic therapy in CF children