

**Казахский Национальный Университет им. Аль-Фараби
Факультет биологии и биотехнологии**

Дисциплина «Фармакогенетика»

**Лекция 2. Фармакогенетические исследования.
Фазы биотрансформации лекарственных средств.**

**Лектор: Амирова Айгуль Кузембаевна
Ассоциированный профессор
Кандидат биологических наук**



Контрольные вопросы:

- 1. Фармакогенетика.**
- 2. Этапы развития фармакогенетики.**
- 3. Фармакогенетические методы.**
- 4. Значение фармакогенетики.**

Темы СРСП

Фармакогенетические методы:

- 1. ПЦР и рестрикционный анализ**
- 2. Секвенирование**
- 3. Аллель-специфичный ПЦР**
- 4. Скрининг с зондами Taqman**
- 5. Гибридизация на олигонуклеотидных чипах**
- 6. Гибридизация на олигонуклеотидных чипах с мелкими шариками (beads)**
- 7. Анализ кривых плавления.**

Цель занятия: Ознакомление студентов с фармакогенетическими исследованиями и системой биотрансформаций лекарственных средств .

План занятия:

- 1. Основные механизмы всасывания лекарственных средств.**
- 2. Фармакогенетические исследования: фенотипирование и генотипирование.**
- 3. Фазы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств.**
- 4. Генетические основы индивидуальной чувствительности к лекарствам.**
- 5. Моногенный и полигенный контроль эффектов лекарственных средств.**
- 6. Клиническое значение полиморфизма генов.**

Основные механизмы всасывания лекарственных средств

Всасывание – это процесс поступления **ЛС** из места введения в кровь.

Всасывание лекарственного вещества зависит от:

- пути введения его в организм,
- лекарственной формы,
- физико-химических свойств (растворимости в липидах или гидрофильности вещества),
- интенсивности кровотока в месте введения.

Основные механизмы всасывания лекарственных средств

ЛС, принимаемые перорально, подвергаются всасыванию, проходя через слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта, что определяется их растворимостью в липидах и степенью ионизации.

Различают 4 основные механизма всасывания:

- диффузия,**
- фильтрация,**
- активный транспорт,**
- пиноцитоз.**

Пассивная диффузия

Пассивная диффузия осуществляется через клеточную мембрану.

Всасывание происходит до тех пор, пока концентрация лекарственного вещества по обе стороны биомембраны не сравняется.

Подобным образом всасываются **липофильные вещества** (барбитураты, бензодиазепины, метопролол и др.), причем **чем, выше их липофильность, тем активнее их проникновение через клеточную мембрану.**

Пассивная диффузия веществ идет **без затраты энергии** по градиенту концентрации.

Облегченная диффузия

Облегченная диффузия – это транспорт лекарственных веществ через биологические мембраны **с участием молекул специфических переносчиков**.

При этом перенос лекарства осуществляется также по градиенту концентрации, но **скорость переноса при этом значительно выше**. Например, таким образом всасывается цианокобаламин.

В осуществлении его диффузии участвует **специфический белок** – гастромукопротеид, синтезирующийся в желудке.

Фильтрация

Фильтрация осуществляется через поры клеточных мембран.

Этот механизм пассивного всасывания идет без затраты энергии и **осуществляется по градиенту концентрации.**

Такой механизм всасывания характерен **для гидрофильных веществ** (например, атенолол, лизиноприл и др.), а также ионизированных соединений.

Активный транспорт

Активный транспорт осуществляется с участием специфических транспортных систем клеточных мембран. В отличие от пассивной диффузии и фильтрации активный транспорт **процесс энергозатратный и способен осуществляться против градиента концентрации.** В данном случае несколько веществ могут конкурировать за один и тот же транспортный механизм.

Способы активного транспорта **обладают высокой специфичностью**, поскольку сформировались в процессе длительной эволюции организма для обеспечения его физиологических потребностей.

Пиноцитоз

Пиноцитоз представляет также разновидность всасывания **с затратой энергии**, осуществление которого возможно **против градиента концентрации**.

При этом происходит захват лекарственного вещества и инвагинация клеточной мембраны с образованием вакуоли, которая направляется к противоположной стороне клетки, где происходит экзоцитоз с высвобождением лекарственного соединения.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛС В ОРГАНИЗМЕ

Попадая в системный кровоток, ЛС начинает распределяться по различным органам и тканям организма. Большинство лекарств распределяются по организму неравномерно.

Характер распределения определяется многими условиями: растворимостью, комплексообразованием с белками плазмы крови, интенсивностью кровотока в отдельных органах и т.д.

С учетом этого наибольшие концентрации лекарственного вещества в первые минуты после абсорбции создаются в органах, имеющих наиболее активное кровоснабжение, таких как сердце, печень, почки.

Медленнее препараты проникают в мышцы, кожу, жировую ткань.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЛС В ОРГАНИЗМЕ

Попадая в системный кровоток, ЛС начинает распределяться по различным органам и тканям организма. Большинство лекарств распределяются по организму неравномерно.

Характер распределения определяется многими условиями: растворимостью, комплексообразованием с белками плазмы крови, интенсивностью кровотока в отдельных органах и т.д.

СВЯЗЫВАНИЕ ЛС С БЕЛКАМИ КРОВИ И ТКАНЕЙ

С учетом этого наибольшие концентрации лекарственного вещества в первые минуты после абсорбции создаются **в органах, имеющих наиболее активное кровоснабжение**, таких как сердце, печень, почки.

Медленнее препараты проникают в мышцы, кожу, жировую ткань.

Попав в системный кровоток, ЛС присутствуют там в двух фракциях – свободной и связанной. Лекарства способны взаимодействовать и формировать комплексы с альбуминами, в меньшей степени – с кислыми альфа1-гликопротеинами, липопротеинами, гамма-глобулинами и форменными элементами крови (эритроцитами и тромбоцитами).

СВЯЗЫВАНИЕ ЛС С БЕЛКАМИ КРОВИ И ТКАНЕЙ

Связь лекарственного вещества с белками плазмы приводит к тому, что проникновение его в различные органы и ткани резко снижается, поскольку через клеточные мембраны проходит лишь свободный препарат.

Лекарства, связанные с белком, не взаимодействуют с рецепторами, ферментами и не проникают через клеточные барьеры.

Свободная и связанная фракции ЛС находятся в состоянии динамического равновесия – по мере снижения фракции свободного вещества лекарственное средство высвобождается из связи с белком, в результате чего концентрация вещества снижается.

ВЫВЕДЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИХ МЕТАБОЛИЗМ

Выведение (элиминация) ЛС – это сложный процесс удаления лекарства из организма, включающий в себя его нейтрализацию (биотрансформацию** или метаболизм) и собственно экскрецию.**

При характеристике элиминации различают **пресистемную элиминацию и **системную элиминацию**.**

Пресистемный метаболизм, или эффект первичного прохождения, – это биотрансформация лекарственного вещества при первичном прохождении в печени после его всасывания. **Системная элиминация** – удаление ксенобиотика после его попадания в системный кровоток [Чекман с соавт., 2013].

На биотрансформацию влияют:

- **возраст,**
- **пол,**
- **состояние отдельных органов человека и**
- **генетические особенности.**

В процессе биотрансформации веществ в организме появляются новые вещества (**метаболиты**), отличающиеся от исходных субстанций по своим физико-химическим и фармакологическим свойствам.

Однако в ряде случаев ксенобиотики в организме превращаются в более токсичные соединения. По мере накопления таких фактов появился термин **«летальный синтез»**.

В результате биотрансформации могут **образовываться вещества более токсичные** (иногда в десятки раз) по сравнению с исходными веществами. Классическим примером может быть снотворный препарат талидомид.

Талидомид был причиной медицинской катастрофы, имевшей трагические последствия.

Другим примером может быть биотрансформация низших спиртов. В результате **биотрансформации метанола** образуются формальдегид и муравьиная кислота. **Оба метаболита – высокотоксичные соединения.** Они вызывают отравление с серьезными последствиями и необратимую слепоту.

По предложению **Уильямса** биотрансформацию рассматривают как **двухфазовый процесс**.

В первую фазу относят реакции **окисления, восстановления, гидролиза**.

Ко второй фазе относят вторичные эффекты, представляющие собой **реакции конъюгации с некоторыми эндогенными соединениями**, в том числе глюкуроновой кислотой, серной кислотой, уксусной кислотой, аминокислотами, реакции метилирования.

ПРОЦЕССЫ ПРЕВРАЩЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ОРГАНИЗМЕ: I ФАЗА БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Реакции окисления. Основными и наиболее часто встречающимися процессами являются реакции окисления. Их протекание зависит от образования в организме «активного кислорода» с участием определенных ферментов (энзимов).

Энзимы являются посредниками в использовании молекулярного кислорода для образования «активного кислорода».

Реакции восстановления. Этим реакциям подвергаются ксенобиотики, содержащие нитрогруппу, азогруппу, N-оксидную группу или ненасыщенные связи.

Процессы восстановления катализируются с помощью флавопротеиновых энзимов, присутствующих в микросомах печени, и восстановленным НАДФН.

Реакции гидролиза. Относительно большая группа ксенобиотиков содержит эфирные, амидные, гидразидные группировки, которые в процессе биотрансформации подвергаются гидролизу.

Энзимами в этих процессах могут быть специфические и неспецифические гидролазы (эстеразы, амидазы), содержащиеся в микросомах печени и других тканях.

КОНЪЮГАЦИЯ КСЕНОБИОТИКОВ И МЕТАБОЛИТОВ: II ФАЗА БИОТРАНСФОРМАЦИИ

Во второй фазе биотрансформации происходят реакции **конъюгации**. Эти процессы обусловлены либо предварительным образованием активной формы метаболита в первой фазе, либо образованием активной формы веществ эндогенного характера. Для образования активных форм затрачивается энергия за счет разложения АТФ.

Конъюгация с глюкуроновой кислотой. Реакции конъюгации с глюкуроновой кислотой чаще всего подвергаются спирты, фенолы, алифатические и ароматические кислоты, ароматические амины, тиолы, карбаматы, а также некоторые гетероциклические соединения

Конъюгация с уксусной кислотой. Ксенобиотики или метаболиты, содержащие свободную аминогруппу, могут подвергаться в организме реакции ацетилирования. Реакция протекает при участии коэнзима А и ацетилтрансферазы.

Конъюгация с аминокислотами. Ароматические кислоты могут подвергаться в организме конденсации с аминокислотами. В этом случае при участии АТФ и коэнзима А образуется активная форма метаболита, связывающаяся с эндогенной кислотой, чаще всего с глицином, цистеином, глютаминовой кислотой или таурином.

Реакции метилирования. Ксенобиотики или их метаболиты, содержащие атомы со свободной парой электронов (кислород, азот, сера), могут подвергаться реакциям метилирования. Источником метильных групп для этих реакций является «активный метионин», образующийся из метионина и АТФ.

Процесс метилирования катализируется с помощью метилтрансферазы в печени, почках, нервной ткани.

Метилированию могут подвергаться катехоламины, производные пиридина, тиолы и другие вещества

РОЛЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ В ФОРМИРОВАНИИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА

Роль наследственности в формировании индивидуального ответа на воздействие лекарственных средств была известна давно, однако понимание механизмов влияния генетических факторов на эффективность и безопасность фармакотерапии стало возможным только при развитии методов молекулярной биологии и реализации международной программы «Геном человека».

Фармакокинетические и фармакодинамические процессы, протекающие с участием различных белков организма человека (ферментов, ионных каналов, молекул-переносчиков, рецепторов), находятся под генетическим контролем.

Различные наследуемые изменения (мутации и/или полиморфные варианты) в генах, кодирующих эти белки, могут приводить к изменению фармакокинетики и фармакодинамики лекарства, в результате чего изменяется **фармакологический ответ.**

Полиморфизм соответствующих генов может быть причиной различий в фармакологическом ответе на лекарственные средства.

С момента разработки **метода полимеразной цепной реакции (ПЦР)** стало возможным выявлять и диагностировать такие маркеры у пациентов (**генотипирование**).

Методы генотипирования позволяют прогнозировать фармакологический ответ на лекарства, а значит, повысить эффективность и безопасность назначения ЛС, поскольку выявление соответствующего аллельного варианта у больного требует коррекции лечения (дозы, кратности введения, пути введения, замены препарата). Этот подход лежит в основе персонализированной медицины.

Изучение генов, определяющих фармакокинетику и фармакодинамику ЛС, широко внедряют в клиническую практику во всех развитых странах.

В последние годы активное развитие получили **генетические микрочипы (microarray-technology), позволяющие выявлять одновременно целые серии мутантных аллелей, ответственные за изменение фармакологического ответа.**

Некоторые полиморфные маркеры, связанные с изменением фармакокинетики и фармакодинамики ЛС, часто ассоциируются также с некоторыми заболеваниями (онкопатологией, болезнями Альцгеймера, Паркинсона, атеросклерозом), следовательно, фармакогенетические исследования способствуют более полному пониманию этиологии и патогенеза этих заболеваний.

Генетически детерминированные изменения фармакологического ответа с клинических позиций можно классифицировать следующим образом:

1. Приводящие к серьезным НЛР (например, к дефициту глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы). При этом назначение некоторых препаратов противопоказано.

2. Приводящие к НЛР, не относящимся к серьезным (например, к носительству «медленных» аллельных вариантов гена **CYP2D6**, приводящему к фенотипу «медленного метаболизатора»). В подобных случаях требуется назначение ЛС в низкой дозе

3. Неэффективность ЛС или низкая эффективность (например, дупликация функциональных аллелей гена **CYP2D6**, приводящая к фенотипу «быстрого метаболизатора»). Для лиц с подобными генотипами назначают ЛС в высокой дозе.

Все этапы фармакокинетики ЛС, такие как, всасывание, распределение, биотрансформация и выведение, находятся под контролем соответствующих генов, кодирующих **транспортеры ЛС** и ферменты их биотрансформации.

Генетический полиморфизм характерен как для генов, кодирующих белки транспортеры лекарственных средств (гликопротеин-P, транспортеры органических анионов и катионов), ферменты I фазы биотрансформации (изоферменты цитохрома P-450, дигидропиримидин дигидрогеназа, бутирилхолинэстераза, параоксоназа) и II фазы метаболизма (N-ацетилтрансфераза, тиопурин S-метилтрансфераза, эпоксид гидролаза).

Генетический полиморфизм может приводить к синтезу ферментов с измененной активностью, что может становиться причиной изменения скорости всасывания, биотрансформации и и/или выведения (замедление или ускорение) ЛС.

Лица принимающие ЛС являются метаболизаторами.

В зависимости от активности ферментов биотрансформации выделяются следующие группы:

1. «Экстенсивные» метаболизаторы (extensive metabolism, EM) – лица с «нормальной» скоростью биотрансформации определенных ЛС, как правило, гомозиготы по «дикому» аллелю гена соответствующего фермента. К «экстенсивным» метаболизаторам относятся большинство населения.

2. «Медленные» метаболизаторы (poor metabolism, PM)
– лица со сниженной скоростью биотрансформации определенных ЛС, как правило, гомозиготы или гетерозиготы по «медленному» аллелю гена соответствующего фермента.

Иногда выделяют и **«промежуточные» метаболизаторы (intermedium metabolism, IM)**, к которым относят гетерозигот по «медленному» аллелю (при аутосомно-рецессивном типе наследования).

3. «Сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы (ultraextensive metabolism, UM) – лица с повышенной скоростью биотрансформации определенных ЛС, как правило, гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по «быстрому» аллелю гена соответствующего фермента или, что встречается чаще, несущие копии функциональных аллелей.

В настоящее время, активно изучается **клиническое значение полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации**, в частности изоферментов цитохрома P-450 (CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19) и ферментов II фазы биотрансформации (N-цетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы, тиопуринометил-трансферазы, глутатион SH-S-трансферазы и т.д.).

В последние годы начато изучение влияния на фармакокинетику ЛС полиморфизма генов, кодирующих транспортеры ЛС:

- транспортеры органических анионов (OATP-C, OAT-1, OAT-3),**
- транспортеры органических катионов (OCT-1),**
- гликопротеин-P (MDR1).**

Носительство функционально измененных в результате однонуклеотидных замен аллелей генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеры, может приводить к изменению концентраций липофильных и гидрофильных ЛС, а, следовательно, и к изменению фармакологического ответа у пациентов.

Клиническое значение аллельных вариантов генов, кодирующих ферменты биотрансформации и транспортеры, для проведения эффективной и безопасной фармакотерапии во многом зависит от особенностей фармакокинетики липофильных и гидрофильных ЛС.

Наибольшее клиническое значение имеет **генетический полиморфизм генов:**

- **CYP2D6** (ассоциирован с НЛР при приеме нейрорептиков, антидепрессантов, БАБ),
- **CYP2C9** (ассоциирован с НЛР при приеме антикоагулянтов непрямого действия),
- **CYP2C19** (ассоциирован с НЛР при приеме антидепрессантов),
- **гликопротеина-Р** (ассоциирован с неэффективностью антидепрессантов, противосудорожных ЛС, иммуносупрессоров).

Биотрансформация (метаболизм) – изменение химической структуры препаратов и их физико-химических свойств под действием ферментов организма с целью превращения липофильных веществ, которые легко реабсорбируются (обратно всасываются) в почечных канальцах, в гидрофильные полярные соединения, которые быстро выводятся ...

Контрольные вопросы:

- 1. Основные механизмы всасывания лекарственных средств.**
- 2. Фазы биотрансформации и транспортеров лекарственных средств.**
- 3. Генетические основы индивидуальной чувствительности к лекарствам.**
- 4. Моногенный и полигенный контроль эффектов лекарственных средств.**
- 5. Клиническое значение полиморфизма генов.**



СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!