

**Казахский Национальный Университет им. Аль-Фараби  
Биологический факультет  
Кафедра Молекулярной биологии и генетики**

**Дисциплина «Фармакогенетика»**

**Лекция 6. Роль полиморфных вариантов генов,  
кодирующих ферменты I фазы  
биотрансформации лекарственных средств, в  
фармакологическом ответе.**

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



## **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.**
- 6. Фармакокинетика липофильных и гидрофильных лекарственных средств в организме.**
- 7. Терапевтический лекарственный мониторинг.**
- 8. Роль полиморфных вариантов генов, кодирующих транспортеры лекарственных средств, в фармакологическом ответе.**
- 9. Гликопротеин-P.**
- 10. Транспортеры органических анионов и катионов.**
- 11. Субстраты транспортеров органических анионов и катионов.**

***Цель занятия:*** Ознакомление студентов с ролью полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств, в фармакологическом ответе.

## **План занятия:**

- 1. Ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств.**
- 2. Семейство цитохромов P450.**
- 3. Ингибиторы и индукторы цитохрома P450.**
- 4. Роль полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств, в фармакологическом ответе.**

## Роль полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств, в фармакологическом ответе

**Семейство цитохромов P450.** Цитохром P-450, в литературе часто обозначаемый CYP, представляет группу ферментов, осуществляющих не только метаболизм ЛС и других ксенобиотиков, но и участвующих в синтезе глюкокортикоидных гормонов, желчных кислот, простаноидов (тромбоксана A<sub>2</sub>, простаглицлина I<sub>2</sub>), холестерина.

Филогенетические исследования показали, что цитохромы P-450 появились в живых организмах около 3,5 млрд лет назад.

**Семейство цитохромов P450.** Цитохром P-450 является гемопротеином (содержит гем). Название цитохрома P-450 связано с особыми свойствами этого гемопротеина. В восстановленной форме цитохром P-450 связывает монооксид углерода с образованием комплекса с максимальным поглощением света при длине волны 450 нм.

Это свойство объясняют тем, что в геме цитохрома P-450 железо связано не только с атомами азота четырех лигандов (при этом образуя порфириновое кольцо).

Существуют также пятый и шестой лиганды (сверху и снизу кольца гема) – атом азота гистидина и атом серы цистеина, входящие в состав полипептидной цепи белковой части цитохрома P-450.

**Наибольшее количество цитохрома P-450** располагается в **гепатоцитах**. Однако цитохром P-450 обнаруживают и в других органах: **в кишечнике, почках, легких, надпочечниках, головном мозге, коже, плаценте и миокарде.**

Важнейшее свойство цитохрома P-450 – способность метаболизировать практически все известные химические соединения. Наиболее важная реакция – **гидроксилирование.**

Как уже указывалось, цитохромы P-450 еще называют монооксигеназами, так как они включают один атом кислорода в субстрат, окисляя его, а один – в воду, в отличие от диоксигеназ, которые включают оба атома кислорода в субстрат.

**Цитохром P-450 имеет множество изоформ – изоферментов.**

**В настоящее время выделено более 1000 изоферментов цитохрома P-450. Изоферменты цитохрома P-450, по классификации Nebert (1987), принято разделять по близости (гомологии) нуклеотид/аминокислотной последовательности на семейства.**

**В свою очередь, семейства подразделяют на подсемейства.**



**Изоферменты цитохрома P-450 с идентичностью аминокислотного состава более 40%** объединены в семейства (выделено 36 семейств, 12 из них обнаружены у млекопитающих).

**Изоферменты цитохрома P-450 с идентичностью аминокислотного состава более 55%** объединены в подсемейства (выделено 39 подсемейств).

Семейства цитохромов P-450 принято обозначать римскими цифрами, подсемейства – римскими цифрами и латинской буквой. Первый символ (вначале) – арабская цифра, обозначающая семейство (CYP3A4).

**Второй символ – латинская буква, обозначающая подсемейство (CYP3A4). В конце (третий символ) указывают арабскую цифру, соответствующую изоферменту (CYP3A4). Например, изофермент цитохрома P-450, обозначенный как CYP3A4, принадлежит к семейству 3, подсемейству A.**

**Изоферменты цитохрома P-450 – представители различных семейств и подсемейств – различаются регуляторами активности (ингибиторы и индукторы) и субстратной специфичностью.**

**Например, CYP2C9 метаболизирует исключительно S-варфарин, в то время как R-варфарин метаболизируют изоферменты CYP1A2 и CYP3A4.**

Однако члены отдельных семейств, подсемейств и отдельные изоферменты цитохрома Р-450 могут обладать перекрестной субстратной специфичностью, а также иметь перекрестные ингибиторы и индукторы.

Например, **ритонавир** (противовирусный препарат) метаболизируют принадлежащие к различным семействам и подсемействам **7 изоферментов (СYP1A2, СYP2A6, СYP2C9, СYP2C19, СYP2D6, СYP2E1, СYP3A4)**.

**Циметидин** одновременно **ингибирует 4 изофермента: CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 и CYP3A4.**

В метаболизме ЛС принимают участие изоферменты цитохрома P-450 I, II и III семейств. **CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP209, CYP2E1, CYP3A4** – наиболее важные для метаболизма лекарственных веществ и хорошо изученные изоферменты цитохрома P-450.

**Содержание различных изоферментов цитохрома P-450 в печени человека, а также их вклад в окисление ЛС различны.**

Для фармакогенетики особенно важны **шесть генов (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 и CYP3A4)**, поскольку кодируемые ими **шесть ферментов отвечают за I фазу метаболизма у более 90% всех обычно используемых лекарственных средств.**

Только **CYP3A4** включен в метаболизм **свыше 40% всех лекарств**, используемых в клинической медицине. Кроме того, многие гены CYP очень полиморфны, с аллелями, имеющими функциональные последствия для реакции на лекарственную терапию.

**Аллели CYP могут приводить к отсутствию, уменьшению или повышению активности фермента, влияя на скорость метаболизма многих лекарственных средств.**

**Например, CYP2D6 — первичный цитохром в I фазе метаболизма активен более чем для 70 разных лекарств.**

**Описаны 26 аллелей в гене CYP2D6, влияющие на его активность, понижая, устраняя или повышая ее.**

**Миссенс-мутации** уменьшают активность этих цитохромов; аллели, при которых активность отсутствует полностью, вызваны мутациями сайта сплайсинга или сдвига рамки считывания.

В отличие от них, аллель CYP2D6\*1XN представляет серию копий числового полиморфизма аллелей, когда ген CYP2D присутствует в трех, четырех и более копий в одной хромосоме.

## **Миссенс-мутации**

**Как и следовало ожидать, копии приводят к высокой активности фермента.**

**Существует больше десятка аллелей, не влияющих на функцию белка и считающихся диким типом.**

**Различные комбинации четырех классов аллелей приводят к количественным различиям метаболической активности, хотя некоторые комбинации встречаются очень редко и недостаточно изучены.**



## Миссенс-мутации

Обычно выделяют три основных фенотипа: **с нормальным, сниженным и быстрым метаболизмом.**

Индивидуумы **со сниженным метаболизмом** имеют явный риск накопления токсичного уровня лекарств.

**При быстром метаболизме** есть риск недостаточного эффекта при использовании обычных доз, неадекватных для поддержания терапевтического уровня препарата в крови.

Изменения ферментов цитохромов P450 важны не только для детоксикации лекарственных средств, они также участвуют в активации некоторых препаратов.

Например, **кодеин** — слабый наркотик, оказывающий болеутоляющее действие за счет преобразования в морфин — активный метаболит с 10-кратно повышенным действием.

Преобразование выполняет фермент **CYP2D6**.

Лица **с низким метаболизмом**, вызванным утратой активных аллелей в гене CYP2D6, не способны преобразовать кодеин в морфин, поэтому получают меньшую терапевтическую пользу.

И, наоборот, для пациентов **с повышенной скоростью метаболизма** низкие дозы кодеина могут оказаться **ТОКСИЧНЫМИ**.

**Частота многих аллелей цитохромов P450** различается в разных популяциях.

**Например**, фенотип с медленным метаболизмом **CYP2D6** присутствует у 1 из 14 европеоидов, редко встречается у монголоидов и практически отсутствует у американских индейцев.

Аналогичным образом аллели с медленным метаболизмом гена **CYP2C19** имеют выраженную этническую изменчивость, составляя 3% у европеоидов и почти 16% у всех монголоидов, имеющих медленный метаболизм.

## **Дигидропиримидин дегидрогеназа (ДПДГ).**

**Физиологическая функция фермента ДПДГ – восстановление урацила и тимидина.**

**Это первая реакция трехэтапного метаболизма этих соединений до  $\beta$ -аланина.**

**Кроме того, ДПДГ является основным ферментом, который метаболизирует фторурацил.**

## **Дигидропиримидин дегидрогеназа (ДПДГ).**

Он широко применяется в составе комбинированной химиотерапии рака молочной железы, яичников, пищевода, желудка, толстой и прямой кишки, печени, шейки матки, вульвы, мочевого пузыря, предстательной железы, опухолях головы, шеи, слюнных желез, надпочечников, поджелудочной железы.

С середины 80-х годов появились сообщения о серьезных осложнениях, возникающих при применении **фторурацила**, связанных с низкой активностью ДПДГ.

## Дигидропиримидин дегидрогеназа (ДПДГ).

Позже было показано, что низкая активность ДПДГ наследуется по **аутосомно-рецессивному** типу.

У пациентов с низкой активностью ДПДГ отмечается удлиненный период полувыведения **фторурацила** (до 160 мин, при нормальном периоде полувыведения 8-22 мин).

Есть четкая закономерность: **чем ниже активность ДПДГ, тем тяжелее побочные эффекты** (нейротоксичность, кардиотоксичность) фторурацила.

## Дигидропиримидин дегидрогеназа (ДПДГ).

Генетические исследования позволили выявить ряд **мутаций гена *DPYD***, который кодирует данный белок, ответственных за сниженную активность этого фермента, а следовательно, и за повышенную чувствительность к фторурацилу.

Наиболее распространенными мутациями оказались **делеция в 165-м положении, замена гуанина на аденин в 14-м положении и сочетание этих двух мутаций.**

## Дигидропиримидин дегидрогеназа (ДПДГ).

На сегодняшний день распространенность **гомозигот по мутантным аллелям гена ДПДГ** известна только среди японцев и составляет 1 на 10 000.

Однако следует отметить, что повышенная чувствительность к фторурацилу, отмечается **не только у гомозигот, но и у гетерозигот по мутантным аллелям гена ДПДГ.**

**ДПДГ** можно считать **ферментом, обладающим генетическим полиморфизмом.** Современные представления о генетическом полиморфизме ДПДГ позволяют рекомендовать **внедрение генотипирования по гену DPYD** в генетическую практику.



## **Параоксоназа.**

**Параоксоназа – фермент из группы арилэстераз.**

**Свое название фермент приобрел из-за способности метаболизировать параоксон, антихолинэстеразный препарат, применяемый местно **при глаукоме**.**

**Кроме параоксона, параоксоназа инактивирует путем эфирного гидролиза такие ксенобиотики, как фосфорорганические соединения, органофосфаты, карбаматы, эфиры уксусной кислоты.**

## **Параоксоназа.**

**Эти соединения широко применяются в сельском хозяйстве и промышленности, используются в качестве лекарственных препаратов, а некоторые из них являются боевыми отравляющими веществами (например, **зарин и зоман**).**

**С начала 70-х гг. появлялись сообщения о наличии различий в активности параоксоназы среди населения. Однако, лишь в 90-е годы были идентифицированы мутации, приводящие к изменению активности параоксоназы.**

## **Параоксоназа.**

Таким образом, был доказан **генетический полиморфизм параоксоназы.**

Наиболее распространенной мутацией, обуславливающей изменение активности параоксоназы, оказалась **аминокислотная замена в ферменте в 192-м положении глутамина на аргинин (p.Gln192Arg).**

Эта мутация наследуется по **аутосомно-рецессивному типу.**

## Параоксоназа.

Носители **мутации p.Gln192Arg**, особенно гомозиготы, более **чувствительны** в отношении фосфорорганических соединений.

Распространенность гомозигот по этой мутации среди испанского населения составляет 16%, среди североевропейского населения – 9%.

Наибольшая распространенность этой мутации зафиксирована **в Японии** и составляет **41,4%**. Именно это обстоятельство явилось причиной больших жертв **при применении зарина во время террористического акта в Токийском метро в 1995 г.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

Физиологическая функция бутирилхолинэстеразы – гидролиз ацетилхолина.

Кроме того, бутирилхолинэстераза катализирует реакцию гидролиза деполяризирующего миорелаксанта суксаметония.

**Суксаметония йодид** широко применяется в анестезиологии.

С начала 50-х годов появились сообщения о **повышенной чувствительности к суксаметонию, которая обусловлена сниженной активностью бутирилхолинэстеразы.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

Бутирилхолинэстеразу со сниженной активностью в литературе часто называют **атипичной псевдохолинэстеразой**.

Еще в 50-е годы XX в. были описаны случаи продолжительной остановки дыхания (**апноэ**) при применении **суксаметония**: вместо 2-3 мин апноэ у лиц с парадоксальной реакцией продолжалось **два часа и более**.

## **Бутирилхолинэстераза.**

**В начале 70-х годов XX в. предположили возможность аутосомно-рецессивного моногенного наследования низкой активности бутирилхолинэстеразы.**

**Генетические исследования позволили выявить ряд мутаций гена бутирилхолинэстеразы.**

**Повышенная чувствительность к суксаметонию наблюдается только у гомозигот.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

Наиболее распространенной мутацией, приводящей к синтезу бутирилхолинэстеразы со сниженной активностью, оказалась **замена в нуклеотидной последовательности в 209-м положении аденина на гуанин.**

В результате синтезируется **фермент, у которого в 70-м положении аминокислота аспарагинат заменена на глицин.** Его обычно называют **атипичной бутирилхолинэстеразой.**



## Бутирилхолинэстераза.

Гомозиготы по этому мутантному аллелю проявляют повышенную чувствительность к суксаметонию. Распространенность гомозигот среди европейского населения северной америки составляет 1:3000.

Другая мутация, приводящая к синтезу бутирилхолинэстеразы с резко сниженной активностью, – **инсерция в 117-м положении нуклеотидной последовательности**. В результате синтезируется **белок, длина которого составляет лишь 22% от нормы**. Его в литературе называют **«тихой» бутирилхолинэстеразой**.

## **Бутирилхолинэстераза.**

**Гомозиготы по этой мутантной аллели также проявляют повышенную чувствительность к суксаметонию.**

**Распространенность гомозигот среди европейского населения северной америки – 1:100 000.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

**Другая мутация, вызванная аминокислотной заменой в 243-м положении треонина на метионин, также приводит к синтезу фермента со сниженной активностью.**

**В результате синтезируется бутирилхолинэстераза, которую в литературе называют **фторрезистентной** бутирилхолинэстеразой.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

**Гомозиготы по этому мутантному аллелю** также проявляют **повышенную чувствительность** к суксаметонию, однако период **апноэ** у них длится меньше, около **30 мин.** Распространенность гомозигот среди европейского населения северной америки составляет **1:150 000.**

**Частота гетерозигот и гомозигот по всем мутантным аллелям, которые определяют сниженную активность бутирилхолинэстеразы** среди европейского населения, составляет соответственно **2-4% и 1:2500.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

Фенотипирование бутирилхолинэстеразы для определения ее сниженной активности осуществляется с помощью, так называемого, **дибукаинового теста**, основанного на подавлении активности бутирилхолинэстеразы дибукаином в стандартных условиях.

Результат теста представляется в виде **«дибукаинового числа»**, которое является степенью подавления фермента, выраженной в процентах. **У людей с нормальной активностью бутирилхолинэстеразы дибукаиновое число равно 80%.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

**У гомозигот по мутантным аллелям, которые определяют сниженную активность бутирилхолинэстеразы, дибукаиновое число равно 20%, а у гетерозигот по этим аллелям – 60%.**

**Таким образом, дибукаиновый тест позволяет не только выявлять лиц с повышенной чувствительностью к суксаметонию, но и гетерозигот.**

## **Бутирилхолинэстераза.**

**Это важно для профилактики осложнений при применении суксаметония у потомства.**

**Внедрение генотипирования бутирилхолинэстеразы в клиническую практику позволит более точно выявлять лиц с повышенной чувствительностью к суксаметонию и обеспечить высокую безопасность применения суксаметония.**

## **S-метилтрансфераза.**

**Тиопурин S-метилтрансфераза (ТРМТ) – фермент, который катализирует реакцию S-метилирования производных тиопурина.**

**Это основной путь метаболизма цитостатиков из группы антагонистов пурина: меркаптопурина, тиогуанина, азатиоприна.**



## **S-метилтрансфераза.**

**Меркаптопурин** широко используется в составе комбинированной химиотерапии миелобластного и лимфобластного лейкозов, хронического миелолейкоза, лимфосаркомы, саркомы мягких тканей. 6-тиогуанин применяется в основном при острых лейкозах.

Активность ТРМТ имеет значительные различия: 88,6% людей имеют высокую активность ТРМТ, 11,1% промежуточную, а у 0,3% активность ТРМТ весьма низкая или вовсе отсутствует.

## **S-метилтрансфераза.**

**При этом известно, что у людей с низкой активностью TPMT выявляют повышенную чувствительность к меркаптопурину, тиогуанину и азатиоприну, которая проявляется опасными для жизни гематотоксическим (лейкопения, тромбоцитопения, анемия) и гепатотоксическими эффектами.**

**В условиях низкой активности TPMT метаболизм меркаптопурина идет по альтернативному пути, до высокотоксичного соединения 6-тиогуанина нуклеотида (6TGN).**

## **S-метилтрансфераза.**

**Чем меньше активность TPMT, тем больше концентрации 6TGN в плазме крови и тем более выражены побочные эффекты меркаптопурина.**

**Низкая активность TPMT наследуется по аутосомно-рецессивному типу, при этом гомозиготы проявляют низкую активность TPMT, а гетерозиготы – промежуточную.**

## **S-метилтрансфераза.**

**Генетические исследования позволили выявить ряд мутаций гена TPMT, определяющих ее низкую активность.**

**Распространенность гомозигот по мутантным аллелям, определяющим низкую активность TPMT, среди европейского населения составляет 3,7%, среди афроамериканцев 4,6%.**

**Повышенная чувствительность к тиопуринам отмечается не только у гомозигот, но и у гетерозигот по мутантным аллелям гена TPMT.**

## **S-метилтрансфераза.**

**Таким образом, для обеспечения безопасности проводимой химиотерапии перед назначением тиопуринов необходимо определять активность ТРМТ в эритроцитах пациента (фенотипирование ТРМТ) или определять генотип пациента с помощью ПЦР (генотипирование ТРМТ).**

**Фенотипирование и генотипирование ТРМТ используется в клиниках Европы и США.**

## **S-метилтрансфераза.**

**Разработана коррекция дозировок меркаптопурина в зависимости от активности ТРМТ или генотипа этого фермента, при этом безопасные дозы для пациентов с низкой активностью ТРМТ должны быть в 10-15 раз ниже среднетерапевтических.**

## **Алкогольдегидрогеназа.**

**Митохондриальный НАД-зависимый цинксодержащий фермент алкогольдегидрогеназа (АДГ) окисляет эндогенный алкоголь и другие спирты организма.**

**Интенсивность алкогольдегидрогеназной реакции лимитирована реокислением НАД•Н в НАД+.**

**Известны три изофермента алкогольдегидрогеназы.**

## **Алкогольдегидрогеназа.**

У коренных народов Сибири **недостаточно функционирует изофермент АДГ2**, поэтому при употреблении даже малого количества спирта этилового (40 — 80 г) развиваются **гиперемия лица, головная боль, тахикардия, артериальная гипотензия, рвота и другие симптомы дискомфорта.**



## **Алкогольдегидрогеназа.**

**На стадии алкогольной дистрофии печени активность алкогольдегидрогеназы возрастает, что можно рассматривать как защитную реакцию организма;**

**в период формирования гепатита и цирроза печени общая активность фермента снижается, оставаясь высокой в регенерирующих гепатоцитах.**

## **Алкогольдегидрогеназа.**

Ген этого фермента хорошо изучен, особенно его полиморфный вариант G141A.

Следовательно, **возможна и его ПЦР-диагностика.**  
**Аллель А** обуславливает повышенную активность фермента, что **ведет к накоплению альдегидов** (весь алкоголь «перерабатывается»), которые обладают выраженным **токсическим эффектом.**  
Такие индивиды имеют **резко повышенную чувствительность к этиловому спирту** и поэтому менее подвержены алкоголизму.  
**Даже небольшие дозы алкоголя ведут к сильнейшему отравлению.**

## **Алкогольдегидрогеназа.**

Фермент экспрессируется в печени в двух формах: **ALDH-1** (цитозольная) и **ALDH-2** (митохондриальная).

С генетической точки зрения **лучше изучен ген ALDH-2, мутации в котором ведут к алкогольной интоксикации.** Фермент ALDH-2 вовлечен в патогенез различных злокачественных новообразований, связанных со злоупотреблением алкоголем.

**Распространенность мутантных форм ALDH-2 очень высокая среди населения монголоидной расы (до 50%).** Молекулярно-генетическая диагностика гетеро- и гомозигот по патологическим мутациям возможна.

## **Контрольные вопросы:**

- 1. Ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств.**
- 2. Семейство цитохромов P450.**
- 3. Ингибиторы и индукторы цитохрома P450.**
- 4. Роль полиморфных вариантов генов, кодирующих ферменты I фазы биотрансформации лекарственных средств, в фармакологическом ответе.**