

Изучение полиморфных вариантов генов 1 фазы биотрансформации ксенобиотиков у детей и подростков из г.Москвы и г.Минска

Новоселова О.Г.^{1,2}, Петрова Н.В.¹, Чакова Н.Н.³, Кондратьева Е.И.¹,
Воловик Н.О.³, Биканов Р.А.¹, Бобровнический В.И.⁴, Зинченко Р.А.^{1,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, e-mail: Ignovoselova@gmail.com

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская детская клиническая больница №13 им. Н.Ф. Филатова Департамента здравоохранения г. Москвы»

³ ГНУ «Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси»

⁴ УО «Белорусский государственный медицинский университет»

⁵ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

В работе исследованы полиморфизмы генов *CYP2C9* (1075A>C; I359L, rs1057910 и 430C>T; R144C, rs1799853), *CYP2C19* (681G>A, rs4244285 и 636G>A; W212X, rs4986893), *CYP2D6* (1846G>A, rs3892097), *CYP3A4* (p.Met445Thr; c.1334T>C, rs4986910 и -392C>T, rs2740574) в выборках здоровых школьников: 70 из г. Москвы (Российская Федерация) и 100 из г. Минска (Республика Беларусь). Не выявлено статистически значимых различий частот аллелей и генотипов полиморфизма изученных генов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков между сравниваемыми группами.

Ключевые слова: гены первой фазы системы биотрансформации, цитохромы P450, этнические особенности распределения частот аллелей.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

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.

Polymorphism of xenobiotic metabolism genes in children from Moscow and Minsk

Novoselova O.G.¹, Petrova N.V.¹, Chakova N.N.³, Kondratyeva E.I.¹,
Volovik N.O.³, Bikanov R.A.¹, Bobrovnichiy V.I.⁴, Zinchenko R.A.^{1,2}

¹ Federal state scientific budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics» Moscow, 115478, e-mail: Ignovoselova@com.ru

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, e-mail: renazinchenko@mail.ru

³ Institute of Genetics and Cytology, Belarus National Academy of Sciences, Minsk, Belarus, n.chakava@igc.by

⁴ Belarus Government Medical University, Minsk, Belarus

Polymorphic loci of genes *CYP2C9* (1075A>C; I359L, rs1057910 и 430C>T; R144C, rs1799853), *CYP2C19* (681G>A, rs4244285 и 636G>A; W212X, rs4986893), *CYP2D6* (1846G>A, rs3892097), *CYP3A4* (p.Met445Thr; c.1334T>C, rs4986910 и -392C>T, rs2740574) were studied in healthy schoolchildren: 70 from Moscow (Russian Federation) and 100 from Minsk (Republic of Belarus). Statistically significant differences of allele and genotype frequencies between two studied groups were not absent.

Key words: genes of the first phase biotransformation of xenobiotics, cytochrome P450 system, ethnic peculiarities of the distribution of allele frequencies.

Актуальность

Метаболизм лекарственных препаратов представляет собой сложную цепь биохимических превращений, разделенных на множество различных этапов и реакций в организме человека. Некоторые препараты выводятся из организма в неизмененном виде через кишечник и почки, но большая часть химических соединений претерпевает многоступенчатую трансформацию в печени. Основная доля ксенобиотиков метаболизируется в 1-й фазе семейством

ферментов цитохрома P450, которое находится в центре внимания фармацевтических исследований в течение многих десятилетий [1]. Исследование фармакогенетики до недавнего времени не было широко принято в клинической практике, но достижения в области молекулярно-генетической диагностики, позволившие внедрить программы превентивного генетического тестирования в медицинских центрах, позволяют надеяться, что персонализированная медицина в части фармакогенетики может стать доступной в современном мире [2].

На сегодняшний день известно более 50 ферментов цитохрома P450 человека, аллельные варианты в генах которых описаны в различных популяциях. К наиболее важным ферментам, участвующим в трансформации большого числа клинически значимых препаратов, а потому часто используемым в фармакогенетическом генотипировании, относят ферменты CYP2C9 [3], CYP2C19 [4], CYP2D6 и CYP3A4 [5]. Активность ферментов, может меняться как в результате воздействия внешних факторов (определенные виды пищи, температура окружающей среды), так и при совместном приеме медицинских препаратов, способных ингибировать или индуцировать активность цитохромов, оказывая дополнительное воздействие на генетически детерминированный метаболический профиль, что очень важно при расчёте дозы препарата [6].

Различия в метаболической активности лекарственных средств могут быть обусловлены изменением количества функционально активного фермента, различиями в молекулярной структуре, эффектами модификаторов [7].

Другой областью интереса является разнообразие полиморфных вариантов генов цитохрома в различных этнических группах. Исследование различий между популяциями необходимо, поскольку позволяет рассчитывать на определенный элемент предсказуемости, которая отсутствует при тестировании случайных индивидов.

Необходимо принимать во внимание, что частота встречаемости аллельных вариантов генов метаболизма ксенобиотиков значительно варьирует в различных этнических группах. Определение частот аллелей и пространственных функционально значимых генетических вариантов, определяющих метаболизм лекарственных средств, в конкретной популяции, является важной задачей.

Наиболее изученным в европейских популяциях является аллель CYP2C9*2, в среднем имеющий частоту 10%, но крайне редко встречающийся (либо не обнаруживаемый вовсе) в популяциях Восточной Азии (0,5%, за исключением якутов — 2%) [8—10]. Частота аллеля CYP2C9*3, по литературным данным, составляет 8% среди европеоидов и 2% среди населения Восточной Азии. В африканской, маланезийской и индийской популяциях аллели CYP2C9*2 и CYP2C9*3, как правило, отсутствуют или встречаются с очень низкой частотой, за исключением папуасов, у которых частота аллеля CYP2C9*3 достигает 12% [11, 12]. Количество индивидов, имеющих сниженную активность данного фермента, в российской популяции составляет до 20% [10].

В настоящей работе проведен анализ генетического полиморфизма некоторых ферментов I фазы биотрансформации ксенобиотиков (CYP2C9, CYP2C1, CYP2D6, CYP3A4) у жителей Российской Федерации (г. Москва) и Республики Беларусь (г. Минск).

Материалы и методы

Материалом исследования является ДНК здоровых детей и подростков (7—17 лет): 70 из г. Москвы (РФ) и 100 из г. Минска (Республика Беларусь), не имеющих хронической соматической патологии (распределение по полу 1:1). Исследование одобрено локальным этическим комитетом ФГБНУ «МГНЦ» Протокол № 9 от 22 декабря 2015 года.

ДНК индивидов из г. Москвы (РФ) выделяли из лейкоцитов цельной крови с использованием коммерческого набора реактивов для выделения ДНК производства Wizard® Genomic DNA Purification Kit. ДНК индивидов из г. Минска (Республика Беларусь) выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Изучение полиморфизма генов биотрансформации проводили методом ПЦР и последующего ПДРФ-анализа [13, 14].

Для оценки соответствия распределения генотипов ДНК-маркеров ожидаемым значениям при равновесии Харди—Вайнберга (РХВ) использовали критерий χ^2 Пирсона, для сравнения распределений частот аллелей и генотипов в выборках здоровых индивидов — точный критерий Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящей работе исследованы следующие полиморфизмы: CYP2C9*3 (1075A>C; I359L, rs1057910), CYP2C9*2 (430C>T; R144C, rs1799853), CYP2C19*2 (681G>A, rs4244285), CYP2C19*3 (636G>A; W212X, rs4986893), CYP2D6*4 (1846G>A, rs3892097), CYP3A4*3 (p.Met445Thr; c.1334T>C, rs4986910), CYP3A4*1B (-392C>T, rs2740574) в выборках здоровых индивидов 70 из Российской Федерации и 100 из Республики Беларусь. Полиморфные варианты генов CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и вариант CYP3A4*3 снижают ферментативную активность соответствующих цитохромов, их носительство приводит к фенотипу «медленный метаболизатор». Полиморфизм -392C>T в гене CYP3A4 приводит к повышению активности фермента, обусловленной более высоким уровнем транскрипции. Во всех выборках наблюдается соответствие распределения частот генотипов всех изученных полиморфизмов равновесному распределению Харди—Вайнберга.

Анализ частот аллелей и генотипов изученных генов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков не выявил статистически значимых различий между сравниваемыми группами (табл. 1). Полученный результат ожидаем в связи с принадлежностью выборок к родственным этническим группам (русские и белорусы).

Отсутствие различий между контрольными группами школьников из РФ и Беларуси позволяет обе группы в дальнейших исследованиях объединить и использовать, как единую группу контроля.

Таблица 1

Частоты аллелей и генотипов генов цитохромов P450 в группе здорового контроля из России и Беларуси

Генотип / аллель	Контроль. Выборка здоровых детей и подростков, Россия, N = 70		Контроль. Выборка здоровых детей и подростков, Беларусь, n = 100	
	N	%	N	%
CYP2C9*3	70		97	
AA	57	81,43	77	79,38
AC	13	18,57	18	18,56
CC	0	0,00	2	2,06
	P = 0,84			
A	127	90,71	172	88,66
C	13	9,29	22	11,34
	P = 0,59			
CYP2C9*2	69		101	
CC	52	75,46	75	74,26
TC	17	24,64	24	23,76
TT	0	0,00	2	1,98
	P = 0,86			
C	121	87,68	174	86,14
T	17	12,32	28	13,86
	P = 0,87			
CYP2C19*2	70		94	
AA	2	2,86	0	0,00
AG	14	20,00	19	20,21
GG	54	77,14	75	79,79
	P = 0,70			
A	18	12,86	19	10,11
G	122	87,14	169	89,89
	P = 0,48			
CYP2C19*3	70		100	
AA	0	0,00	0	0,00
AG	1	1,43	0	0,00
GG	69	98,57	100	100,00
A	1	0,71	0	0,00
G	139	99,29	200	100,00
CYP2D6*4	70		94	
AA	1	1,43	2	2,13
AG	19	27,14	25	26,59
GG	50	71,43	67	71,28
	P = 1,00			
A	21	15,00	29	15,43
G	119	85,00	159	84,57
	P = 0,87			
CYP3A4*3	70		100	
TT	69	98,57	100	100,00
CT	1	1,43	0	0,00
CC	0	0,00	0	0,00
T	139	99,29	200	100,00
C	1	0,71	0	0,00
CYP3A4 *1B	70		97	
TT	64	91,43	92	94,85
CT	6	8,57	5	5,15
CC	0		0	0,00

Частота аллелей генов цитохромов в различных популяциях

	Москва*	Беларусь*	Москва, взрослые [18]	Воронеж [20]	Татары [22]	Украина [21]	Европейцы [19]
CYP2C9*2	0,1232	0,1386		0,105			До 0,20
CYP2C9*3	0,0929	0,1337		0,067			0,09
CYP2C19*2	0,1286	0,1011	0,154	0,114	0,13	0, 15	0,16
CYP2C19*3	0,0071	0		0,003		0,0005	<0,005
CYP2D6*4	0,1500	0,1533		0,182			0,207
CYP3A4*1B	0,0429	0,0258					0,17-0,23
CYP3A4*3	0,0071	0					<0,005

Примечание. * — настоящее исследование (дети)

Согласно данным литературы, частота встречаемости аллеля CYP2C19*2 варьирует от 23 до 39% у монголоидов, от 11 до 16% европейцев и от 13 до 25%, у негроидов. Частота аллеля CYP2C19*3 составляет от 5 до 12% у представителей монголоидной и 2% — негроидной и европеоидной рас. Таким образом, 2—5% европейского населения, 4—7,5% коренных африканцев, 13—20% жителей Восточной Азии и 38—79% населения тихоокеанских островов являются «медленными метаболиторами» [15, 16]. Изоляция негроидной, европеоидной и монголоидной рас в эволюционном процессе — вероятное объяснение наблюдаемой межрасовой вариации в функциональной активности ферментов цитохрома P450 [17, 18]. Однако гены, определяющие лекарственный метаболизм, находятся под давлением других видов отбора, чем гены, передающие фенотипические характеристики расы, и во многом зависят от факторов окружающей среды, таких как состав почвы и воды, характера питания, что обуславливает более тонкие межпопуляционные различия частот полиморфных вариантов генов цитохромов. На важность данного наблюдения обращал внимание один из самых известных фармакогенетиков профессор Вернер Калоу, в обзоре по этническим различиям в метаболизме лекарств, указывая на необходимость сбора данных о полиморфизме генов цитохромов.

Сравнение частот аллелей в выборках детей из г.Москвы (РФ) и г.Минска (Беларусь) с выборкой Воронежа и Европы показало, что частоты изученных аллелей генов биотрансформации ксенобиотиков первой фазы соответствуют литературным данным по распределению частот аллелей в европейских популяциях [19], в исследованной русской популяции из Воронежа [20] и Украины [21] и выборке татар из Астрахани [22] (табл. 2).

Накопление данных о частотах генотипов «быстрых» и «медленных» метаболиторов лекарственных средств в различных популяционных выборках и в разных этнических группах населения может иметь значение при проведении медикаментозной терапии [23]. Так, во избежание нежелательных побочных эффектов лечебную дозу нестероидных противовоспалительных, противоди-

абетических, антиэпилептических препаратов и антикоагулянтов у носителей аллелей *2 и *3 гена CYP2C9 необходимо уменьшать в 2—4 раза [24]. Наилучшие результаты противотуберкулезной терапии у пациентов с впервые диагностированным туберкулезом отмечались у носителей генотипов *2/*3, *3/*3, ассоциированных с медленным метаболизмом изониазида и рифампицина. Мультирезистентная форма туберкулеза чаще развивалась у больных с генотипом *1/*1 [25].

Список литературы

1. Gricman L, Vogel C, Pleiss J. Identification of universal selectivity-determining positions in cytochrome P450 monooxygenases by systematic sequence-based literature mining. *Proteins*. 2015 Sep;83(9):1593-603. doi:10.1002/prot.24840. PubMed PMID: 26033392.
2. Abul-Husn NS, Owusu Obeng A, Sanderson SC, Gottesman O, Scott SA. Implementation and utilization of genetic testing in personalized medicine. *Pharmacogenomics Pers Med*. 2014 Aug 13;7:227-40. doi: 10.2147/PGPM.S48887. Review. PubMed PMID: 25206309; PubMed Central PMCID: PMC4157398.
3. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB *Pharmacogenet Genomics*. 2010 Apr; 20(4):277-81.
4. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot JS, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Feb;22(2):159-65. doi: 10.1097/FPC.0b013e32834d4962. PubMed PMID: 22027650; PubMed Central PMCID: PMC3349992.
5. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther*. 2014 Sep;96(3):340-8. doi: 10.1038/clpt.2014.129. Review. PubMed PMID: 24926778.
6. Lu C, Hatsis P, Berg C, Lee FW, Balani SK. Prediction of pharmacokinetic drug-drug interactions using human hepatocyte suspension in plasma and cytochrome P450 phenotypic data. II. In vitro-in vivo correlation with ketoconazole. *Drug Metab. Dispos*. 2008;36:1255-1260.
7. Kalow W. Ethnic differences in drug metabolism. *Clin Pharmacokinet*. 1982 Sep-Oct;7(5):373-400. Review. PubMed PMID: 6754206.
8. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, et al. (2009) Cytochrome-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360: 354-362.

9. Luo HR, Poland RE, Lin KM, Wan YJ (2006) Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C19 in Mexican Americans: a cross-ethnic comparative study. *Clin Pharmacol Ther* 80: 33-40.
10. Корчагина Р. П. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков (CYP2C9, CYP4F2, CYP2D6, GSTM1, GSTT1) и гена VKORC1 в популяции коренных этносов Северной Сибири. Генетика — 03.02.07 Новосибирск 2012
11. Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, et al. (2009) Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis. *Am J Cardiol* 103: 806-811.
12. Bonello L, Armero S, Ait Mokhtar O, Mancini J, Aldebert P, et al. (2010) Clopidogrel loading dose adjustment according to platelet reactivity monitoring in patients carrying the 2C19*2 loss of function polymorphism. *J Am Coll Cardiol* 56: 1630-1636.
13. Петрова Н.В., Новоселова О.Г., Кондратьева Е.И., Биканов Р.А., Зинченко Р.А., Шерман В.Д. Влияние генов первой фазы биотрансформации ксенобиотиков на течение муковисцидоза и ответ при проведении антибактериальной терапии. Медицинская генетика. 2016. Т. 15. № 10 (172). С. 17-24
14. Чакова Н.Н., Михаленко Е.П., Крупнова Э.В., Чеботарева Н.В., Кругленко С.С., Золотухина С.Ф., Ковкова А.В. Генетический полиморфизм ферментов метаболизма лекарственных средств (CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, GST, NAT2 и MDR1) у жителей Беларуси // «Молекулярная и прикладная генетика»: сб. научн. тр. — 2009. — Т. 10. — С. 161-169.
15. И.Л. Кляритская, Ю.С. Работягова Полиморфизм гена цитохрома CYP2C19 и клиническое значение его определения Крымский терапевтический КТЖ 2013, №1, с 19-24]
16. Chaudhry A.S., R. Kochhar K.K. Kohli Indian Genetic polymorphism of CYP2C19 and therapeutic response to proton pump inhibitors // *J Med Res* 127, June 2008, pp 521-530.
17. Bertilsson L. Geographical/interracial differences in polymorphic drug oxidation. Current state of knowledge of cytochromes P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet.* 1995 Sep;29(3):192-209. Review. PubMed PMID: 8521680.
18. Lazaridis I, Patterson N, Mitnick A, Renaud G, Mallick S, Kirsanow K, Sudmant PH, Schraiber JG, Castellano S, Lipson M, Berger B, Economou C, Bollongino R, Fu Q, Bos KI, Nordenfelt S, Li H, de Filippo C, Prufer K, Sawyer S, Posth C, Haak W, Hallgren F, Fornander E, Rohland N, Delsate D, Francken M, Guinet JM, Wahl J, Ayodo G, Babiker HA, Bailliet G, Balanovska E, Balanovsky O, Barrantes R, Bedoya G, Ben-Ami H, Bene J, Berrada F, Bravi CM, Brisighelli F, Busby GB, Cali F, Churnosov M, Cole DE, Corach D, Damba L, van Driem G, Dryomov S, Dugoujon JM, Fedorova SA, Gallego Romero I, Gubina M, Hammer M, Henn BM, Hervig T, Hodoglugil U, Jha AR, Karachanak-Yankova S, Khusainova R, Khusnutdinova E, Kittles R, Kivisild T, Klitz W, Kucinskas V, Kushniarevich A, Laredj L, Litvinov S, Loukidis T, Mahley RW, Melegh B, Metspalu E, Molina J, Mountain J, Nakkalajarvi K, Nesheva D, Nyambo T, Osipova L, Parik J, Platnov F, Posukh O, Romano V, Rothhammer F, Rudan I, Ruizbakev R, Sahakyan H, Sajantila A, Salas A, Starikovskaya EB, Tarekegn A, Toncheva D, Turdikulova S, Uktveryte I, Utevska O, Vasquez R, Villena M, Voevoda M, Winkler CA, Yepiskoposyan L, Zalloua P, Zemunik T, Cooper A, Capelli C, Thomas MG, Ruiz-Linares A, Tishkoff SA, Singh L, Thangaraj K, Vilems R, Comas D, Sukernik R, Metspalu M, Meyer M, Eichler EE, Burger J, Slatkin M, Paabo S, Kelso J, Reich D, Krause J. Ancient human genomes suggest three ancestral populations for present-day Europeans. *Nature*. 2014 Sep 18;513(7518):409-13. doi: 10.1038/nature13673. PubMed PMID: 25230663; PubMedCentral PMCID: PMC4170574.
19. 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
20. 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.
21. В.Г. Передерий, С.М. Ткач, С.В. Клименко Клиническое значение генетического полиморфизма CYP2C19 на примере метаболизма ИПП/ Здоровье Украины 2014, с 14-16 , www.healthua.com
22. А.Р. Халикова, А.А. Архипова, И.И. Ахметов, Р.А. Абдулхаков, С.Р. Абдулхаков Изучение полиморфизма гена цитохрома Р-450 CYP2C19 в популяции татар, проживающих на территории Республики Татарстан . Практическая медицина. — 2012. — № 3. — С. 53-55
23. Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, and Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. // *Clin Pharmacol Ther* (2006) 79:103- 113.
24. Маев И.В., Момыналиев К.Т., Оганесян Т.С., Говорун В.М., Кучерявый Ю.А., Селезнева О.В. Полиморфизм гена цитохрома Р-450 в свете эффективности эрадикации *Helicobacter pylori* Клиническая медицина №2 2009. С 35-39.
25. Антоненко П.Б., Кресюн В.И. Эффективность лечения туберкулеза легких в зависимости от генотипа CYP2C9 Дальневосточный медицинский журнал, 2014.-N 2.-С.31-34.