

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА CYP2C9 И РИСК РАЗВИТИЯ ГЕПАТОТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ АНТИРЕТРОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ

М. Н. Курбат, В. М. Цыркунов, Т. Л. Степура¹

Целью исследования было изучение ассоциации полиморфных вариантов генов CYP2C9 с риском возникновения лекарственного поражения печени при проведении антиретровирусной терапии ВИЧ-инфицированным пациентам. Анализ исследуемых полиморфных вариантов генов CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Leu359Leu) в исследуемой выборке показал, что доминирующим генотипом гена CYP2C9*2 было гомозиготное носительство CC, а по гену CYP2C9*3 — преобладание генотипа AA, частота встречаемости которых в популяции оказалась одинаковой и составила 80 %. Не обнаружена ассоциация изучаемых генотипов с риском развития лекарственного поражения печени. Носительство отдельных аллелей С или Т в случае гена CYP2C9*2, а также А или С при CYP2C9*2 не является прогностическим признаком поражения гепатоцита антиретровирусными лекарственными средствами.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция; терапия; полиморфизм; цитохромы; лекарственное поражение печени.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из причин гепатотоксичности некоторых лекарств является полиморфизм генов ферментов, обеспечивающих их метаболизм. В число таких ферментов входят семейство цитохромов P450 (CYP), глутатион-S-трансферазы (GST), N-ацилтрансферазы (NAT) и др. [2, 5, 14]. Мутации в генах, кодирующих эти белки, могут приводить к повышению, снижению или потере активности фермента. Гепатоциты очень чувствительны к изменению метаболизма, поскольку в них происходит активный обмен веществ, требующий больших количеств энергии — глюконеогенез, метаболизм жирных кислот, детоксикация ксенобиотиков, образование мочевины и т. д.

Печень является высокорегенерирующим органом и постоянно восполняет потерю клеток в результате некроза и апоптоза, однако высокая пролиферативная активность гепатоцитов делает печень уязвимой для действия ксенобиотиков, а последующее поражение гепатоцитов приводит к развитию неалкогольного стеатогепатита [13].

В процессе детоксикации ксенобиотиков выделяют 3 последовательные фазы. I фаза осуществляется ферментами семейства цитохромов P450, метаболизирующих ксенобиотики с образованием короткоживущих промежуточных электрофильных метаболитов, которые часто обладают токсическими свойствами. II фаза — нейтрализация метаболитов I фазы; ферменты II фазы присутствуют во всех клетках и осуществляют или завершают процесс детоксикации. К ним относят-

ся эпоксигидролазы, глутатионтрансферазы, глюкуронилтрансферазы, ацетилтрансферазы и другие, которые превращают токсичные промежуточные продукты метаболизма I фазы в полярные водорастворимые нетоксичные соединения, подлежащие выведению из организма. III фаза — выведение из организма продуктов детоксикации, которое обеспечивается Р-гликопротеином [2]. Описаны изоформы всех этих ферментов, отличающиеся ферментативной активностью (повышенной, сниженной или утраченной), что связано с полиморфизмом кодирующих их генов и определяет гепатотоксичность ряда лекарственных препаратов.

Вклад различных цитохромов в метаболизм лекарств неравноценен. Существует как минимум 57 изоформ CYP, но только 10 из них связаны с метаболизмом лекарств, при этом наибольший вклад вносят цитохромы CYP3A4, CYP2D6 и CYP2C9 [9]. Фермент CYP3A4 обеспечивает метаболизм большинства лекарственных препаратов (50 %). Участие других цитохромов несколько меньше: CYP2D6 – 20 %, CYP2C9 и CYP2C19 – 15 %.

CYP2C9 — изофермент подсемейства цитохромов CYP2C, куда также входят CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19, относящиеся к микросомальной фракции цитохромов P450. Аминокислотный состав этих ферментов идентичен более чем на 82 %. CYP2C составляет примерно 20 % от общего содержания цитохромов в микросомах печени человека. Изофермент CYP2C9 имеет размер 55,6 кДа и состоит из 490 аминокислотных остатков, вовлечен в биоактивацию таких канцерогенов, как полициклические ароматические гидрокарбонаты и гетероциклические ароматиче-

¹ УО “Гродненский государственный медицинский университет”, Беларусь, 230015, Гродно, ул. Горького, 80, ГрГМУ.

ские амины. Ген CYP2C9 локализован на 10-й хромосоме в области 10q24, содержит 9 экзонов и входит в состав кластера CYP2C8 — CYP2C9 — CYP2C19 — CYP2C18 [10].

Существуют данные о том, что присутствие определенных полиморфных маркеров в гене CYP2C9 связано с риском развития побочных реакций у индивидов в ответ на применение нестероидных противовоспалительных лекарственных препаратов и варфарина [6]. В популяции определены 2 наиболее частые вариантные аллели гена CYP2C9, CYP2C9*2 и CYP2C9*3, снижающие активность фермента на 12 и 5 %, соответственно. Вариантные аллели гена изофермента CYP2C9*2 и *3 отличаются от нормального гена одной аминокислотой, замещенной в кодоне Arg144Cys и Ile359Leu, соответственно.

По сравнению с аллелем “дикого” типа, обозначаемым как CYP2C9*1, варианты CYP2C9*2 и CYP2C9*3 обеспечивают синтез фермента со сниженной метаболизующей активностью. Поэтому носителей вариантов CYP2C9*2 и CYP2C9*3 как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии считают “медленными” метаболизаторами, которым следует назначать лекарственные средства в дозе, меньшей средней терапевтической [3, 8]. Однако в ряде случаев данный фармакологический подход невозможен.

К одной из таких ситуаций относится антиретровирусная терапия (АРТ) ВИЧ-инфицированных пациентов с применением антиретровирусных лекарственных средств (АРЛС), гепатотоксический потенциал которых известен и широко описан в доступной литературе [7, 11].

Цель исследования — установить ассоциации полиморфных вариантов генов CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Ile359Leu) с развитием гепатотоксичности вследствие приема АРЛС для терапии ВИЧ-инфекции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были 70 пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекции, 47 (67 %) из которых получали АРТ в соответствии с утвержденными клиническими протоколами [4]. Критерии включения: верификация диагноза ВИЧ-инфекция (ИФА, иммунный блоттинг, ПЦР), наличие иммунологического (CD4) и вирусологического (вирусная нагрузка) мониторинга эффективности АРТ, добровольное с письменным информированным согласием участие пациентов, отсутствие перерывов в приеме АРЛС (при их назначении).

Генотипирование пациентов осуществлялось методом ПЦР с применением наборов реагентов НПФ “ЛИТЕХ” (РФ) для выявления полиморфизмов гена CYP2C9*2 (Arg144Cys) (кат. № t01104 – 100) и CYP2C9*3 (Ile359Leu) (кат. № t01111 – 100). Выделение геномной ДНК пациентов проводилось из лейкоцитов цельной венозной крови набором реагентов “ДНК-экспресс-кровь” производства НПФ “ЛИТЕХ” (РФ). С образцом выделенной ДНК параллельно про-

водили 2 реакции амплификации с 2 парами аллель-специфичных праймеров. Образование продуктов амплификации оценивали по росту флуоресценции интеркалирующего красителя в режиме реального времени на амплификаторе Rotor Gene-Q (“Qiagen”, Германия).

Статистическую обработку данных осуществляли при помощи пакета Statistica 10.0 (серийный номер AXAR207F394425FA-Q). Оценку соответствия частот генотипов равновесию Харди — Вайнберга проводили с использованием критерия χ^2 (Пирсона), применяя on-line тест-программу <http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-allele.html> (при $p > 0,05$ равновесие выполняется). Оценку достоверности различий по частотам аллелей между исследованными выборками проводили по критерию χ^2 (при $p < 0,05$ результаты считали статистически значимыми).

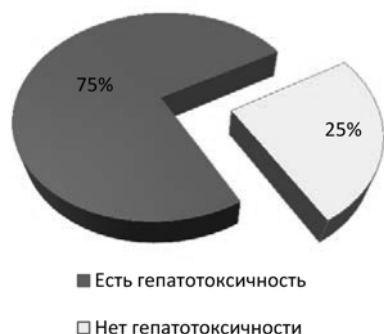
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ исследуемых полиморфных вариантов генов CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Ile359Leu) в исследуемой выборке показал соответствие наблюдаемого распределения генотипов для всех изученных вариантов гена ожидаемому при равновесии Харди — Вайнберга (табл. 1). Такое равновесие указывало на то, что на генетическую структуру популяции по изучаемым полиморфизмам не оказывали влияния различные воздействия (не действует отбор, не идет мутационный процесс, отсутствует обмен особями с другими популяциями, не происходит дрейф генов, все скрещивания случайны).

Согласно полученным результатам, доминирующим генотипом гена CYP2C9*2 было гомозиготное носительство CC, а по гену CYP2C9*3 — AA, частота встречаемости которых в популяции оказалась одинаковой и составила 80 %. Примечательно, что полученные нами данные согласуются с результатами исследо-

Таблица 1. Распределение генотипов CYP2C9 (Arg144Cys), CYP2C9 (Ile359Leu) и соответствие их равновесию Харди–Вайнберга (HWE) в исследованных популяциях

Генотип	Наблюдаемые частоты	HWE	<i>p</i>
CYP2C9*2 (Arg144Cys)			
CC	0,80	0,81	0,3483
CT	0,20	0,18	
TT	0,0	0,01	
Аллель С		89,86 %	
Аллель Т		10,14 %	
CYP2C9*3 (Ile359Leu)			
AA	0,80	0,82	0,3918
AC	0,20	0,12	
CC	0,0	0,06	
Аллель А		90,71 %	
Аллель С		9,29 %	



Частота развития гепатотоксичности при терапии АРЛС

вания встречаемости данных генотипов в популяциях коренных жителей Северной Сибири [5]: в самодийских популяциях численно преобладали индивиды с “нормальными” генотипами CYP2C9*2-CC и CYP2C9*3 — AA. Их частоты варьировали и лежали в пределах 86,5 – 94,9 % для CYP2C9*2 и 83,9 – 98,0 % для CYP2C9*3, превышая соответствующие значения для русских Северной Сибири (74,5 и 80,9 %, соответственно). Такие же данные получены при изучении распространенности этих генотипов в европейской, японской и израильской популяциях [15].

На последующем этапе нашего исследования изучена взаимосвязь лекарственного поражения печени (ЛПП), верифицированного нами в соответствии с международными критериями гепатотоксичности (National Cancer Institute Cancer Therapy Evaluation Program: Common Toxicity Criteria. Veers. 2.0. 1999) с носительством определенного генотипа CYP2C9.

Для этого проанализирована активность ключевых диагностических органоспецифических печеночных

ферментов (аланинаминотрансферазы — АлАТ, аспаратаминотрансферазы — АсАТ, γ -глутамилтранспептидазы — ГГТП, щелочной фосфатазы — ЩФ) и концентрации общего билирубина. Гепатотоксичность вследствие приема АРЛС диагностировалась при превышении верхней границы нормы хотя бы по одному из перечисленных лабораторных тестов в процессе АРТ [1]. Частота развития гепатотоксичности при приеме АРЛС представлена на рисунке.

Как видно из представленной диаграммы, гепатотоксичность, диагностированная на основе общепринятых лабораторных признаков, выявлена у 75 % ВИЧ-инфицированных пациентов, получающих АРТ.

Далее проанализирована возможная связь генотипов генов CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Phe359Leu) с риском развития лекарственного поражения печени (табл. 2).

Как видно из табл. 2, не обнаружена ассоциация изучаемых генотипов с риском развития ЛПП. Носительство отдельных аллелей С или Т в случае гена CYP2C9*2, а также А или С при CYP2C9*3 не является прогностическим признаком поражения гепатоцита АРЛС.

Представленные результаты исследований об отсутствии ассоциации CYP2C9 (Arg144Cys) и CYP2C9 (Phe359Leu) с развитием ЛПП, вероятно, свидетельствуют о иных патогенетических механизмах лекарственно-индуцированного поражения гепатоцитов при терапии ВИЧ-инфекции. Вероятно, точкой приложения токсического воздействия АРЛС (в особенности ингибиторов обратной транскриптазы) является не микросомальное окисление с вовлечением CYP2C9, а воздействие на метаболизм в митохондриях прямым ингибированием матричных синтезов с участием ми-

Таблица 2. Частота встречаемости возможных генотипов CYP2C9*2 и CYP2C9*3 и отношение шансов (OR) развития гепатотоксичности у ВИЧ-инфицированных пациентов, принимающих АРЛС

Генотип	Гепатотоксичность есть	Гепатотоксичности нет	Достоверность	OR, 95 % CI
CYP2C9*2 (Arg144Cys)				
CC	0,82	0,75	$\chi^2 = 0,305$ $p > 0,05$, df = 1	OR = 1,556 [0,322 – 7,525]
CT	0,18	0,25		OR = 0,643 [0,133 – 3,110]
TT	0,0	0,0		–
Аллель С	0,91	0,88	$\chi^2 = 0,272$ $p > 0,05$, df = 1	OR = 1,476 [0,339 – 6,431]
Аллель Т	0,09	0,12		OR = 0,677 [0,156 – 2,951]
CYP2C9*3 (Phe359Leu)				
AA	0,78	0,92	$\chi^2 = 1,140$ $p > 0,05$, df = 1	OR = 0,318 [0,036 – 2,851]
AC	0,22	0,08		OR = 3,143 [0,351 – 28,160]
CC	0,0	0,0		–
Аллель А	0,89	0,96	$\chi^2 = 1,022$ $p > 0,05$, df = 1	OR = 0,348 [0,041, 2,935]
Аллель С	0,11	0,04		OR = 2,875 [0,341, 24,261]

тохондриального генома и опосредованно, вследствие нарушения энергетических процессов, генерации активных форм кислорода, а также запуском митохондриального пути апоптоза гепатоцита [12].

Тем не менее, высокий риск развития гепатита, вызванного применением лекарственных средств, служит предпосылкой продолжения дальнейших исследований, связанных с генотипированием по определенным кластерам генов, полиморфизм которых более значим в ЛПП. Первостепенное значение для генотипирования представляют гены с явно выраженным эффектом на метаболизм препаратов, ключевыми из которых являются гены цитохромов P450. Генотипирование мутантных аллелей позволит осуществить индивидуальный подход при планировании АРТ и предоставит возможность избежать токсического действия лекарственных средств на печень ВИЧ-инфицированных пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Доминирующим генотипом гена CYP2C9*2 в исследуемой когорте является гомозиготное носительство CC, а по гену CYP2C9*3 — AA, частота встречаемости которых оказалась одинаковой и составила 80 %.

2. Риск развития гепатотоксичности при проведении АРТ не ассоциирован с полиморфными вариантами гена CYP2C9 (Arg144Cys) и CYP2C9 (Ile359Leu).

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Бабанина, *Медиаль*, № 2, 59 – 61 (2013).
2. В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Ивашенко, М. В. Асеев, *Геном человека и гены “предрасположенности” (введение в предиктивную медицину)*, Интермедика, Санкт-Петербург (2000).
3. И. В. Зотова, А. Г. Никитин, Э. Н. Фагтахова и др., *Клин. практика*, № 4, 3 – 10 (2013).
4. И. А. Карпов, А. И. Василенко, Д. С. Падучо, С. В. Еремин, *Метод оптимизации обследования и проведения антиретровирусной терапии у взрослых и подростков*, Минск (2012).
5. Р. П. Корчагина, Л. П. Осипова, Н. А. Вавилова и др., *Бюл. Сиб. отд. РАМН*, **31**(6), 39 – 46 (2011).
6. Р. Д. Курбанов, Н. У. Закиров, Д. Б. Ирисов и др., *Мед. новости*, № 9, 35 – 38 (2012).
7. М. Н. Курбат, В. М. Цыркунов, И. А. Кондратович, *Мед. панорама*, № 1, 3 – 6 (2015).
8. А. Ю. Обжерина, *Автореф. дис. к-та мед. наук*, Москва (2011).
9. М. Н. Сомова, Е. Н. Музалевская, В. А. Николаевский, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **76**(9), 38 – 43 (2013).
10. Е. О. Яблоков, *Автореф. дис. к-та биол. наук*, Москва (2014).
11. V. S. Antonello, *J. Infect. Dev. Ctries*, **8**(3), 1444 – 1450 (2014).
12. J. R. Friedman, J. Nunnari, *Nature*, **505**(7483), 335 – 343 (2014).
13. G. C. Farrell, *Semin. Liver Dis.*, **22**(2), 185 – 194 (2002).
14. T. Khourykh, A. A. Rmeilehx, L. Yosha, et al., *J. Clin. Translat. Hepatol.*, № 3, 99 – 108 (2015).
15. K. Nakai, W. Habano, K. Nakai, *Life Sci.*, **78**(1), 107 – 111 (2005).

Поступила 09.03.16

POLYMORPHISM OF CYP2C9 GENE AND RISK OF HEPATOTOXICITY DEVELOPMENT DURING ANTIRETROVIRAL THERAPY

M. N. Kurbat, V. M. Tsyrukunov, and T. L. Stepuro

Grodno State Medical University, Ministry of Public Health of the Republic of Belarus, ul. Gorkogo 80, Grodno, 230015 Belarus

We have studied the association of polymorphic variants of CYP2C9 genes with the risk of drug-induced liver injury (DILI) during antiretroviral therapy of HIV-infected patients. The analysis of polymorphic variants of CYP2C9*2 (Arg144Cys) and CYP2C9*3 (Ile359Leu) genes showed that the dominant genotype of CYP2C9*2 was the homozygous CC carriership and for CYP2C9*3 it was the prevalence of AA genotype, the incidence of which was close and amounted to 80%. There was no association of these genotypes CYP2C9 with the risk of DILI. Thus, the carriership of individual C and T alleles in the case of CYP2C9*2 gene, as well as A and C for CYP2C9*3 is not a predictor of antiretroviral DILI.

Keywords: HIV infection; therapy; polymorphism; cytochromes; drug induced liver injury.