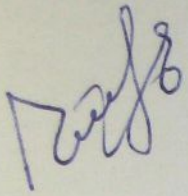


819
Б 168

Ю. И. Бажора

ФАРМАКОГЕНЕТИКА: достижения и перспективы




Ю. И. Бажора

ФАРМАКОГЕНЕТИКА: достижения и перспективы

Одесса
«Друк»
2003

375
168

2012

ББК 52.81

Б 168

УДК 615:575

Рецензенты: Головенко Н. Я. — академик АМН Украины;
Сиволап Ю. М. — академик ААН Украины;

Рекомендовано к изданию Ученым советом Одесского государственного университета (протокол № 3 от 26 декабря 2002 г.).

Бажора Ю. И.

Б 168 Фармакогенетика: достижения и перспективы. — Одеса: «Друк», 2003, — 140 с.; ил., табл.
Російською мовою.
ISBN 966-8099-61-3

У книзі узагальнено останні досягнення нового напрямку генетики і фармакології, який виник недавно, — фармакогенетики. Стисло описано історію розвитку фармакогенетики, її зв'язок з еволюційною теорією та екологією. Дано різнобічну характеристику ферментної системи Р-450, що бере участь у 1-й фазі метаболізму лікарських засобів. Наведено дані щодо генетичного різноманіття ферментів, метаболізуючих ліки в організмі людини, а також етнічні відмінності у процесі метаболізму, небажані ефекти біотрансформації ксенобіотиків. Описано сучасні методи молекулярної біології, які застосовуються у фармакогенетиці.

Видання представляє інтерес для студентів, викладачів, наукових працівників медико-біологічних спеціальностей і практичних лікарів.

В книге обобщены последние достижения недавно возникшего на стыке генетики и фармакологии научного направления — фармакогенетики. Кратко описана история развития фармакогенетики, ее связь с эволюционной теорией и экологией. Дана разносторонняя характеристика ферментной системе цитохрома Р-450, участвующей в I-й фазе метаболизма лекарственных средств. Приведены данные о генетическом разнообразии ферментов, метаболизирующих лекарства в организме человека, а также этнические различия в процессе метаболизма, нежелательные эффекты биотрансформации ксенобиотиков. Описаны современные методы молекулярной

Б 4107000000
2003

Без объявл.



ББК 52.81

ISBN 966-8099-61-3

© Ю. И. Бажора, 2003

Содержание:

Введение	5
Глава 1. Проблема индивидуального ответа на фармакотерапию	7
Глава 2. История развития фармакогенетики	13
Глава 3. Система цитохрома P-450 в метаболизме лекарственных средств	21
3.1. Номенклатура цитохрома P-450	21
3.2. Общая характеристика ферментов P-450	27
3.3. Каталитическое разнообразие ферментов P-450	32
3.4. Образование реактивных продуктов, опосредованное P-450	38
3.5. Индукция P-450 экзогенными химическими веществами	41
Глава 4. Генетическое разнообразие ферментов лекарственного метаболизма	45
4.1. Система ферментов цитохрома P-450	47
4.1.1. Цитохромы P-450 в метаболизме эндогенных веществ	48
4.1.2. Цитохромы P-450 в метаболизме лекарственных средств	62
4.2. Ферменты фазы II лекарственного метаболизма	72
4.3. Этнические различия в лекарственном метаболизме	87
Глава 5. Биотрансформация лекарственных средств и ее нежелательные эффекты	89
Глава 6. Клинические проблемы фармакогенетики	101
Глава 7. Молекулярная генетика и современная фармакология	113
7.1. Значение расшифровки генома человека для медицины	113
7.2. Гены и их экспрессия	119
7.3. Методы, применяемые в фармакогенетике	122
Глава 8. Перспективы развития фармакогенетики	131

ВВЕДЕНИЕ

Бурное развитие генетики во второй половине XX ст. способствовало ее быстрому внедрению в различные отрасли биологии и медицины и образованию новых направлений естествознания. Ярким примером может быть совершенно новая наука, возникшая из фармакологии, благодаря разработке новых методов биохимической, а в последующем молекулярно-биологической генетики, - фармакогенетика.

Зародившись в 50-е годы XX ст., фармакогенетика совершила буквально прыжок в последние годы, став одной из перспективных медико-биологических наук, базирующейся на современных, порой кажущихся фантастическими технологиях молекулярной генетики. Этому в значительной степени способствовали исследования, выполненные в рамках международной программы "Геном человека", основной этап которых завершен в 2001 году.

В течение короткого времени были выявлены генетически обусловленные причины вариабельности индивидуального ответа на фармакотерапию, установлены гены, контролирующие синтез многообразия ферментов лекарственного метаболизма, описан их полиморфизм. С внедрением в фармакологические исследования современных методов молекулярной биологии вырисовалась реальная возможность создания индивидуального "фармакологического паспорта". Эти методы позволяют вскрыть тонкие механизмы влияния лекарственных средств на экспрессию со-

ответствующих генов, что повлекло за собой развитие совершенно нового направления – фармакогеномики.

В научной литературе за последние десять лет накопилось большое количество работ, описывающих результаты экспериментальных и клинических исследований в области фармакогенетики, которые все шире начинают внедряться в практическое здравоохранение. О них необходимо знакомить студентов-медиков, а также врачей-практиков, которые уже в скором будущем столкнутся в своей работе с вопросами фармакогенетики.

Настоящая книга – попытка довести до этого круга читателей основные достижения и перспективы развития фармакогенетики.

Глава 1

ПРОБЛЕМА ИНДИВИДУАЛЬНОГО ОТВЕТА НА ФАРМАКОТЕРАПИЮ

Важной клинической задачей является изучение индивидуальных особенностей ответа на лекарственную терапию. Необычные реакции на лекарственные средства часто вызывают побочные действия и могут быть даже причиной смерти. Сейчас точно установлено, что во многих случаях индивидуальные реакции на лекарства обусловлены генетическими механизмами, определяющими особенности всасывания, распределения, метаболизма и выведения лекарств.

Следует отметить, что большинство часто употребляющихся лекарств безопасно для больных. Однако вследствие многообразия индивидуального ответа на лекарственную терапию побочные эффекты встречаются нередко. Неблагоприятные реакции на лекарственные средства (НРЛС), побочные эффекты бывают часто и в большинстве случаев не угрожают жизни пациента. Тем не менее, в последние годы, например, в Великобритании, наблюдается около 20000 серьезных НРЛС, в США в течение 1998 года было госпитализировано 221600 человек по поводу НРЛС, а летальные НРЛС вышли в лидирующие причины смерти. Только в 1994 году погибших от НРЛС в США было более 100000 человек. В настоящее время смертность от НРЛС занимает пятое место в мире.

Проблема индивидуальности ответа на лекарственные средства приобретает большую клиническую значимость. Разнообразие индивидуальности может проявляться как отсутствием терапевтического эффекта, так и спектром различных побочных реакций. К последним можно отнести, например, нарушение клиренса лекарственного препарата, что приводит к его аккумуляции и повышению токсичности. Возможность предвидеть и в последующем избежать неблагоприятных осложнений

позволит назначать лекарственные средства в максимально оптимальных дозах, избегать применение других препаратов. Такой подход не только повышает эффективность фармакотерапии, но имеет и экономическое значение, так как дает возможность избежать затрат на лекарства и снизить госпитализацию без необходимости.

Даже в настоящее время для практических врачей это только мечты. Однако изучение генетических механизмов, определяющих индивидуальную чувствительность к лекарствам, и совершенствование ДНК-технологий в генетических исследованиях позволяют проводить скрининг больных по чувствительности к тому или иному препарату. С недавнего времени эти технологии стали обычными в фармацевтической индустрии при планировании и анализе клинических испытаний лекарственных средств.

Рутинное использование генетических методов для выявления индивидуальной чувствительности к лекарственной терапии становится реальностью. На стыке генетики и фармакологии возникла и интенсивно развивается новая наука – фармакогенетика. Она изучает генетические механизмы индивидуальной чувствительности к лекарственной терапии. В принципе, это практическое приложение фундаментального аспекта процесса эволюции определенных генов, которые играют защитную роль от повреждающего действия факторов внешней среды.

Фармакогенетическая изменчивость лекарственного ответа определяется генами, которые можно разделить на две группы. Первую группу составляют гены, кодирующие белки – медиаторы, являющиеся частью внутриклеточной системы. Эти белки – первичная мишень лекарственных средств. Вторая группа генов участвует в специфических процессах поступления, метаболизма и накопления. Именно данная группа генов наиболее интенсивно изучается фармакогенетикой. Выше было отмечено, что эта группа генов формировалась и развивалась, защищая многоклеточные организмы в процессе их эволюции от вредного действия естественных токсинов, поступающих с пищей, и являлась одним из важных факторов эволюционного процесса. Таким же образом эти гены участвуют в поступлении, метаболизме, накоплении лекарственных препаратов, поступающих в организм извне.

Следует отметить, что существует много факторов, не относящихся к генетически детерминированной индивидуальной чувствительности к фармакотерапии. Так, например, изменчивость терапевтического эффекта на антибиотики, противопаразитарную и противовирус-

ную терапию связана с генетическими изменениями в организме-мишени. Возникающие в организме соматические мутации могут быть причиной лекарственной устойчивости при химиотерапии злокачественных новообразований. Тем не менее исследования в этом направлении показали, что фармакогенетический полиморфизм может быть важным фактором, определяющим исход противомикробной и противоопухолевой терапии.

Фармакологическая эффективность терапии зависит от получения требуемой концентрации препарата в заданном участке-мишени в течение достаточного для получения необходимого эффекта времени без возникновения побочных действий. Механизмы взаимодействия лекарства с мишенью на поверхности и внутри клетки также являются критическими детерминантами эффективности лекарства (рис. 1).

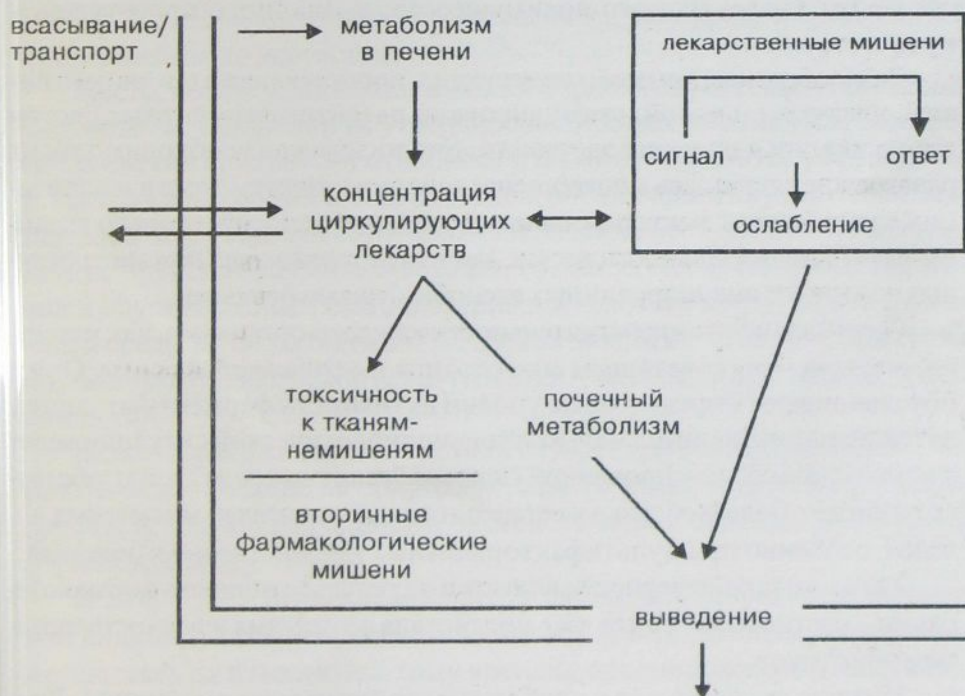


Рис. 1. Факторы, ограничивающие терапевтический эффект лекарственных средств.

У человека есть гены, отвечающие за защиту организма от внешних химических факторов. Они же определяют чувствительность или резистентность к фармакотерапии. Большинство этих генов полиморфно. Выдвигаются различные гипотезы, объясняющие столь выраженный полиморфизм. Ряд ученых считает, что эти гены не имеют значения для выживания вида, являясь, по-видимому, рудиментом, который исчезает в процессе эволюции вида. Другие придерживаются мнения о том, что полиморфизм – отражение гетерогенности факторов внешней среды и следствия давления на отдельные гены в процессе эволюции, чтобы организмы могли справиться с определенными провоцирующими факторами среды. То есть, они считают наоборот – полиморфизм является средством выживания вида. Однако эта рабочая гипотеза не может объяснить превалирование нулевых (полностью неактивных) аллелей у некоторых полиморфных генов. Требуется рациональное объяснение селективного преимущества, вызванного присутствием нуль-аллелей.

Разнообразные химические вещества, поступающие в организм с пищей, воздухом и водой, стимулировали развитие ферментных систем детоксикации в процессе эволюции. Биологическая необходимость их развития заключалась в совершенствовании резистентности и адаптации к колебаниям факторов внешней среды, что способствовало увеличению продолжительности жизни, защите от тератогенных, канцерогенных влияний и индуцированных ксенобиотиками болезней.

Оптимальность жизнедеятельности каждого организма, как известно, определяется сочетанием его генотипа и окружающей среды. Они и обуславливают определенные уровни активности ферментных систем детоксикации. Значительное ухудшение экологической ситуации ведет к нарушению сбалансированной системы “генотип-среда” и способствует развитию болезней даже у гетерозиготных носителей мутантных аллелей, особенно при мультифакториальных наследственных болезнях.

Такие же закономерности влияют и на результативность фармакотерапии – частного варианта взаимодействия организма и лекарственных ксенобиотиков.

Интерес человечества к проблемам экологии возник внезапно. Движение, которое Ю.Одум назвал как “всеобщая озабоченность проблемами окружающей среды” развернулось в середине 60-х годов XX ст. На фоне научно-технического прогресса человечество впервые за свою

длительную историю в масштабе всей планеты столкнулось с огромным давлением на все живое, включая человека, загрязняющих факторов химической, физической и биологической природы. Требуется разработка и построение конкретной системы доказательств опасности отдельного или совокупности факторов. Именно в этом состоит единственная возможность избежать преимущественно запретительных мероприятий в стратегии охраны окружающей среды. Это основная задача экологии.

Содержание современной экологии определяется из концепции уровней организации живого, которые составляют своеобразный биологический каскад. На каждом уровне (субклеточном, клеточном, органном, организменном, популяционном, биоценотическом) в результате взаимодействия с окружающей средой, поставляющей энергию и вещество, возникают соответствующие функциональные системы (генетические, клеточные, органные, системы организмов, популяционные, экосистемы). До настоящего времени экология изучает уровни организации от организмов до экосистем.

Место, которое занимают в экологической науке гены и генетические системы, до сих пор не утвердилось. Видный генетик Н.В. Тимофеев-Ресовский критически относился к термину "экология", считая, что Э.Геккель легкомысленно ввел его для обозначения науки "обо всем и еще кое о чем". Но если современная экология имеет тенденцию охватывать все функциональные процессы, то генетическая система и генетически обусловленные реакции организма человека на факторы окружающей среды должны быть в поле зрения экологии. Эти вопросы стали предметом изучения новой ветви генетики — экологической генетики (экогенетики).

В своем содержании экогенетика изучает три основных аспекта: патологические реакции на природно-климатические и бытовые факторы, профессиональные вредности; экогенетические аспекты мутагенеза; фармакогенетику.

В 1971 г. G.J. Brewer, анализируя накопленные факторы различной индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам и полагаясь на известные к тому времени предположения о генетических причинах индивидуального разнообразия в реакциях на лекарства, допустил возможность объяснения сходным образом реакции и на другие, кроме лекарств, факторы среды. Так в одном термине

была определена взаимосвязь наследственности и экологии – экогенетика. Основная рабочая гипотеза экогенетики предполагает, что биохимическая индивидуальность определяет характер реакции организма на любое внешнее воздействие. В 50-е годы XX ст. были накоплены факты, подтверждающие обусловленность патологических реакций измененной активностью специфических ферментов.

Собственно первые работы в области фармакогенетики сразу же повлекли за собой возникновение новой отрасли генетики – экогенетики.

Глава 2

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИКИ

Фармакогенетика берет свое начало с конца XIX ст. и связана с бурным развитием в то время органической химии. Благодаря этому разделу химии, выяснилось, что большинство лекарств выводится из организма в химическом виде, отличающимся от первоначального, который приписывался больному. Было высказано предположение о том, что некий “внутренний фактор” трансформировал или метаболизировал исходное химическое соединение.

На основе открытых Г. Менделем (1866) законов наследственности и дальнейших успехов в области генетики в начале XX ст. были опубликованы работы, свидетельствующие о том, что эти законы управляют биотрансформацией лекарств и детоксикацией чужеродных соединений. Основными в этом направлении стали наблюдения А. Гаррода, касающиеся физиологии пигментов мочи, а в последующем исследования алкаптонурии. В своей книге “Врожденные нарушения метаболизма” (1906) он высказывается об индивидуальной чувствительности к лекарствам, которая возникает из-за “расстройства метаболических факторов”.

Интенсивное развитие биохимической генетики человека, установление наследственных дефектов ферментов привели к выделению нового направления в генетике – фармакогенетики.

На основании многочисленных наблюдений А. Мотульски (1957) устанавливает, что наследственные дефекты метаболизма могут объяснить многие индивидуальные различия в эффективности лекарств и побочных реакций, которые следует отличать от аллергических реакций. В 1959 г. Ф. Фогель впервые дал определение фармакогенетике как “клинически значимой изменчивости в ответ на терапию”, а в 1962 г. W. Kalow публи-

кует первую работу (“Наследственность и чувствительность к лекарствам”), специально посвященную фармакогенетике.

Вначале исследования в области фармакогенетики не имели какой-то системности. Это были самостоятельные несвязанные между собой работы. Тем не менее они имели большое значение в объяснении биохимической и генетической основы многих казалось бы не имеющих общего между собой реакций непереносимости лекарственной терапии.

Так, было доказано, что уровень активности сывороточной холинэстеразы – генетически детерминированный признак. Наблюдения показали, что некоторое число пациентов пережили пролонгированную анестезию после назначения миелорелаксанта суксаметония (сукцинилдихолина).

Суксаметониум или сукцинилдихолин широко используется как релаксант мышц при хирургических операциях. Псевдохолинэстераза катализирует гидролиз препарата, поэтому в норме его действие непродолжительно. У отдельных больных этот фермент обладает очень низким сродством к препарату, что приводит к длительной задержке дыхания вследствие подавления деятельности дыхательных мышц. В таких случаях пациенту необходимо вводить очищенный фермент или плазму, содержащую псевдохолинэстеразу, а до того времени переводить его на искусственное дыхание.

Причиной этого служат различные мутации как в гетерозиготном, так и в компаунд-гетерозиготном состоянии, изменяющие активный центр псевдохолинэстеразы, которая теряет способность эффективно гидролизовать субстрат. К настоящему времени охарактеризованы некоторые аллельные варианты данного гена и определены молекулярные механизмы его полиморфизма. Основная атипичная форма фермента возникает вследствие замены аспарагиновой кислоты на глицин в участке белка, который присоединяет субстрат. В этом случае не происходит электростатического взаимодействия и субстрат не присоединяется. Аллель, кодирующий нормальную псевдохолинэстеразу, обозначают $СНЕ_1^U$. Мутантный аллель, который встречается наиболее часто – $СНЕ_1^D$. Около 3-4 % людей европейской популяции – гетерозиготы ($СНЕ_1^U/СНЕ_1^D$), а один из 3500 людей – мутантная гомозигота ($СНЕ_1^D/СНЕ_1^D$). Последние вместе с гетерозиготами составляют группу риска при введении суксаметониума. Измененный фермент идентифицируют по его устойчивости к ингибитору дибукаину. Фермент му-

тантных гомозигот относительно устойчив к дибукаину, у гетерозигот выявляется умеренная устойчивость. Другой аллель псевдохolinэстеразы (CNE_1^S) детерминирует полное отсутствие активности этого фермента. Гомозиготы $\text{CNE}_1^S/\text{CNE}_1^S$ очень чувствительны к действию суксаметониума, так как в плазме крови у них нет псевдохolinэстеразы. Этот аллель распространен среди эскимосов Аляски. Еще один мутантный аллель (CNE_1^F) детерминирует устойчивость к фториду (таблица 1).

Таблица 1. Типы псевдохolinэстеразы и чувствительность к суксаметониуму

Генотип	Активность	Дибукановое число	Фторидное число	Частота Фенотипа в европейских популяциях	Чувствительность к суксаметониуму
$\text{CNE}_1^U/\text{CNE}_1^U$	Нормальная	80	59	95 %	Нет
$\text{CNE}_1^D/\text{CNE}_1^D$	Умеренно снижена	22	27	1:3200	+++
$\text{CNE}_1^S/\text{CNE}_1^S$	Отсутствует	0	0	1:170 000	++++
$\text{CNE}_1^F/\text{CNE}_1^F$	Немного снижена	66	35	1:28 000	++
$\text{CNE}_1^D/\text{CNE}_1^S$	Снижена	22	27	1:11 000	+++
$\text{CNE}_1^D/\text{CNE}_1^F$	Немного снижена	49	33	1:2500	+++
$\text{CNE}_1^F/\text{CNE}_1^S$	«	67	43	1:33 000	++
$\text{CNE}_1^U/\text{CNE}_1^D$	«	62	48	3,5 %	(+)
$\text{CNE}_1^U/\text{CNE}_1^F$	«	74	50	1,2 %	(+)
$\text{CNE}_1^U/\text{CNE}_1^S$	«	80	59	1:200	Неизвестна

При исследованиях псевдохolinэстеразы обычно используют бензоилхолин. Однако у некоторых больных, перенесших длительную задержку дыхания, нарушение фермента обнаруживается только при использовании сукцинилдихолина.

Изучение причин развития гемолитической анемии у мужчин афроамериканской популяции после приема противомаларийного препарата примахина привело к выявлению наследственного дефекта в гене, кодирующем глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г-6-ФДГ).

Во время войны в Корее в начале 50-х годов XX ст. все американские солдаты проходили профилактический курс лечения противомаларийным препаратом примахином. У 10% чернокожих и 1-2% белых солдат из 1000 в ответ на прием примахина развивалась сосудистая гемоли-

тическая реакция. Ранее сходные реакции наблюдались при лечении чернокожих больных сульфаниламидами, а также у жителей Сардинии после употребления в пищу конских бобов. Первоначально это пытались объяснить патологическими иммунными реакциями, но последующие исследования показали, что побочное действие (гемолиз) примахина связано с недостаточностью Г-6-ФДГ.

Вскоре была обнаружена еще одна особенность – гемолиз встречается чаще у мужчин, чем у женщин. Дальнейшее изучение уровня глутатиона в эритроцитах показало, что у афроамериканцев наблюдается ярко выраженный бимодальный характер кривой распределения, причем в значительной части популяции уровень содержания глутатиона был крайне низким. В группе афроамериканских женщин кривая смещена влево, а доля больных с низким содержанием глутатиона гораздо меньше, чем в группе мужчин. Исходя из этого, было сделано заключение, что данный признак сцеплен с X-хромосомой. Последующие работы касались анализа родословных и генеалогические данные также подтвердили X-сцепленный характер наследования реакции на данные препараты, причем в этих работах были использованы и прямые тесты исследования активности фермента Г-6-ФДГ. В дальнейшем в популяциях человека были выявлены несколько редких типов Г-6-ФДГ, которые отличаются друг от друга активностью фермента, электрофоретической подвижностью в различных буферных системах, зависимостью активности фермента от pH, термостабильностью, субстратной специфичностью и другими параметрами. В настоящее время различают около 400 вариантов Г-6-ФДГ. Генетический анализ ДНК позволил обнаружить большое количество мутаций в гене Г-6-ФДГ. Наименее активная форма фермента возникает в результате только одной замены (аспарагина на аспарагиновую кислоту). Она наследуется как X-сцепленный признак. Более 30 аллелей гена имеет измененную последовательность нуклеотидов. Мутации образуют непрерывный ряд фенотипов от вариантов с практически неизменными биологическими функциями к тем, которые проявляются только в неблагоприятных условиях, вплоть до вариантов, вызывающих развитие заболевания даже при отсутствии неблагоприятных факторов. Кроме противомаларийных препаратов Г-6-ФДГ метаболизирует широкий спектр лекарственных препаратов, в том числе хлорамфеникол, сульфаниламиды.

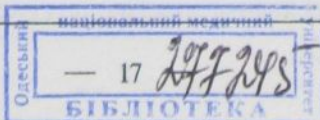
После введения в практическое здравоохранение изониазида появились сообщения об аномальном ответе и развитии периферической

нейропатии у значительного числа пациентов, которым назначался этот противотуберкулезный препарат. В серии сравнений реакций моно- и дизиготных близнецов на изониазид была впервые определена генетическая основа полиморфизма N-ацетилтрансферазы.

Следующим шагом вперед в изучении индивидуальной чувствительности к лекарственным препаратам было выявление генетической вариабельности путем окисления лекарственных препаратов, определяемых системой цитохрома P-450. Вслед за назначением антипирина и бис-гидроксикумарина появились первые сообщения об индивидуальной изменчивости в клиренсе препаратов. Доказательством того, что это генетически обусловлено, было изучение повышенной чувствительности к ряду гипотензивных и антиаритмических средств, к которым относятся дебрисохин и спартеин (таблица 2).

Таблица 2. Полиморфизм по спартеину/дебрисохину: патологические реакции у людей с "медленным" метаболизмом

Препарат	Реакция
Дебрисохин	Пониженное давление
Спартеин	Усиленное действие, имитирующее окситоцин, и сердечная недостаточность
Фенацетин	Метгемоглобинемия
Фенформин	Молочный ацидоз
Пергексиллин	Периферическая нейропатия и агранулоцитоз
Каптоприл	Агранулоцитоз
D-пеницилламин	Протеинурия и тромбоцитопения
Нортриптилин	Пониженное давление
Гуаноксан	Пониженное давление
Метиамид	Агранулоцитоз
Энкаинид	Препарат не действует; активен только препарат, подвергшийся метаболизму
<i>β-блокаторы</i>	
Пропранолол	Брадикардия и пониженное давление
Метопролол	«
Тимолол	«
Алпренолол	«
Буфуралол	«



Индивиды, способные быстро окислять эти препараты, являются нормальными гомозиготами и гетерозиготами, тогда как медленное окисление свойственно лишь мутантным гомозиготам. Выявить окислительный полиморфизм *in vitro*, к сожалению невозможно. Для определения окислительного статуса человека необходим прием внутрь контрольного препарата и анализ его метаболитов в моче (определение соотношения 4-оксидебрисохина к дебрисохину). Эти лекарственные средства метаболизируются с участием полиморфного фермента CYP2D6 (гидроксилаза дебрисохина) семейства P-450. Повышенная чувствительность была связана с отсутствием функции фермента вследствие мутации в соответствующем гене. Основные типы мутаций, которые обуславливают инактивацию ферментов, идентифицированы в настоящее время. На основании полученных результатов разработаны ДНК-тесты для выявления индивидуумов с нарушением метаболизма CYP2D6.

В данных примерах отражены концептуальные положения экогенетики в целом и фармакогенетики в частности. Главные из них следующие:

- полиморфизм является генетическим субстратом, на котором формируются восприимчивость или устойчивость к заболеваниям;
- эффективность или безуспешность лекарственной терапии;
- существование достаточно большого числа мутаций генома человека в отдельных локусах, которые обуславливают патологическую реакцию на специфический фактор среды; лишь некоторая часть мутаций приводит к развитию болезни или нежелательной реакции.

Выше шла речь о моногенном характере необычных реакций на внешнесредовые факторы. Для этой группы экопатологических реакций возможен надежный прогноз на повторение или встречаемость подобных состояний у родственников на основе менделевских закономерностей наследования. Известен ряд других важных с точки зрения фармакогенетики состояний, которые наследуются как простые менделевские признаки (таблица 3).

Моногенный характер патологических реакций существует наряду с полигенными системами, контролирующими экогенетические ответы. В таких случаях доказательства участия многих генов в реакции на конкретный экологический фактор строятся на близнецовых сопоставлениях, внутрисемейном корреляционном анализе исследуемых фенотипов и сравнении характера реакций в различных этнических группах населения.

Таблица 3. Моногенные фармакогенетические признаки

Энзиматические или метаболические аномалии	Результат и/или заболевание
<p>А. Хорошо изученные признаки а) Часто встречающиеся признаки Некоторые варианты Г-6-ФДГ Полиморфизм по N-ацетил-трансферазе Слабое окисление (дебрисохин/спартеин) б) Редкие признаки Варианты псевдохолинэстеразы</p> <p>Нарушение метаболизма кальция</p> <p>Некоторые нестабильные гемоглобины</p> <p>Различные порфирии</p> <p>Недостаточность метгемоглобин-редуктазы</p> <p>Б. Менее полно изученные признаки Полиморфизм по параоксоназе</p> <p>Слабое окисление мепенитонина</p> <p>Полиморфизм по тиопури-метилтрансферазе (цитозоля)</p> <p>Полиморфизм по катехол-0-метилтрансферазе Недостаточность эпоксидгидролазы</p>	<p>Гемолиз Понижено ацетилирование ряда препаратов Неспецифические реакции на многие препараты</p> <p>Продолжительная задержка дыхания под действием суксаметониума Злокачественная гипертермия после ингаляционной анестезии Гемолиз</p> <p>Ряд препаратов усиливает симптомы заболеваний Цианоз, вызываемый некоторыми препаратами-окислителями</p> <p>Люди с пониженной активностью фермента (~ 50 %) более подвержены отравлению паратионом Тяжелые побочные эффекты мепенитонина Неэффективность тиопуриновых препаратов (например, меркаптопурина) Неэффективность L-допа и б-метилдопа Гепатотоксичность фенитоина</p>

В настоящее время основной блок научных исследований в области фармакогенетики состоит из работ, посвященных изучению генетического полиморфизма ферментов, ответственных за метаболизм лекарственных средств.

Таким образом, возникла возможность идентификации молекулярных основ фармакогенетического полиморфизма и, как следствие, скринирование индивидуумов на присутствие соответствующего аллеля, что открывает перспективы предвидеть результаты лекарственной терапии и позволит индивидуализировать лекарственную терапию на базе генетической конституции. Это наиболее перспективный путь повышения эффективности лекарственных средств и сокращения числа побочных эффектов.

Глава 3

СИСТЕМА ЦИТОХРОМА P-450 В МЕТАБОЛИЗМЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Большая часть лекарственных средств, поступающих в организм пероральным путем, в той или иной степени липофильны, поэтому их всасывание происходит, в основном, за счет пассивной диффузии. После всасывания лекарства связываются с плазменными белками и циркулируют с током крови по всему организму или накапливаются в жировой ткани. В таком виде они не могут выделяться с мочой. Их эффективная элиминация возможна лишь при условии превращения в более гидрофильные метаболиты. Основной орган метаболизма – печень. Эндотелиальные клетки ее синусоидов имеют большие клеточные поры (фенестры), через которые проникают белки плазмы крови. Белки плазмы пассивно проникают через синусоиды в пространства Диссе. Затем лекарственное средство поступает в гепатоцит путем пассивного или активного транспорта, где метаболизируется комплексами ферментов I и II фаз. Образовавшиеся метаболиты либо вновь попадают в кровь через синусоидальный ток и выводятся почками с мочой, либо через каналикулярную мембрану секретируются в желчь и потом выводятся с калом.

Особую роль в метаболизме лекарственных средств играет ферментная система цитохрома P-450.

3.1. Номенклатура цитохрома P-450

Цитохромы P-450 – большая группа белков. Методами белковой химии (очистка ферментов, определение аминокислотного состава и др.), а также молекулярной биологии (иммунохимические методы) в настоящее время установлено значительное количество изоформ цитохрома P-450 и соответственно их генов. Считается, что все они ко-

дируются генами, произошедшими от общего гена – предшественника. Количество таких генов составляет в настоящее время около 500. Они обнаружены в 85 видах эукариот (беспозвоночные, позвоночные животные, растения, грибы) и 20 видах прокариот. Родственное происхождение положено в основу широко используемой номенклатуры (т.е. родстве последовательностей, кодирующих соответствующие белки-ферменты).

В настоящее время, исходя из неполного соответствия гемопротейна классу цитохромов, Номенклатурной Комиссией Международного Союза биохимиков и Молекулярных биологов (NC-IUBMB) рекомендовано этот фермент называть гемтиолатный протеин P-450 вместо цитохром P-450.

Для обозначения цитохромов P-450 используют аббревиатуру CYP (cytochrome P-450). Гены и продукты их экспрессии (mRNA, cDNA) также обозначаются CYP. Исключения составляют гены мышей и дрозофил (Cyp). Все цитохромы P-450 называются суперсемейством.

Название отдельного CYP P-450 обозначается согласно простому правилу комбинации число-буква-число. Первое число обозначает семейство P-450, представители которого имеют 40 % и более идентичных аминокислотных последовательностей. В настоящее время распознано 43 семейства P-450 у животных, 46 – у растений и 25 – у грибов (таблица 4).

На сегодняшний день насчитывается более 270 различных семейств генов CYP (18 – у млекопитающих). У растений разнообразие малых молекул огромное, поэтому предполагается, что у них содержится много ферментов CYP P-450. Это подтверждается в геноме небольшого горчичного растения *Arabidopsis thaliana*, который содержит 249 активных генов CYP и 24 нефункциональных псевдогена (1 % от общего числа генов). Сходен и геном риса, в котором найдено 324 функциональных гена. В то же время у человека 57 генов CYP и 33 псевдогена, распределенных в 18 семейств и 42 подсемейства. Предполагается, что это число не изменится, если не будут найдены активные гены человеческих подсемейств CYP2G и CYP2T.

Комбинация число-буква, например, P-4501B определяет соответствующее подсемейство внутри каждого семейства. Для их обозначения используются буквы латинского алфавита (A, B, C и т.д.). У членов подсемейства отмечается идентичность последовательностей аминокислот более чем 65 % и даже 75 % внутри вида и даже между видами млекопитающих. Есть семейства P-450, которые не имеют под-

Таблица 4. Общая характеристика семейств CYP P-450 различных таксономических групп организма

CYP 1	Позвоночные: индуцируются диоксином; метаболизм полициклических углеводов, гетероциклических соединений, ароматических аминов
CYP 2	Позвоночные и беспозвоночные: метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды
CYP 3	Позвоночные: метаболизм лекарств и химических веществ окружающей среды
CYP 4	Позвоночные: гидроксильрование жирных кислот; беспозвоночные – неизвестные функции
CYP 5	Позвоночные: тромбоксансинтаза. Насекомые: метаболизм веществ растительного происхождения и пестицидов
CYP 6	Насекомые: метаболизм веществ растительного происхождения и пестицидов
CYP 7A	Позвоночные: холестерин 7- α -гидроксилаза
CYP 7B	Позвоночные – неизвестные функции
CYP 8	Позвоночные: простаглицинсинтаза
CYP 9	Насекомые
CYP 10	Моллюски (митохондриальные ферменты)
CYP 11	Позвоночные: расщепление боковой цепи холестерина, стероид 11- β -гидроксилаза и альдостеронсинтаза (митохондрии)
CYP 12	Насекомые (митохондриальные ферменты)
CYP 13	Нематоды
CYP 14	Нематоды
CYP 15	Насекомые
CYP 16	Нематоды
CYP 17	Позвоночные: стероид 17- α -гидроксилаза
CYP 18	Насекомые
CYP 19	Позвоночные: ароматизация андрогенов

Таблица 4. (Продолжение) *Общая характеристика семейств CYP P-450 различных таксономических групп организма*

CYP 21	Позвоночные: стероид 21-гидроксилаза
CYP 24	Позвоночные: стероид 24-гидроксилаза (митохондрии)
CYP 27	Позвоночные: стероид 27-гидроксилаза (митохондрии)
CYP 51	Животные, грибы, дрожжи, растения, биосинтез стерола
CYP 52	Дрожжи: гидроксигирование алканов
CYP 53 - CYP 62	Грибы
CYP 71 - CYP 92	Растения
CYP 73	Растения: гидроксигирование коричной кислоты
CYP 101 - CYP 118	Бактерии

семейства. В то же время такие, как семейство 2 у млекопитающих, содержат более 10 подсемейств.

Последняя цифра в обозначении используется для определения специфического фермента P-450, например, P-450 2C9. Когда обозначают ген P-450, то используют трехбуквенный код CYP, который дополняется кодом число-буква-число для закодированного этим геном белка (CYP2C9). Например, ферменты стероид 27-гидроксилаза и витамин D 24-гидроксилаза относятся к семейству CYP27, так как они имеют 40 % идентичности последовательностей. Стероид 27-гидроксилаза затем относится к подсемейству CYP27A, а витамин D 24-гидроксилаза – к подсемейству CYP27B, так как их последовательности идентичны менее, чем на 55 %. Если будет открыт дополнительный фермент, который более, чем на 55 % идентичен со стероид 24-гидроксилазой, то он будет назван CYP27A2 и т.д.

Единая номенклатура обеспечивает идентификацию ферментов, которые метаболизируют множественные структурно разные субстраты. В эту группу включены как ферменты P-450, вовлеченные в метаболизм ксенобиотиков, так и гены, кодирующие P-450 с до сих пор не идентифицированными функциями.

В то же время такая классификация имеет ряд неудобств и трудностей. Прежде всего, это относится к тривиальным наименованиям генов, которые были открыты ранее, а позже была установлена их роль в кодировании цитохрома P-450. Например, для *Drosophila melanogaster* и *Arabidopsis thaliana* определен ген *Eig 17-1*, который является не чем иным, как *Cyp18*. Следовательно, *Cyp* становится официальным синонимом. Во многих опубликованных работах использовалась старая номенклатура гемопротеинов, основанная на видовых особенностях („*olf 1*” и „*PC16*” кодируются соответственно *CYP2C16* генами).

В банке данных также существует переход от старых наименований монооксигеназ, катализирующих гидроксилирование стероидов, на новую классификацию. Например, P-450_{scs}, P-450_{11b1}, P-450_{11b2}, P-450_{agom} могут называться P-450_{scs}, P-450_{c11b1}, P-450_{cb1}, P-450_{agom}, но правильнее, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *CYP17* соответственно.

Методы современной молекулярной биологии позволяют выделить гены из любого источника и в достаточном количестве. Благодаря этому, удалось получить изоформы цитохромов P-450, отличающиеся аминокислотной последовательностью от природных гемопротеинов. Для них используют следующую номенклатуру. Вначале указывается природная изоформа цитохрома P-450, затем идет аббревиатура X-число-Y, где X-аминокислота природного цитохрома, число – место ее локализации, Y – аминокислота, которая ее сменила в реконструированном (химерном) гемопротеине. Например, *CYP1A1I426V* следует считать, что в *CYP1A1* в 426 положении изолейцин заменен валином.

Подсемейства генов P-450 могут быть простыми и сложными. У разных видов в подсемействах с множеством членов третий номер в обозначении белка обычно уникален для каждого фермента каждого вида. Число генов каждого семейства, также как число каждого подсемейства может варьировать между видами (таблица 5). Многие из этих генов, вероятно, отражают дубликацию гена и дивергенцию, которая произошла с момента расхождения видов млекопитающих. Так,

например P-450 2C ферменты человека имеют приблизительно 75 % идентичности аминокислотных последовательностей с белками P-450 2C кролика. В то же время сходство среди кроличьих 2C варьирует от 68 % до 95 %.

Таблица 5. Широкие (1,2,3,4) семейства P-450.

Виды	1A	1B	2A	2B	2C	2D	2E	2F	2G	2J	2R	2S	3A	4A	4B	4F	4X	4Z
Человек	2	1	3	1	4	1	1	1	-	1	1	1	3	1	1	5	1	1
Мышь	2	1	3	5	6	6	1	1	1	5	-	1	3	3	1	6	-	-
Крыса	2	1	2	3	7	5	1	1	1	1	-	-	4	4	1	5	-	-

Примечание. Подсемейства обозначены в верхней строчке кодом число-буква. Для указанных видов дано число известных ферментов

В литературе накоплен значительный материал, касающийся определения локализации генов цитохромов P-450. В частности, доказано, что CYP1A1 и CYP1A2 находятся близко друг от друга в хромосоме 15 человека. В случае, когда два или более гена находятся в кластере рекомендовано указывать только принадлежность к семейству, т.е. "CYP1A кластер". У мышей *Cyp1a1* и *Cyp1a2* локализованы в хромосоме 9 и также соответствуют *Cyp1a* кластеру. Для указания на место локализации гена в хромосоме используется принятая в генетике аббревиатура, например, для CYP1A 15q22-qter (MPJ). Локализованы пять функциональных генов у CYP2D и аналогичное количество *Cyp2d* (15-я хромосома). Кластер CYP2D (22q13.1) человека представлен 1 геном и 2 псевдогенами.

У крысы CYP2D кластер состоит из 5 генов. Предполагается, что они возникли в результате дупликации единичного гена. После дупликации диплоидные клетки имеют уже не 2, а 4 гена для каждого белка. В последующих генерациях каждая пара генов может изменяться независимо от других пар генов. При этом одна пара продолжает контролировать синтез исходного функционального белка, другая пара, претерпевая значительные мутационные изменения, отвечает за синтез белка с той же функцией, но отличающегося по специфичности или активности.

Вероятно, дубликации генов цитохромов P-450 в ходе эволюции сопровождалась также и их транслокацией. В результате этого близкие гены оказались в различных хромосомах, например, гены человека CYP2B (19q13.1-13.2), CYP2C (19q12-q13.2) и CYP2D (10q24.1-24.3), образующие одно семейство. Наиболее древний ген CYP51 представлен у человека соответствующим кластером CYP51 (7-я хромосома) и двумя псевдогенами CYP51P1 (3-я хромосома), CYP51P2 (13-я хромосома).

3.2. Общая характеристика ферментов P-450

Цитохром P-450-зависимые ферменты (монооксигеназы) катализируют прямую реакцию между своими субстратами и O_2 . Монооксигеназы присоединяют один атом кислорода к субстрату и восстанавливают второй атом до воды. Эти ферменты, в которых роль простетической группы выполняет цитохром P-450, разделяют на три группы, в зависимости от места локализации.

1. Микросомы печени

НАДФН → флавонопротеид II → негеминовый Fe-белок → цитохром P-450 → O_2 .

2. Митохондрии надпочечников

НАДФН → флавонопротеид III → адренодоксина цитохром P-450 → O_2 .

3. Бактериальные монооксигеназы

НАДФН → флавонопротеид III → путидаредоксин → цитохром P-450 → O_2 .

Между указанными группами ферментов имеются существенные различия, но все они содержат цитохром P-450. Как все гемопротейны (гемоглобин, каталаза) цитохром P-450 имеет тетрапирольную простетическую группу, содержащую ион железа. Хелатный комплекс протопорфирина с Fe^{2+} называется гемом или протогемом. Аналогичный комплекс с Fe^{3+} носит название гемина или гематина.

Несмотря на отличие цитохромов P-450, полученных из разнообразных биологических источников, существует определенная последовательность реакций, при которых гемопротейн взаимодействует с субстратами, кислородом и донорами электронов. Этот процесс условно разделяют на пять стадий.

1. Взаимодействие низкоспиновой формы цитохрома P-450 (Fe^{3+}) с субстратом.
2. Восстановление образовавшегося фермент-субстратного комплекса в НАДФН-специфической цепи переноса электронов.
3. Взаимодействие атмосферного кислорода с комплексом цитохром P-450 (Fe^{2+}) – субстрат и образование тройственного комплекса P-450 (Fe^{3+}) – субстрат – O_2 .
4. Активирование молекулярного кислорода в оксигенированном комплексе путем его восстановления.
5. Распад комплекса на окисленный цитохром P-450 и окисленный субстрат.

В монооксигеназный катализ вовлекается большое число субстратов, поэтому принято их подразделять на определенные типы реакций (таблица 6).

Химическая структура субстратов и продуктов их окисления (метаболитов) указывает на то, что такие реакции могут протекать как с эндогенными, так и чужеродными соединениями (ксенобиотиками). К эндогенным относятся стероиды, желчные кислоты, жирные кислоты, простагландины, лейкотриены, биогенные амины, ретиноиды, гидроперекиси липидов. К ксенобиотикам относятся многие синтетические и природные лекарственные средства, пестициды, гербициды, промышленные яды, отходы промышленных предприятий, пищевые добавки, косметические составы и др.

Реакции гидроксирования ксенобиотиков носят защитный характер и направлены на предупреждение накопления в живых системах гидрофобных соединений. Во многих случаях эти реакции приводят к образованию промежуточных реакционноспособных активных метаболитов, продуктов неполного восстановления кислорода. Они химически модифицируют макромолекулы и стимулируют реакции перекисного окисления. Это, в свою очередь, служит причиной проявления различных видов токсичности, канцерогенеза, мутагенеза, тератогенеза и аллергий.

Таким образом, цитохромы P-450 играют чрезвычайно важную роль в поддержании стационарного уровня эндогенных лигандов, вызывая лигандмодулирующую транскрипцию генов, тем самым определяя рост, дифференцировку, апоптоз, а также клеточный гомеостаз.

Для доказательства существования цитохрома P-450 в различных изоформах были использованы его индукторы. Число различных

Таблица 6. Типы реакций монооксигеназного катализа

Алифатическое гидрокселирование	$R-CH_3 \rightarrow R-CH_2OH$
Эпоксилирование	$R-CH=CH-R \rightarrow R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH-R$
Ароматическое гидрокселирование	$R-\text{C}_6\text{H}_5 \rightarrow R-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$
Окислительное дезалкилирование	
N-деалкилирование	$R-NHCH_3 \rightarrow R-NH_2 + CH_2OH$
O-деалкилирование	$R-O-CH_3 \rightarrow R-OH + CH_2O$
S-деалкилирование	$R-S-CH_3 \rightarrow R-SH + CH_2O$
N-окисление	
Первичные амины	$R-NH_2 \rightarrow RNHOH$
Вторичные амины	$R_1R_2-NH \rightarrow R_1R_2-NOH$
Третичные амины	$R_1R_2R_3-N \rightarrow R_1R_2R_3-N=O$
S-окисление	$R_1R_2-S \rightarrow R_1R_2-S=O$
Дезаминирование	$R-\overset{\overset{NH}{\diagup}}{CH}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_3 \rightarrow R-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_3 + NH_3$
Десульфирование	$R_1R_2-C=S \rightarrow R_1R_2-C=O$
Дегалогенирование	$R-CH_2Cl \rightarrow R-CH_2OH$

веществ, которые вызывают индукцию монооксигеназ, окисляющих ксенобиотики, превышает несколько сотен. Они различны по химической природе и биологическому действию. Единственным общим свойством для них является то, что они жирорастворимые и в значительных количествах накапливаются в эндоплазматической сети клеток. Избирательное поступление веществ в цитомембраны способствует взаимодействию фермента с субстратом. Чем длительнее субстрат находится в организме, тем продолжительнее его контакт с ферментом и, следовательно, более высокий уровень его индукции. Индукция, предположительно, носит приспособительный характер, так как приводит к увеличению скорости метаболизма ксенобиотиков, т.е. к ускорению их элиминации из организма.

Исследования, проведенные с классическими индукторами цитохрома P-450 (фенобарбитал, 3-метилхолантрен), и спектральные характеристики комплексов фермент-субстрат показали, что в одном и том же биологическом объекте этот гемопротейн существует в нескольких разновидностях. На основании этого возник вопрос, касающийся прежде всего количества этих изоферментов и возможности их классификации. Установлено, что множественные формы цитохрома P-450 в сравнении с другими ферментами имеют относительно невысокую субстратную специфичность, и часто один и тот же субстрат окисляется различными изоформами. Отсутствуют и специфические по отношению к тем или иным изоформам цитохрома индукторы или ингибиторы. Это, в свою очередь, затрудняет классификацию изоформ цитохрома P-450.

Открытие цитохрома P-450 считается значительным событием в биохимии. Более 40 лет тому назад D.Garfinkel, а затем вскоре M.Klingenberg установили, что в эндоплазматической сети печени экспериментальных животных содержится неизвестное пигментное вещество. Оно, восстанавливаясь, присоединяет CO и образует комплекс с максимумом поглощения при длине волны 450 нм, что послужило основанием для обозначения его P-450 (P-пигмент), а когда определили его гемопротейновую природу – цитохромом P-450.

Это характерный спектр поглощения отражает уникальное присоединение железа гема к цистеиновому остатку в месте связывания напротив присоединения CO. Этот цистеин и соседние с ним фрагменты формируют аминокислотный участок, который высоко

специфичен для каждого из P-450. Трехмерный структурный компонент P-450, который образует участок, присоединяющий гем, высоко консервативен у P-450.

В начале 60-х годов XX ст. считали, что P-450 – единственный фермент. В середине 60-х годов он ассоциировался с метаболизмом лекарств и стероидов. В конце 70-х предполагалось о существовании шести ферментов P-450. Мембран-ассоциированная и гидрофобная природа ферментной системы препятствовала их очистке и число таких белков не могло быть точно подсчитано. Достижения в области методов очистки и РНК позволили Gonzales F.J. et al. в начале 80-х годов выделить первую кДНК, кодирующую полный белок цитохрома P-450 (CYP). Затем методология клонирования позволила выявить множество различных ферментов P-450.

Дальнейшими исследованиями было установлено, что цитохром P-450 является простетической группой ферментов, относящихся к монооксигеназам (гидроксилазам). Последние широко распространены в живой природе, их обнаружили у беспозвоночных и позвоночных животных, растений, бактерий.

Цитохром P-450-зависимые ферменты окисляют большое число природных субстратов и практически все ксенобиотики. Эти ферменты играют ключевую роль в фармакологии. Во многих случаях они определяют активность лекарств (пролекарств), их фармакологический профиль, а также побочные действие и толерантность. Данные ферментные системы важны и для токсикологии. Связано это с тем, что метаболиты, которые образуются в процессе монооксигеназного катализа, оказывают существенное влияние на генетический аппарат клеток, их деление и, следовательно, на такие процессы, как репродукция, мутагенез, онкогенез.

При катализе ферменты расщепляют O_2 с восстановлением одного атома до воды и активной формы кислорода, присоединяющейся к субстрату. Микросомальные P-450 локализуются преимущественно в эндоплазматической сети, но определяются также и на наружной поверхности плазматической мембраны. Это может быть причиной того, что они связывают аутоантитела.

Предполагается, что белки, которые экспрессируются в эндоплазматической сети, попадают в везикулярную транспортную систему при

их нехватке для внутриклеточных процессов. Пузырьки, которые отпочковываются от эндоплазматической сети, доставляют белки в аппарат Гольджи, откуда они с помощью транспортных пузырьков направляются к специфическим органеллам, а также к плазматической мембране. Считают, что белки, которые остаются в эндоплазматической сети, обладают специфическими свойствами, предупреждающими их включение в транспортные пузырьки, а также стимулирующими их возврат в эндоплазматическую сеть. То, что микросомальные P-450 экспрессированы на наружной плазматической мембране, предполагает высвобождение некоторых P-450 из этой системы повторного использования и сохранения. Вероятно, N-концевая лидерная последовательность и цитоплазматический каталитический домен содержат сигнал сохранения. Обычно P-450 не проявляет каких-либо известных последовательностей распознавания для сохранения в эндоплазматической сети и механизмы, обеспечивающие сохранение, остаются неизвестными.

3.3. Каталитическое разнообразие ферментов P-450

В зависимости от выполняемой функции ферменты P-450 млекопитающих можно разделить на две группы: биосинтетические и катаболические.

Биосинтетические P-450 участвуют во многих реакциях, включая синтез тромбоксана, андрогенов, стероидных гормонов, желчных кислот, гормональных форм витамина D₃. В процессе эволюции эти ферменты заполнили специфические ниши и могут быть различены по их специфическому катализу одной реакции.

Фермент, расщепляющий боковые цепи (CYP11A1) обнаружен в митохондриях и катализирует первый этап биосинтеза стероидов путем превращения холестерина в прегненолон. 17- α -гидроксилаза (CYP17) находится в тканях яичка и яичника, где она катализирует специфический этап синтеза андрогенов и эстрогенов. Этот фермент экспрессируется также в надпочечниках вместе с 21-гидроксилазой (CYP21), где она участвует в продукции кортизола. Таким образом, эта группа P-450 играет важную роль в организме, но она весьма специфическая.

Напротив, ферменты, которые возникали и развивались для участия в детоксикации чужеродных соединений и катаболизма эндогенных жирных кислот и стерола, являются более многочисленными и с готовностью метаболизируют множество структурно непохожих субстратов.

Такая каталитическая избыточность, без сомнения, обеспечивает важную защитную функцию, но делает более сложной идентификацию определенных P-450 ферментов по специфической реакции, которую они катализируют.

Катаболические P-450 найдены в различных тканях, а многие из них обнаруживаются в сравнительно высоких концентрациях в печени, которая играет центральную роль в детоксикации чужеродных соединений. Установлено, что катаболические P-450 распознаются аутоантигенами, ассоциированными с аутоиммунным гепатитом и гепатитом, индуцированным лекарственными средствами.

Разнообразие реакций, катализируемых P-450, связано со структурными отличиями в этих белках, которые присоединяют различные органические соединения и определяют местонахождение субстратов для реакций с активированным кислородом, образующимся в протетической группе гема. Поверхность гема со стороны, присоединяющей кислород, формирует основу присоединяющего участка для органических веществ. Обычно шесть топологических элементов структур P-450 формируют присоединяющий сайт для органических веществ. Gotoh O., который предсказал соответствующие участки ферментов семейства 2, основанные на структуре микробного фермента P-450 cam, используя параллельность последовательностей, назвал их субстрат-распознающими сайтами (Substrate recognition sites – SRS). Сегменты последовательностей семейства 2 у млекопитающих, окружающие участки, которые сходны с субстрат-контактирующими участками P-450 cam, были идентифицированы, как потенциальные SRS.

Изучение мутагенеза в семействе 2 ферментов позволило идентифицировать ключевые остатки, которые придают каталитическую активность или районспецифичность гидроксирования от одного фермента к другому. Эти участки находятся, в основном, внутри SRS, описанных O.Gotoh. Замена аминокислот в SRS-участке ферментов семейства 2, вероятно, отвечает за отличия в специфичности к субстрату и каталитических свойствах, которые часто проявляют родственные P-450. У более отдаленных родственных ферментов P-450 трехмерная топология SRS-участка варьирует, что создает более выраженные изменения в субстрат-связывающей полости разных P-450.

Множественность, которая очевидна для P-450 ферментов, с высокой вероятностью отражает процесс дубликации гена и дивергенции.

Этот процесс значительно расширяет каталитическую емкость системы P-450 для метаболизма широкого круга структурно различных субстратов, включая недавно созданные человеком химикаты для промышленности, фармакологические препараты. Дивергенция удвоенных генов привела также к образованию псевдогенов, кодирующих дефектный аллель, и полиморфных аллелей, кодирующих ферменты с нарушенной метаболической активностью.

Врожденные генетические нарушения формируют разнообразие уровней ферментативной активности, которое реализуется на уровне популяций. По этим признакам можно выделить в крайних вариантах три группы людей: медленных, эффективных и быстрых метаболизаторов. Для медленных метаболизаторов характерна низкая активность ферментов, для быстрых – высокая активность. Кроме того, могут быть и другие варианты спектра ферментной активности с широким диапазоном колебаний, определяющие метаболизм ксенобиотиков. Распределение может быть гауссовским или полимодальным, включая группы индивидуумов, отличающихся от большинства в популяции различной степенью экспрессии ферментов, вплоть до ультрабыстрых метаболизаторов, которые не реагируют на стандартные дозы лекарственных средств из-за быстрой их деградации.

Меж- и внутрииндивидуальная вариабельность ферментов метаболизма лекарственных средств в значительной степени определяет различия в фармакокинетике и фармакодинамике и обуславливает следующие эффекты:

- 1) чрезмерное терапевтическое действие – при низкой активности фермента (медленные метаболизаторы);
- 2) увеличение терапевтической токсичности в результате отсутствия трансформации (медленные метаболизаторы);
- 3) снижение эффекта – при высокой активности ферментов (быстрые метаболизаторы);
- 4) появление токсичности от метаболических продуктов, образующихся на различных, отличающихся от главного, путях метаболизма.

Функциональные последствия дефектных аллелей явно прослеживаются у человека в локусе CYP2D, который кодирует один из P-450 ферментов (P-4502D6), распознаваемый аутоантителами, ассоциированными с аутоиммунным хроническим активным гепатитом. Дефектный

аллель CYP2D6 встречается с высокой частотой (до 10%) у белых людей. Люди белой расы часто имеют его сниженную активность, что приводит к нарушению выведения из организма многих лекарственных веществ. Нарушение метаболизма лекарств может приводить к неожиданным побочным токсическим эффектам. Полиморфизм, приводящий к фенотипам слабых метаболизаторов, был выявлен для ряда P-450 человека. Сниженная способность к выведению лекарств особенно опасна в случаях небольшой разницы между терапевтической и токсической дозами.

Большой объем информации об изоформах цитохрома P-450 лег в основу построения филогенетического дерева эволюции этих белков. Известно, что функционально те же самые ферменты из филогенетически удаленных видов сохраняют общие элементы структуры, но могут иметь существенно различающиеся последовательности. Однако важным для таких белков является то, что они не имеют изменений аминокислотной последовательности в области активного центра. Вероятно любая перестройка на этом участке либо изменяет его стерическое соответствие и способность связывать субстрат, либо приводит к утрате той группы, которая принимает участие в каталитическом процессе. Следовательно, передачу признаков с модификацией можно легко оценить по дивергенции аминокислотной последовательности гомологичных белков, т.е. на основе вычисленного количества мутаций в кодонах.

Предложено несколько схем, определяющих родство отдельных семейств цитохромов P-450. В наиболее распространенной и общепризнанной схеме основные семейства или отдельные изоформы разбиты на восемь групп (I-VIII), которые последовательно связаны друг с другом. Основаны они на гомологиях в полипептидных цепях.

I-я группа (5 генов) – гемопротейны (четыре), присутствующие у позвоночных животных, а CYP18 – у насекомых.

II-я группа – кластер генов (13), встречающихся у растений.

III-я группа (6 генов) – характерна для беспозвоночных животных.

IV-я группа (5 генов) – цитохромы P-450, катализирующие окисление жирных кислот в организме прокариот и эукариот.

V-я группа (7 генов) – кодируют митохондриальные цитохромы P-450, в большей части, обеспечивающие окисление стероидов.

VI-я группа (4 гена) – относятся к растениям.

VII-я группа (6 генов) – находятся у грибов.

VIII-я группа (7 генов) – объединяет цитохромы Р-450, находящиеся в различных таксономических группах.

При этом следует отметить, что ген ароматазы млекопитающих CYP19 гомологичен CYP86A1, выделенный из *Arabidopsis thaliana*. CYP51 (стероид 14-деметилаза) распространен среди животных, растений, грибов, дрожжей и является гомологичным гену CYP54, выделенного из *Neurospora*.

Все это указывает на то, что гены цитохрома Р-450 от бактерий до человека имеют общего предшественника. Принципиальные черты структуры и функций цитохрома Р-450 не претерпели существенных изменений за время дивергенции бактерий, растений и животных.

В связи с частым использованием в экспериментальной медицине в качестве подопытных крыс и мышей интерес представляет сопоставление их изоформ цитохрома Р-450 с таковыми у человека (таблица 7).

Только 3 изоформы семейства 1 (1A1, 1A2, 1B1) и одна изоформа семейства 2 (2E1) представлены ортологосными формами у человека и грызунов, т.е. эти изоформы есть у представителей трех видов. Однако и для них характерна видовая специфичность. Например, CYP1B1 человека эффективно катализирует О-диэтилированные этоксирезорфина. Аналогичная изоформа мышей абсолютно неактивна в этих реакциях. Отмечены также значительные различия между CYP1A2 человека, с одной стороны, мышинными и крысинными, с другой, по отношению к варфаринмонооксигеназной активности. Видовую специфичность ортологосных изоформ, очевидно, можно объяснить различием в их аминокислотном составе.

Указанные ферменты играют важную роль в метаболизме ксенобиотиков. Так, цитохром CYP1A1 окисляет плоские молекулы полициклических ароматических углеводородов в конформационных закрытых позициях. В результате таких реакций образуются ареновые окислы, которые недоступны для эпоксигидролаз, превращающих их в соответствующие трансдигидродиолы. Поэтому вероятно взаимодействие таких реакционноспособных метаболитов ковалентно связываться с белками и нуклеиновыми кислотами, что обуславливает их цитотоксическое, мутагенное и канцерогенное действие.

Таблица 7. Основные изоформы цитохрома P-450, катализирующие окисление ксенобиотиков в организме человека, крысы и мыши

P-450	Человек	Крыса	Мышь
1A	1(100), 2(100)	1 (79), 2 (75)	1 (80), 2 (73)
1B	1	1	1
2A	6,7,13	1,2,3	4,5,12
2B	6	1,2,3,12,15	9,10,13
2C	8,9,18,19	6,7,11,12,13,22,23,24	29
2D	6,18	1,2,3,4,5	9,10,11,12,13
2E	1(100)	1(80)	1(77)
2F	1	-	2
2G	-	1	-
2J	2	3	-
3A	4,5,7	1,2,9,18,23	11,13,16

Примечание: в скобках – процент аминокислотного подобия изоформ P-450, кодирующихся ортологосными генами.

Изоформа CYP1A2 отличается субстратной специфичностью, катализируя процессы N-гидроксилирования полиядерных ароматических аминов, которые в организме также образуют реакционноспособные метаболиты.

Изоформа CYP1B1 по субстратной специфичности в большой степени напоминает CYP1A1.

Цитохром CYP2E1 катализирует реакции окисления различных углеводородов – производных бензола, стирола, четыреххлористого углерода, хлороформа, дихлорметана, хлорвинила, этилкарбомата, акрилонитрила. В результате их метаболических превращений образуются токсические соединения.

Цитохром CYP2E1 является практически единственным ферментом, ответственным за образование в организме гепатотоксических метаболитов из ингаляционных анестетиков. С этой изоформой связаны также этанолюкисляющие свойства, так как этот фермент, наряду с алкогольдегидрогеназой, окисляет спирт до ацетальдегида.

3.4. Образование реактивных продуктов, опосредованное P-450

Некоторые из P-450 ферментов, представленных в таблице 8, распознаются аутоантителами, ассоциированными с аутоиммунным ответом, который индуцирован лекарственными средствами.

Аутоиммунный ответ развивается под воздействием специфических лекарств, которые являются субстратами для ферментов, распознаваемых антителами. Таковыми могут быть гипотензивные (дигид-

Таблица 8. P-450 ферменты человека, взаимодействующие с аутоантителами

P-450	Состояние
1A2	Идиопатический аутоиммунный гепатит Аутоиммунная полигландулярная болезнь Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дигидралазин) Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)
2A6	Аутоиммунная полигландулярная болезнь
2C9	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (тиениловая кислота)
2D6	Идиопатический аутоиммунный гепатит
2E1	Алкогольное поражение печени
3A7	Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (фенобарбитал, фенитоин, карбамазепин) Лекарственно-индуцированная гиперчувствительность (дисульфирам)
11A1	Аддисонова болезнь Аутоиммунная полигландулярная болезнь
17	Аддисонова болезнь Аутоиммунная полигландулярная болезнь
21	Аддисонова болезнь Аутоиммунная полигландулярная болезнь

ролазин, тиениловая кислота) и противосудорожные препараты (фенитоин, карбамазепин), барбитураты (фенобарбитал, дисульфирам, который используется для отвращения к употреблению алкоголя).

Тесная связь между распознаванием антигена P-450 и взаимодействием его как фермента с субстратом позволяет предположить о вероятности не очень сложных механизмов отношения между аутоиммунным ответом, лекарством и его метаболизмом, осуществляемым P-450. Реактивные метаболиты, которые образуются при P-450 катализе могут модифицировать белки. Последние становятся аутоантигенами, к которым формируются аутоантитела. При их взаимодействии возникает цитотоксическая реакция.

Пролонгированное химическое взаимодействие также может привести к изменениям, вызывающим аутоиммунный ответ. Например, алкогольное поражение печени (АПП) является частым проявлением хронической алкогольной зависимости. Это прогрессирующее заболевание характеризуется стеатозом, гепатитом, фиброзом и, в конце концов, циррозом. Развитие АПП также ассоциируется с аутоиммунными реакциями.

В отличие от других реакций гиперчувствительности, отмеченных выше, которые встречаются относительно редко, отсроченное появление этих аутоантител предполагает более опосредованную обусловленность повреждения тканей в результате постоянного воздействия. У больных с АПП выявляются циркулирующие антитела, которые реагируют с белковыми комплексами ацетальдегида и гидроксэтила. Оба радикала образуются в результате окисления этанола и их ковалентное присоединение к белку формирует неоантигены, которые инициируют иммунный ответ. Опосредованное CYP2E1 окисление этанола – важный источник этих радикалов и CYP2E1 является главным антигеном для аутоантител, выявленных у алкоголиков.

Прояснить роль этого фермента в образовании радикалов помогут CYP2E1-дефицитные мыши, которые являются удобной моделью для изучения иммунного ответа. Уровень экспрессии печеночных P-450 определяется воздействием этанола. Предполагается, что повышение ферментативной активности может способствовать прогрессированию АПП. Повышенная активность CYP2E1, возникающая под действием некоторых других химических веществ (включая галогеновые анестетики), активируемых этим ферментом, может также повышать риск развития АПП.

Электрофильные продукты, образованные с помощью P-450, могут ковалентно видоизменять клеточные макромолекулы. Предполагается,

что этот процесс лежит в основе канцерогенности многих химикатов, которые сами инертны.

Цитохромы Р-450 могут катализировать начальные этапы как канцерогенной активации, так и детоксикации. Например, 2-ацетиламинофлуоринон у кролика метаболизируется множеством Р-450 в гидроксильированные продукты циклических систем. Они легко выводятся и не считаются канцерогенными. С другой стороны, СYP1A2 катализирует N-гидроксильирование 2-ацетиламинофлуоринона, который затем образует серные конъюгаты. В то же время N-ацетильная группа может формировать N-ацетоксисоединение. Гидроксилсульфат- и ацетоксиметаболиты являются клеточными нуклеофилами, взаимодействующими с нуклеиновыми кислотами. Возникающая в результате этого модификация клеточной ДНК, как предполагается, приводит к мутациям, которые, в свою очередь, ведут к неопластическому росту.

Относительный баланс между процессами детоксикации, катализируемыми одними Р-450 ферментами, с одной стороны, и процессами активации, катализируемыми другими Р-450 ферментами, с другой стороны, вносит определенный вклад в риск канцерогенеза. Этот баланс зависит от типов тканей, клеток, диеты, возраста, что связано с высокой дифференциацией экспрессии различных членов системы Р-450. Баланс может быть нарушен из-за индукции специфических Р-450 в результате воздействия лекарств и химических веществ окружающей среды.

Определение фенотипа активности фермента позволяет предположить несколько ответов на применяемые лекарственные средства:

1) Токсичность лекарственного средства вызывается его исходной формой; элиминация происходит исключительно путем дезактивации полиморфным ферментом; дополнительных путей метаболизма не существует. По такому варианту могут накапливаться продукты метаболизма у медленных метаболизаторов и вызывать токсичность как, например, изониазидная нейропатия, индуцированная пестицидами болезнь Паркинсона и др.

2) При наличии нескольких возможных путей метаболизма возможно смещение на альтернативный, дополнительный путь с образованием реакционноспособного промежуточного продукта токсичности. Веро-

ятность появления такого эффекта возможна у медленных метаболизаторов. Примером может служить изониазидная гепатотоксичность.

3) Образование токсичных метаболитов провоцируется реактивным метаболитом под действием полиморфного фермента. У быстрых метаболизаторов по сравнению с медленными возникает более высокий риск развития интоксикации или химического канцерогенеза.

3.5. Индукция P-450 экзогенными химическими веществами

Биосинтез различных изоформ цитохрома P-450 находится под генетическим контролем. Одни из них могут быть конститутивные, т.е. образуются независимо от того, в каких условиях находится клетка, другие – индуцибельные, часто синтезирующиеся в следовых количествах и достигающие необходимого уровня при наличии эндогенных или экзогенных субстратов. Для некоторых изоформ цитохрома P-450 наблюдается явление импринтинга. Оно заключается в том, что после введения в неонатальном периоде индуктора (фенобарбитала) соответствующие значения гемопротеида в печени животных сохраняются и при достижении половой зрелости. В этом случае происходит необратимая индукция. Для некоторых конститутивных форм ферментов также наблюдается явление индукции. Транскрипционная активация отдельных генов начинается на различных стадиях развития организмов и зависит от вида животных, пола, типа тканей. Для некоторых генов обнаружен промотор, содержащий как отрицательные, так и положительные регулирующие элементы. Это может быть специфический белок, который в фосфорилированной форме действует как положительный элемент промотора, а в дефосфорилированной – как отрицательный. Различные гормоны (половые, тиреоидные гормоны, глюкокортикоиды, гормон роста) в значительной мере модулируют экспрессию генов.

Большое количество чужеродных химических веществ может избирательно увеличивать относительное содержание специфических P-450. Предполагается, что принципиальный механизм индукции – увеличение транскрипции гена (таблица 9).

Это было доказано экспериментальными исследованиями внутриядерных процессов в клетке путем изучения индукции CYP2B ферментов фенобарбиталом, ферментов CYP1A2; CYP1A3; CYP1A7;

CYP1A8 – диоксином, ферментов CYP3A – дексаметазоном и рифампицином, ферментов CYP4A клофибратом. Наоборот, индукция P-450 фер-

Таблица 9. Опосредованная рецепторами регуляция экспрессии гена P-450

P-450 ген	Рецептор	Действие	Лиганды
CYP1A1	Ah-рецептор	Индукция метаболизма полициклического ароматического углеводорода	Полициклический ароматический углеводород
CYP4A#	Активированный рецептор α -пролиферации пероксисом	Индукция ω -гидроксилирования жирных кислот	Жирные кислоты, DHEA
CYP2B#	Активированный конститутивный рецептор	Индукция лекарственного метаболизма	Фенобарбитал
CYP3A#	Прегнан X-рецептор	Индукция лекарственного метаболизма и метаболизма стероидов	Рифампицин, стероиды
CYP26	Рецептор ретиноевой кислоты	Индукция распада ретиноевой кислоты	Ретиноевая кислота
CYP27B	Рецептор витамина D3	Подавление продукции гормонов	1 α , 25-дигидрокси-витамин D3
CYP24	Рецептор витамина D3	Активация распада гормонов	1 α , 25-дигидрокси-витамин D3
CYP7	X-рецептор печени	Активация синтеза желчных кислот	Оксистерин
CYP7	Фарнизен X-рецептор	Подавление синтеза желчных кислот	Желчные кислоты

ментов этанолом или гетероциклическими соединениями (пиразол или имидазол), похоже, отражает устойчивость фермента к превращениям,

так как накоплению белка не предшествует повышение концентрации мРНК. Относительное содержание СУР2Е повышается при диабетических состояниях. В этих случаях увеличивается относительное содержание мРНК, но нет доказательств увеличения транскрипции. Индукция СУР3А ферментов антибиотиками эритромицином и тролеандромицином отражает их участие в стабилизации белка, так как период полужизни СУР3А увеличивается этими лекарствами.

Изучение модифицирующего действия лекарственных средств на активность ферментов – важная проблема, имеющая не только научный, но и практический интерес.

Как уже отмечалось, каждый изофермент цитохрома P-450 может катализировать метаболизм не одного, а нескольких лекарственных соединений, подходящих ему своей структурой. Это способствует взаимодействию лекарств, одновременно поступающих в организм, например, циклоспорина и эритромицина. При одновременном введении в организм больного этих лекарств концентрация циклоспорина в крови повышается, что влечет за собой его большую токсичность. Последняя связана с конкурентным связыванием данных препаратов с цитохромом СУР3А в печени. Находящийся в эндоплазматической сети эритромицин угнетает метаболизм циклоспорина пропорционально его концентрации. Метаболизм циклоспорина восстанавливается при отмене эритромицина.

Взаимодействие лекарства может вызывать индукцию цитохрома P-450. Например, рифампицин индуцирует СУР3А, что является основой для повышенного метаболизма циклоспорина и преднизолона. Недостаточное действие контрацептивов у женщин, получающих рифампицин, также может быть связано с индукцией СУР3А.

Следует отметить, что число индуцирующих агентов варьирует в зависимости от вида животных организмов. Так, например, антибиотик рифампицин индуцирует ферменты СУР3А у человека и кролика, но не у крысы.

Член суперсемейства ядерных гормональных рецепторов – прегнан X-рецептор обычно опосредует активацию транскрипции СУР3А гена в ответ на ксенобиотики. Прегнан X-рецептор человека и кролика активируется рифампицином, в то время как у крысы – нет. В общем, ядерные рецепторы присоединяются непосредственно к отвечающим элемен-

там в гене-мишени, такие, как гетеродимер с ретиноидным X-рецептором. Лиганд изменяет конформацию рецептора, ведущую к привлечению протеина коактиватора. Этот полипротеиновый комплекс стимулирует транскрипцию гена-мишени.

Индукция ферментов CYP2B фенобарбиталом также опосредована ядерным гормональным рецептором – конститутивным активированным рецептором. Однако, фенобарбитал может изменять способность рецептора активировать ген-мишень. Транскрипционная активация CYP1A ферментов полициклическими ароматическими углеводородами и диоксином также отражает действие цитозольных рецепторов.

Хроническое действие индукторов может значительно увеличивать содержание P-450 в эндоплазматической сети и ее перегрузке. Возможно, что эти изменения нарушают нормальный протеолитический процессинг P-450 и потенциально ведут к презентации клеткам иммунной системы новых пептидных молекул, что инициирует аутоиммунный ответ.

Накопление подобных данных о взаимодействии генов риска и их взаимодействие с лекарственными средствами позволит в перспективе предотвращать как кратковременные проявления лекарственной токсичности, так и скрыто формирующийся канцерогенез.

Глава 4.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ФЕРМЕНТОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО МЕТАБОЛИЗМА

Различные ксенобиотики, в том числе лекарственные вещества, которые попадают в организм через желудочно-кишечный тракт, легкие, кожу, при введении в кровь, подвергаются метаболизму специальными ферментными системами. Большинство лекарств – малые липофильные молекулы. При проникновении в организм они метаболизируются с образованием более полярных продуктов. Это необходимо для удаления их с мочой и желчью. Процесс превращения катализируется, в основном, ферментами печени и состоит из двух последовательных этапов. Фаза I – окисление лекарственного препарата цитохром Р-450-зависимыми монооксигеназами, а также другими ферментами, например, алкогольдегидрогеназой, флавиномоноксигеназой. Ферменты цитохрома Р-450, участвуя в окислении, играют двойную роль в метаболизме ксенобиотиков. С одной стороны, они инактивируют лекарственные препараты и чужеродные химические вещества, подготавливая их к элиминации из организма. С другой – активируют промутагены и проканцерогены, превращая их в электрофильные интермедианты, повреждающие ДНК. Таким образом они могут участвовать в процессах мутагенеза и канцерогенеза. Фаза II – конъюгация, которая включает сульфатирование и ацетилирование, а затем происходит глюкуронирование. В катализ этих реакций вовлекается ряд ферментов, включая глутатион-S-трансферазу, О- и N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазу, сульфотрансферазы, которые завершают цикл детоксикации (рис. 2).

Практически все ферменты, участвующие в метаболизме лекарственных препаратов, сосредоточены преимущественно в печени.



Рис. 2. Роль ферментов фазы I и фазы II в биотрансформации ксенобиотиков

Однако они представлены также изоэнзимными формами в большинстве других тканей и органов (кишечнике, легких, почках, крови и коже). Большой спектр (поступающих извне) химических веществ, которые они метаболизируют, объясняет наличие мультигенных семейств ферментов, каждый из которых проявляет уникальную субстрат-специфичность. От скорости метаболизма лекарственных препаратов ферментными системами зависит длительность их нахождения в кровотоке и конечный терапевтический эффект.

Лекарственный полиморфизм объясняется мутациями в генах, отвечающих за синтез ферментов метаболизма ксенобиотиков. Мутации могут приводить к усилению или ослаблению и даже отсутствию ферментативной активности. Генетическое разнообразие в экспрессии генов, которые контролируют ферменты I и II фаз, — один из основных факторов в восприимчивости к развитию токсичности или канцерогенности ксенобиотика, а также развития злокачественных опухолей.

Генетический полиморфизм обмена ксенобиотиков определяет разделение людей в популяциях на группы, различающиеся по своей спо-

способности метаболизировать лекарственные средства: от недостаточных до сверхбыстрых метаболизаторов.

4.1. Ферменты цитохрома P-450

Достижения в области молекулярной биологии и геномики облегчили биохимическую характеристику определенных ферментов P-450. Это, в свою очередь, открыло много удивительного о системе, которая, как предполагалось, метаболизирует лекарства преимущественно в печени.

Оказалось, что цитохромы P-450 действуют на многие эндогенные субстраты, проводя окислительные, перекисные и восстановительные изменения во многих молекулах различных химических субстратов. К ним сегодня относят насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, эйкозаноиды, стеролы и стероиды, желчные кислоты, производные витамина B, ретиноиды, уropорфириногены.

Наряду с этим, многие цитохромы P-450 могут метаболизировать различные экзогенные соединения, включая лекарства, химикаты и загрязняющие внешнюю среду вещества, естественные растительные продукты. Метаболизм чужеродных химических соединений часто приводит к их успешной детоксикации, но, к сожалению, действие ферментов P-450 может также вызывать образование токсических метаболитов, повышающих риск возникновения рака, врожденных аномалий и других токсических эффектов.

Экспрессия многих ферментов P-450 часто индуцируется накоплением субстрата. Примером может служить увеличение концентрации фермента печени человека CYP3A при приеме таких лекарств, как рифампицин, назначаемый при бактериальных инфекциях. Такая индукция не только увеличивает метаболизм рифампицина, но и ведет к увеличению клиренса других лекарств-субстратов CYP3A. Так как рифампицин индуцирует также некоторые ферменты CYP2C, то этот процесс ведет к быстрому клиренсу субстратов CYP2C. Способность субстрата одного P-450 влиять на концентрацию другого субстрата таким путем является основой так называемого межлекарственного взаимодействия, которое может существенно осложнять лечение.

Клонирование генов, биохимические и иммунохимические зонды, полученные с кДНК, позволили по-новому рассматривать биологическую и клиническую роль отдельных цитохромов P-450.

По данным различных групп исследователей в области изучения генома человека, у него есть более 50 генов, кодирующих ферменты P-450, которые объединяются в 17 семейств. Обобщенные функции семейств и число подсемейств представлены в таблице 10. Семейства 11, 24, 27 кодируют митохондриальные ферменты P-450, а остальные семейства – микросомальные P-450. Кроме того, было идентифицировано 14 псевдогенов, которые не кодируют функциональных белков.

Полиморфные формы P-450 были определены в подсемействах 1A, 1B, 2A, 2C, 2D, 2E и 3A. Обычная замена аминокислоты может существенно влиять на функцию фермента и тем самым на способность индивидуума метаболизировать определенное лекарство. Полиморфизм определяется отличиями в последовательности нуклеотидов, которые наблюдаются в отношении обсуждаемых генов по крайней мере у 1 % популяции. Описаны также и редкие мутации.

4.1.1. Цитохромы P-450 в метаболизме эндогенных веществ

Семейства цитохромов P-450 человека включает в себя четыре группы, из которых 1-3-я (CYP1, CYP2, CYP3) метаболизируют чужеродные химические вещества (ксенобиотики), включающие лекарственные средства, вторичные метаболиты растений и грибов, поступающие с пищей, тысячи химических веществ, загрязняющих окружающую среду. В меньшей степени это касается четвертой группы (CYP4). Внутри каждого из этих семейств генов существует много аллельных вариантов, что и является причиной фармакогенетической гетерогенности между индивидуумами.

Исходная последовательность обычно кодирует эффективный метаболический фенотип. В то же время варианты аллели кодируют слабые метаболические фенотипы с низкой или нулевой активностью по отношению к определенным препаратам. В результате одной или более случайных дубликаций гена вариант генотипа может определять очень высокий ультраметаболический фенотип. Различные аллели генов, метаболизирующих лекарственные средства (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, CYP2A6, CYP2B6), являются причиной неудачного лечения, токсических эффектов лекарств и даже смерти. Наряду с этим, скорость детоксикации, иногда метаболической активации химикатов внешней среды может резко отличаться у

Таблица 10. Общая характеристика семейств генов P-450 человека

СУР	Выполняемая функция фермента	Количество	
		подсемейств	членов
1	Метаболизм ксенобиотиков	2	3
2	Метаболизм ксенобиотиков	9	14
3	Метаболизм ксенобиотиков и стероидов	1	4
4	ω - гидроксирование жирных кислот и лейкотриена	5	9
5	Тромбоксансинтетаза	1	1
7	Холестерин и стероид 7 β -гидроксирование	2	2
8	Синтез жирных кислот (12 β ОН) и простаглицина	2	2
11	Синтез стероидных гормонов (митохондриальные ферменты)	2	3
17	Синтез стероидных гормонов	1	1
19	Ароматаза (синтез эстрогена)	1	1
21	Синтез стероидных гормонов	1	1
24	1 β , 25-дигидроксивитамин D3 инактивация (митохондриальный)	1	1
26	Инактивация ретиноевой кислоты	1	1
27	Активация витамина D3 и синтез желчных кислот	2	2
39	24-гидроксихолестерин 7 β -гидроксилаза	1	1
46	Холестерин 24-гидроксилаза	1	1
51	Ланостерин 14 β -деметилаза	1	1

индивидуумов с разными СУР гаплотипами. Метаболическая активация наблюдается у ферментов СУР1А1, СУР1А2, СУР1В1, СУР2D6, СУР2Е1, СУР3А4, СУР3А5. Для этих ферментов эффективный метаболизм или высоко активный фенотип ассоциирован с увеличением риска определенного типа рака или токсического эффекта. Это явление может усиливаться одновременным наследованием других полиморфных систем метаболического пути определенного лекарственного средства или химического вещества.

Семейство генов CYP1. Экспрессия генов семейства CYP1 индуцируется арилуглеводородным рецептором — фактором транскрипции, который активируется присоединением полициклических ароматических углеводов (промышленные продукты сгорания, сигаретный дым, пищевые продукты, поджаренные на древесном угле). CYP1A1 и CYP1B1 экспрессируются в различных количествах в разных тканях и являются наиболее активными метаболиторами полициклических ароматических углеводов. CYP1A2 метаболизирует преимущественно ариламины и азотистые гетероциклы. CYP1A1 и, возможно, CYP1A2 и CYP1B1 метаболизируют пока не идентифицированные лиганды для арилуглеводородного рецептора. CYP1A1 инактивирует также простагландин G2. CYP1A2 и CYP1B1 гидроксилируют эстроген во втором и четвертом положении углерода соответственно. CYP1A2 окисляет также уропорфириноген и мелатонин. CYP1A2 метаболизирует 10-20 различных лекарственных средств. В то же время не похоже, чтобы CYP1A1 и CYP1B1 действовали преимущественно на лекарства. Не известны причины необычно высокой экспрессии CYP1B1 в некоторых типах солидных опухолей, но этот факт может иметь значение при назначении химиотерапии. Все ферменты CYP1 детоксицируют или активируют многие канцерогены внешней среды.

У мышей без *Cyp1a1*, *Cyp1a2* и *Cyp1b1* генов описаны отклонения в метаболизме лекарств и канцерогенов; однако такие животные жизнеспособны. Это предполагает, что кодируемые ферменты P-450 или избыточны, или не играют существенной роли в метаболизме эндогенных соединений. В то же время мутации гена CYP1B1 вызывает у человека первичную врожденную глаукому (буфтальм) (таблица 11, стр. 58). На основании этого полагают, что развитие передней камеры глаза при эмбриогенезе требует метаболизма важных эндогенных соединений CYP1B1. Тот факт, что CYP1B1 играет роль в биосинтезе и распаде ретиноевой кислоты, может объяснить причину первичной врожденной глаукомы.

Семейство генов CYP2. Это самое большое семейство у млекопитающих. Такие гены, как CYP2C8; CYP2C9; CYP2C18; CYP2C19 у человека метаболизируют более половины всех наиболее часто назначаемых лекарств, арахидоновую кислоту и некоторые стероиды. По данным биохимических исследований *in vitro*, CYP2D6 метаболизирует более, чем 75 лекарственных препаратов. Ферменты CYP2A6, CYP2A13,

CYP2B6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2 также участвуют в метаболизме некоторых лекарственных средств. Функции таких членов семейства, как CYP2A7, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1 до настоящего времени не изучены.

Обычно считают, что ферменты подсемейства CYP2C принимают участие в метаболизме лекарств, но индуцируемый β -нафтофлавоном фермент CYP2C участвует в синтезе 11-, 12- эпоксиэйкозатриеновой кислоты сосудистого эпителия. Этот, как и ряд других факторов, указывают на то, что большинство продуктов генов CYP у позвоночных вначале эволюционировали для обеспечения важных жизненных функций, а не для расщепления растительных метаболитов и других ксенобиотиков. Хотя подсемейства CYP2G и CYP2T кодируют функциональные гены у грызунов, у человека они представлены только псевдогенами. Мыши, не имеющие гена *Cyp2e1*, внешне кажутся нормальными, но очень устойчивы к токсическому эффекту бензена, что указывает на роль этого подсемейства в метаболизме ксенобиотиков.

Семейство генов CYP3. Семейство CYP3 включает 4 гена; CYP3A4 и CYP3A5 имеют наиболее выраженную экспрессию в печени и желудочно-кишечном тракте и метаболизируют более чем 120 часто назначаемых лекарств и эндогенные субстраты, такие как стероиды и желчные кислоты.

Клиническое значение имеет то, что метаболизм некоторых противогрибковых и иммуносупрессорных препаратов ферментами CYP3A4 и CYP3A5 может привести к снижению их уровня у больных с усиленным метаболизмом и избыточной их концентрацией у пациентов с замедленным метаболизмом в случаях, когда больные обеих групп получают прописываемые дозы препаратов.

Функция CYP3A43 еще не установлена. CYP3A7 экспрессируется в печени плода и эндометрии матки, но роль их в этих тканях неизвестна.

Для подсемейства CYP3A описан важный регуляторный путь контроля экспрессии этих генов в печени и пищеварительной трубке. Разнообразные химические соединения могут индуцировать гены этого подсемейства и выраженность индукции варьирует между видами. Молекулярные основы индукции были прослежены до лиганд-активируемого фактора транскрипции, который известен как прегнан X-рецептор (PXR) (прегнан-активируемый рецептор или стероид- и ксенобиотик-рецептор). Этот белок – член суперсемейства ядерных гормональных

рецепторов, который присоединяет небольшие молекулы и активирует транскрипцию генов CYP3A, содержащих определенный ДНК мотив или соответствующую последовательность в их регуляторном районе. Различия между видами в индукции ферментов CYP3A определенными лекарствами показывают способность соединений взаимодействовать с лиганд-присоединяющими доменами PXR.

Наличие таких регуляторных систем и их фармакологические свойства объясняют способность определенных лекарственных средств длительно защищать организм от токсического эффекта других соединений. Так, производные прегненолона могут снижать гепатотоксичность индометацина и дигитоксина. Соединения, родственные прегненолону, являются лигандами для PXR и индуцируют синтез членов подсемейства CYP3A, которые, в свою очередь, инактивируют вещества, вызвавшие поражение печени. Возможность в будущем предвидеть взаимодействие между лекарствами и создавать новые лекарственные средства может быть облегчена скринингом с использованием PXR и их генов-мишеней CYP3A.

Некоторые из CYP3A и CYP2B генов индуцируются фенобарбиталом и иными лекарствами с помощью других членов суперсемейства ядерных гормональных рецепторов – конститутивными андро-становыми рецепторами (CAR), а также PXR. Хотя элементы ДНК мотивов, реагирующие с CAR и PXR в регуляторных участках этих генов различны, установлено, что CAR могут активировать CYP3A гены через PXR-реагирующие элементы и PXR могут регулировать CYP2B гены через CAR и фенобарбитал-реагирующие элементы. Предполагается, что этот перекрест между рецепторами факторов транскрипции защищает от вредного воздействия растительных метаболитов или лекарств и в то же время расширяет предрасположенность к межлекарственному взаимодействию.

Семейство генов CYP4. Семейство CYP4 включает в себя 12 генов. CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 метаболизируют некоторые лекарства, но основная их роль состоит в метаболизме жирных кислот, арахидоновой кислоты, лейкотриенов, простагландинов, эпоксиэйкозатриеновой кислоты (EETs), гидроксиейкозатетраеновой кислоты (HETEс) и гидроксипероксиэйкозатетраеновой кислоты (HPETEс). Есть данные об участии CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22 в метаболизме арахидоновой кислоты и жирных кислот. Функция CYP4A20, CYP4A22, CYP4V2, CYP4X1 не установлена. Активированные рецеп-

торы пролиферации пероксисом (PPAR α , β , γ и δ классов), которые также являются членами суперсемейства ядерных рецепторов, играют роль в регуляции генов CYP4A и CYP4B.

Некоторые ферменты CYP4A и CYP4B экспрессируются в дистальных отделах извитых канальцев почек и дефект некоторых генов CYP4 вызывает нарушение обмена солей, водного баланса, артериального давления. Большая часть экспериментов по изучению артериального давления было проведено на крысах, однако установлено также, что CYP4A11 и CYP4F2 почек человека превращает арахидоновую кислоту в 20-НЕТЕс.

Ферменты P-450 в обмене арахидоновой кислоты и эйкозаноидов.

Вероятно, все цитохромы P-450 выполняют одну или несколько эндогенных функций, кроме метаболизма внешних химических веществ и растительных соединений, из которых получают почти все лекарственные вещества. Такой двойственной функцией обладают ферменты цитохромов P-450, метаболизирующие арахидоновую кислоту, которая превращается в более, чем 100 метаболитов эйкозаноидов (рис. 3). Установлено участие 14 цитохромов семейств CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 в эпексидации, восстановлении и окислении этих молекул. Про-

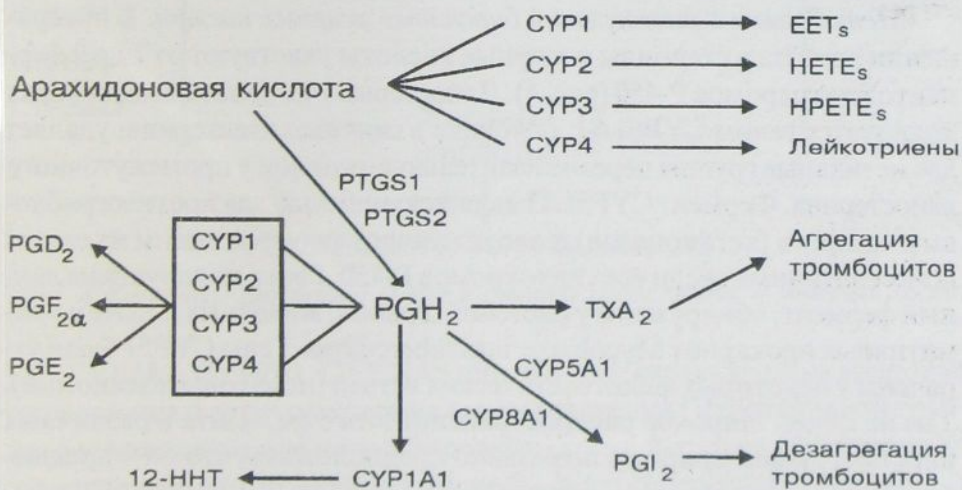


Рис.3. Ферменты цитохрома P-450, участвующие в каскаде арахидоновой кислоты. PTGS1 — простагландин G/H-синтетаза-1, PTGS2 — простагландин G/H-синтетаза-2, PTH₂ — простагландин H₂, PTE₂ — простагландин E₂, 12-ННТ — 12(S)-12-гидрокси-5,8,10-гептадекатриеновая кислота, TXA₂ — тромбосан A₂, PGI₂ — простаглицин

стагландины D2, F2 α , E2 и EETs, HETE_s, HPETE_s принимают участие во многих жизненно важных процессах (сужение сосудов почек, сужение и расширение бронхов, отек, расширение сосудов кишечника, сокращение гладких мышц, аллергическая реакция, хемотаксис, угнетение агрегации тромбоцитов, резорбция костной ткани, лихорадка, модуляция ионного транспорта, усиление секреции пептидов и др.). Пока не описаны болезни, вызванные мутацией ферментов P-450, участвующих в метаболизме арахидоновой кислоты, но большая вероятность их существования.

Гены тромбоксанА₂-синтазы (CYP5A1) и простагландинсинтазы (CYP8A1) кодируют ферменты P-450, роль которых в свертывании крови прямо противоположная. ТромбоксанА₂ – продукт фермента CYP5A1, является метаболитом жирных кислот. Он уменьшает роль циклической АМФ в тромбоцитах и тем самым стимулирует их способность к агрегации. CYP8A1, наоборот, формирует простагландин J₂ (простагландин), который повышает концентрацию АМФ внутри клетки и угнетает агрегацию тромбоцитов. Предполагается, что мутации генов CYP5A1 или CYP8A1 ведут к повышенной свертываемости и патологическим процессам, таким как ИБС и легочная гипертензия.

Метаболизм холестерина и биосинтез жирных кислот. В превращении ацетата в стероиды и жирные кислоты участвуют от 7 до 9 ферментов цитохромов P-450 (рис. 4). Ланостерин 14 α -деметилаза, которая кодируется геном CYP51A1, основная в синтезе холестерина, удаляет две метильные группы через окислительные реакции у промежуточного ланостерина. Фермент CYP51A1 является мишенью для противогрибковых лекарств (кетоконазол) и эволюционно является одним из самых консервативных среди всех цитохромов P-450. Гены, кодирующие данный фермент, обнаружены у растений, грибов, животных и даже у примитивных прокариот *Mycobacterium tuberculosis*. Гены CYP51 были утрачены у некоторых филогенетических ветвей (нематоды, насекомые). Тем не менее, широкое распространение этого фермента в различных царствах живой природы позволило предположить, что он – предшественник всех цитохромов эукариот.

Синтез желчных кислот из холестерина – основной катаболический путь удаления холестерина у млекопитающих. Гидроксилирование циклических структур холестерина, затем окисление и укорочение восьмьюглеродной боковой цепи, приводит к образованию водорастворимых

желчных кислот с детергентным действием. Метаболизм холестерина катализируется как минимум семью различными ферментами (CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39, CYP46).

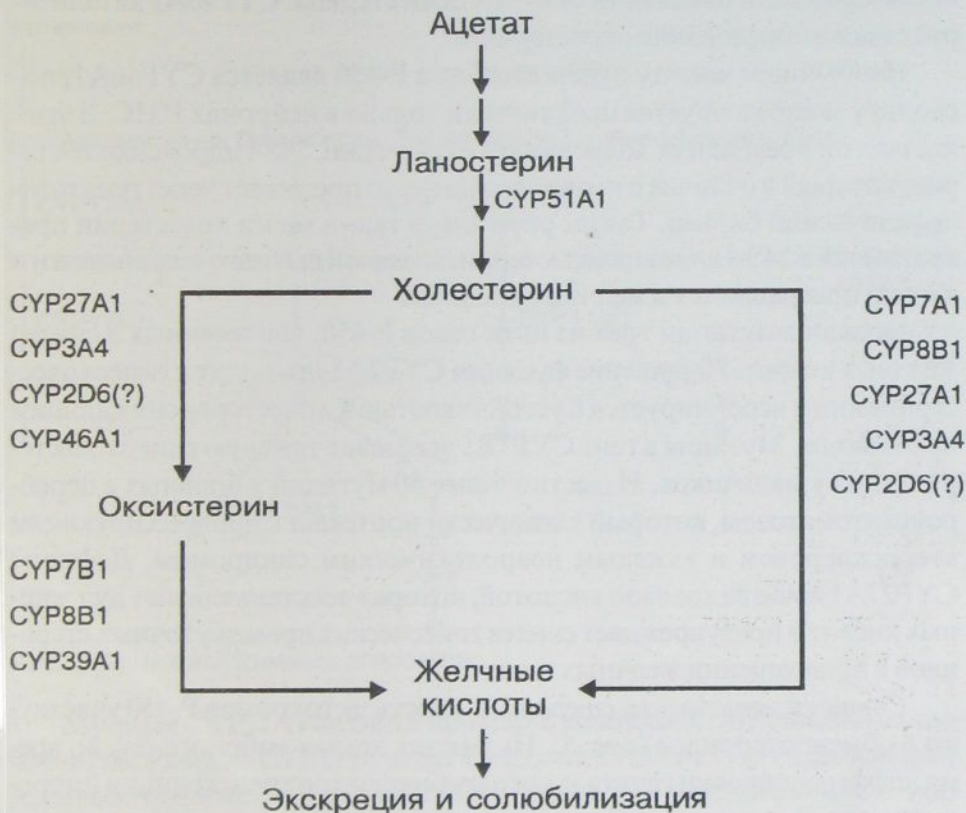


Рис. 4 Ферменты цитохрома P-450 в синтезе холестерина и желчных кислот

CYP7A1, CYP7B1, CYP39A1 инициируют синтез жирных кислот из холестерина и оксистерина путем внедрения гидроксильной группы в α -положение седьмого углеродного атома В-кольца. Фарнезоид X-рецептор (рецептор желчных кислот) – член суперсемейства ядерных рецепторов гормонов, участвует в регуляции гена CYP7A1. Мыши, лишённые Fx1 гена, имеют повышенную концентрацию желчных кислот, холестерина, триглицеридов и проатерогенных сывороточных липоп-

протеинов. СYP8B1 является стероид 12 α -гидроксилазой, которая необходима для синтеза первичной желчной кислоты, холата. СYP27A1 является ферментом стероид 27-/26-гидроксилазой с участием в синтезе оккостероидов и окислении боковой цепи стерина. СYP46A1 катализирует также образование оккостероинов.

Необычным членом суперсемейства P-450 является СYP46A1, поскольку экспрессируется практически только в нейронах ЦНС. В этих клетках он превращает холестерин в оккостерин, 24S-гидроксихолестерин, который в отличие от холестерина легко проникает через гематоэнцефалический барьер. Таким образом, в ткани мозга холестерин превращается в 24S-гидроксихолестерин, который выходит в кровоток и в печени превращается в желчные кислоты.

Описаны мутации трех из пяти генов P-450, вовлеченных в синтез желчных кислот. Нарушение функции СYP7A1 приводит к гиперхолестеринемии и ассоциируется с устойчивостью к холестеринснижающим препаратам. Мутация в гене СYP7B1 вызывает тяжелую гиперхолестеринемия у мальчиков. Известно более 50 мутаций у больных с цереброксантоматозом, который клинически протекает с прогрессирующим атеросклерозом и тяжелым неврологическим синдромом. Дефицит СYP27A1 лечится холевой кислотой, которая восстанавливает пул жирных кислот и предупреждает синтез токсических промежуточных стероидов в превращении желчных кислот.

Синтез и метаболизм стероидов. Шесть цитохромов P-450 участвуют в обмене стероидов (рис. 5). На ранних этапах эмбриогенеза во время дифференцировки генитального гребня фактор транскрипции (стероидфактор-1) — член семейства ядерных рецепторов гормонов, является главным в активации генов P-450, участвующих в синтезе стероидных гормонов, в том числе относящихся к семействам СYP11, СYP17, СYP19, СYP21. Митохондриальными ферментами являются СYP11A1, СYP11B1, СYP11B2.

СYP17A1 необходим для синтеза кортизола, тестостерона и эстрогена. СYP19A1 превращает андрогенные предшественники в эстрогены. Оба они локализируются в эндоплазматической сети.

Фермент СYP17A1 выполняет двойную роль, катализируя 17 α -гидроксилирование стероидных субстратов, расщепление и окисление их боковых цепей. Мутации гена СYP17A1, нарушающие обе

функции фермента, сопровождаются недостаточной продукцией глюкокортикоидов и половых стероидов. Нарушение окисления и укорочения боковых цепей ведет к дефициту только половых стероидов.

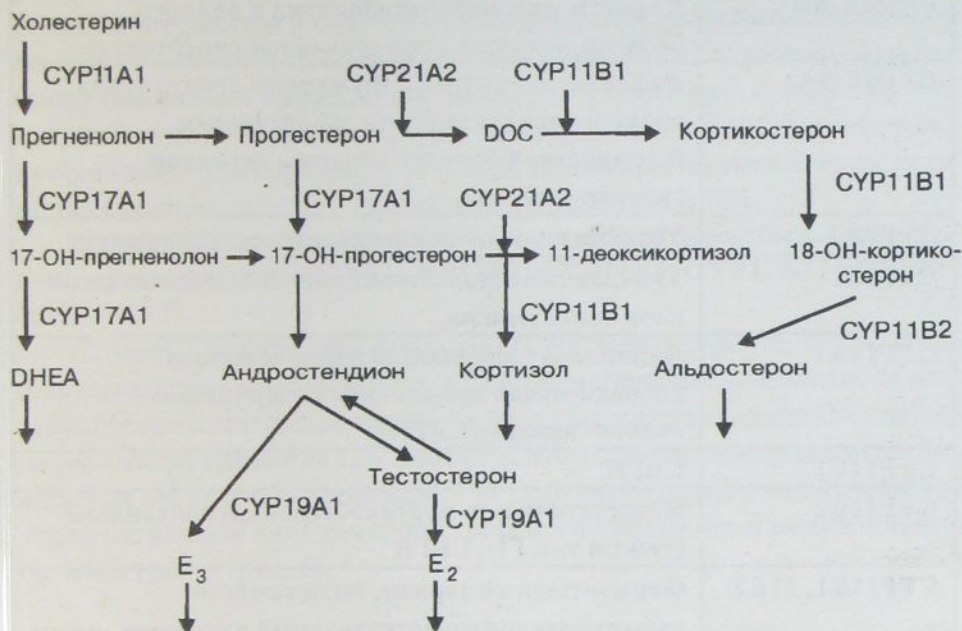


Рис. 5 Пути метаболизма стероидов

Мутация **CYP11A1** является причиной липоидной гиперплазии надпочечников, а дефект **CYP11B1** ведет к недостаточности 11-β-гидроксилазы. Аллельспецифическая мутация **CYP11B2** приводит к недостаточности кортикостерон-метилоксидазы как типа I, так и типа II. Рекомбинация между двумя тесно сцепленными генами **CYP11B1** и **CYP11B2** в 8-й хромосоме, которые кодируют функциональные химерные ферменты, обуславливает поддающийся лечению глюкокортикоидами альдостеронизм (таблица 11).

CYP19A1 участвует в синтезе эстрогенов путем ароматизации А кольца андрогенного стероидного субстрата. Мутации с потерей функции в **CYP19A1** вызывают избыток андрогенов, что ведет к несоответствующей вирилизации у женщин и гипервирилизации у мужчин. У таких больных наблюдаются нарушения в скелете, указывающие на важную роль эстрогенов в образовании костной ткани. Редкая мутация вызывает гинекомастию у мужчин.

Таблица 11. Болезни, ассоциированные с мутациями в генах CYP

CYP-гены	Болезни
CYP1B1	Первичная врожденная глаукома (буфтальм)
CYP4A, 4B	Дефекты солевого метаболизма и водного баланса, ведущие к артериальной гипертензии
CYP51, 8A1	Дефекты, ведущие к нарушениям свертывания крови и воспалительным заболеваниям, ишемической болезни сердца и легочной гипертензии
CYP7A1	Устойчивая к лечению гиперхолестеринемия
CYP7B1	Тяжелая гиперхолестеринемия и неонатальное поражение печени
CYP11A1	Липоидная гиперплазия надпочечников; спорадическая врожденная гиперплазия надпочечников (СВГН)
CYP11B1	СВГН
CYP11B2	Недостаточность кортикостеронметилоксидазы (тип I и тип II); СВГН
CYP11B1, 11B2	Ферментный химеризм, вызывающий глюкокортикоидчувствительный альдостеронизм; СВГН
CYP17A1	Синдром избыточности минералокортикоидов, дефициты глюкокортикоидов и половых гормонов, сочетающийся с повышенным риском развития рака и гипертрофии простаты; СВГН
CYP19A1	<i>Мутация с потерей функции:</i> вирилизация женщин, гипервирилизация мужчин, СВГН. <i>Мутация с приобретением функции:</i> гинекомастия молодых мужчин
CYP21A2	Более чем 90% всех врожденных гиперплазий надпочечников
CYP24A1	Гипервитаминоз D
CYP27A1	Сухожильно-мозговой ксантоматоз
CYP27B1	Витамин В-зависимый рахит (тип I)

CYP21A1 гидроксилирует стероидный предшественник в углероде-21, что является определенным этапом в биосинтезе глюкокортикоидов и минералокортикоидов. Мутации, нарушающие 21-гидроксилирование более, чем в 90 % случаев, являются причиной врожденной гиперплазии надпочечников – довольно частой наследственной болезни. Различают три варианта заболевания: соль-теряющая форма с маскулинизацией у женщин с угрозой для жизни очень низкого уровня натрия и высокого уровня калия и гиповолемией (классическая форма); простая вирильная врожденная гиперплазия коры надпочечников; нетипичная форма с легким нарушением активности CYP21.

Врожденная гиперплазия коры надпочечников может быть также вызвана мутацией в CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2, CYP17A1, CYP19A1 (таблица 11).

Синтез и метаболизм витамина D. Четыре фермента, три из которых находятся в митохондриях, а один в эндоплазматической сети, участвуют в синтезе и расщеплении $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина D_3 – лиганда рецептора витамина D_3 . Этот рецептор относится к суперсемейству ядерных рецепторов гормонов. Система рецептор-лиганд отвечает за усиление выхода кальция из костей и поглощение его в желудочно-кишечном тракте (рис. 6).

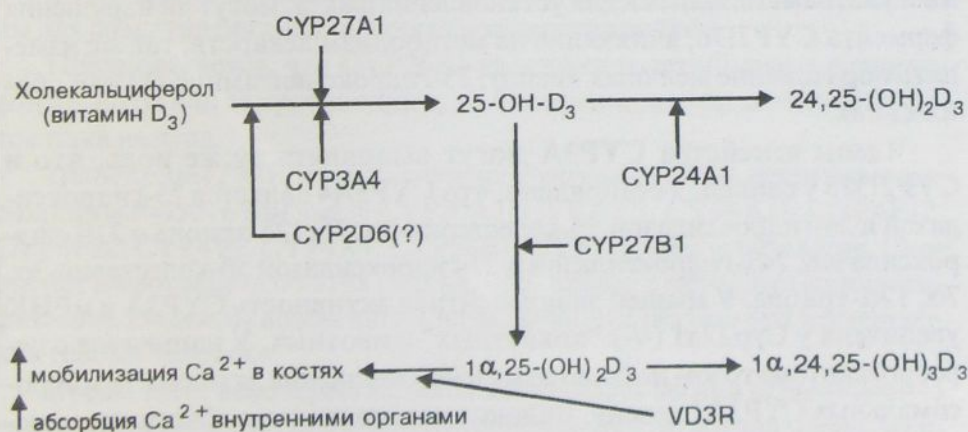


Рис. 6. Участие ферментов цитохрома P-450 в метаболизме витамина D_3

CYP27A1 человека (митохондриальный) и CYP2B25 свиньи (микросомальный) катализируют образование 25-гидроксивитамина D₃ из предшественника витамина D₃ холекальциферола. Оба фермента экспрессируются в печени, где CYP27A1 также играет важную роль в синтезе желчных кислот. У человека мутации, выключающие активность CYP27A1, приводят к фенотипической недостаточности желчных кислот (цереброксантоматозу). Однако они не оказывают влияния на метаболизм витамина D₃.

У мышей и крыс было описано пять генов CYP2D, известно их количество у свиней и один у человека (CYP2D6). Ядерный рецептор фактора транскрипции (печеночный ядерный фактор-4 α - HNF-4 α) контролирует экспрессию гена CYP2D6 у человека. Описано многократное повышение уровня сывороточных желчных кислот у мышей, лишенных гена Hnf4 α , что ассоциируется с потерей активности фермента CYP2D. Возможно это связано со взаимоотношением между генами CYP27A1 и CYP2D6, а именно, утрата экспрессии гена CYP2D6 может нарушить это равновесие и ведет к сверхэкспрессии CYP27A1 и увеличению образования желчных кислот. Потеря активности CYP27A1, наоборот, ведет к недостатку желчных кислот. Предполагается, что изучение концентрации метаболитов желчных кислот и 25-гидроксивитамина D₃ может быть информативным при сравнении пациентов с фенотипами (CYP2D6) эффективного метаболизма, слабого метаболизма и ультраметаболизма для установления факта, могут ли нарушения фермента CYP2D6, влияющие на метаболизм лекарств, так же изменять образование желчных кислот, 25-гидроксивитамина D₃ или обоих из них.

Члены семейства CYP3A могут выполнять ту же роль, что и CYP2D25 у свиней. Установлено, что CYP3A4 является 25-гидроксилазой и 26-гидроксилазой 5 β -холестерин-3 α , 7 δ , 12 δ -ариола и 23R-гидроксилазой, 24S-гидроксилазой и 27-гидроксилазой 5 β -холестерин-3 α , 7 α , 12 α -триола. У мышей эквивалентная активность CYP3A и мРНК увеличена у Cyp27a1 (-/-) "нокаутных" животных. У пациентов с цереброксантоматозом не было отмечено увеличения активности микросомальных CYP3A1 печени. Видовые различия могут объяснить, почему Cyp27a1 (-/-) "нокаутных" мышей не имеют симптомов цереброксантоматоза.

Фермент CYP27B1 катализирует 1α -гидроксилирование 25-гидрокси-витамина D, для активного лиганда витамина D₃-рецептора. Мутация CYP27B1, кодирующего этот митохондриальный фермент, лежит в основе витамин D-зависимого рахита типа I. 24-гидроксилирование витамина D₃ и его промежуточных продуктов, которое катализируется митохондриальными ферментами CYP24A1, предупреждает лиганд-зависимое присоединение к рецептору и представляет главный катаболический путь витамина D₃. Транскрипция гена CYP24A1 человека увеличивается ионами кальция и избыточным количеством $1\alpha,25$ -дигидроксивитамина D₃. Дефект гена Cyp24a1 мышей ведет к образованию витамина D₃ и ассоциирован с фенотипом гипервитаминоза D.

Гидроксилирование ретиноевой кислоты. Семейство генов CYP26 включает три гена (по одному в каждом из подсемейств). Предполагают, что эти гены произошли от общего предшественника примерно 150-200 млн. лет назад. Все они катализируют гидроксилирование ретиноевой кислоты (витамина А). CYP26A1 является гидроксилазой всех типов трансретиноевой кислоты. Он не действует на 9-цис или 13-цис ретиноевую кислоту. Ретиноевая кислота является важным фактором при развитии позвоночных и действует через несколько рецепторов ретиноевой кислоты и X-ретиноид рецепторы. Как и в случае с другими цитохромами P-450 и иными метаболизирующими лекарства ферментами, CYP26A1 может катаболизировать витамин А, разрушая лиганд для рецепторов ретиноевой кислоты и тем самым выключает мощные сигналы для развития организма, посылаемые ретиноидами.

Предполагается, что CYP26B1 участвует в метаболизме ретиноевой кислоты или ее производных, но биологическая роль этих ферментов пока не ясна.

Цитохромы P-450 с неизвестными функциями. Роль некоторых цитохромов P-450 (в том числе CYP20A1, CYP27C1, CYP4A20, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP26B1, CYP26C1) не установлена. Скорее нет информации об этих белках, что связано с методами их идентификации. Надежды возлагаются на дальнейшие результаты исследования генома человека.

Кроме того, некоторые из генов могут иметь весьма ограниченную ткане-специфическую или клеточно-специфическую локализацию, экспрессироваться на определенных этапах онтогенеза. Не исключено, что все эти причины имеют место во время эмбриогенеза или фетогенеза.

Заключая выше изложенные факты о роли ферментов цитохромов Р-450 в метаболических процессах эндогенных веществ, следует отметить, что роль их в различных биологических системах будет расширяться по мере анализа продуктов генов СYP с помощью современных методов исследований.

4.1.2. Цитохромы Р-450 в метаболизме лекарственных средств

Гены суперсемейства СYP высоко полиморфны. С генетическими различиями Р-450 связаны индивидуальные вариации фенотипа. В ближайшее время многие исследования покажут связь между вариантами аллелей СYP и генетическими болезнями, а также токсическими эффектами факторов среды, раком или другими мультифакториальными болезнями.

По различным данным в организме человека насчитывается около 100 ферментов семейства цитохрома Р-450. Следует подчеркнуть, что хотя многие из этих ферментов обладают возможностью метаболизировать определенные лекарства, преобладающая часть Р-450-опосредованного лекарственного метаболизма у человека протекает с участием двух ферментов: СYP3A4 и полиморфный СYP2D6. В таблице 12 представлены данные, отражающие относительное содержание различных цитохромов в печени и их вклад в метаболизм лекарственных препаратов.

Таблица 12. Ферменты семейства цитохромов Р-450

№	Фермент	Относительное содержание в печени (%)	Относительный вклад в метаболизм лекарственных средств (%)
1.	СYP3A	28.8	51.0
2.	СYP2D6	1.5	24.0
3.	СYP1A2	12.7	5.0
4.	СYP2A6	4.0	
5.	СYP2C	18.2	19.0
6.	СYP2B6	0.2	
7.	СYP2E1	7.0	1.0
8.	Другие	28.0	

Причиной того, что присутствующий в относительно малом количестве фермент CYP2D6 принимает участие в метаболизме около 1/4 всех лекарств, является нацеленность этих препаратов на нервную систему (Таблица 13). CYP2D6 обнаруживается в головном мозге и,

Таблица 13. Активные в отношении ЦНС лекарственные средства, метаболизируемые одним или несколькими полиморфными энзимами P-450.

Лекарственные препараты	Гены, контролирующие их метаболизм
Алпразолам	CYP3A
Амитриптилин	CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A
Бусипрон	CYP3A
Кофеин	CYP1A2, CYP2E1
Карбемазепин	CYP3A, CYP2C8
Хлопромазин	CYP1A1, CYP2B6, CYP3A
Кломипразин	CYP2C19, CYP2D6, CYP3A
Клозапин	CYP1A2, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A
Диазепам	CYP2C18, CYP2C19, CYP3A
Дезипрамин	CYP2D6
Флюоксетин	CYP2C19, CYP2D6, CYP3A, CYP2C9, CYP2E1
Флюфеназин	CYP2D6
Флювоксамин	CYP1A2, CYP2C19, CYP3A, CYP2D6, CYP2C9
Галоперидол	CYP2D6, CYP3A, CYP1A2, CYP3A
Имипрамин	CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19
Левопромазин	CYP2D6
Миансерин	CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A
Мидазолам	CYP3A, CYP4B1
Моклобемид	CYP2C19
Нортриптилин	CYP2D6
Пароксетин	CYP2D6
Перфеназин	CYP2D6
Фенитоин	CYP2C19, CYP2C9, CYP3A
Рisperидон	CYP2D6
Сертралин	CYP2C9, CYP2D6, CYP3A
Темазепам	CYP2C8, CYP2C19, CYP3A
Транилципромин	CYP2D6
Тразодон	CYP3A
Триазолам	CYP3A
Трифлюперидол	CYP2D6
Тримипрамин	CYP2D6
Циклопентиксол	CYP2D6

возможно, возник для защиты его клеток от нейротоксинов окружающей среды. Его субстратами являются нейролептики, трициклические антидепрессанты, антиаритмические средства, β -блокаторы, наркотические анальгетики. Фермент CYP3A4 метаболизирует многие естественные антибиотики, что может объяснить его центральную роль в метаболизме лекарств. Хотя CYP3A4 и CYP2D6 катализируют большинство реакций окисления лекарственных препаратов у человека, другие ферменты P-450 могут играть стержневую роль в метаболизме других лекарств. CYP2C19 метаболизирует транквилизаторы, противосудорожные препараты, ингибиторы протонной помпы. Цитохром CYP2C9 участвует в метаболизме антидиабетических средств, непрямых антикоагулянтов, нестероидных противовоспалительных средств, антигипертензивного препарата лозартан.

Комплекс цитохрома P-450 – система первичной защиты против поглощенных химических веществ. Она определяет биологический период полужизни большинства лекарств, которые применяют в клинической практике.

В результате цитохром P-450-опосредованных реакций окисления происходит превращение предшественников в активные формы лекарств как, например, активация противоопухолевого препарата циклофосфамида в его основной цитостатический метаболит или превращение кодеина в морфин.

Ферменты лекарственного метаболизма могут играть и отрицательную роль, способствуя развитию злокачественных опухолей. Большинство канцерогенов поступают в организм человека в неактивной форме. Однако под действием ферментов лекарственного метаболизма они подвергаются биоактивации и приобретают канцерогенные свойства.

Важная роль системы цитохромов и ее выраженный полиморфизм определяют следующие возможные варианты терапевтического эффекта при приеме лекарственных средств:

- отсутствие ожидаемого эффекта из-за сверхбыстрого метаболизма и выведения препарата из организма;
- отсутствие активации пролекарства;
- токсические побочные эффекты вследствие аккумуляции препарата;
- метаболическое превращение в токсические продукты.

Есть данные, свидетельствующие о том, что при химиотерапии опухолевых заболеваний в индивидуальном ответе на лечение важное зна-

чение может иметь разнообразие уровня ферментов лекарственного метаболизма в опухолевых клетках-мишенях.

Модуляция функции цитохрома Р-450 может быть причиной нежелательных реакций взаимодействия медикамент/медикамент, которые развиваются, когда один лекарственный препарат угнетает Р-450- опосредованный метаболизм другого препарата, принятого одновременно. Например, фуранокумарин, бергамотин и флавиноид нарингерин, которые содержатся в соке грейпфрута, способны угнетать активность СYP3A4. Это может вызывать нежелательные реакции на такие препараты, как ингибитор протеаз ВИЧ саквинивир, ловастатин – препарат, уменьшающий уровень холестерина и иммуносупрессор циклоспорин.

Система цитохрома Р-450 обеспечивает адаптивный ответ на “вызов” внешней среды, поэтому действие химического вещества часто приводит к индукции Р-450-изозима, активного в метаболизме этого вещества. Такой механизм был впервые описан Conney (1967), который установил, что некоторые лекарства, в том числе и фенилбутазон, способны усиливать свой метаболизм. Такой эффект приводит к большой индивидуальной изменчивости в экспрессии изозима цитохрома Р-450 печени. Генетически детерминированная изменчивость в реакции на лекарства часто накладывается на выраженную изменчивость метаболизма и нередко бывает замаскированной, особенно если индивидуальные аллельные варианты отличаются незначительно по их кинетическим свойствам. Несмотря на эти факторы, генетический полиморфизм системы цитохрома Р-450 может четко влиять на исход терапии.

Значительное число генов цитохрома Р-450 сейчас определены как полиморфные (таблица 14).

Наиболее хорошо изученный из них – СYP2D6. Полиморфизм этого гена впервые был обнаружен в 1977 г. в Англии. При использовании дебризохина у больных гипертонической болезнью было отмечено, что обычные дозировки препарата иногда вызывают развитие нежелательных побочных эффектов или были вообще неэффективными. В последующем выявили существование быстрых и медленных метаболизаторов. Медленные метаболизаторы встречаются с частотой от 5 до 10 % среди населения Европы, а среди арабского населения с частотой 1-2 %. Ген СYP2D локализуется в хромосоме 22 (q 13.1) и включает в себя два псевдогена (СYP2D7 и СYP2D8) и полиморфный СYP2D6.

Таблица 14.

Полиморфизм генов P-450, метаболизирующих лекарственные препараты

Ферменты	Локализация хромосом	Номер аллели	Множественные аллели
CYP1A1	15q 22-pter	4	
CYP1B1	2q 22-21	6	
CYP2A6	19q 13.1-13.3	3	17 % v1, T→A экзон 3, 78 % v2, C→A экзон 3, 7 %
CYP2C9	10q 24.1-24.3	3	79 % CYP2C9*2, C→T экзон 3, 12.5 % CYP2C9*3, A→C экзон 7, 8.5 %
CYP2C19	10q 24.1-24.3	10	75-79 % CYP2C19*2, G→A экзон 5, 22-29 % CYP2C19*3, G→A экзон 4
CYP2D6	22q 11.2-pter	>18	65-70 % CYP2D6*3, делеция A ₂₆₃₇ , апрокс. 4 % CYP2D6*4, G ₁₉₃₄ A, 10-20 % CYP2D6*5, делец., апрокс. 4 %
CYP2E1	10	3	

Активность CYP2D варьирует от полного отсутствия до сверхбыстрого метаболизма, что зависит от комбинации по крайней мере 30 различных аллелей. Около 6 % популяции белых людей несет два нулевых аллеля в локусе CYP2D6. В Великобритании ≈ 3.6 млн людей не экспрессирует этот фермент (медленные метаболизаторы) и, как следствие у них нарушен метаболизм широкого круга лекарственных препаратов, являющихся субстратами CYP2D6 (таблица 15). Дефектные аллели могут возникнуть в результате делеции гена, появления точечных мутаций, сдвига рамок считывания. С нуль-генотипом CYP2D6 связаны различные фенотипические последствия (таблица 16), такие как редкие летальные аномальные реакции на лекарства, например, при назначении в случаях сте-

Таблица 15. Лекарственные препараты – субстраты CYP2D6

Алпренолол	Амифлавин
Амиодарон	Амитриптилин
Апигенин	Будесонид
Буфуралол	Бупранолол
Хлоргидрат	Кломипраמיד
Клонидин	Клотримазол
Клозапин	Кодеин
Циклобензаприн	Десипрамин
Дексфенфлурамин	Декстрометорфан
Дибукаин	Дигидроэрготамин
Доласетрон	Доксорубин
Энкаинид	Етинилэстрадиол
Этилморфин	Фенотерол
Флекаинид	Флювоксамин малеат
Флюоксетин	Формотерол
Гуаноксан	Галоперидол
4-гидроксиамфетамин	Имипрамин
Индорамин	Кетоконазол
Лауданозин	Левомепразин
Лоратадин	MDMA
Мефлогун	Метоксамин HCl
Метоксифенамин	Метоксипсорален
Метисергид HCl	Метоклопрамид
Метопролол	Минаприн
Моклобемид	MPTP
Мексилетин	Никерголин
Нимодипин	Нитрендипин
Нортриптилин	Оланзапин
Ондансетрон	Оксипренолол
Пароксетин	Перексилин
Перфеназин	Фенформин
Фенилпропаноламин	Прокаинамид
Прометазин	N-пропилаамалин
Пропафенон	Пропранолол
Пириметамин	Кверцитин
Рифампицин	Ритонавир
Рокситромицин	Серотонин
Спартеин	Сульфазалин
Такрин	Тамоксифен
Тиоридазин	Тимолол
Томокситин	Транилципрамин
Тропизетрон	Циклофентиксол

нокардии перфексила; отсутствие терапевтического эффекта в результате сверхбыстрого метаболизма или вследствие отсутствия активации предшественника (пролекарства).

Среди дефектных аллелей наиболее распространенными у европейцев являются CYP2D6*4 (0,1-0,2 %), CYP2D6*3 (0,07-0,14 %), CYP2D6*5 (0,01-0,08 %), CYP2D6*6 (0,013-0,018 %). Кроме полностью дефектных аллелей, есть такие, которые вызывают незначительное

Таблица 16. Последствия сочетания двух неактивных аллелей CYP2D6

<i>Снижение элиминации – аккумуляции родственных компонентов, которые выражаются в токсичности</i>	
β-блокаторы	Метопролол Тимолол Буфуранол
Противоаритмические	Спартеин Мексилетин Флекаинид
Трициклические Антидепрессанты	Нортриптилин Кломипразин
Нейролептики	Перфеназин Циклофентиксол
<i>Снижение активности пролекарств</i>	
Енкаинид	метаболит: О-деметил енкаинид
Кодеин	метаболит: морфин
<i>Снижение выведения активных метаболитов</i>	
Имипрамин	Метаболит: дезимипрамин
<i>Снижение выведения родственных препаратов и активных метаболитов</i>	
Амитриптилин	метаболит: нортриптилин

снижение или изменение лекарственного метаболизма. Например, аллель CYP2D6*10 часто встречается среди китайского населения. Она кодирует синтез фермента со сниженной функциональной активностью. Аналогично аллель CYP2D6*17 распространена среди представительниц африканской расы.

В дополнение к обозначенным нулевым аллелям CYP2D6 существуют несколько аллелей с заменой одной аминокислоты. Некоторые из них также ассоциируются с измененным фенотипом. Однако, для многих аллелей не установлено четкого фенотипа, что затрудняет определение чувствительной группы людей и полезность выявления этих аллелей в прогнозировании ответа на соответствующую терапию.

Наблюдения за некоторыми индивидуумами – “сверхбыстрыми” метаболизаторами, которые являются нечувствительными или дают слабый ответ на терапию лекарственными препаратами-субстратами CYP2D6, показали выраженный полиморфизм данного гена. Причиной этого оказалась амплификация гена CYP2D6. У некоторых индивидуумов наследуется от 2, 3 до 13 tandemно расположенных копий CYP2D6. Для таких людей требуется значительное увеличение доз препаратов, метаболизируемых CYP2D6, чтобы достичь заметного терапевтического эффекта.

Мультикопии CYP2D6 наиболее часто встречаются среди жителей Эфиопии и Саудовской Аравии. Около 30 % населения этих стран – сверхбыстрые метаболизаторы. Наличие мультикопий функционально активного гена CYP2D6 приводит к тому, что у их носителей метаболизм определенных лекарств происходит более интенсивно. Вследствие этого уровень препарата в циркулирующей крови не достигает терапевтических концентраций при обычных дозировках. Впервые такое явление было описано у больного, которому трехкратно увеличили дозу нортриптилина для достижения терапевтического уровня препарата в плазме. Оказалось, что он носитель трех активных генов CYP2D6.

Исследования полиморфизма CYP2D6 имеет важное значение для клинической практики. Как было показано выше, этот фермент метаболизирует ряд часто назначаемых лекарственных препаратов, ко-

торые имеют низкий терапевтический индекс, в связи с чем увеличение дозы препаратов при повышении их концентрации в крови не приводит к увеличению терапевтического эффекта. Однако такая тактика нередко ведет к возникновению побочных и токсических эффектов (таблица 17).

Таблица 17. Возможные нежелательные эффекты лекарственных препаратов-субстратов ферментов полиморфного P-450 у медленных метаболизаторов

Полиморфные гены, кодирующие Соответствующие ферменты	Нежелательные эффекты		
	Снижен клиренс препаратов	Побочные эффекты	Снижена активация пролекарства
CYP2D6	Трициклические Антидепрессанты Галоперидол Антиаритмические препараты	Кардиотоксический Паркинсонизм (?) Аритмии	Трамадол Кодеин Этилморфин
CYP2C9	S-варфарин Фенитоин Лозартан Толбутамид НПВС	Кровотечения Атаксия Гипогликемия Гастроинтестинальные кровотечения (?)	Лозартан
CYP2C19	Омепразол Диазепам	Сонливость	Прогуанил

Так, например, у медленных метаболизаторов отмечали тошноту, рвоту и аритмии – побочные эффекты при лечении различных видов аритмии пропafenоном и мексилетином.

Из-за замедления активации пролекарств цитохромом CYP2D6 у медленных метаболизаторов наблюдается их неэффективное использование, в частности, снижается анальгезирующее действие трамадола. Известно также, что при приеме кодеина, который также является субстра-

том для CYP2D6, преобразующего его в морфин, у быстрых метаболизаторов наблюдается развитие характерного побочного эффекта морфина – абдоминальные боли. У медленных метаболизаторов не обнаруживается морфин в плазме крови и не наблюдается анальгезирующий эффект кодеина. Предполагается, что замедление метаболизма, контролируемого CYP2D6, может быть одним из защитных факторов в развитии опиоидной зависимости.

Некоторые препараты (аймалин, примахин, хинидин) обладают способностью ингибировать активность фермента CYP2D6.

Другие гены P-450 также генетически полиморфны. Наиболее заметный из них CYP2C19. Он имеет неактивную или нулевую аллель с известными фенотипическими проявлениями. CYP2C19 метаболизирует меньшее число лекарств, однако его субстраты, в том числе диазепам, омепразол, пропранолол, прогунил, толбутамид относятся к часто назначаемым лекарственным средствам.

Гомозиготные носители дефектных аллелей гена CYP2C19 – группа людей с высоким риском развития побочных эффектов лекарственных средств, которые являются субстратом для данного гена. Эти люди составляют 2-4 % европейской популяции и 10-25 % азиатского населения. У гомозигот по дефектным аллелям CYP2C19 многократное увеличение площади концентрации под кривой при использовании омепразола у больных язвенной болезнью желудка по сравнению с больными – быстрыми метаболизаторами. У медленных метаболизаторов возрастал период полувыведения препарата, что указывает на изменение его фармакокинетических параметров. У гетерозигот по дефектной аллели при применении стандартных доз омепразола отмечается повышение интрагастрального pH и уровня гастрина в плазме по сравнению с гомозиготами нормального гена CYP2C19.

Клинически обусловленный фенотип может быть связан с аллелями, отличающимися только по одной аминокислоте, как у гена CYP2C9. Наглядным примером служит наблюдение Reittie D., который описал тяжелую варфариновую интоксикацию при лечении инфаркта миокарда у пациента, гомозиготного по редкому аллелю CYP2C9 с малой активностью.

Кроме варфарина, CYP2C9 метаболизирует лозартан, нестероидные противовоспалительные средства. Этот ген имеет немутантную (CYP2C9*1) и два мутантных аллеля (CYP2C9*2 и CYP2C9*3), имеющих очень низкую активность. Частота встречаемости последних в ев-

ропейской популяции составляет 10,7% и 7,4% соответственно. Исследования показали, что клиренс варфарина у носителей мутантной аллели CYP2C9*3 составлял у гомозигот 66%, у гетерозигот 90% по отношению к доминантным гомозиготам.

Описаны случаи, когда доза варфарина 0,5 мг/сутки вызывала клинический эффект у гомозигот рецессивной аллели CYP2C9*3. В тоже время для достижения такого же эффекта у доминантных гомозигот дозу следует увеличивать в 10-16 раз для ежедневного приема.

Носители мутантных аллелей CYP2C9 входят также в группу риска в отношении приема непрямых антикоагулянтов. У них может быть большая вероятность развития кровотечений, как побочных эффектов препаратов данной группы. Генотипирование таких пациентов перед лечением позволит снизить дозировку препарата и предотвратить развитие осложнений.

Известно, что фермент CYP2C9 трансформирует гипотензивный препарат лозартан в фармакологически активную форму карбоксиметаболит E-3174. У рецессивных гомозигот CYP2C9*3 преобразуется всего лишь 5% лозартана в его активную форму по сравнению с доминантными гомозиготами.

У человека относительно недавно выделен еще один ген P-450 – CYP1B1. Он также оказался полиморфным, хотя фенотипические последствия аллельной изменчивости гена пока мало изучены. Этот ген привлекает особое внимание, так как кроме метаболизма лекарств и ксенобиотиков CYP1B1 играет роль в превращении эстрогена, катализируя 4-гидроксилирование эстрогена в эстрадиол. Установлена также ассоциация мутаций CYP1B1 с развитием первичной врожденной глаукомы.

4.2. Ферменты фазы II лекарственного метаболизма

Многие ферменты фазы II превращения лекарств также являются полиморфными, в частности, семейств глутатион-S-трансферазы, N-ацетилтрансферазы, УДФ-глюкуронилтрансферазы и сульфотрансферазы. GSTM1 и GSTT1 гены глутатион-S-трансферазы часто имеют делеции, а ген GSTP1 – аллельные варианты с заменой одной аминокислоты, которые влияют как на стабильность белка, так и субстратную специфичность.

Эксперименты на трансгенных мышах, из генома которых был удален ген GStp, позволили установить значительно большую частоту па-

пиллом кожи, вызванных химическими веществами, по сравнению с мышами “дикого” типа, полученных от той же пары родителей.

N-ацетилтрансферазы. Генетическая основа полиморфизма ацетилирования хорошо изучена. Он связан с присутствием множественных аллелей локуса гена NAT2. Фермент этого гена отвечает за метаболизм широкого круга часто употребляемых лекарств, включая противотуберкулезный препарат изониазид, стимулятор кофеин и гетероциклические амины канцерогенов. Полиморфная изменчивость приводит к тримодальному распределению фенотипов ацетилирования. Несмотря на то, что прямой эффект полиморфизма ферментов фазы II чаще менее выражен, чем генетически обусловленная изменчивость в экспрессии специфических изоферментов P-450, эффект наследственных изменений в обоих фазах метаболизма может быть синергичным.

О значении полиморфизма NAT как для эффективности химиотерапии, так и для качества жизни в зависимости от степени детоксикации в литературе накоплен значительный материал.

Установлено, что NAT детерминируется двумя генами – NAT1 и NAT2.

Полиморфизм *N*-ацетилирования лекарств был открыт при использовании изониазида в лечении больных туберкулезом (Bonicke, Reif, 1953). Оказалось, что изониазид, гидралазин, ряд сульфаниламидных препаратов ацетилируются с участием полиморфного фермента ариламин *N*-ацетилтрансферазы 2 (NAT2). Ацетилярный полиморфизм связан с мутациями в локусе NAT2.

В литературе постоянно описываются новые варианты аллелей NAT. Методом полиморфизма длины рестрикции фрагментов ДНК идентифицированы 15 аллелей NAT2 гена для изониазидного полиморфизма. У человека вариабельна также экспрессия NAT1 – описано 9 аллелей.

Установлено, что NAT1*14 и NAT1*15 продуцируют дефектный NAT1 белок, который задерживает метаболизм NAT1-зависимых субстратов *in vivo* и *in vitro*; наоборот, NAT1*10-вариант ассоциируется с повышенной активностью NAT1 и возрастанием риска возникновения рака кишечника и мочевого пузыря.

Ген NAT2 локализуется в хромосоме 8 и контролирует выработку фермента ариламин *N*-ацетилтрансферазы 2 (NAT2). Этот фермент синтезируется, в основном, в печени, но определяется в незначительных количествах в других тканях: в коже, легких, почках. NAT2 участвует в ацетилировании ряда лекарственных средств, а также большого чис-

ла ариламинов и ксенобиотиков, вызывающих в организме человека многие неблагоприятные эффекты, в том числе и развитие злокачественных новообразований.

Для удаления из организма токсических продуктов необходима их метаболическая активация. Важный этап в метаболической активации и дезактивации ариламинов – ацетилирование.

В результате N-конъюгации ариламинов (в процессе участвуют N-ацетилтрансферазы 1 и 2, УДФ-глюкуронилтрансфераза, сульфотранс-

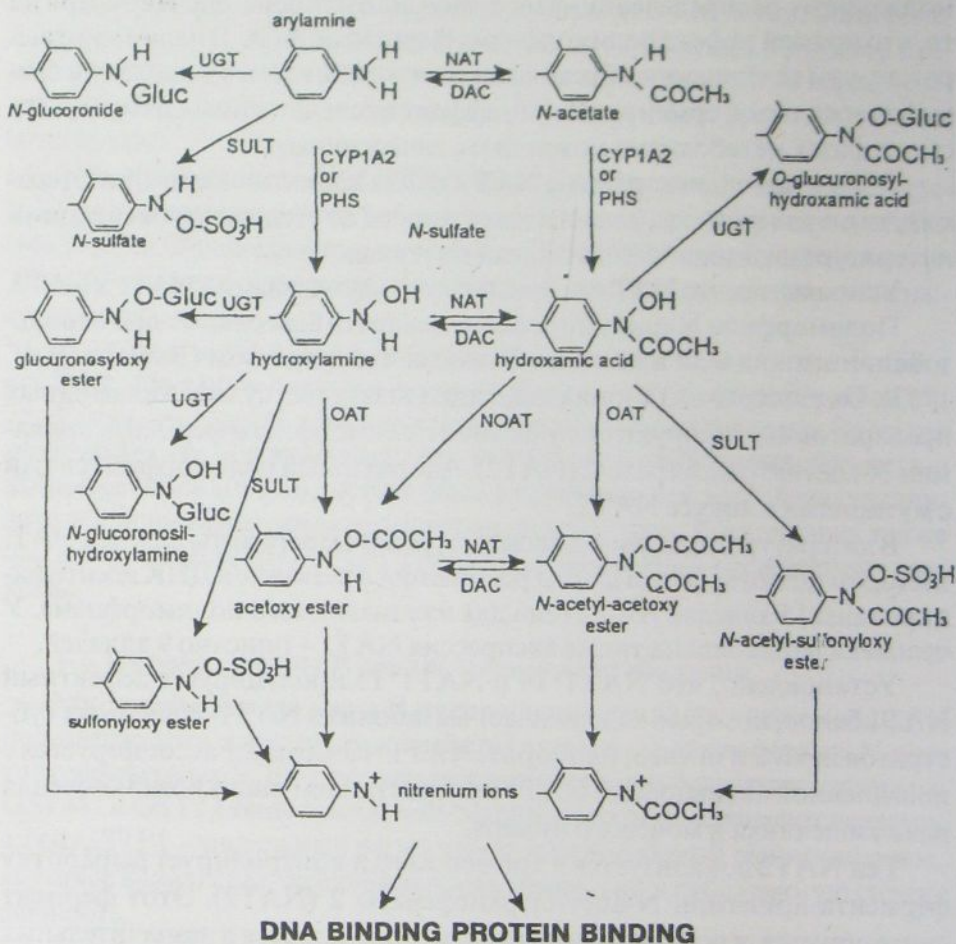


Рис. 7. Преобразование ариламинов с образованием в организме токсичных и нетоксичных метаболитов

фераза) образуются нетоксичные и стабильные продукты: N-ацетаты, N-глюкуроныды, N-сульфаты (рис. 7).

Ариламиды могут также подвергаться и активации (под воздействием цитохрома CYP1A2 или простагландин Н-синтетазы) с образованием гидроксиламинов и гидроксаминовых кислот, которые в дальнейшем активируются в производные ариламинов (реакция катализируется NAT1 и NAT2), которые спонтанно распадаются с образованием реактивного арилнитрениум иона, обладающего мутагенным и канцерогенным свойствами.

Преобладание того или иного пути метаболизма ксенобиотика зависит от активности ферментов NAT, сульфотрансферазы, глюкуронилтрансферазы, а также от вида ксенобиотика и его количества.

Исследования показали, что NAT2 полиморфизм связан с комбинацией по крайней мере восьми точечных мутаций в пределах региона NAT2 гена с локализацией его в 8p 21.3-23.1. Пять мутаций NAT2 связаны с заменой одной аминокислоты. Из них четыре приводят к уменьшению ацетилирующей способности (медленному ацетиляторному полиморфизму) в гомозиготном рецессивном состоянии.

Установлено, что NAT 2*4 и редкая NAT 2*2 аллели определяют быстрое ацелирование, а *5B, *6B и более редкие аллели *5A, *5C, *6B, *7B, *14B кодируют медленное ацелирование.

Ацелирующая способность гомозигот с быстрым типом ацелирования: wild-tipe/wild-tipe (wt/wt) значительно выше, чем у гетерозигот: wild-tipe/mutation (wt/mut). Следует отметить, что медленные ацелираторы значительно отличаются друг от друга. Так, *6A, *7B и *13 аллели кодируют ферменты, обладающие меньшей ацелирующей активностью, чем аллели *5 группы. Предполагается, что с аллелями группы *5 связано уменьшение количества NAT2 фермента в печени из-за нарушения процесса трансляции, а *6A аллель обеспечивает синтез нестойкого фермента.

В различных человеческих популяциях частота встречаемости аллелей ускоренного метаболизма NAT 2*4 разная: среди японцев – 68,6 %, китайцев – 51 %, а среди европейцев – 23,4 %. Такие аллели медленного метаболизма как NAT 2*14A и *14B встречаются исключительно у представителей негроидной расы.

Распространение аллелей NAT2 и частота их встречаемости у представителей европейских народов представлены в таблице 18.

Гомозиготные мутанты обладают низкой способностью ацетилировать субстраты NAT2 ферменты, поэтому фармакотерапия у таких гомозигот должна быть направленной на снижение дозы лекарственного средства и требует контроля за возможными нежелательными эффектами. В литературе освещены проблемы применения тех или иных лекар-

Таблица 18. Распространение аллелей NAT2 среди населения Европы

Аллель	Позиция замены нуклеотида								Частота встречаемости (%)	Фенотип
	111	191	282	341	481	590	803	857		
*4 (wt)	T	G	C	T	C	G	A	G	22.69	ускоренный
*5A	T	G	C	C	T	G	A	G	4.15	замедленный
*5B	T	G	C	C	T	G	G	G	38.33	замедленный
*5C	T	G	C	C	C	G	G	G	4.03	замедленный
*6A	T	G	T	T	C	A	A	G	27.84	замедленный
*7B	T	G	T	T	C	G	A	A	1.30	замедленный
*14A	T	A	C	T	C	G	A	G	1.54	замедленный
*14B	T	A	T	T	C	G	A	G	0.12	замедленный

ственных средств при различных заболеваниях с учетом вариантов генотипа NAT2. Так, исследования показали, что назначение сульфасалазина больным СКВ может приводить к различным эффектам. Больные, у которых наблюдался хороший терапевтический эффект, были быстрыми ацетиляторами. В то же время, у медленных метаболизаторов отмечали неэффективность такого лечения. На основании полученных данных было сделано заключение о связи NAT2 полиморфизма с различной восприимчивостью больных СКВ к сульфасалазину.

Интересные результаты были получены при изучении генотипа NAT2 у больных контактной аллергией. Среди таких больных преобладали быстрые ацетиляторы. Исходя из этого, сделано предположение о том, что ускоренное ацетилирование может повышать сенсibilизацию организма. Не исключается, что тип фермента NAT2 может служить маркером повышенной чувствительности к контактными аллергенами.

Полиморфизм NAT2 обуславливает также разнообразие метаболизма потенциальных канцерогенов, что служит одной из причин предрасположенности к развитию химически-индуцированных нежелательных

эффектов. К настоящему времени имеются многочисленные публикации, в которых указывается на взаимосвязь между типом ацелирования и повышенным риском развития злокачественных опухолей (рак мочевого пузыря, пищевода, прямой кишки, легких, молочной железы). Данные некоторых исследований противоречивы, но, в целом, они позволяют заключить, что определенные генотипы ферментов лекарственного метаболизма в сочетании с другими факторами (характер питания, вредные привычки, профессиональные факторы) имеют существенное значение в канцерогенезе.

Эти ферменты играют важную роль в обеспечении детоксикации при конъюгации-ацелировании с участием ацетил-КоА различных amino- и гидроксиламиногрупп, особенно важных для токсикологии гомо- и гетероциклических ариламинов и гидразиновых ксенобиотиков.

Дальнейшее накопление данных молекулярной эпидемиологии, касающиеся изучения аллельных вариантов генов лекарственного метаболизма, необходимо для внедрения в практику здравоохранения.

Неоднородность фенотипических проявлений активности NAT объясняет противоречивость опубликованных данных и указывает на то, что анализа фенотипов недостаточно для определения его прогностической значимости относительно возможной токсичности и переносимости изониазида. Так, по данным индийских исследователей, не установлено влияние фенотипа NAT на выраженность гепатотоксичности изониазида, рифампицина и пиперазинамида. Это заключение следует из результатов определения скорости ацелирования в группах больных туберкулезом с лекарственной гепатотоксичностью (1 группа) и больных туберкулезом без поражения печени (2 группа). В группе 1 соотношение быстрых и медленных ацелираторов составляло 70 % и 30 %, а в группе 2 – 66,6 % и 33,3 %. Не установлено зависимости концентраций гидралазина и изониазида в крови от уровня ацелирования у 34 здоровых людей, 18 больных туберкулезом и 25 детей – туберкулезным менингитом, хотя у 4 больных туберкулезом и алкоголизмом концентрация этих препаратов была в 3 раза выше, чем у остальных больных, причем у 1 из них выявлена гепатотоксичность.

Результаты исследований, проведенных в Южной Африке, наоборот, указывают на то, что медленный фенотип ацелирования способствует токсичности фармакотерапии, особенно при сочетанном приме-

нении противотуберкулезных препаратов. На фоне 50%-й распространенности медленных ацетиляторов сочетанное применение антиотуберкулезных средств (изониазида) приводило к интоксикации фенитонином. У 16% больных установлен токсический уровень препарата в крови, у 70% возникли эпилептиформные расстройства. При настороженности в отношении предполагаемой токсичности и соответствующем контроле уже через 12 недель лечения изониазидом у 16% больных обнаруживались симптомы неврологических нарушений, причем, чаще они наблюдались у медленных метаболизаторов. Молекулярно-генетические методы исследования подтверждают, что изониазидная нейропатия характерна для лиц с медленным генотипом.

Серьезные осложнения у больных могут возникнуть в результате биотрансформации гидралазина, который широко применяется в клинической практике как вазодилататор при гипертензии (депрессин, адельфан). Во II-й фазе превращения этого препарата образуется ацетилированный гидралазин, который спонтанно циклизуется в стабильный продукт 3-метил-S-триазоло-[3,4-альфа]-фталазин. К его специфическим побочным эффектам относят индуцированный волчаночноподобный (гидралазиновый) синдром. Медленные ацетиляторы в большей мере, чем быстрые, подвержены развитию этой интоксикации.

На модели бактериальных культур с различной активностью NAT подтвержден дозависимый от гидралазина мутагенез. Характер мутации был связан с Г:Ц к Т:А-трансверсии, выросшей до 54% при индуцировании препаратом. Для сравнения – 25% спонтанных мутаций при Ц:А-трансверсиях.

Субтоксические дозы гидралазина (0,32 – 1мМ) вызывают дозависимую ДНК-фрагментацию и стимуляцию репаративного синтеза в культуре гепатоцитов крыс. Предварительное введение индометацина в целях угнетения синтеза простагландинов снижало выраженность этих эффектов на 13-50% при неизменной активности NAT. Более низкие дозы гидралазина (0,1-0,3 мМ) в 2,1-2,8 раза повышали частоту мутаций в культуре клеток V79 под действием 6-тиогуанина. Даже однократная доза 80 мг/кг вызывала бластогенный эффект в печени крыс. Многократное введение гидралазина (14 дней) в дозе 46 мг/кг также усиливало инициированный канцерогеном диэтилнитрозамином эффект печеночных нарушений.

У больных с гипертензией, принимающих гидралазин, в 82 % случаев определялись Z-ДНК-антитела, которые отсутствовали у больных контрольной возрастной группы. Предполагается, что сходный механизм образования аутоантител и при волчанке, обусловленной гидралазином. Данное предположение подтверждается на модели бактериальных плазмид, в которых гидралазин изменял конформацию ДНК.

Описанное отрицательное свойство гидралазина, которое зависит от NAT, не ограничивается только этим ферментом. Он модифицирует и другие детоксикационные группы ферментов. В частности, установлено существование повышения активности глутатион-S-трансферазы-альфа и белка CYP2E1.

От уровня активности NAT зависит действие лекарственных препаратов, которые относятся и к другим группам фармакологических средств. Так, фармакокинетическая оценка концентраций прокаиамида и его ацетилированного метаболита у добровольцев показала, что уровень препарата в сыворотке крови был выше у медленных ацетиляторов, а его ацетилированная форма – ниже. У быстрых фенотипов наблюдалась обратная зависимость. В рандомизированном перекрестном исследовании у добровольцев с быстрым фенотипом NAT с помощью иммунофлуоресцентного метода и жидкостной хромато-графии изучали концентрацию ацетилированного прокаиамида для оценки его влияния на кинетику парааминобензойной кислоты. Введение парааминобензойной кислоты в течение 5 дней не повлияло на клиренс, площадь под кривой, экскрецию с мочой и объем распределения препарата. Однако парааминобензойная кислота угнетала его ацетилирование и клиренс в почках. Соответственно сочетание этих лекарственных средств не безопасно для больных.

На характер ответной реакции организма влияет не только полиморфизм ферментов биотрансформации лекарственных средств, но и применяемый препарат, который способен модифицировать активность ферментов детоксикации. Классический ингибитор цитохрома P-450 циметидин и его аналоги, блокаторы H₂-рецепторов гистамина новых поколений, неодинаково влияют на активность NAT. Ведение в течение 7 дней циметидина, рамитидина у крыс достоверно угнетало активность NAT в печени, но низатидин не оказывал такого эффекта, фамотидин в низких дозах несколько снижал, а в высоких – повышал активность

NAT. Циметидин, ранитидин и фамотидин угнетали активность NAT2 на 9%, 48% и 75 % соответственно, при соотношении препарата с субстратом (прокаионамидом) 2:1 отмечалось незначительное угнетение активности NAT1 (субстрат-парааминобензойная кислота). Добавление ацетил-КоА не усиливало ингибирующие эффекты этих лекарственных средств.

Генотипирование дает возможность не только регулировать дозы тех или иных лекарственных препаратов, но и давать рекомендации лицам, относящимся к группам риска развития злокачественных опухолей. В частности, медленным ацетиляторам не рекомендуется выбор профессий, предполагающих контакт с ариламинами. Эти люди должны быть информированы о высоком риске развития рака мочевого пузыря у них при курении, а также рака толстого кишечника при употреблении жареного мяса в больших количествах.

Около 20 лет назад были впервые отмечены генетически детерминированные различия в чувствительности к алкоголю. Было предложено много механизмов для учета различных фенотипов после приема алкоголя, в том числе генетически детерминированные различия в метаболизме алкоголя. Кроме метаболизма полиморфными P-450 (CYP2E1) этанол метаболизируется множеством других также полиморфных путей. Сначала этанол превращается в ацетальдегид под влиянием димерного фермента цитозоля алкогольдегидрогеназы (АДГ), который имеет выраженную каталитическую активность. Молекулярный механизм столь повышенной активности фермента установлен. Связан он с единичной заменой аргинина на гистидин в β -субъединице (ген ADH2). Ацетальдегид метаболизируется другим полиморфным ферментом цитозоля – альдегиддегидрогеназой (АлДГ). Известна довольно низкая активность АлДГ для некоторых популяций. Эти данные, хотя и требующие дополнительных исследований, все же указывают на связь между генетическими различиями в метаболизме алкоголя и вероятностью алкоголизма и алкогольным поражением печени.

Тиопуринометилтрансфераза (ТПМТ) катализирует присоединение метильной группы S-аденозилметионина к ароматическим и гетероциклическим сульфгидрильным субстратам. Такими субстратами являются антилейкемические (6-меркаптопурин, 6-тиогуанин) препараты, азати-

оприн – иммунодепрессант, используемый для предотвращения отторжения трансплантата и лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидный артрит и рассеянный склероз. ТПМТ проявляется трехмодальным распределением фенотипов, которое объясняется многочисленными аллельными вариантами в локусе гена ТПМТ, а также наличием неактивного псевдогена.

Насчитывается несколько ТПМТ аллелей, содержащих инактивирующий ген мутаций. Наследование этих форм фермента – причина неудачной лекарственной терапии, например, лечение детской лейкемии препаратами, которые являются субстратами ТПМТ.

Считается, что ТПМТ – идеальный ген как кандидат для тестов, основанных на определении ДНК, которые могут быть рутинным скринингом популяции восприимчивых пациентов накануне лекарственной терапии.

Уридиндифосфат-5'-глюкуронилтрансферазы (УГТ – англ. UGT) – суперсемейство ферментов, метаболизирующих лекарственные средства. Они локализируются с внутренней стороны мембраны эндоплазматической сети. UGT катализируют простые биохимические реакции, превращающие липофильные соединения (компоненты пищи, токсины, поступающие из внешней среды, лекарственные средства) в водорастворимые глюкурониды. Конъюгация этих веществ с глюкуроновой кислотой почти всегда ведет к образованию неактивных метаболитов, облегчает их выведение с мочой и желчью.

UGT эволюционировали в процессе развития живой природы, и у позвоночных число идентифицированных изоформ превышает 50. Образование глюкуронидов продолжает утилизацию различных химических групп (-O-R; -S-R; -N-R'R''; -C-R). Такая неразборчивость ведет к тому, что широкий круг химически различающихся ксенобиотиков и эндогенных соединений являются мишенями процесса глюкуронизации. Обладая способностью метаболизировать окисленные соединения, UGT дополняет функцию ферментов I фазы, включая цитохромы P-450 (CYP), которые также локализируются с наружной стороны эндоплазматической мембраны (рис. 8).

Значительное число и функциональная избыточность суперсемейства генов UGT указывает на важность процесса глюкуронизации для гомеостаза. На сегодняшний день идентифицированы и клонированы 16 UGT

человека. Учитывая данные о гомологии последовательностей нуклеотидов, UGT делят на два семейства: UGT1 (включает 8 генов) и UGT2 (содержит 7 генов).

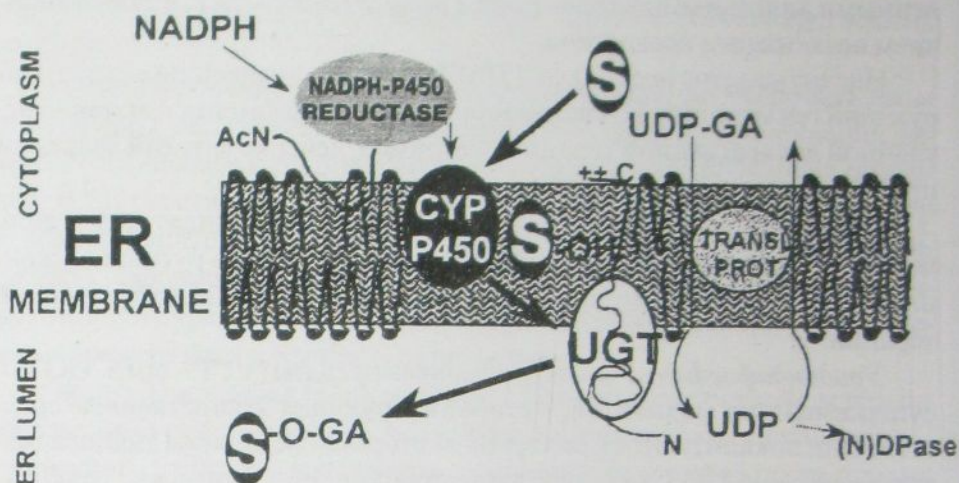


Рис. 8. Расположение UGT в мембране эндоплазматической сети и выполняемая ферментом функция

Локус UGT1A содержит более 150 т.п.н. во второй хромосоме (2q37) и кодирует UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A5, UGT1A7, UGT1A8, UGT1A9, UGT1A10. Этот локус характеризуется уникальной генетической организацией, которая сочетает блоки индивидуального первого экзона на 5'-конце и общие экзоны (2-5) на 3'-конце люкуса (рис. 9). Индивидуальные формы трансфераз являются продуктами вариантов UGT1A1 гена, которые состоят из общего для них карбоксильного концевой домена и отличающихся аминоконцевых участков. Несмотря на наличие общего концевой карбоксильного участка из 245 аминокислот, продукты UGT1A гена регулируются и транскрибируются индивидуально.

В отличие от локуса UGT1A, гены UGT2B были картированы в 4-й хромосоме (4q13 и 4q27 соответственно). Гены UGT2B кодируются индивидуально и содержат 6 экзонов. В настоящее время идентифици-

рованы транскрипты UGT2B4, UGT2B7, UGT2B10, UGT2B11, UGT2B15, UGT2B17. Кроме того, клонирован ген UGT2A1, локализующийся в обонятельных тканях.

UGT человека содержит 529-534 аминокислоты. Аминокислотная последовательность включает в себя консервативный участок на С-конце цепи, который фиксирует белок в мембране эндоплазматичес-

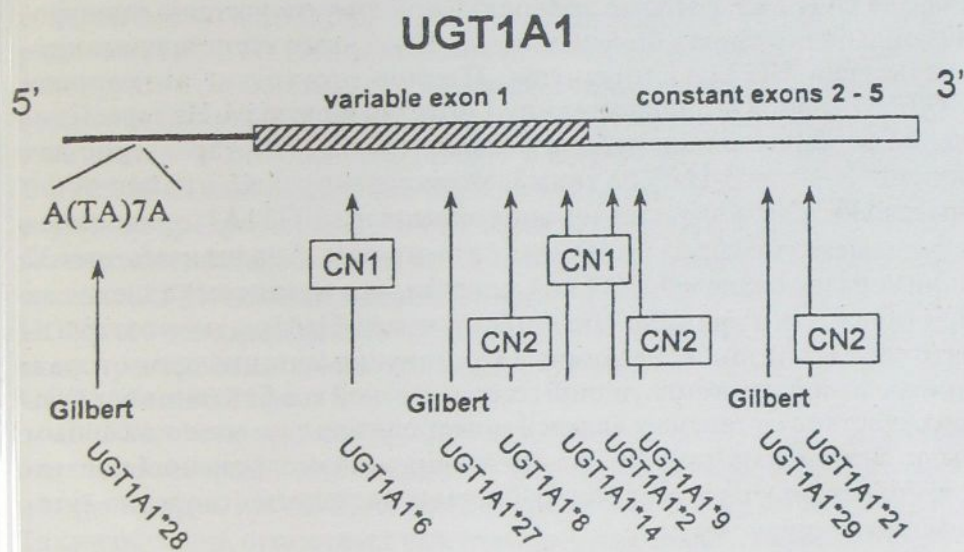


Рис. 9. Мутции гена UGT1A1, изменяющие функцию фермента UGT1A1, что приводит к различным типам неконъюгированной гипербилирубинемии

кой сети. Все UGT, кроме UGT1A10, содержат N-концевой сигнальный белковый домен, который направляет белок в эндоплазматическую сеть.

На начальном этапе исследования физиологической роли глюкуронизации в организме человека были основаны на выделении и очистке белков UGT из печени. Внедрение новых технологий молекулярной биологии привело к идентификации новых изоформ фермента, установлению каталитических функций UGT и освещению их роли в развитии различных патологий у человека, в том числе и неконъюгированных гипербилирубинемий, канцерогенеза, аутоиммунных процессов.

Открытие в 1991 г. UGT билирубина человека послужило к открытию локуса UGT1A. Начиная с 1991 г. идентифицировано 33 аллеля UGT1A1 и стало понятным, что неконъюгированная гипербилирубинемия – результат гомозиготной или компаундной гетерозиготной мутации этой изоформы. UGT1A1 является единственным эффективным ферментом глюкуронизации билирубина у человека. Это было доказано после обнаружения мутаций исключительно экзон1-кодирующего участка UGT1A1, которые приводят к полному отсутствию глюкуронизации билирубина у больных людей. Из-за этого все остальные продукты гена UGT1A1 интактны. Полное отсутствие активности UGT1A1 ведет к летальному типу 1 болезни Криглера-Найара. Снижение активности билирубина меньше, чем на 30 %, характерно для болезни Криглера-Найара типа 2. Установлено также, что причиной болезни Гилберта является мутация промотора UGT1A1, приводящая к уменьшению экспрессии продуктов этого гена. Анализ известных 32 полиморфных аллелей UGT1A1 показал, что мутантные аллели как при типе 1, так и при типе 2 болезни Криглера-Найара, могут затрагивать все пять экзонов. Различные комбинации мутаций промотора и гомозиготной или компаундной гетерозиготной комбинации кодирующих участков мутантных аллелей может привести ко всем описанным выше патологиям (рис. 10). На основании этих исследований полагают, что неконъюгируемая билирубинемия наследуется скорее по ауто-сомно-рецессивному типу.

Первоначально, основываясь на открытии UGT билирубина, считали, что глюкуронизация характерна для метаболических процессов печени. Это было доказано путем клонирования UGT1A1, UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9 из кДНК библиотек печени.

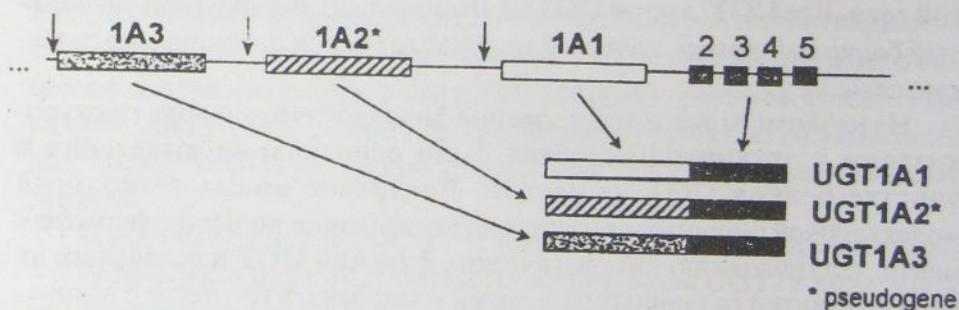


Рис. 10. Схема строения локуса гена UGT1A, локализованного в хромосоме 2

Принимая во внимание предположение о том, что UGT может функционировать как метаболический барьер, необходимый для тканей, взаимодействующих с ксенобиотиками, например, желудочно-кишечного тракта, была разработана основанная на ПЦР методология для определения индивидуальных UGT1A экзонов с высокой гомологией.

Исследования показали, что активность UGT есть в почках, тонкой и толстой кишке. Анализ тканей пищевода, желчного пузыря и толстой кишки подтвердил присутствие активности фермента и экспрессию иРНК UGT1A в этих органах, которые непосредственно контактируют с поглощенными человеком веществами. При этом были выделены новые UGT иРНК, не присутствующие в печени: UGT1A7 – в пищеводе и желудке, UGT1A8 – в пищеводе и толстой кишке и UGT1A10 во всем желудочно-кишечном тракте, кроме печени. Внепеченочные продукты гена UGT1A были подвержены молекулярно-генетическим исследованиям, что позволило выявить типичные транскрипты UGT1A с отличающимся первым экзоном. Как UGT1A7, так и UGT1A10 обладали каталитической активностью; они глюкуронировали простые и сложные фенольные субстраты, как и печеночные UGT1A6 и UGT1A9.

UGT1A10 проявлял каталитическую активность по отношению к стероидным гормонам (β -эстрадиол, эстрон, андростерон), но все они не метаболизируются UGT1A7. Есть и другие особенности этих изоформ. Таким образом, существует качественное и количественное отличие в регулировании UGT в печени и других органах желудочно-кишечного тракта, что составляет биохимическую основу тканеспецифической глюкуронизации у человека.

Исследование ферментативной активности в печени и толстой кишке человека показало отличие каталитических профилей этих органов. Скорость активности в печени по отношению к фенольным субстратам была в 96 раз, а к 4-изопропилфенолу в 64 раза выше, чем в толстой кишке. Однако скорость конъюгирования группы химических соединений, включающих амитриптилин, дезмипрамин, эстрон, имипрамин, ацетаминофен была сравнима в обоих органах. Это указывает на тканеспецифическое распределение глюкуронизации в тканях человека и позволяет считать толстую кишку как место активного метаболизма.

При анализе желудочного эпителия, был определен полиморфный характер экспрессии продуктов гена UGT1. Установленный регулятор-

ный полиморфизм, который отличается от бимодального распределения генетического полиморфизма, обнаруженного у других ферментов метаболизма лекарственных средств, может быть биохимической основой межиндивидуальных отличий во внепеченочном микросомальном метаболизме лекарственных средств.

В 1973 г. у человека были выявлены аутоантитела против эндоплазматической сети клеток печени и проксимальных почечных канальцев (печень-почки микросомальные – LKM аутоантитела). В настоящее время их рассматривают как антитела против микросомальных ферментов, метаболизирующих лекарственные средства. С помощью LKM-аутоантител (анти CYP2D6), как серологических маркеров, идентифицировали клинически различимую вторую форму аутоиммунного гепатита (аутоиммунный гепатит тип 2). Другой тип LKM-аутоантител был открыт в 1983 г. у больного с хроническим гепатитом D. Их обозначили как LKM-3 и установили, что эти антитела направлены против семейства UGT1. Как серологические маркеры они были обнаружены у 10 % больных с гепатитом D. Кроме того, LKM-3 выявлялись у 10 % больных аутоиммунным гепатитом типа 2. У человека антигенами для LKM-3 были определены UGT1A1, UGT1A6, UGT1A4, а у кролика UGT1A6.

В-клеточный иммунный ответ при гепатите C и гепатите D является специфичным и неперекрестным. LKM-3-анти-UGT1A аутоантитела не определены при аутоиммунном гепатите тип 1, а также при вирусном гепатите C. В то же время, LKM-1-анти CYP2D6 аутоантитела не определяются при гепатите D, но есть при гепатите C.

На основании этого высказывается мнение, что белки CYP и UGT могут становиться мишенями иммунной системы при взаимодействии вируса и специфической эндогенной иммунологической дисрегуляции. Эти аутоантигенные мишени могут служить моделью для изучения механизма потери ауто толерантности, составляющей основу аутоагрессии.

Ферменты лекарственного метаболизма человека развивались не для превращений назначаемых сейчас препаратов. Большое разнообразие токсических, мутационных и канцерогенных веществ было идентифицировано как их субстраты; что связано с большой субстратной специфичностью каждого фермента.

Учитывая изложенное выше, можно полагать, что аллельные варианты этих ферментов являются важным фактором того, как мы отвечаем на действие окружающей среды и имеет значение для индивидуальной восприимчивости к различным заболеваниям, в том числе болезни Паркинсона, разнообразным формам рака. Степень выраженности этих ассоциаций для многих болезней еще предстоит изучить.

4.3. Этнические различия в лекарственном метаболизме.

Установлены четкие этнические различия в распространении аллельных вариантов многих ферментов, участвующих в метаболизме лекарств. Эти различия необходимо принимать во внимание при рутинном скрининге новых лекарственных средств и особенно при назначении лекарств, которые являются субстратом полиморфного метаболизма, пациентам, имеющим различные этнические корни.

Выявлено, что аллели, которые отсутствуют или есть в наличие с очень малой частотой у лиц европейской популяции, могут быть ведущими в реакциях на препараты в других популяциях, организующих специфические этнические группы, более чувствительные или более устойчивые к определенной лекарственной терапии. С увеличением уровня этнической гетерогенности внутри популяции, вероятно, что любой фармакогенетический скрининг будет включать скрининг каждого пациента на все известные аллели определенного полиморфного гена в соответствии с их этническим распространением, если известны его фенотипические следствия.

На примере CYP2D6 полиморфный генотип установлен у 6 % белой популяции, у 2 % американских негров, менее чем у 1 % в восточных популяциях. Генетические основы этого различия были исследованы в восточных популяциях и связаны с относительно низкой распространенностью частого “европейского” CYP2D6 нулевого аллеля в восточных популяциях. И наоборот, другие аллели CYP2D6, которые очень редко встречаются в “западных” популяциях, относительно частые на Востоке. Эти “восточные” аллели не имеют инактивирующих ген мутаций, но отличаются сниженной активностью. Поэтому, вследствие высокой частоты этих аллелей в восточных популяциях, антидепрессанты, являющиеся субстратами для CYP2D6 обычно назначаются в более низких дозах на востоке по сравнению с белой популяцией.

Сходная картина складывается и относительно субстратов CYP2C19. Нулевой фенотип CYP2C19 встречается у 3-5 % лиц белой популяции и более, чем у 20 % китайцев. Поэтому на востоке значительно уменьшена дозировка препаратов, являющихся субстратами для CYP2C19, включая диазепам.

Существует также значительное межэтническое различие в частоте “сверхбыстрых” метаболитаторов гена CYP2D6. Частота встречаемости их составляет 20 % в Эфиопии, 7 % в Испании и 1,5 % в скандинавской популяции.

Выраженные этнические различия наблюдаются в других разнообразных ферментах лекарственного метаболизма, включая NAT2. Так как многие из этих аллелей в настоящее время ассоциируются с восприимчивостью к лекарствам, они имеют отношение к восприимчивости к различным заболеваниям в этнически далеких популяциях.

Глава 5

БИОТРАНСФОРМАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ЕЕ НЕЖЕЛАТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ

Биотрансформация чужеродных химических веществ – это биохимический процесс, в ходе которого вещества трансформируются под действием ферментных систем организма. Этот процесс называют также метаболизмом или детоксикацией. Однако необходимо отметить, что “метаболизм” подразумевает усвоение организмом вещества в качестве продукта питания, источника энергии. Большинство чужеродных химических веществ не могут играть эту роль, хотя их биотрансформация осуществляется в результате тех же химических реакций и с участием тех же ферментативных систем, что и биотрансформация продуктов питания и эндогенных веществ.

В течение длительного времени процесс превращения веществ в организме рассматривался только как позитивное явление, направленное на уменьшение токсичности, а случаи увеличения токсичности считались исключением и получили название “летальный синтез”. В связи с этим было вполне оправданным применение термина “детоксикация”.

В последнее десятилетие накопилась информация о том, что образование на отдельных стадиях биохимических превращений продуктов или промежуточных соединений, более токсичных, чем исходные вещества, является скорее правилом, чем исключением.

Учитывая изложенное, следует полагать, что термин “биотрансформация” более точен, чем “метаболизм” или “детоксикация”.

Биотрансформация – сложный многостадийный процесс. Суть его заключается в следующем. Большинство чужеродных веществ липофильны и без превращения в растворимые в воде соединения не могут быть

легко удалены из организма. В результате биотрансформации они переводятся в форму, облегчающую их выведение из организма. Процесс состоит из двух фаз.

Основные ферменты реакций первой фазы – ферменты монооксигеназной системы цитохрома Р-450. Для некоторых субстратов ферментные превращения в этой фазе могут осуществлять и другие энзимные системы: флавиносодержащие монооксигеназы, алкогольдегидрогеназы, простагландинсинтетазы. Под действием всех этих ферментов происходит внедрение полярных групп в молекулу чужеродного вещества. В результате эти вещества становятся субстратами реакций второй фазы биотрансформации, в ходе которой они становятся еще более гидрофильными.

Под действием различных цитозольных или связанных с мембранами ферментов (эпоксидгидролазы, глутатион-S-трансферазы, глюкуро-нилтрансферазы, сульфотрансферазы и ацетилтрансферазы) происходит конъюгация (присоединение) гидрофильных, хорошо растворимых в воде групп, к полярным группам в ходе реакций первой фазы.

Во время реакций первой и второй фаз биотрансформации возможно превращение химических веществ в более реакционноспособные соединения, которые могут формировать ковалентные связи с биомолекулами. Этот процесс получил название “биоактивация”. Важность биоактивации в литературе приводится на примере веществ, которые образуются в процессе биотрансформации канцерогенов. Биоактивация, связанная с образованием высокореакционных продуктов или промежуточных соединений, может происходить в ходе первой и второй фаз биотрансформации. Взаимодействие химических веществ или продуктов их трансформации с биомолекулами, которое определяется как ключевая реакция механизма токсического действия, запускает ряд биохимических и фенотипических изменений, приводящих к токсическому эффекту. Выяснение того, какой продукт трансформации или само исходное вещество участвует в этой ключевой реакции, позволяет теоретически обосновать механизм токсического действия.

Реакции биотрансформации ксенобиотиков, которые приводят к усилению токсичности и опасности веществ, следующие.

Основная энзимная система, катализирующая реакции первой фазы, - монооксигеназная система гладкого эндоплазматического ретикулу-ма клеток печени.

Моноксигеназная ферментная система катализирует многие реакции окисления, однако основными являются реакции гидроксилирования и эпоксилирования.

C-гидроксилирование – это реакция внедрения атома кислорода в связь C-H.

а) Ароматическое гидроксилирование. Токсичность бензола связана с его биотрансформацией в печени под действием цитохрома P-450. Установлено, что образование всех метаболитов бензола (фенолов, гидрохинона, катехола, бензохинонов и др.) проходит через стадию образования ареноксидов.

б) Алифатическое гидроксилирование. Высокая скорость реакции может привести к накоплению гидроксильных радикалов, что само по себе очень опасно, так как при этом интенсифицируются процессы повреждения биомолекул, в частности, перекисное окисление липидов. Спирты могут далее окисляться в более токсичные альдегиды и кетоны.

В процессе гидроксилирования возможно образование неустойчивых соединений, при распаде которых могут образовываться стабильные вещества, более токсичные, чем исходные. Например, биотрансформация алифатических нитрилов, в ходе которой отщепляется ион CN^- . Еще один пример – биотрансформация диалкилнитрозаминов, в результате которой образуются алкилдиазогидроксиды $RNNOH$ и ионы алкилдиазония RNN^+ . Ионы алкилдиазония способны алкилировать нуклеиновые основания ДНК. Эти реакции определяют канцерогенную активность исходных веществ.

Дегалогенирование. Дегалогенирование неполностью замещенных галогенсодержащих насыщенных углеводородов приводит к образованию галогензамещенных альдегидов и кетонов, многие из которых высокотоксичны, например, хлорзамещенный ацетон, являющийся сильным алкилирующим агентом.

Накопление 2-галогензамещенных ненасыщенных альдегидов способствует образованию циклических продуктов ДНК. Эти метаболиты определяют мутагенный эффект у млекопитающих при интоксикации галогензамещенными пропенами. Аналогичный механизм присущ и хлороформу, продуктом биотрансформации которого является фосген, обладающий высокой гепато- и нефротоксичностью.

Полностью галогензамещенные алифатические соединения трансформируются с образованием радикалов, а затем происходит рекомбинация радикалов, как, например, в ходе биотрансформации четырехлористого углерода до фосгена и электрофильного хлорирующего агента НОСl.

Эпоксидирование. Эпоксиды являются высокореакционными соединениями, которые способны связываться с биомолекулами, в частности, с ДНК. Они наиболее реакционноспособны в гидрированной форме. Эпоксиды и галогензамещенные альдегиды или ацилхлориды, образующиеся в процессе биотрансформации, определяют гепатотоксичность, мутагенную и канцерогенную активность галогензамещенных ненасыщенных углеводородов.

При высоких дозах ненасыщенных углеводородов в результате их биотрансформации может происходить также алкилирование гема, входящего в состав цитохрома Р-450, что приводит к инактивации фермента.

В процессе биотрансформации полициклических ароматических углеводородов (бензпирена) возникает их мутагенная и канцерогенная активность. Они подвергаются эпоксидированию, а затем под действием эпоксидгидролазы образуются дигидродиолы, которые в результате эпоксидирования превращаются в высококанцерогенные дигидродиолэпоксиды.

N-гидроксилирование – внедрение атома кислорода в связь N-H. Гидроксилирование ароматических аминов по аминогруппе – первая стадия биотрансформации, которая определяет токсическое действие этих соединений: канцерогенную и мутагенную активность и способность к метгемоглобинообразованию (рис. 11).

При N-окислении ариламинов образуются N-фенилгидроксиламины, которые в кислой среде преобразуются в аминофенолы. Этот процесс может происходить в мочевом пузыре. Клеточные нуклеофилы (глутатион, нуклеофильные группы белков и ДНК) связываются с ними, что может привести к раку мочевого пузыря.

Многие ариламины – сильные метгемоглобинообразователи. N-фенилгидроксиламины окисляются в эритроцитах оксигемоглобином до арилнитрозосоединений с одновременным образованием перекиси водорода и метгемоглобина. Арилнитрозосоединения взаимодействуют с β -93-цистеином гемоглобина.

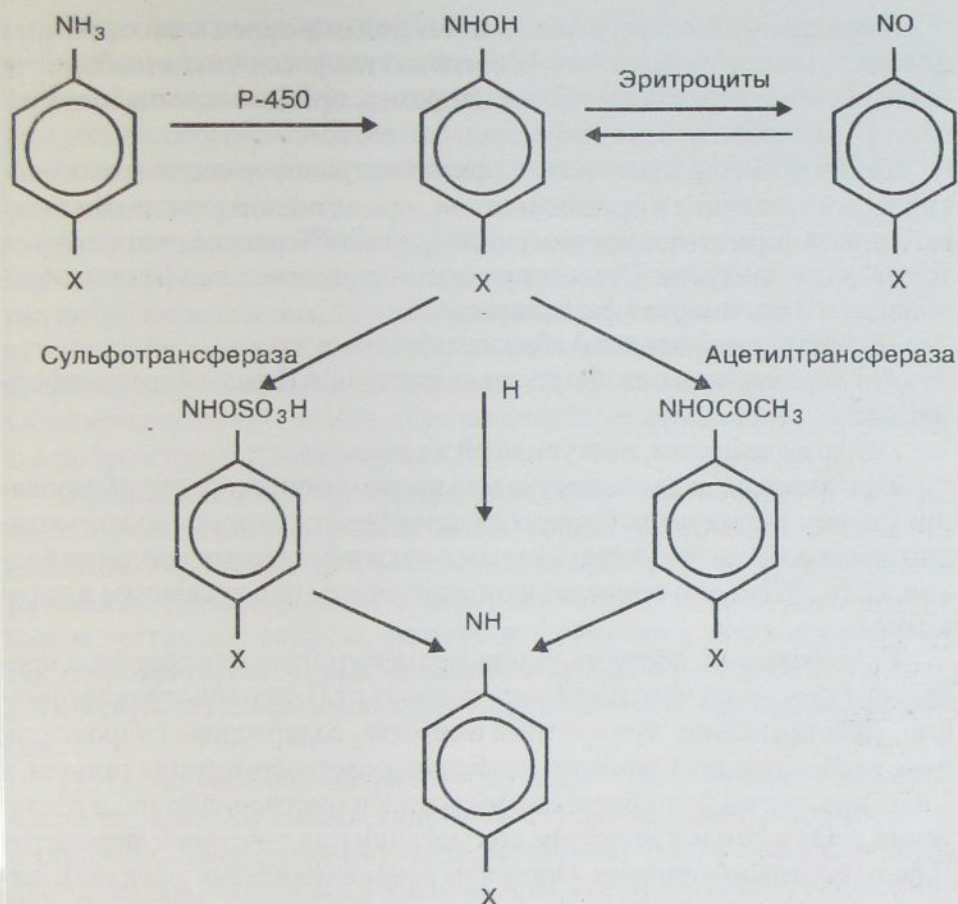


Рис. 11. Биотрансформация ариламинов в организме человека

Восстановительным дегалогенированием *in vivo*, в определенной мере, обусловлено токсическое действие некоторых анестетиков, хлоралканов, хлоралкенов, ДДТ. Молекулярный кислород ингибирует эту реакцию. Однако в центре печеночных долек концентрации O_2 недостаточно для торможения восстановительного дегалогенирования.

При отсутствии молекулярного кислорода вместо присоединения кислорода к комплексу цитохром P-450-субстрат происходит быстрый перенос электрона на субстрат. При этом от галоидалкана отщепляется анион галогена и образуются галоидалкильные радикалы, которые представляют собой высокоактивные частицы, приводящие к повреждению печени.

S-окисление. Тиозфиры окисляются под действием монооксигеназ до сульфоксидов и сульфонов. Многие из сульфоксидных метаболитов проявляют цитотоксичность, как, например, при *S*-окислении инсектицида фората образуется сульфоксид.

Таким образом, в результате I фазы биотрансформации ксено-биотиков, поступающих в организм из-вне, при активном участии монооксигеназной ферментной системы цитохрома Р-450 могут формироваться токсические продукты. Степень проявления токсического эффекта, обусловленного реакциями I фазы, зависит от:

- вероятности (легкости) образования продуктов;
- от вероятности или скорости наступления II фазы биотрансформации;
- от дозы вещества, поступившей в организм.

При высоких дозах вещества или превышении скорости образования опасных продуктов биотрансформации над скоростью конъюгации эти продукты будут связываться с нуклеофильными центрами белков, ДНК, РНК, что приведет к определенным повреждениям в организме.

Следовательно, обезвреживание промежуточных или конечных продуктов I фазы в значительной мере зависит от II фазы биотрансформации. Действительно, чужеродные вещества, содержащие гидроксильную, карбоксильную, эпоксидную группы, аминогруппу или галоген, а также продукты I фазы биотрансформации и многие эндогенные соединения, подвергаются реакциям конъюгации под действием ферментов II фазы биотрансформации. Продукты конъюгации более полярны и легче выводятся из организма.

Реакции II фазы направлены на детоксикацию. Однако в последние годы установлено, что здесь также может происходить образование более активных метаболитов, чем исходные вещества. Эти метаболиты могут индуцировать канцеро- и мутагенез. Предполагается, что "ошибки" в детоксикации ферментов II фазы являются результатом несоответствия скорости изменения генетических факторов этой системы резко возрастающему многообразию химических соединений в окружающей среде.

Реакции детоксикации химических соединений, в том числе и лекарственных средств, описаны выше. Остановимся лишь на примерах образования соединений, более реакционноспособных и опасных в отличие от исходных, которые образуются во II фазе биотрансформации.

Под действием группы ферментов глутатион-S-трансфераз происходит конъюгация токсичных электрофильных чужеродных веществ, которые образовались в I фазе, с глутатионом. Конъюгаты обычно менее реакционноспособны и более полярны, поэтому легко выводятся с желчью или, попадая в почки, превращаются в меркаптуриновые кислоты, выводящиеся с мочой.

Субстратами глутатион-S-трансфераз являются эпоксиды, соединения с ненасыщенными связями, органические гидроперекиси, альдегиды, нитрозосоединения. Однако в результате этих реакций конъюгации с глутатионом могут образовываться высокоактивные промежуточные соединения, способные алкилировать ДНК (эписульфониевые ионы). Образование таких ионов обуславливает мутагенность, например, 1,2-дибромэтан и 1,2-дихлорэтан.

В реакциях с участием сульфотрансфераз осуществляется сульфатная конъюгация. В ходе реакции конъюгации группа SO_3 переносится с аденозин-3'-фосфат-5'-фосфосульфата на субстрат, что приводит к образованию сульфозэфиров. Субстратами являются первичные, вторичные и третичные спирты, фенолы и ариламины. Установлено, что N-сульфозефире некоторых ариламинов проявляют более высокую биологическую активность (канцеро- и мутагенность), чем исходные вещества.

Под действием ацетилтрансфераз эндогенные и чужеродные соединения, содержащие amino-, гидрокси- и сульфгидрильную группы, подвергаются ферментативному ацетилированию. Ацетилирование – перенос ацетильной группы с коэнзима А на субстрат. N-ацетилирование происходит в основном в печени. Ацетилирование вносит вклад в биоактивацию ароматических аминов.

N-ацетилирование ароматических аминов (присоединение ацетильной группы непосредственно к атому азота) приводит к детоксикации соединений. При этом затрудняется образование активных метаболитов (нитрениевых ионов).

Рядом исследований установлено, что рак мочевого пузыря чаще возникает у медленных ацетиляторов. Возможно, это связано с пониженной способностью к детоксикации через N-ацетилирование.

В этиологии многих новообразований человека значительную роль играют пищевые канцерогены, а также канцерогены окружающей среды (выбросы промышленного производства, выхлопные газы, табач-

ный дым). Желудочно-кишечный тракт – место частой локализации рака, например, 97 % всех впервые диагностированных опухолей находят в толстой кишке.

Высказана гипотеза о генопротекторной и цитопротекторной роли UGT. От их экспрессии в пищеварительной системе зависит степень глюкуронизации и связанная с ней неопластическая трансформация. В микросомальном метаболизме генетически регулируемый баланс окислительного метаболизма цитохром Р-450-монооксигеназами и конъюгации предупреждает накопление дериватов активного кислорода, которые могут приводить к повреждению ДНК и белков и, в конце концов, инициировать канцерогенез (рис. 12). Например, фенольные субстраты могут быть окислены до радикалов: эпоксиды, полифенолы, полухиноны и хиноны. Последние поступают в хинол/хинон окислительный цикл и приводит к накоплению кислородных радикалов. Глюкуронизация фенолов продуктами гена UGT1A предупреждает образование реактивных нуклеофилов и электрофилов.

Белки UGT1A найдены в эпителии органов, подверженных канцерогенезу и развитию рака желудочно-кишечного тракта: пищевод, желудок, печень и желчные пути, дистальный отдел толстой кишки. Как уже отмечалось, выявлена значительная разница в активности UGT в печени и толстой кишке человека. Так, в сигмовидной кишке наблюдалось снижение скорости глюкуронизации 8-гидрокси-бензо(α)пирена по сравнению с печенью в 214 раз и эффективность глюкуронизации (V_{max}/K_m) – в 70 раз. Следует отметить, что низкая скорость глюкуронизации реактивных метаболитов совпадает с анатомической локализацией канцерогенной неопластической трансформации в толстой кишке. Каталитический анализ рекомбинантных UGT белков показал, что такие канцерогены, как первичные амины, бензо(α)пирен и канцероген табачного дыма 2-гидроксиамино-1-метил-6-фенилимидазо-(4,5- β)пиридин (N-гидроксил PhIP) – субстраты различных UGT, включая новые идентифицированные внепеченочные изоформы UGT1A7; 1A8; 1A10.

Исследования гепатоцеллюлярной, холангиоцеллюлярной, желудочной и пищеводной карцином человека показало дифференциальное подавление транскрипции UGT1A в раковых тканях по сравнению с таковой в нормальных тканях. Общим является значительное снижение каталитической активности UGT в отношении канцерогенов.

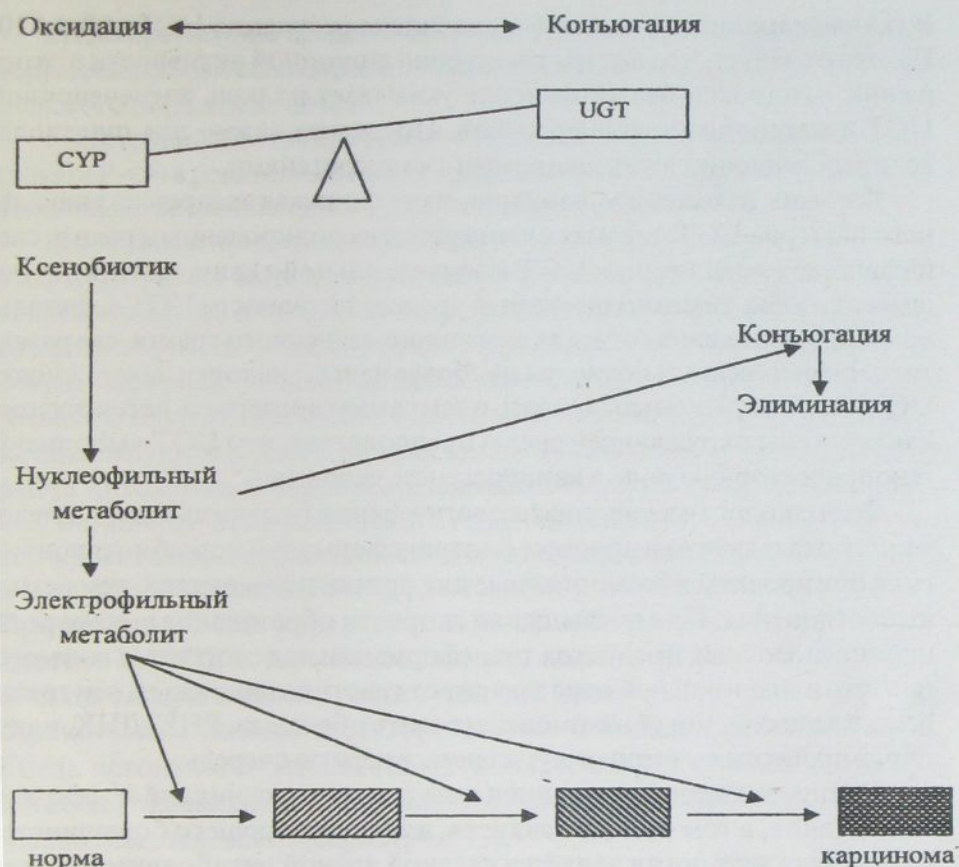


Рис. 12. Возможный механизм химически индуцированного канцерогенеза

Выше было отмечено, что в тканях желудка установлена полиморфная регуляция изоформ UGT1A. Изменчивость глюкуронизации варьирует 4-кратно между индивидами. Следовательно, полиморфная экспрессия изоформ UGT является не только биохимической основой индивидуального лекарственного метаболизма, но и фактором риска канцерогенеза.

В пищеводе человека выявлена ограниченная экспрессия четырех высоко гомологичных продуктов гена UGT: UGT1A7; UGT1A8; UGT1A9; UGT1A10. Этот орган стал моделью для изучения каталитического эффекта данных, в основном, внепеченочных изоформ при отсутствии продуктов генов печени (UGT1A1; 1A3; 1A4; 1A6).

В тканях карциномы пищевода подавлена регуляция UGT1A7; 1A10. Из этого следует, что потеря глюкуронизационной активности в отношении 7-гидрокси-бензо(α)пирена указывает на роль внепеченочной UGT в метаболизме канцерогенов. Последнее важно для пищевода, который эпидемиологически связан с канцерогенами.

Все выше изложенное, а именно, специфическая экспрессия уникального паттерна UGT в тканях с канцерогенассоциированным раком; специфическая локализация UGT в эпителиальной ткани, контактирующей с ксенобиотиками; сниженный уровень активности UGT в дистальном и проксимальном отделах желудочно-кишечного тракта, где развитие злокачественных опухолей наиболее частое; наконец, возможность UGT1A изоформ конъюгировать и тем самым подвергать детоксикации канцерогены окружающей среды предполагает, что UGT выполняют генопротекторную роль в канцерогенезе человека.

Фармакологические, токсикологические и биохимические исследования показали, что в процессе биотрансформации ксенобиотиков могут формироваться более опасные для организма вещества, чем исходные соединения. При превышении скорости образования высокореакционноспособных продуктов трансформации над скоростью конъюгации, что в значительной мере зависит от генотипа индивидов, эти токсические вещества могут взаимодействовать с белками, РНК, ДНК, индуцируя процессы канцеро- и мутагенеза, в первую очередь.

Важное значение для клиники имеет гепатотоксический эффект ксенобиотиков, в том числе и лекарств, для подавляющего большинства из которых этот орган является главной ареной метаболических процессов.

Гепатотоксичность лекарственных средств имеет несколько механизмов. Основные из них следующие:

1. Прямая дозозависимая токсичность характерна для многих лекарственных средств, когда они попадают в организм в больших количествах.

2. Некоторые препараты вызывают поражение печени только у части больных даже в терапевтических дозах (идиосинкразия, связанная с вовлечением в патологический процесс иммунной системы).

3. Генетически детерминированные изменения профиля системы метаболизма ксенобиотиков, в том числе и лекарственных средств, могут быть предрасполагающими факторами к развитию гепатотоксичности у пациента. В этих случаях она возникает по двум причинам.

а) Лекарственное средство само по себе гепатотоксично и в случае нарушения его детоксикации или элиминации происходит развитие токсического поражения печени.

б) Нетоксическое лекарственное средство метаболизируется цитохромом Р-450 в реактивный или потенциально токсичный метаболит (наиболее часто встречающаяся причина гепатотоксичности).

Наглядным примером гепатотоксичности, развивающейся по второму пути, может быть передозировка парацетамола. Как известно, парацетамол – один из наиболее широко используемых в мире анальгетиков/антипиретиков, благодаря его эффективности и безопасности. Однократный прием большой дозы в основном с целью суицида приводит к развитию гепатотоксичности с центрoлoбулярными некрозами. Некрозы локализуются в зоне 3, так как пик — наибольший уровень концентрации цитохрома Р-450, превращающего парацетамол в его реактивный метаболит, отмечен именно в гепатоцитах зоны 3. Гепатотоксический эффект связан с действием его нестабильного метаболита N-ацетил-п-аминобензохиноном (NAPQJ), который инактивируется глутатионом. При обычных дозах парацетамола лишь небольшая часть его превращается в NAPQJ, который связывается с глутатионом и затем выводится из организма в виде меркаптуриновой кислоты. При больших дозах парацетамола повышается образование его активного метаболита. Когда истощаются запасы глутатиона, связывающего NAPQJ, этот метаболит ковалентно связывается с белками плазмы; образующиеся комплексы вызывают некроз (рис. 13).

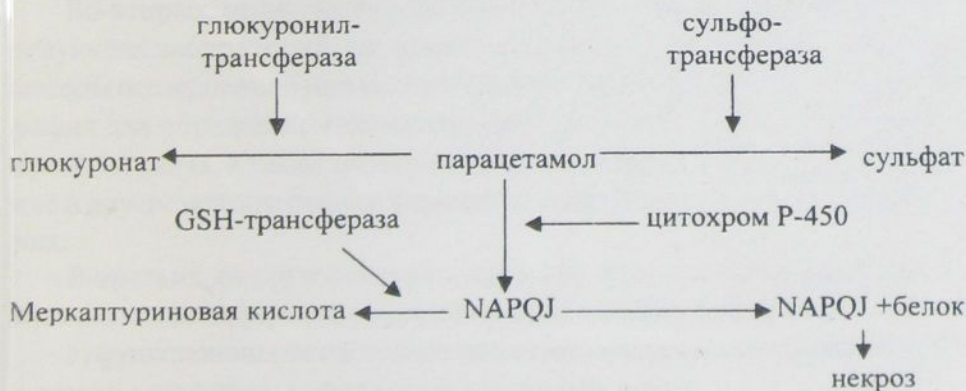


Рис. 13. Схема метаболизма парацетамола с образованием активного метаболита, повреждающего печень

Обобщая изложенное, можно заключить, что гепатотоксичность парацетамола зависит от дозы препарата, скорости его трансформации, запаса глутатиона в тканях, агентов, способных индуцировать цитохром Р-450 или истощать запасы глутатиона (хронический алкоголизм, прием противосудорожных препаратов).

Раскрытие механизмов биотрансформации ксенобиотиков, в том числе и молекулярно-генетических, позволяет объяснить и прогнозировать характер их токсического эффекта, действенность фармакотерапии в каждом конкретном случае. Кроме того, понижение этих механизмов дает возможность разрабатывать теоретически обоснованные модели для прогноза токсичности и опасности нежелательных эффектов новых лекарственных средств.

Глава 6

КЛИНИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ФАРМАКОГЕНЕТИКИ

Информативность и прогностическая убедительность результатов фармакогенетических исследований определяется факторами, объединенными в несколько групп:

Во-первых, они базируются на концепции взаимодействия “субстрат-фермент”. Вариабельность большинства известных на сегодня ферментов, метаболизирующих лекарства, определяются специфичностью тест-вещества, используемого для оценки активности фермента. При этом возможно использование смеси тестов (коктейль-подход), а также анализ нескольких метаболитов единичного теста (метаболические аналоги отпечатков пальцев, например, метаболитов кофеина с участием ферментов CYP1A2, ацетилтрансфераз и ксантиноксидазы).

Во-вторых, решающую роль играет методический уровень соответствующих лабораторий, где применяются современные биохимические методы исследований или высокочувствительная жидкостная хроматография для определения концентрации препарата и его метаболитов в крови и тканях, а также иммунологические и молекулярно-биологические и другие методы оценки ферментов и выявления уровня их содержания.

В-третьих, следует отметить, что на генетически детерминированную активность ферментов существенное влияние оказывают.

а) функциональное состояние организма и отдельных его систем (пол, возраст, масса тела, гормональная секреция и др.);

б) патологические процессы (нарушения метаболизма кровотока в печени и почках, болезни печени);

в) внешние влияния (вредные факторы среды, профессиональные вредности, вредные привычки – табакокурение, алкоголизм, характер пищи, наличие витаминов).

Однако, четкая зависимость наблюдается при сопоставлении с этими факторами фенотипа. При анализе взаимосвязи между генотипом NAT и перечисленными выше физиологическими, патологическими факторами самого организма и окружающей среды не установлено зависимости активности NAT от пола, возраста, курения, употребления кофе, способа обработки употребляемого мяса и др. В то же время эти влияния существенно изменчивы для фенотипов цитохрома P-450.

К настоящему времени из-за ограничения возможности применения дорогостоящих методов генетического контроля шло накопление данных преимущественно о фенотипических проявлениях. Они крайне неоднозначны. На примере монголоидной расы разнообразие результатов исследований в определенной мере устраняется при использовании метаанализа. Частота фенотипов медленных ацетиляторов у 3516 здоровых лиц составляет от 15,8 до 25,5 % ($19,9 \pm 4$ %). У 1842 представителей 17 китайских меньшинств этот показатель существенно колеблется – от 3,2 до 50,6 % ($20,6 \pm 12,9$ %).

В большинстве случаев фенотипические проявления активности фермента коррелируют с генотипом. У представителей европейской популяции (Швейцария) генотип соответствовал фенотипу быстрого метаболизма дебризохина у всех 74 обследованных и у 6 из 8 медленных метаболизаторов; у всех 48 быстрых ацетиляторов и у 33 из 36 медленных ацетиляторов. В целом результаты ДНК-анализа совпадают с фенотипом в 97,5 % случаев. Это свидетельствует о том, что накопление атипичных (мутантных) аллелей в популяции и даже в отдельных семьях, увеличивает разрыв связей между вариабельностью генома и проявлениями фенотипа. Как известно, существует последовательность вариаций структуры ДНК, фенотипический эффект которых проявляется от нулевого до: незначительного, малого, умеренного, значительного, сверхвыраженного. В подавляющем большинстве случаев гены взаимодействуют друг с другом и с факторами внешней среды, оказывая воздействие на фенотип. Это касается и функционирования ферментов. Их фенотипические свойства оказываются гете-

рогенными, так как на них сказывается сравнительный вклад варьирующих факторов внешней среды на фоне основного гена, определяющего генотип данного признака.

Успехи в области биохимической генетики во второй половине XX ст. позволили выявлять гетерозиготных носителей многих болезней, особенно тех, которые обусловлены дефектами ферментов, определяемых в фибробластах или клетках крови. Как правило, активность ферментов у гетерозигот снижена примерно вдвое по сравнению с нормальными гомозиготами. Все же во многих случаях четкую грань между этими двумя группами провести нельзя. Некоторые индивиды имеют промежуточные параметры даже при прямом измерении активности фермента. Это вполне объяснимо, если учитывать, что разные мутации в составе одного и того же локуса вызывают изменения активности фермента различных типов.

Выявление гетерозигот имеет не только научный интерес по изучению механизмов действия ферментов, но и большое практическое значение. Гетерозигот важно выявлять среди людей, родственники которых страдают болезнями, сцепленными с X-хромосомой или аутосомно-рецессивными заболеваниями. В перспективе необходимо также выявлять гетерозиготных носителей генов, родственники которых дают выраженные побочные реакции на лекарственные средства.

Рядом исследований, проведенных с помощью близнецового метода, было показано, что генетические факторы играют важную роль в определении времени полураспада лекарственных средств. При введении препарата ди- и монозиготным близнецам время его полураспада всегда различалось гораздо меньше для монозиготных близнецов. Коэффициент наследуемости показывает, что генетические факторы вносят большой вклад в общий размах времени полураспада препаратов, а в некоторых случаях он доходит до 99% (таблица 19).

Время полужизни лекарственного препарата является в целом постоянным для каждого индивида и, как было отмечено выше, контролируется генетическими факторами. Варианты времени полураспада для большинства лекарственных средств в популяции могут быть представлены в виде кривой Гаусса. После введения средней дозы препарата у определенной части людей (по обе стороны от моды) в организме уста-

навливается либо слишком высокий, либо слишком низкий уровень лекарственного средства (рис. 14). При высоком уровне препарата может

Таблица 19. Результаты измерения скорости метаболизма лекарственных препаратов или стационарного уровня препаратов у близнецов

Препарат	Число пар близнецов	Измеренный параметр	Диапазон измерений	$\Gamma_{\text{м}}^3)$	$\Gamma_{\text{д}}^3)$	h^2 ⁴⁾
Антипирин	9МЗ, 9ДЗ	Время полураспада в плазме (ч)	5,1-16,7	0,93	-0,03	0,99
Фенилбутазон 6 мг/кг (одной дозой, перорально)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме(дни)	1,2-7,3	0,98	0,45	0,99
Дикумарол 4 мг/кг (одной дозой, перорально)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в плазме (ч)	7,0-74,0	0,99	0,80	0,98
Галотан 3.4 мг (одной дозой, внутривенно)	5МЗ, 5ДЗ	Выделение с мочой трифторацетата натрия за 24 ч	2,7-11,4	0,71	0,54	0,63
Этанол 0.5 г/кг (одной дозой, перорально) 1 мл/кг (одной дозой, перорально) 1,2 мл/кг (одной дозой, перорально)	10МЗ, 10ДЗ	(β_{60} мг/мл · ч)	0,051-0,141	0,64	0,16	0,63
	• 7МЗ, 7ДЗ	СДЭ (мг/кг · г) ²⁾	50,00-109,63	0,77	0,77	0,67
	19МЗ.21ДЗ	(β_{60} мг/мл · ч) ¹⁾	0,11-0,24	0,98	-0,38	0,98
		Скорость всасывания (мг/мл · 30 мин)	0,20-1,12	0,56	0,27	0,57
Дифенилгидантоин 100 мг (одной дозой, внутривенно)	7МЗ, 7ДЗ	Время полураспада в сыворотке (ч)	7,7-25,5	0,92	0,14	0,85
Литий 300 мг/12 ч (в течение 7 дней, перорально)	5МЗ, 5ДЗ	Концентрация в плазме (м-экв/л)	0,16-0,38	0,94	0,61	0,86
		Концентрация в эритроцитах (м-экв/л)	0,050-0,102	0,98	0,71	0,83
		Соотношение концентраций эритроцитов в плазме (через каждые 3 дня после введения)	0,18-0,56	0,84	0,62	0,92
Амобарбитал 125 мг (одной дозой, внутривенно)	7МЗ, 7ДЗ	Скорость осветления плазмы (мл/мин)	16,0-67,2	0,87	0,55	0,83
		Скорость очистки в пересчете на вес 1/(кг · ч)	1,76-6,16	0,92	0,60	0,80

Таблица 19. (Продолжение)

		Константа скорости выведения ($ч^{-1}$)	2,09-8,17	0,93	0,03	0,91
Нортриптилин 0,6 мг/кг в день (в течение 8 дней, перорально)	19МЗ, 20ДЗ	Стационарный уровень в плазме (нг/мл)	8-78			
Салицилат натрия 40 мг/кг (одной дозой, внутривенно)	7МЗ, 7ДЗ	Скорость распада салицилата в сыворотке (мг/дл·ч)	-1,02	0,64	0,32	0,86
Аспирин 65 мг/кг в день (в течение 3 дней, перорально)		Уровень салициловой кислоты в сыворотке	11,9-36,4	0,90	0,33	0,98
		Стационарная скорость выделения салицилмочевой кислоты (мг/кг·ч)	0,84-1,91	0,94	0,76	0,89

- 1) β_{60} = скорость исчезновения из крови.
- 2) СДЭ = скорость деградации этанола.
- 3) $r_{M1, D3}$ = внутригрупповой коэффициент корреляции для МЗ и ДЗ близнецов соответственно.
- 4) h_2^2 = (наследуемость) $\frac{V_w(D3) - V_w(M3)}{V_w(D3)}$
- 5) V_w = дисперсия внутри пар близнецов.



Рис. 14. Постоянная концентрация лекарственного вещества в плазме крови и его биологический эффект

возникнуть его токсичность, при низком – отсутствие терапевтического эффекта.

Для широко распространенных признаков характерно отсутствие четкого распределения фенотипов по двум классам. При этом не каждого индивида можно с уверенностью отнести к какому-то определенному классу из-за возможных перекрытий. Даже если область пе-

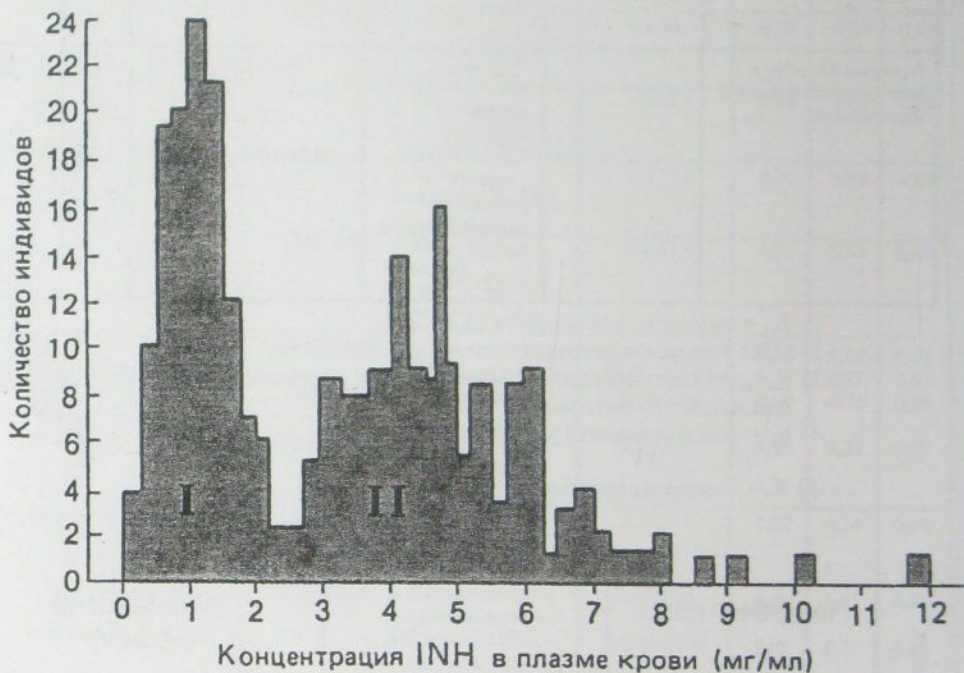


Рис. 15. Концентрация итзониазида в плазме крови 267 людей из 53 семей

рекрывания фенотипических значений относительно небольшая, то общее распределение остается все же бимодальным. Это явление обычно иллюстрируют ставший классическим в фармакогенетике примером распределения концентрации противотуберкулезного препарата – гидразида изоникотиновой кислоты (изониазида) в плазме крови (Ф.Фогель, А.Мотульски, 1989). После приема одинаковой

дозы изониазида его концентрация в плазме крови различных больных оказывается разной, а общее распределение имеет бимодальную конфигурацию (рис. 15). Было высказано предположение, что биотрансформация изониазида детерминирована одним геном. Гипотеза была подтверждена в семейных исследованиях. Так, у гомозигот Ac^s/Ac^s (Ac^s – аллель медленной трансформации) выявлялся высокий уровень лекарства в крови. У гетерозигот Ac^f/Ac^s (Ac^f – аллель быстрой инактивации) и у гомозигот Ac^f/Ac^f выявлялся низкий уровень лекарства. На основании этого был сделан вывод о том, что фенотипические различия в биотрансформации изониазида связаны с генетически обусловленными вариантами фермента N-ацетилтрансферазы. Подтверждение генетической гипотезы было получено благодаря открытию бимодального распределения концентраций лекарственного средства в крови.

Таким образом, при моногенном типе наследования должны наблюдаться качественные различия между продуктами нормального и мутантного генов. При измерении на уровне продукта гена графическая обработка результатов обычно позволяет идентифицировать различные генетические классы в виде отдельных мод на кривой распределения. Так, кривая распределения активности Г-6-ФДГ у мужчин с нормальной активностью и с дефектом этого фермента имеет две неперекрывающиеся моды. Другой пример: все три генетических класса вариантов псевдохоллинэстеразы можно определить в опытах со специфическим ингибитором. Однако при измерении уровня псевдохоллинэстеразы в крови, а не характера его ингибирования, различия не столь выражены, так как между нормальными гомозиготами, гетерозиготами и мутантными гомозиготами соответственно происходит перекрытие (рис. 16).

Изложенные данные указывают на то, что бимодальная (мультимодальная) кривая распределения может рассматриваться как свидетельство моногенного наследования признака. В случаях, когда об активности мутантного гена судят не по его первичному продукту, на результаты исследований будут влиять другие генетические факторы и факторы среды, что может обуславливать мономодальный характер кривой распределения. Мономодальная кривая обычно свидетельствует о полигенной детерминации признака. Исходя

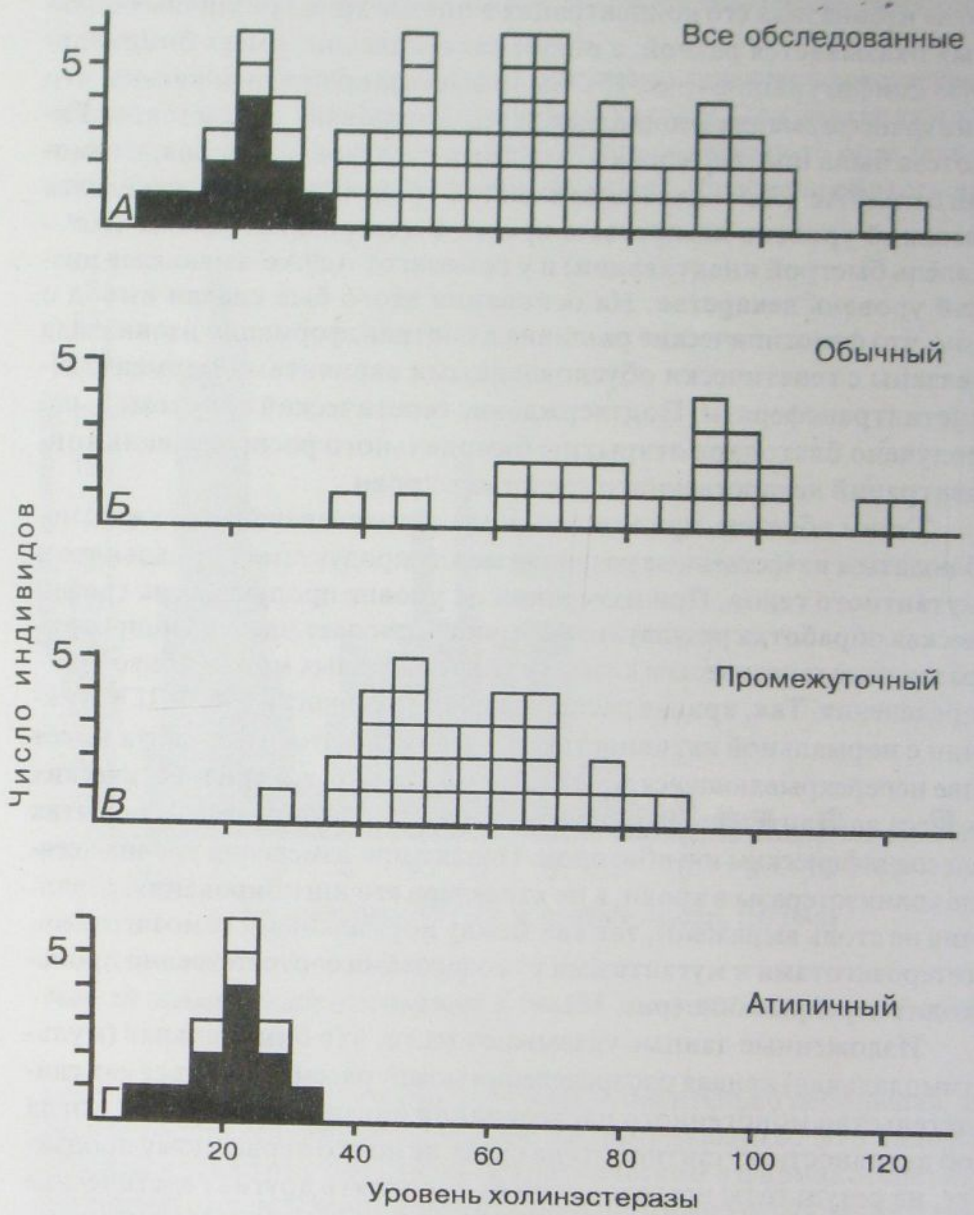


Рис. 16. Распределение уровней активности холинэстеразы сыворотки крови у людей с высокой чувствительностью к суксаметониуму и их родственников

из этого, судить о механизме наследования только на основании распределения частот следует с осторожностью.

В-четвертых, большие затруднения вызывают сопоставления данных литературы и интерпретация результатов, полученных различными исследованиями, так как во многих случаях для ферментов применялись разные субстраты (тест-препараты). При анализе данных следует учитывать возможные различия между ними. Это в наибольшей мере проявляется, когда один тест-препарат позволяет оценить пути его биотрансформации в зависимости от образующихся метаболитов. Примером могут служить результаты исследований на 60 добровольцах (Испания) после приема 250 мг амидопирина. Характерно участие в метаболизме этого лекарственного средства ферментов цитохрома P-450 и NAT. Установлено, что экскреция метаболитов амидопирина в течение 24 часов составляла: неизмененного амидопирина $0,2 \pm 0,2$ мг; метиламидопирина $4,5 \pm 2,8$ мг; формиламидопирина $18,5 \pm 10,1$ мг; аминокамидопирина $9,2 \pm 6,6$ мг; ацетилированного амидопирина $31,8 \pm 21,1$ мг. При этом отмечены значительные индивидуальные различия до 12-200-кратных величин. Ацетилирование подчинялось достоверному полиморфному распределению и не коррелировало с другими метаболическими путями. Метаболиты цитохромов имели высокую степень корреляции между собой.

При сравнении метаболизма амидопирина и кофеина установлено, что активность фенотипов медленных ацетиляторов была более, чем в 3,8 раза ниже. Показатели деметилирования амидопирина, осуществленного цитохромами, имеет высокую степень корреляции, так же, как и метаболиты кофеина.

Сходные результаты получены при оценке применения разных тестов активности NAT при метаанализе у выходцев из Китая. Исследования не выявили значительных отличий между результатами тестов с изониазидом, сульфадимезином и сульфаметазиним. Частота медленных ацетиляторов составляла 24,5 %, совпадая с таковой у коренных жителей Китая. При этом частота медленного генотипа совпадает с частотой фенотипа NAT2. Наиболее распространенны-

ми были аллели *4/*4 (29,9 %); *4/*6A (27,4 %); *4/*7A (12 %); *6A/*6A (11,3 %).

В японской популяции (140 человек), по данным теста с кофеином, частота медленных ацетиляторов, а также при использовании изониазида и дапсона составляла 10,7 %, быстрых – 89,3 %. В Дании (335 обследованных), по данным теста с кофеином, быстрые ацетиляторы составили 47 %, а медленные – 53 %.

В-пятых, нередко экспериментальные данные, полученные у обезьян и других животных, используемых для тестирования и оценки ферментзависимой фармакокинетики, зачастую экстраполируют на человека без коррекции клиническими наблюдениями. В то же время сравнительные исследования свидетельствуют о биологических различиях. Установлено, что внутривидовые различия активности восьми цитохромзависимых ферментов субклеточных фракций печени у обезьян мало выражены, но она превышала метаболическую активность у человека; значительные отличия активности отмечены и у собак. Генетический полиморфизм для ацетилирования с изониазодом был отмечен только у человека с 200-кратными различиями между индивидуумами.

В печени собак не образуются ацетилированные метаболиты промутагенного ароматического аминобензида с формированием канцерогенных продуктов ДНК, как у мышей, хомячков или крыс. Ацетилирование бензида у человека осуществляется преимущественно полиморфным NAT1, что в 3 раза интенсивнее, чем NAT2. В соответствии с экспериментально-заданными 20-кратными вариациями содержания ацетил-КоА в образцах печени кинетические параметры ацетилирования менялись, в них не наблюдалась корреляция с генотипом NAT2, однако результаты ацетилирования были сопоставимы с NAT1*4 аллелям. Следовательно и бензидин, и ацетилбензидин являются субстратами преимущественно для NAT1. Таким образом, разнообразие активности ферментов биотрансформации может быть причиной уязвимости к химическому лекарственному повреждению. Так, например, при сравнительном исследовании содержание основного метаболита нитразепама 7-ацетиламинонит-

разепама в 8,5 раза выше в цитозоле печени у беременных крыс, чем у мышей, а уровень диацетилированного метаболита, наоборот, в 9 раз выше в микросомах печени мышей, чем у крыс. Поэтому 7-ацетиламинонитразепам и вызывал множественные пороки развития у крыс и они отсутствовали у мышей. У этих животных очевидна различная чувствительность к нитразепаминдуцированному тератогенезу в зависимости от активности NAT.

В-шестых, органная вариабельность активности ферментов также влияет на относительный прогноз фармакотерапии. В большинстве исследований оценивается ферментативный метаболизм печени. В то же время активность процессов детоксикации в организме определяется комплексом ферментных систем легких, слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, почек, мозга, кожи. Это требует оценки метаболических профилей и локализации ферментов для каждого лекарственного средства в различных органах, особенно при нарушениях функций печени. В различных тканях роль NAT1 и NAT2 отличается. Например, мономорфное распределение NAT1 представлено только в мононуклеарах с большой тропностью к метаболизму сульфаметоксазола, что влияет на его терапевтические концентрации в плазме крови, хотя и NAT2 гепатоцитов в определенной мере модифицирует его токсичность.

Перечисленные выше причины в определенной степени могут объяснить отсутствие широко применяемых превентивных мер для оптимизации фармакотерапии в медицинской практике. В научной литературе высказывалось мнение о серьезных ограничениях концепции тестовых препаратов. Это основывается на том, что результаты оценки активности ферментов биотрансформации лекарственных средств являются прозаичной картиной сочетания перечисленных факторов с их разнонаправленной векторностью и удельным весом у разных индивидуумов.

Успешное развитие фармакогенетики в последние годы позволило установить некоторые принципиальные положения, которые применительно к химиотерапии следует обязательно учитывать и развивать с целью терапевтического контроля, прогноза эффективности и

безопасности лекарственных средств. К установленным проявлениям генетического полиморфизма относятся метаболическая активность NAT, изоэнзимов гена CYP2D6 – дебризохин – спартеиновый полиморфизм или гена CYP2C8, CYP2C9, CYP2C10 – мефентоиновый полиморфизм.

Глава 7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА И СОВРЕМЕННАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

7.1. Значение расшифровки генома человека для медицины

Достижения в области молекулярной биологии в последние десятилетия XX ст. привели к возникновению молекулярной медицины – нового междисциплинарного направления исследований. Это, в свою очередь, инициировало развитие прогрессивных технологий, которые совершенствовали старые и создавали новые методы. Подавляющее большинство этих методов автоматизировано и сопряжено с компьютерными технологиями. Наглядными примерами являются автоматические подходы секвенирования генома человека и следующие за ними исследования человеческого протеома. Новые технологии позволяют довольно быстро получить колоссальный объем информации о структуре до сих пор неизвестных белков. Последующее выделение и изучение их функций позволит досконально исследовать клеточные процессы, механизмы индивидуального развития, эволюции живого мира.

Идентификация новых белков усилит интеграцию биологии и фундаментальной медицины, что приведет к открытию новых диагностических маркеров, выявлению белков-мишеней для фармакологических препаратов. Большие надежды возлагаются на изучение протеома опухолей, что позволит улучшить их диагностику и особенно лечение.

Усилиями многих ученых, работающих в проекте “Геном человека” и в частной компании Celera Genomics, к началу 2001 года были представлены две предварительные версии генома человека.

Обе версии содержат еще много пробелов и неточностей, которые продолжают устраняться. Тем не менее, полученные результаты позволили сопоставить геном человека с геномами других эукариот (дрожжей, червя, мухи дрозофилы и растения). Установлено, что последовательность генома человека, как и других эукариот, состоит из областей, кодирующих белки (? 2 %), областей, кодирующих РНК (? 20 %), а более 50 % составляют повторяющиеся последовательности, которые трудно клонируются и поэтому дают много пробелов.

Итак, большая часть генома человека не кодирует белки. В эту часть входят фрагменты, кодирующие только РНК и области ДНК повторов.

Тысячи генов у человека только транскрибируются и продуцируют РНК, которые не кодируют белок (нкРНК). Идентифицировано также около полутысячи генов для транспортных РНК. Нет пока полных последовательностей для рибосомальных РНК (рРНК), хотя интерес к ним очень большой, учитывая их роль в образовании пептидных связей при трансляции.

Кроме того, идентифицированы около 80-ти малых ядерных РНК, участвующих в сплайсинге незрелой РНК, а также около сотни генов малых ядрышковых РНК, участвующих в процессинге.

Гены нкРНК и возникшие из них псевдогены малы по своим размерам и не имеют групп-специфических структурных особенностей, их поиск с помощью компьютерных методов затруднен, хотя они очень распространены в геноме человека.

Давно установлено, что нет прямой корреляции между количеством ДНК в клетке и уровнем организации живых существ. Например, геном человека в 200 раз меньше генома амебы. Причиной этому является то, что в геноме эукариот очень много повторов (более 50 % ДНК). Их разделяют на несколько групп:

1. Длинные и короткие, возникшие из подвижных элементов и рассеянные по всему геному повторы. Они составляют примерно 45 % генома человека.
2. Неактивные копии генов (псевдогены), которые образовались в результате обратной транскрипции.

3. Простые повторы последовательностей, состоящие из 10-13 оснований (“микросателлиты”), либо более длинных повторов (14-50 оснований), именуемых “минисателлитами”. В популяциях человека простые повторы характеризуются значительным полиморфизмом по длине, что имеет важное значение для генетических исследований.

4. Повторы больших (от 1 до 200 т.п.н.) сегментов ДНК, которые копируются из одного района генома в другой в одной хромосоме или между разными хромосомами.

5. Часто наблюдаемые около центромеров хромосом и в теломерных участках хромосом человека тандемно повторяющиеся последовательности.

Ранее считалось, что ДНК-повторы не представляют научного интереса и это в последующем привело к ряду ошибочных выводов. В настоящее время предполагают, что “эгоистичная ДНК” (термин предложен Ф.Криком) создает новые регуляторные элементы или генерирует новые гены. В геноме человека насчитано 47 генов – производных от обычных транспозонов.

Важным достижением при расшифровке генома человека было установление количества генов, кодирующих белки. На момент объявления о практическом завершении расшифровки генома ученые группы “Геном человека” насчитали 32 000 белок-кодирующих генов, а группа Celera Genomics – около 40 000, что оказалось намного меньшим, чем постулировалось ранее (до 150 000). Предполагается, что протеом человека может содержать до 250 000 разных белков. Столь большое различие между ожидаемыми и фактически полученными данными можно объяснить следующими причинами. Во-первых, полная расшифровка не завершена и многие вопросы идентификации генов еще предстоит решить. Во-вторых, не исключено, что человек каким-то непонятным образом экономно использует минимальное количество генов для шифровки большого количества белков. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут установить точное количество белок-кодирующих генов у человека.

Полученные данные позволяют охарактеризовать типичный ген человека. Он состоит примерно из 28 000 оснований и включает в себя восемь экзонов. Кодированная последовательность такого гена имеет около 1300 п.н. и несет информацию о белке, состоящем из

450 аминокислот. Самый большой из обнаруженных генов человека – ген дистрофина ($2,4 \times 10^6$ п.н.). Фибриллярный белок титин включает 27 000 аминокислотных остатков, а его ген содержит самое большое (234) число экзонов среди всех обнаруженных генов человека.

Структура генов человека намного сложнее, чем у других эукариот: часто они прерываются большими интронами, примерно 35 % генов могут считываться с разными рамками, 40 % иРНК могут подвергаться альтернативному сплайсингу. Следовательно, одна последовательность ДНК может кодировать более чем один тип иРНК.

В человеческой популяции широко распространены одиночные замены нуклеотидов – полиморфизм одиночных нуклеотидов – single nucleotide polymorphism (SNP). В геноме человека точно картированы 1,42 млн одиночных нуклеотидных замен. Они чаще встречаются в областях кодирующих генов, чем в участках повторов ДНК. Внутри генов обнаружено 60 000 одиночных замен нуклеотидов. Практически каждый ген человека отличается вариабельностью. В геноме человека есть области с повышенной и пониженной вариабельностью. Например, области главного комплекса гистосовместимости (МНС), кодирующие белки гистосовместимости, отличаются значительной вариабельностью, определяя иммунологическую индивидуальность человека.

Генетический полиморфизм имеет большое биологическое значение для человека. Так, полиморфизм гена апоЕ4 способствует увеличению плотности бляшек при болезни Альцгеймера, а делеция гена, кодирующего хемокиновый рецептор CCR 5, повышает устойчивость к вирусу иммунодефицита человека. Этот корецептор необходим, наряду с рецептором CD 4, для связывания и проникновения вируса в Т-лимфоцит. При сравнении расположения и частоты одиночных замен у больных и здоровых людей устанавливаются те замены, которые связаны с той или иной болезнью. Такие сопоставления позволяют выяснить роль определенных генов в развитии мультифакториальных заболеваний. Исследования в этом направлении весьма перспективны и интенсивно развиваются в настоящее время.

В 1994 году в молекулярной биологии возник новый термин – протеом. Он подразумевает описание всей совокупности белков, которые синтезируются в течение жизни клеток организма. Область исследования структуры и функции белков – продуктов функционирования генов получила название протеомика. Ее значение в медицине чрезвычайно важно, так как будут идентифицированы белковые маркеры различных болезней. Перспективно также изучение эффектов взаимодействия лекарственных веществ с геномом человека (фармакогеномика).

Следует отметить, что расшифровка первичной структуры белков на основе изученных белок-кодирующих генов еще не указывает на раскрытие функций тех или иных продуктов генов. За этим следует длительный систематический анализ протеома человека. Большое значение в расшифровке роли определенных белок-синтезирующих генов имеет сравнение первичной структуры белков с известными и неизвестными функциями, которые получены от представителей видов различного уровня эволюционного развития. Сегодня такая работа начинается. На основе установления только первичной структуры белка нельзя говорить о точной его функции. Тем не менее, изучение генома дает важную информацию о возникновении белковых доменов, о расширении их семейств, семейств самих белков и т.д.

В геноме человека обнаружены гены, гомологичные таковым в геноме мухи (61 %), в геноме червя (43 %), в геноме дрожжей (46 %). Это – основной набор генов, кодирующих главные жизненные процессы в клетке: основной метаболизм, репликация и репарация ДНК, биосинтез белка.

Выявлено также более 220 генов, продукты которых похожи на белки бактерий, но не похожи на белки дрожжей, растений, беспозвоночных. Скорее всего, эти гены попали в геном человека путем переноса от бактерий.

Сопоставление генома человека и исследованных беспозвоночных позволило установить значительно большее количество генов, отвечающих за различные регуляторные функции в организме: защита и иммунность; развитие, структура и функции центральной

нервной системы; белков, участвующих в построении цитоскелета и движении везикул; внутри- и межклеточная сигнализация в развитии и гомеостазе; транскрипция и трансляция; гемостаз; апоптоз и др.

Для генома человека характерно увеличение белковых семейств, участвующих в развитии нервной системы: нейротрофические факторы, факторы роста нервов, миелиновые, синаптические белки, сигнальные молекулы. С помощью традиционных методов выявлен ряд генов для белков цитоскелета клетки человека и высших позвоночных. При секвенировании генома гены большинства этих больших и многодоменных моторных белков обнаружены у человека.

По сравнению с беспозвоночными, у человека существенно расширилось семейство белков, которые участвуют в процессах развития и дифференцировки: фактор роста фибробластов, фактор роста нервов и другие факторы роста: гормоны, рецепторы, сигнальные молекулы, факторы транскрипции. Количество генов, кодирующих транскрипционные белки, а также белки, участвующие в посттранскрипционных процессах, у человека оказалось значительно больше, чем у беспозвоночных.

Секвенирование генома послужило толчком к исследованию генов, ответственных за болезни человека. Требуется проведение функциональной классификации самих генов и их продуктов – белков. Все гены (923), вызывающие моногенные заболевания или повышающие вероятность возникновения болезни, характеризовались по функции их продуктов в отношении патологического процесса и клинических проявлений. Наибольшую функциональную группу составили ферменты (31 %). Вторая по величине группа – группа белков-активаторов и стабилизаторов, белков, участвующих в правильном сворачивании полипептидных цепей (14 %). Каждая из остальных групп (рецепторы, факторы транскрипции, трансмембранные переносчики и др.) составляли менее 10 % от всех генов, вызывающих болезни. Корреляционный анализ между функцией продуктов генных болезней и возрастом больных показал, что болезни, связанные с нарушением функции ферментов, проявляются на всех этапах развития. В то же время болезни, связанные с генами, кодирующими транскрипцион-

ные факторы, проявляются на этапе внутриутробного развития.

Таким образом, секвенирование генома человека свидетельствует об усложнении генома в ходе эволюции от дрожжей до человека. Однако количество генов увеличивалось только в 5 раз. Усложнение заключается в возникновении большого числа белков, а не белок-синтезирующих генов. Организм человека, используя известные структурные конструкции, собирает новые белки с новыми функциями. Возможно, это достигается с помощью сложных механизмов пост-транскрипционных процессов.

Следует отметить, что описанные достижения еще не являются расшифровкой генетического “текста”. Настоящее чтение генетического текста, перевод его с языка молекул на язык характеристик морфологических и функциональных особенностей человека, его болезней только начинается. Тем не менее, уже сейчас становится очевидным, что молекулярная медицина занимает ведущие позиции в клинических исследованиях и начинает внедряться в практическое здравоохранение.

7.2. Гены и их экспрессия

Большинство генов эукариот, в отличие от генов прокариот имеет прерывистую структуру. Относительно короткие кодирующие участки (экзоны) чередуются с некодирующими участками (интроны). Регуляторные элементы гена – промоторы, определяющие точность инициации, транскрипции, локализованы перед первым экзоном на 5'-конце нити ДНК и представлены несколькими элементами (ТАТА-, ССААТ-боксы, GC-мотив). Экспрессия генов регулируется также усилителями (энхансеры), ослабителями (сайленсоры), а также инсульторами (ограничители действия энхансеров) и элементами отклика, взаимодействующими с факторами транскрипции, ксенобиотиками, стероидными гормонами и др. Эти последовательности участвуют в определении частоты инициации транскрипции.

По выполняемой функции в клетке эукариотические гены делятся на несколько групп.

Первую группу составляют гены, экспрессирующиеся во всех типах клеток. Продукты их деятельности – белки, необходимые для

обеспечения жизнедеятельности любой клетки организма (гены рибосомальных РНК, гистонов и др.).

Вторая группа – тканеспецифические гены, которые функционируют только в определенных типах клеток или тканях на определенных стадиях онтогенеза (гены глобулинов, альбумина, α -фетопротейна, иммуноглобулинов, мышечных белков, секреторных белков эндокринных и пищеварительных желез и многие другие).

Третью группу составляют гены, которые кодируют различные белки, участвующие в регуляции транскрипции (транскрипционные факторы). Белковые продукты этих генов взаимодействуют с регуляторными участками генов, вызывая усиление или подавление экспрессии.

К четвертой группе относят гены, экспрессия которых индуцируется внешними факторами, в том числе ксенобиотиками.

Первый этап реализации генетической информации – транскрипция. Гены эукариот транскрибируются в виде предшественника, который состоит из экзонов и интронов (незрелая иРНК). Затем интроны вырезаются специальными ферментами, а экзоны последовательно сшиваются друг с другом, формируя готовый для трансляции транскрипт (зрелая иРНК). Этот процесс получил название сплайсинга. Одна и та же последовательность ДНК может кодировать несколько различных белков, благодаря так называемому альтернативному сплайсингу (образование разных иРНК за счет изменения чередования соединения экзонов из одного первичного РНК транскрипта).

После транскрипции или параллельно с ней незрелая иРНК подвергается дальнейшей модификации. К 5'-концу пре-иРНК с помощью фермента присоединяется метилированный остаток гуанина в 7-м положении пуринового кольца (процесс кэпирования). Считается, что кэп (шапочка) необходима для правильной ориентации и присоединения рибосом к иРНК перед началом трансляции. К 3'-концу пре-иРНК также ферментативно присоединяется короткая нуклеотидная последовательность, состоящая из остатков аденина (полиаденилирование). Полагают, что поли-А-последовательность необходима для транспорта иРНК через ядерную мембрану в цитоплазму.

Для поддержания внутриклеточного гомеостаза функционирующей эукариотической клетки необходимы механизмы оперативной коррекции экспрессии генов. На уровне транскрипции этот процесс состоит из следующих этапов. На первом этапе формируется прединициационный комплекс. В нем участвуют шесть основных белков: TFIIA (B, D, E, F, H) и РНК-полимераза II (в случае генов класса II). На втором этапе идет сборка комплекса, отличного от выше описанного. Он формируется за счет взаимодействия проксимальных регуляторных элементов со специфическими транскрипционными факторами-белками. Взаимодействие этих белков (через различные кофакторы) с прединицирующим комплексом обеспечивает частоту транскрипции данного гена в зависимости от функционального состояния клетки или воздействия внешних сигналов.

Координацию транскрипции генов, активирующихся синхронно при воздействии на клетку нескольких сигналов, осуществляет семейство интегрирующих коактиваторов (белки р 300/СВР).

Коррекция в экспрессию генов может вноситься на промежуточных этапах между транскрипцией и трансляцией: на стадиях процессинга, посттранскрипционной модификации, транспорта транскриптов из ядра в цитоплазму; а также трансляции на рибосомах.

Таким образом, эукариотическая клетка реагирует на внешние сигналы, индуцируя синтез определенных белков. Одной из основных задач геномики является изучение экспрессии генов при различных заболеваниях и воздействии внешних факторов. Отсюда вытекает и важная проблема фармакогеномики, заключающаяся в идентификации дифференциально экспрессирующихся генов и их функционального состояния под воздействием того или иного лекарства или изучаемого соединения. Это позволит определять возможность их направленной регуляции.

7.3. Методы, применяемые в фармакогенетике

К настоящему времени разработан ряд методов для исследования дифференциальной экспрессии генов.

Метод дифференциального дисплея был разработан в 1992 году Р. Liang и А. Pardee. Авторы исходили из предположения, что в клет-

ке экспрессируется ≈ 15 тыс. генов. В принципе, на основе каждой индивидуальной молекулы иРНК можно получить фрагмент кодирующей ее ДНК путем обратной транскрипции (кДНК). Затем этот фрагмент можно многократно воспроизвести методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). При постановке ПЦР авторы использовали необычную пару праймеров. Прямой праймер – короткая последовательность из 10 нуклеотидов произвольного состава – закоривающие основания (произвольный праймер). Обратный праймер состоял из двух частей. К нескольким остаткам дезокситимина (олиго-dT) присоединяются два дополнительных нуклеотида произвольного содержания. Наличие олиго-dT последовательностей позволяет выделить только поли-А содержащую иРНК. Одновременно она является затравочной молекулой в реакции обратной транскрипции. Прямой праймер позволяет синтезировать большое разнообразие кДНК разной длины. Связано это с тем, что возможность локализации данной последовательности в одном и том же месте в иРНК, транскрибированных с разных генов, крайне мала.

После амплификации набор кДНК разделяют путем электрофореза в полиакриламидном геле и проводят сравнительный анализ различных фрагментов электрофореграмм в опытных и контрольных образцах. Интересующие фрагменты выделяют из геля, определяют путем секвенирования первичную структуру кДНК, проводят компьютерный анализ и с помощью банков данных о нуклеотидных последовательностях идентифицируют выявленные гены.

Если использовать большое количество прямых произвольных праймеров, варьируя их нуклеотидный состав, и изменять все возможные сочетания двух пар нуклеотидов в Т-якорном праймере, то можно получить информацию о значительном числе транскриптов.

Метод дифференциального дисплея, относительно простой в исполнении, не требует больших затрат, средств и времени, позволяет работать с небольшим количеством исходного материала, из-за чего нашел широкое применение в научных исследованиях. Однако этот метод имеет ограничения и недостатки. Во-первых, праймеры, которые применяются в ПЦР, имеют низкую температуру гибридизации с матрицей ($\approx 40^\circ \text{C}$), что снижает специфичность амплификации и ведет

к появлению ложно-положительных результатов. На электрофореграмме видно множество избыточных полос, которые не соответствуют реальной дифференциальной экспрессии. Проблема артефактов решается путем модификации структуры праймеров, изменения условий ПЦР, повторяя исследования. Дальнейшему анализу подвергались лишь постоянно проявляющиеся полосы. Во-вторых, при амплификации образуются преимущественно короткие (200-300 п.н.) фрагменты, несущие информацию о 3'-нетранслируемых областях иРНК. Их определение недостаточно для идентификации генов и предсказания их функций. Изменяя условия ПЦР, удалось получить фрагменты кДНК длиной свыше 2 тыс. п.н. Однако самым серьезным недостатком считается невозможность проведения систематического сравнения анализируемых образцов по всем видам иРНК. На основе стандартного метода дифференциального дисплея разработан ряд модификаций, направленных на преодоление ограничений и повышение чувствительности и воспроизводимости методики.

Метод вычитающейся гибридизации был использован E. Bautz и E. Reilly (1966) для поиска последовательности, соответствующей небольшой делеции в геноме бактериофага T4. Вычитание – процесс повторяющихся этапов молекулярной гибридизации набора кДНК одного тестируемого (трейсер) образца с избытком кДНК другого сравниваемого (драйвер), контрольного образца. От образовавшихся гибридов отделяют фракцию, которая не участвовала в гибридизации. Она и содержит искомые последовательности.

Основными недостатками первых, получаемых с помощью этого метода обогащенных библиотек, то есть полного набора непрогибридизовавшейся популяции кДНК, являлась низкая степень представленности искомых последовательностей-мишеней, “неулавливание” редко встречающихся в клетке транскриптов, а также трудоемкость самого метода. В дальнейшем метод прошел ряд усовершенствований, направленных на их устранение. Из них необходимо отметить следующее.

Метод репрезентативного дифференциального анализа (Representational Difference Analysis – RDA) изначально был предназначен для поиска различий между двумя сложными геномами. Для обогащения искомыми последовательностями сравниваемые геномы

упрощались путем разделения драйверной и трейсерной кДНК рестрикционными эндонуклеазами. К 5'-концам полученных фрагментов присоединяли дефосфорилированные короткие нуклеотидные последовательности известного состава, содержащие сайт узнавания определенной рестриктазы (адаптеры) и ставили ПЦР с гомологичными этим адаптерам праймерами.

После такой обработки драйвер и трейсер представляют смесь фрагментов приблизительно одинакового размера. Они использовались для вычитания. Далее адаптеры удаляют и к трейсерным ампликонам присоединяют новые адаптеры. После стадии гибридизации проводили ПЦР с праймером, который соответствовал части последовательности нового адаптера. Амплификации будут подвергаться только двухцепочечные гибриды трейсера, имеющие участки для связывания праймера. Каждый новый этап "вычитание-гибридизация" приводит к обогащению специфическими последовательностями, которые затем клонируют и анализируют.

Метод RDA успешно используется для конструирования кДНК библиотек, поиска и идентификации генов, дифференциально экспрессирующихся в ходе различных биологических процессов или под воздействием внешних факторов.

Методы, разработанные на основе вычитающейся гибридизации, не требуют предварительной информации о структуре искомым генов.

Определить профиль экспрессии редких генов и работать с небольшим количеством ролі-А содержащей иРНК можно с помощью метода, основанного на эффекте селективной супрессии ПЦР (С.А. Лукьянов и соавт., 1994). Супрессионная вычитающая гибридизация дает возможность одновременной нормализации количества транскриптов внутри исследуемой популяции кДНК и вычитать общие для драйвера и трейсера последовательности. Для этого используют два различных адаптера, которые присоединяются к фрагментам трейсера. Полученные два вида тестера гибридизуются с рестрикционными фрагментами драйвера, находящимися в большом избытке. При этом в ПЦР амплифицируются преимущественно только последовательности, в которых гибридизировались цепи трейсера, соединенные с

разными адаптерами. В значительном количестве образуются лишь последовательности, специфические только для трейсера.

К сожалению, все эти методы в полной мере не соответствуют задачам фармакологического анализа. При их применении трудно рассчитывать на полную идентификацию всех генов, экспрессирующихся в ответ на действие определенного лекарственного препарата и, соответственно, на понимание механизмов его действия. В то же время они дают возможность создания кДНК – библиотек и лишь с их помощью можно выявлять новые гены.

Достижения в области геномики послужили толчком к развитию новых технологий в области молекулярной биологии, в том числе и созданию технологии так называемых микрочипов. Теория создания микрочипов основана на гибридизации олигонуклеотидов известной последовательности, иммобилизованных на твердой поверхности в строго определенных местах, с меченой различными способами пробой. Способствовали созданию данной технологии последние достижения в информатике, химии полупроводников, микроэлектронной промышленности, а также обилие информации, которая накопилась за годы работы над программой “Геном человека”.

ДНК-чип – миниатюрная пластина с микрочайками. Каждая микрочайка содержит искусственно синтезированные олигонуклеотиды, соответствующие фрагментам определенных генов, выступающих в качестве матрицы. В этих ячейках происходит комплементарное взаимодействие матрицы и пробы (кДНК исследуемых образцов). В настоящее время существует два направления в создании ДНК-чипов. Они различаются способом синтеза и нанесения матричных олигонуклеотидов.

Первое направление основано на предварительном синтезе олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды синтезируют химически или с помощью ПЦР (длина от 500 до 5000 оснований) и затем наносят на обработанную специальным образом стеклянную поверхность с помощью роботов. Такие типы чипов получили название кДНК-микрочипов (сDNA-microarray). В ПЦР амплифицируются последовательности кДНК определенных генов. Из-за этого данный тип чипов до-

рогостоящий, так как необходимо создавать собственную кДНК-библиотеку или приобретать ее у крупных исследовательских центров.

кДНК-микрочипы оказались непригодными для проведения исследований полиморфизма (генетическая изменчивость отдельного локуса в определенной популяции), мутационного анализа, сравнительного изучения экспрессии большого количества генов, так как плотность размещения матричных олигонуклеотидов очень ограничена (число ячеек составляет ≈ 1000 на чип). Кроме того, применение длинных фрагментов ДНК (кДНК) снижает специфичность гибридизации с исследуемой пробой и появляются ложноположительные сигналы, не соответствующие реальной экспрессии генов.

Несмотря на перечисленные недостатки, основное преимущество кДНК-микрочипов – возможность варьирования качественного и количественного состава фрагментов генов. Компании Incyte и Synteni готовят кДНК-микрочипы на заказ, исходя из целей исследования и возможностей исследователя.

Более перспективное направление создания чипов – применение фотолитографических технологий, которые дают возможность одновременно интегрировать огромное количество олигонуклеотидов любой последовательности непосредственно на поверхности чипа. Плотность размещения синтезированных таким образом нуклеотидов может достигать 1 млн на 1 см². Такие чипы, получившие названия ДНК-чипов (DNA-chips), производится фирмой Affymetrix Inc. Матрица ДНК-чипа – короткая (20-25-мерная) олигонуклеотидная последовательность, причем каждому гену соответствует 15-20 таких олигонуклеотидов, что значительно повышает точность и воспроизводимость результатов. ДНК-чипы позволяют одновременно оценивать экспрессию практически неограниченного количества генов, производить исследование полиморфизма, в том числе и однонуклеотидных замен (SNP). В этом случае синтезируются олигонуклеотиды, специфические для каждой последовательности конкретного гена, учитывая все возможные варианты взаимного расположения нуклеотидов.

При проведении исследований чип гибридизуется с меченой различными способами пробой. При сравнительных исследованиях про-

бой, как правило, служит кДНК, полученная из контрольного и сравниваемого образцов. В качестве метки используются как радиоактивно меченые молекулы, так и флуоресцентные красители, непосредственно присоединенные к исследуемым образцам. При проведении сравнительного анализа обычно применяют двухцветную детекцию, при которой контрольная и опытная кДНК метятся разными красителями. Результаты регистрируют по интенсивности гибридных сигналов тех ячеек чипа, где произошла гибридизация, с последующей компьютерной обработкой данных.

Производятся и упрощенные варианты чипов с небольшим набором генов (в пределах 1000-2000). На нейлоновой мембране фиксируются короткие последовательности известных генов. Они гибридизуются с радиоактивно меченой пробой. Гибридизация детектируется методом радиоавтографии.

Следует отметить, что работа с чипами требует специального дорогостоящего оборудования для проведения гибридизации. Ожидается, что в ближайшие годы цены на комплекты оборудования для производства чипов и работы с ними будут снижены в связи с насыщением рынка.

Разработка и внедрение в науку и практику новых технологий часто является движущим моментом в развитии медико-биологических отраслей знаний как, например, это было с разработкой в недавнем прошлом технологии ПЦР. Развитие молекулярной биологии в настоящее время многим обязано ПЦР, а теперь и микрочипам. Внедрение технологии микрочипов принципиально и для фармакологии. Разработка новых лекарственных средств уже сейчас начинает основываться на информации о функциональной роли определенных генов в развитии патологии. Поэтому сроки разработок могут сократиться с 10-15 до 5-8 лет.

По данным литературы последнего десятилетия известно, что большинство болезней характеризуется определенным профилем экспрессии генов. Сравнение их профилей в норме и при патологии позволяют выявить гены, вовлеченные в этиологию и патогенез того или иного заболевания. Так, R.A.Heller et al. (1997) использовали чип, который содержал около 100 генов, предположительно участвующих в развитии вос-

паления. При сравнении кДНК из тканей больных ревматоидным артритом и колитом показал качественное сходство профилей экспрессии большинства генов, в том числе интерлейкина-3, хемокина G_{ro} α , матричной металлоэстеразы и др. Это подтвердило единый принцип развития воспаления при данных заболеваниях. Одновременно были выявлены гены, специфически экспрессирующиеся лишь при ревматоидном артрите (тканевой ингибитор металлопротеазы I-ферритин, Mn-супероксиддисмутаза, которые могут стать мишенями для лекарственных препаратов.)

H.Zhu et al. (1998) мониторируют генную экспрессию культуры клеток интактных и зараженных цитомегаловирусом фибробластов. При этом были идентифицированы вовлеченные в вирус - индуцированный патогенез гены, на которые может быть направлено действие лекарственных средств.

Проведенный с помощью микрочипов анализ иРНК продуктов различных опухолей позволил установить около 50000 генов, дифференциально экспрессирующихся при различных формах рака. В частности, для клеток рака молочной железы была выявлена повышенная активность 280 генов. Предполагается, что поиск лекарственных средств, направленных именно на эти гены, представляется наиболее перспективным с целью лечения рака молочной железы.

Разрабатывается также направление применения микрочипов с целью выявления лекарственного полиморфизма, лежащего в основе разнообразия индивидов на один и тот же лекарственный препарат. Одним из наиболее часто встречающихся видов полиморфизма является SNP (однонуклеотидные замены). Он встречается, в среднем, через каждые 300-400 п.н., отличается высокой стабильностью и служит надежным фармакогенетическим маркером.

Так, обнаружены полиморфные варианты по SNP гена рецептора дофамина: D₂ - 3 варианта, D₃ - 1, D₄ - 2, D₅ - 5 вариантов SNP. Полиморфизм по SNP гена АпоЕ ассоциирован с болезнью Альцгеймера. Только 40 % носителей мутантной аллели E4 этого гена чувствительны к лечению такрином (ингибитор ацетилхолинэстераз). Препарат S12024, который используется для лечения этой болезни, более эффективен у больных, несущих аллель E4.

К настоящему времени картировано более 60000 SNP, что соответствует 1 SNP на 1.08 т.п.н. Как было отмечено выше, SNP широко представлены в геноме человека. Оптимальной считается их детекция на ДНК-чипах. Сейчас идет интенсивная разработка чипов такого типа, связанная с усовершенствованием существующих фотолитографических технологий и систем детекции. Например, фирма Affymetrix предлагает CYP2C6/CYP2D19 GeneChip® для тестирования медленных метаболитов лекарственных средств, которые метаболизируются ферментами этих генов.

Специалисты в области фармакогенетики интенсивно работают еще в одном перспективном направлении, связанном с применением микрочипов, а именно, возможностью массового скрининга вновь синтезированных химических соединений на предмет проявления специфической биологической активности. Потенциальные лекарственные средства можно отбирать на основе сопоставления характера экспрессии с известными, сходными по механизму действия лекарственными средствами (“эталоны”). В таких случаях информация обо всех химических соединениях, обладающих характерным профилем экспрессии, суммируется в компьютерных базах данных. В качестве примера могут быть результаты экспериментальных данных, полученных S. Braxton et al. (1998). Они моделировали воспаление, подвергая культуру клеток U937 обработке различными агентами (комбинация липосахаридов с фактором некроза опухолей) в присутствии 10 стероидных препаратов, обычно используемых в терапии воспаления. Данные о дифференциальной экспрессии генов были получены с помощью чипа на 10000 генов. Для сопоставления эффектов различных стероидов, создана матрица расстояний на основе корреляции тех генов, дифференциальная экспрессия которых отличалась более чем в 3 раза в любом из экспериментов. Кластеризацию рассчитывали с помощью программы KITCH. Как показал кластерный анализ, такие стероиды, как флуоцинолон, дексаметазон, преднизолон и гидрокортизон, дали сходную картину экспрессии. Формирование кластеров лекарственных препаратов на основе информации о профиле экспрессии генов идентично подходу с анализом “структура-активность”.

Таким образом, описанные выше, а также другие современные молекулярно-биологические технологии, которые начинают широко внедряться в изучение экспрессии генов и их полиморфных вариантов, очевидно, послужат основным рычагом в переходе фармакотерапии от “средней дозы для всех” к “эффективной индивидуальной дозе”. Переход к строго индивидуальному фармакологическому подходу в лечении различных болезней – один из важнейших итогов практического воплощения программы “Геном человека”.

Глава 8

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФАРМАКОГЕНЕТИКИ

Генетическое тестирование в практическом здравоохранении – сложная проблема. Прогресс достигнут в отношении обследования лиц, которые могут нести гены, предрасполагающие к высокой степени семейного наследования как, например, некоторые нейродегенеративные болезни, семейные опухоли и другие. Использование генетических методов в тех случаях, когда аллели с относительно низкой пенетрантностью могут быть маркерами определенного фенотипа (болезни), весьма затруднительно.

Фармакогенетика уже определила область практического здравоохранения, где генетический скрининг в применении к использованию лекарств может быть показан для пациента и иметь колоссальное экономическое значение. Выдвинуто предположение, что в ближайшем будущем участковый врач сможет определять генетический профиль каждого пациента и соответственно ему назначать те или иные лекарства. Достижения в области технологий генотипирования позволяют считать, что решение этой проблемы находится уже не в границах фантастических размышлений.

В развитии фармакогенетики весьма заинтересованы такие отрасли знаний, как фармация и биотехнология. Основное направление исследований в настоящее время – скрининг полиморфизма генов, вовлеченных в поступление и выведение лекарств, а также скрининг других генов, которые участвуют в метаболизме лекарств, и генов, регулирующих экспрессию первичных мишеней для

лекарственных препаратов, каковыми являются клеточные и ядерные рецепторы.

Крайне заинтересована в фармакогенетических исследованиях фармацевтическая промышленность. Все большее число фармацевтических фирм проводят генотипирование различных популяций для клинических испытаний. Связано это с тем, что знания о генетической изменчивости в чувствительности к препаратам – все более важный компонент процесса регистрации лекарственных средств. Кроме того, это дает возможность благоразумно исключать потенциально чувствительных лиц фазы I испытаний с увеличением дозировки препарата. Таким образом, генетические факторы, участвующие в метаболизме лекарств, могут иметь коммерческое влияние.

Скринирование новых соединений *in vitro* с целью определения генов, которые участвуют в их поступлении и метаболизме, позволит предвидеть – могут ли быть полиморфные ферменты важными факторами разложения лекарств. Знание этого дает возможность переделать лекарство так, чтобы избежать определенных метаболических путей при сохранении фармакологической активности. Правда, такой подход имеет и явные недостатки, поскольку ведет к значительному увеличению времени создания новых лекарств. Кроме того, не совсем ясно, будет ли полиморфизм в других нераспознанных сайтах влиять на индивидуальность лекарственной чувствительности.

На этом фоне высказываются предположения о том, что обнаружение полиморфных причин метаболизма некоторых ведущих фармакологических средств скомпрометирует применение их в практике здравоохранения. Такое мнение, по крайней мере, голословно. Решение данного вопроса сложное и его необходимо принимать на основе клинических и коммерческих подходов.

Полиморфизм точек приложения лекарств в организме неизбежен, так уже запрограммировано природой. Все люди генетически различны, невозможно убрать генетически обусловленную изменчивость ответа на лекарственную терапию.

Фармакологический скрининг для определения чувствительности к лекарственным препаратам будет, без сомнения, играть важную

роль, если в ближайшем будущем удастся уйти от эмпирического назначения лекарств и в то же время избежать межиндивидуальной изменчивости в лекарственной чувствительности и побочных эффектов, что сейчас компрометирует многие лекарства.

Анализ результатов исследований в области фармакогенетики, опубликованных в периодических научных изданиях, показывает, что изучены наиболее важные различия метаболизма некоторых представителей отдельных групп фармпрепаратов, которые связаны с генетическим полиморфизмом ферментов, ответственных за биотрансформацию ксенобиотиков.

Дальнейшие исследования в этом направлении важны для оптимизации фармакотерапии, которая может быть связана как с подбором эффективных доз, так и с предсказанием возможных НРЛС. Генотипирование действительно может значительно облегчить подбор доз препаратов. Так, сверхбыстрые метаболизаторы должны получать препарат в суточной дозе в десятки раз превышающей рекомендованную. Гомозиготам по мутантной аллели, имеющим сниженную ферментативную активность, дозу соответствующего препарата необходимо значительно снижать по сравнению с рекомендованной.

Благодаря генотипированию людей в отношении основных полиморфных ферментов лекарственного метаболизма, в частности, цитохромов P-450 (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6) и ариламин-N-ацетилтрансферазы, становится возможным уже на первичных этапах подбора фармакотерапии рекомендовать пациентам препараты в определенных дозах для получения оптимального клинического эффекта в зависимости от особенностей метаболизма индивидуума.

Те средние терапевтические дозы, которые рекомендуются фирмами-производителями лекарственных средств, могут оказаться недостаточными для сверхбыстрых метаболизаторов и весьма завышенными для медленных. В таблице 20 обобщены данные литературы о дозах некоторых препаратов, широко применяемых в клинической практике, с указанием доз для различных групп, выделенных в зависимости от способности метаболизировать лекарственные средства. Эти данные дают представление о зависимости

дозы от генотипа больного по ферментам лекарственного метаболита.

Характер поведения лекарственных препаратов в организме довольно сложный. Наряду с интенсивным изучением генотипов индивидуу-

Таблица 20. Дозировка лекарственных препаратов в зависимости от генотипа ферментов цитохрома P-450 (Drockmoller et al., 2000)

Лекарственный препарат	Средняя доза (мг)	Рекомендованные дозы различным метаболитам (в % от средней дозы)*								
		CYP2D6			CYP2C9			CYP2C19		
		ММ	ИМ	БМ; СМ	ММ	ИМ	БМ	ММ	ИМ	БМ
Флекаинид	50-200	80	90	110						
Пропафенон	400-700	40	80	130						
Амитри-птилин	50-150	50	90	120				50	80	110
Клопирамин	100-200	50	90	120				70	90	100
Галоперидол	4-15	80	90	110						
Метопролол	20-200	30	60	140						
Кодеин	60-100	Не рекомен- дуется		низкие						
Омепразол	20-40							20	50	110
Толбутамит	500				40	80	120			
Варфарин	1,5-3				20	50	130			

Примечания: ММ – медленные метаболиты (гомозиготы-носители двух неактивных аллелей); ИМ – интенсивные метаболиты (гетерозиготы с одной неактивной аллелью); БМ – быстрые метаболиты (гомозиготы по двум активным аллелям); СМ – сверхбыстрые метаболиты (носители трех и более активных аллелей).

*- Относительные дозы препаратов основываются на обобщении данных литературы. Они не могут носить рекомендательного характера.

мов по ферментам лекарственного метаболизма, необходимы исследования генотипов транспортных белков и рецепторов лекарственных средств. Такие исследования могут послужить базисом для составления индивидуальных генетических карт и назначения индивидуальной лекарственной терапии.

Как было отмечено выше, ферменты лекарственного метаболизма имеют важное значение в детоксикации и биоактивации канцерогенов. Изучение полиморфизма ферментов, участвующих в этих процессах, необходимо для определения риска развития злокачественных новообразований. Установление несомненных биомаркеров генетической восприимчивости к раковым заболеваниям и интоксикациям позволит идентифицировать людей с высоким риском их возникновения и принимать превентивные меры профилактики.

Этому способствуют современные достижения в выявлении мутаций и генотипирования человека, что снижает трудности в проведении скрининга больших популяций для составления индивидуальных “геномных отпечатков”, которые можно использовать для рационального назначения препаратов. Для проведения такого исследования достаточно одной капли крови, можно также исследовать клетки буккального эпителия, волосяные фолликулы, а большинство ДНК-технологий автоматизировано.

Итоги основных достижений фармакогенетики, имеющие значение для медицинской практики можно суммировать следующим образом.

1. Побочное действие лекарств – большая клиническая проблема, которая занимает важное место в структуре смертности.

2. Фармакогенетика – наука о генетических основах индивидуальной реакции на лекарственные препараты.

3. Фармакогенетическая гетерогенность популяций объясняет возможное отсутствие клинического эффекта фармакотерапии и наличие идиосинкразии к лекарственным препаратам.

4. Индивидуальная реакция на препараты обусловлена генетически детерминированными различиями во всасывании, распределении, метаболизме и выведении лекарств, а также полиморфизмом рецепторов-мишеней препаратов.

5. Наиболее изучен фармакогенетический полиморфизм генов семейства цитохромов P-450.

6. Одним из ключевых полиморфных цитохромов является фермент CYP2D6, который участвует в метаболизме более чем 25 % всех применяемых в практике здравоохранения лекарственных препаратов.

7. Наследственные аллельные варианты многих полиморфных ферментов могут служить маркерами чувствительности к препаратам.

8. Углубленное изучение генетических основ индивидуальных реакций на препараты имеет важное клиническое и экономическое значение и в ближайшей перспективе может стать базой для рационального назначения препаратов и подбора их доз.

Очевидны следующие пути как развития, так и практического применения достижений фармакогенетики.

Необходимы дальнейшие исследования о полиморфизме специфических генных локусов и фармакологическом значении этого полиморфизма. Такие исследования позволят определить: в какой степени индивидуальная чувствительность к специфическим классам лекарств определена генетически.

Важность генетической изменчивости в чувствительности к лекарствам осознана в научных кругах, в фармацевтической промышленности, фармкомитетах, но, к сожалению, она не находит применения в практическом здравоохранении. В то же время ДНК-технологии уже разработаны для рутинного скрининга и их применение возможно в клинике. Например, многие из лекарственных средств, метаболизируемые CYP2D6, например, действующие на ЦНС и имеющие узкие терапевтические показания, при передозировке и аккумуляции могут вызвать симптомы, сходные с самой болезнью. Генетическая изменчивость может быть главной причиной различной концентрации лекарственного средства в плазме циркулирующей крови. Если пациент получает лечение по поводу психического заболевания, то по этой причине могут возникнуть трудности в распознавании отсутствия ответа на терапию на фоне эффекта передозировки.

Одной из целей медицинской генетики является детальная разработка “маркерных профилей”, которые позволяют выявлять “группы высо-

кого риска” относительно определенных болезней. Это актуально в тех случаях, когда уже существуют профилактические меры, способные предупредить, сдержать проявление вредных эффектов генетического предрасположения с помощью изменения условий жизни. Такой подход перспективен, так как развитие болезни зачастую детерминируется взаимодействием факторов генетической восприимчивости и факторами среды. Профилактическая медицина в таких случаях будет работать с учетом уникальности генотипа индивида, а не направлена на популяцию в целом. Круг ее деятельности весьма широк: предупреждение развития наследственных заболеваний, индивидуальные дозы вакцин, индивидуальный подход к фармакотерапии.

Научные основы для разработки таких рекомендаций призвана формировать экогенетика, в том числе и фармакогенетика. Теория болезней должна трансформироваться в будущем в теорию сохранения здоровья.

ЛИТЕРАТУРА:

1. *Бажора Ю.И.* Введение в иммуногенетику. Одесса: ОГМУ. – 2000 г.
2. *Бажора Ю.И.* Значение расшифровки генома человека для медицины// Юбилейный сборник трудов, посвященный столетию Одесской городской больницы №11. – Одесса, 2002. – с. 43-45.
3. *Головенко М.Я.* Високопродуктивні технології дослідження та створення лікарських засобів. Фармакогеноміка і інформатика// Вісник фармакології та фармації. – 2002. - №1. – с. 2-8.
4. *Головенко. Н. Я.* Некоторые аспекты биохимии, химии, молекулярной биологии и генетики цитохрома Р-450 (обзор литературы)/ / Современные проблемы токсикологии. – 2001. - №3. – с. 17-23.
5. *Головенко М. Я.* Високопродуктивні технології дослідження та створення лікарських засобів. Біофармація та фармакокінетика// Вісник фармакології та фармації. – 2002. - №2. – с. 10-17.
6. *Жолдакова З.И., Харчевникова Н. В.* Механизмы процессов биоактивации чужеродных химических веществ под действием ферментных систем организма// Вестник РАМН. – 2002. - №8. – с.44-49.
7. *Ивашкин В.Т., Фисенко В.П., Маевская М.В., Макарьянц М.Л.* Основные принципы метаболизма лекарств и безопасное применение парацетамола// Провизор. – 2002. - №6. – с. 1-11.
8. *Середенин С.Б., Вахитова Ю.В., Вахитов В.А.* Молекулярно-биологические подходы к созданию геноспецифических фармакологических препаратов// Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2001. – Т. 64. - №3. – с. с-12.
9. *Фогель Ф., Мотульски А.* Генетика человека: в 3-х т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990.
10. *Чернов Ю.Н., Роотс И., Чайкович Е.А.* Метаболизм лекарственных

ных средств: индивидуальные генетически детерминированные особенности// В мире лекарств. – 2001. - №1. – с. 24-31.

11. Яковлева О.А., Косован А.И., Царук В.В., Дякова О.В. Прогностические фармакогенетические аспекты индивидуальной лекарственной переносимости – нерешенные проблемы и перспективы// Укр. хіміотерапевтичний журнал. – 2000. - №1. – с. 63-70.

12. Bradford L.D. CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants// Pharmacogenomics. – 2002. – V.3. - №2. – 229 – 243.

13. Brennan M.D. High throughput genotyping technologies for pharmacogenomics// Am. J. Pharmacogenomics. – 2001. – V.1. - №4. – p. 295 – 302.

14. Griffin K.J., Johnson E.F. The cytochrome P 450 supergene family: genetic organization and function.// In: Immunology and liver. Ed.: Manns M.P., Paumgartner G., Leuschner U. - Kluwer Acad. Publ. – 1999. – p. 167-179.

15. Johnson J.A. Drug target pharmacogenomics: an overview// Am. J. Pharmacogenomics. - 2001 – V.1. – №4 – 271-281.

16. Ioannides C. Ed. (2001) Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics. - John Wiley & Sons. – 578 p.

17. Nebert D.W. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: why is this relevant to the clinical geneticist?// Clin. Genet. – 1990. – V.56. – p. 247-258.

18. Nebert D.W., Russel D.W. Clinical importance of the cytochromes P450// Lancet. – 2002. – V.360. – p. 1155-1162.

19. Strassburg C.P., Manns M.P., Tukey R.H. Uridine diphosphate 5'-glucuronosyltransferases (UGT): genetic organization and function. In: Immunology and liver. Ed.: Manns M.P., Paumgartner G., Leuschner U. – Kluwer Acad. publ., 1999. – p. 180-191.

20. Wolf C.R., Smith G. Pharmacogenetics// British. Med. Bull. – 1999. – V.55. – №2. - p. 366-386.

Науково-практичне видання

БАЖОРА Юрій Іванович

**ФАРМАКОГЕНЕТИКА:
ДОСЯГНЕННЯ І ПЕРСПЕКТИВИ**

Російською мовою

Технічний редактор Терзєман Т. П.

*Оригінал-макет — РВФ “Прес-кур’єр”.
65076 м. Одеса, пл. Незалежності, 1,
Тел. (0482) 65-20-13.*

Підписано до друку з оригінал-макета 5.03.2003.
Формат 60x84/16. Фіз. друк. арк. 8,75. Умов. друк. арк. 8,13.
Гарнітура Times New Roman Суг.
Друк цифровий. Папір офсетний.
Тираж 500 прим. Зам. № 31

Віддруковано в друкарні видавництва «Друк»
Свідоцтво ДК № 295 від 25.12.2000

65107, м. Одеса, вул. Канатна, 83, оф. 208
тел.: 22-38-28