

ЗАГАЛЬНА ФАРМАКОГЕНЕТИКА

Фармакогенетика – це наука, що вивчає роль генетичних факторів у формуванні фармакологічної відповіді організму людини на лікарський препарат.

Засновниками фармакогенетики як науки на сьогоднішній день вважаються такі видатні вчені, як Aron Motulsky (1957), Friedrich Vogel (1959) и Werner Kalow (1962).

Можливо виокремити декілька основних етапів розвитку фармакогенетики:

- I етап – накопичення фармакогенетичних феноменів (1930-1960-ті роки);
- II етап – розвиток фармакогенетики як фундаментальної науки (1960- 1990-ті роки);
- III етап – розвиток клінічного спрямування фармакогенетики, введення поняття «фармакогеномика» (з 2000-их років).

Известно, что под генетическим контролем, который опосредуется функцией различных белков, находятся фармакокинетические и фармакодинамические процессы. Фармакогенетика играет важную роль в идентификации пациентов с разным ответом на препарат, позволяет избегать нежелательных эффектов и оптимизировать дозу препарата. Генетичні особливості генома людини, що модулюють фармакологічну відповідь, являють собою однонуклеотидні поліморфізми в генах (SNP – single nucleotide polymorphism), що кодують білки, які в свою чергу которые в приймають участь в фармакокінетичних і фармакодинамічних процесах ліків.

SNP можуть впливати на:

- процеси фармакокінетики – це або ферменти реакцій біотрансформації (CYP-450, N-ацетилтрансфераза, тощо), або транспортери лікарських речовин (P-глікопротеїн тощо);
- процеси фармакодинаміки – це або молекули-мішені лікарських речовин (рецептори, ферменти тощо), або білки, що визначають небажані реакції (HLA, що є генами головного комплексу гістосумісності), або пов'язані з патогенезом захворювання (NOS, що кодує NO-синтетазу).

Фармакогенетичні тести

Дослідження за допомогою полімеразно ланцюгової реакції біоматеріалу пацієнта (кров, соскоб букального епітелію) дозволяє виявляти наявність/відсутність SNP-ов для окремих генів. Ця процедура отримала назву генотипування пацієнта. Для того, щоб фармакогенетичний тест буде впроваджено в клінічну практику, він має відповідати декільком критеріям:

- має бути доведений зв'язок між SNP і небажаною фармакологічною дією (розвитком небажаної реакції, терапевтичного ефекту);

- тест повинен мати високу специфічність, чутливість і відтворюваність результатів;

- мають бути переваги застосування результатів фармакогенетичного тестування для лікування відносно традиційної терапії (вища ефективність, більша безпека, нижча вартість лікування);

- потрібний алгоритм зміни терапії в залежності від результатів фармакогенетичного тестування (зміна дози, зміни препарату).

Кількість фармакогенетичних тестів останнім десятиріччям стрімко зростає. Внесенням фармакогенетических даних в інструкції для використання лікарських засобів (их маркування) займається організація Food Drug Administration (FDA), США. В 2016 році фармакогенетичним маркуванням було позначено 165 лікарських засобів (ЛЗ). Інформація стосується:

- застережень щодо застосування ЛЗ (80 ЛЗ);
- показань до застосування (53 ЛЗ);
- розвитку побічних ефектів (50 ЛЗ);
- корекції дози і шляху введення препаратів (42 ЛЗ);
- взаємодії ЛЗ (21 ЛЗ).

На сьогодні на сайті FDA (<https://www.fda.gov/medical-devices/precision-medicine/table-pharmacogenetic-associations#section1>) інформація представлено в 3-х таблицях:

- Розділ 1: Фармакогенетичні взаємодії, щодо яких наявні дані рекомендують зміни в лікуванні (Section 1: Pharmacogenetic Associations for which the Data Support Therapeutic Management Recommendations);

- Розділ 2: Фармакогенетичні взаємодії щодо яких наявні дані свідчать про ймовірний вплив на безпечність та дієвість лікування (Section 2: Pharmacogenetic Associations for which the Data Indicate a Potential Impact on Safety or Response)

- Розділ 3: Фармакогенетичні взаємодії щодо яких наявні дані свідчать про ймовірний вплив тільки на фармакокінетичні характеристики (Section 3: Pharmacogenetic Associations for which the Data Demonstrate a Potential Impact on Pharmacokinetic Properties Only).

В Європі Королівською асоціацією Нідерландів було створено Фармакогенетичну робочу групу (Pharmacogenetic Working Group, DPWG), метою якої є розвиток фармакогенетично зумовлених терапевтичних рекомендацій, які базуються на систематичному огляді літератури, допомозі лікарям і фармацевтам в інтеграції рекомендацій у комп'ютеризовані системи для призначення ЛЗ, їх поширення і

автоматизованого відстеження. На сайті <https://www.pharmgkb.org> наведено результати роботи DPWG та інших дослідницьких груп щодо 68 ЛЗ (2016).

Лікарські засоби, для яких було встановлене фармакогенетичне маркування, належали до таких груп:

- антидепресанти — трициклічні антидепресанти (6 ЛЗ), селективні інгібітори зворотного захоплення серотоніну (6 ЛЗ), інші групи (2 ЛЗ);
- антипсихотичні засоби (7 ЛЗ);
- антиконвульсанти (3);
- наркотичні аналгетики (3);
- протипухлинні/імуносупресанти — фторпіримідини (3 ЛЗ), антрацикліни (2 ЛЗ), інші препарати (7 ЛЗ);
- інгібітори протонної помпи (5 ЛЗ);
- антикоагулянти (3 ЛЗ), антиагрегант (1 ЛЗ);
- противірусні препарати (4 ЛЗ);
- пероральні антидіабетичні засоби — похідні сульфанілсечовини (4 ЛЗ)

Більша частина фармакогенетичних тестів стосується генів, що кодують активність ферментативних систем печінки:

CYP2C9 — 8 (з них 4 не потребують змін дозування ЛЗ);

CYP2C19 — 16 (з них 1 не потребує змін дозування ЛЗ);

CYP2D6 — 28;

UGT (uridine diphosphate glucuronosyltransferase) — 4;

DPYD (dihydropyrimidine dehydrogenase) — 3;

TPMT (thiopurine-S-methyltransferase) — 3;

CYP3A5 — 1.

Також декілька тестів визначають ймовірність розвитку побічного або терапевтичного ефектів:

HLA-A; HLA-B — 5;

IFNL3 (ген, модулюючий активність інтерферона) — 2.

Також кілька тестів визначають ймовірність розвитку побічного або терапевтичного ефектів:

HLA-A; HLA-B — 5;

IFNL3 (ген, що модулює активність інтерферону) — 2

На сьогодні на сайті <https://www.pharmgkb.org/> міститься 868 повідомлень щодо маркування ліків; 189 анотацій клінічних рекомендацій тощо

Відомо, що алелі — це різні форми одного й того ж гена, розташовані в однакових ділянках (локусах) гомологічних хромосом і визначають альтернативні варіанти розвитку однієї і тієї ж ознаки. Якщо поліморфізм (мутація) відсутні в обох алелях, то такий індивід належить до швидких метаболізаторів. Для таких пацієнтів зазвичай застосовуються стандартні режими дозування.

Якщо заміна стосується лише одного з двох алелів, то мова йде про помірного метаболізатора; якщо обидва алеля мають поліморфізм, то йдеться про генотип повільного метаболізатора. У таких індивідів відзначається синтез ферменту зі зниженою активністю. У свою чергу, це може призводити до такого:

- 1) кумуляції ЛЗ, посилення фармакологічного ефекту із розвитком симптомів передозування. Тому для повільних метаболізаторів стандартні дози ЛЗ мають бути знижені або замінені на ЛЗ, які метаболізуються іншою ферментною системою;
- 2) зниження ефекту спостерігається у тому випадку, якщо ЛЗ є проліками і зниження ферментної активності призводить до зменшення утворення активного метаболіту (клопідогрел, кодеїн, трамадол). У цьому разі проводять заміну ЛЗ.

Також трапляються й ультрашвидкі метаболізатори за наявності дуплікацій або мультиплікацій нормальних алелів, або присутності поліморфного маркера, що приводить до значного прискорення метаболізму ЛЗ та низької концентрації ЛЗ в крові. У такому випадку необхідно значно збільшувати дозу ЛЗ або замінити іншим препаратом, метаболізм якого забезпечують альтернативні ферментні системи.

Біотрансформація лікарських засобів включає дві фази: метаболізм і кон'югація. Реакції біотрансформації реалізуються ферментами I фази родини цитохром P450 зазвичай модифікуючи функціональні групи ($-OH$, $-SH$, $-NH_2$, $-OCH_3$) молекули ендogenous сполук і ксенобіотиків, що призводить до зміни біологічної активності сполук. В I фазі відбуваються окиснювально-відновні реакції, які каталізуються за допомогою ферментних систем ендоплазматичного ретикулюму. В результаті окиснювально-відновних реакцій біотрансформації лікарський засіб може втратити свої первісні фармакодинамічні властивості (інактивація, або детоксикація) або придбати нові (модифікація); при цьому фармакологічно неактивний препарат (промедикамент) може перетворитися в активний (біологічна активація) або надбати токсичні властивості (летальний синтез, або токсифікація). Ферменти I фази (CYP-450) приймають участь в біотрансформації понад 75% ліків; тому поліморфізм генів, що кодують відповідні ферменти, може значно вплинути на рівень лікарських засобів в крові, що в свою чергу може вплинути на дію

лікв. Найбільша кількість цитохрому P-450 знаходиться в гепатоцитах. Однак цитохром P-450 присутній і в інших органах: в кишечнику, нирках, легенях, наднирниках, головному мозку, шкірі, плаценті і міокарді. Найважливішою властивістю цитохрому P-450 – здатність метаболізувати практично всі відомі хімічні сполуки. Найбільш важлива реакція – гідроксилування. Цитохроми P-450 ще називають монооксигеназами, так як вони включають один атом кисню в субстрат, окислюючи його, а один – перетворюючи в воду. Цитохром P-450 має велику кількість ізоформ – ізоферментів. Насьогодні відомо понад 1000 ізоферментів цитохрому P-450. Ізоферменти цитохрому P-450, відповідно до класифікації Nebert (1987), діляться за близькістю (гомології) нуклеотид/амінокислотної послідовності на родини. В свою чергу, родина розділяється на субродини. Ізоферменти цитохрому P-450 з ідентичністю амінокислотного складу понад 40% об'єднуються в родини (виділено 36 родин, 12 з яких знайдено у ссавців). Ізоферменти цитохрому P-450 з ідентичністю амінокислотного складу понад 55% об'єднані в субродини (виділено 39 субродин). Перший символ (на початку) – арабська цифра, що відповідає родині (CYP3A4). Другий символ – латинська буква, що відповідає субродині (CYP3A4). В кінці (третій символ) вказується арабська цифра, що відповідає ізоферменту (CYP3A4). Наприклад, ізофермент цитохрому P-450, що позначається як CYP3A4, належить до родини 3, субродини А. Ізоферменти цитохрому P-450 – представники різноманітних родин і субродин, що відрізняються регуляторами активності (інгібітори і індуктори) і субстратною специфічністю.

Наприклад, CYP2C9 метаболізує виключно S-варфарин, в той час як R-варфарин метаболізують ізоферменти CYP1A2 і CYP3A4. Однак члени окремих родин, субродин і окремі ізоферменти цитохрому P-450 можуть мати перехресну субстратну специфічність, а також мати перехресні інгібітори і індуктори. Наприклад, ритонавір (протівірусний препарат) метаболізує 7 ізоферментів (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4), що належать до різноманітних родин і субродин. Циметидин одночасно інгібує 4 ізоферменти: CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 і CYP3A4. В метаболізмі лікарських засобів приймає лікарські засоби приймають участь ізоферменти цитохрому P-450 I, II і III родин. CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2O9, CYP2E1, CYP3A4 – найбільш важливі для метаболізму лікарських речовин і досліджені ізоферменти цитохрому P-450. Вміст різноманітних ізоферментів цитохрому P-450 в печенці людини, а також їх внесок в окислення лікарських засобів різноманітні.

Для фармакогенетики особливо важливими є шість генів (CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 і CYP3A4), оскільки шість ферментів, що їми кодуються, відповідають за I фазу метаболізму у понад 90% всіх найбільш використаних лікарських

засобів. Тільки CYP3A4 залучено в метаболізм понад 40% всіх ліків, що використовуються в клінічній медицині. Крім того, багато генів CYP є дуже поліморфні за алелями, що мають функціональні наслідки для реакції на лікарську терапію. Алелі CYP можуть призводити до відсутності, зменшення або підвищення активності ферменту, впливаючи на швидкість метаболізму багатьох лікарських засобів. Наприклад, CYP2D6 — первинний цитохром приймає участь в I фазі метаболізму понад 70 різноманітних ліків. Відомо 26 алелів в гені CYP2D6, що впливають на його активність, знижуючи, усуваючи або підвищуючи її.

Поліморфізм ферментів, що метаболізують ліки, є головними в фармакогеноміці. Після відкриття інформації щодо генотипу, була впроваджена нова номенклатура для характеристики індивідуального рівня метаболізму. Відомо, що диплотип складається з одного материнського і батьківського алелів, використовуючи значок зірки (*) для позначення номенклатури алелю. Кожна зірка (*) алелю визначається специфічною послідовністю нуклеотидної послідовності в локусі гену, наприклад поліморфізм одного нуклеотиду (single nucleotide polymorphisms, SNPs) і може бути пов'язаний з рівнем функціональної характеристики (0 – нефункціональний; 0.5 – знижена функція; 1.0 – повна функція). Деякі гени, зокрема CYP2D6, є суб'єктом делецій цілого гену, наприклад CYP2D6*5 може включати помноження копій *1xN, *2xN, де N є кількістю копій. Якщо понад однієї копії гену присутня, тоді рівень активності множить на кількість копій. is the number of copies. If more than one copy of the gene is detected, the activity score is then multiplied by the number of copies observed. Ферментна активність в цілому може бути кодомінантною або додатковою рисою. Наприклад, якщо особа є носієм одного функціонального («дикого», «немутованого») і одного нефункціонального («мутованого», «варіантного») буде мати помірну метаболічну активність («помірний метаболізатор», IM). Сума алельної активності варіює між 0 і ≥ 3.0 і використовується для позначення фенотипу: 0 = PM («повільний метаболізатор», «poor metabolizer»), 0.5 = IM («помірний метаболізатор», «intermediate metabolizer»), 1.0–2.0 = EM («швидкий метаболізатор», «extensive metabolizer»), and ≥ 2.0 = UM («ультрашвидкий метаболізатор», «ultra-rapid metabolizer»)

Транспортери клітинних мембран локалізуються на епітеліальних клітинах багатьох органів, наприклад кишечника, нирки і печінки. Вони опосередковують селективне захоплення (influx) і винос (efflux) ендогенних сполук і ксенобіотиків. Транспортери часто працюють разом з ферментами, що метаболізують ліки, відіграють важливу роль у визначенні концентрації ліків та їх метаболітів в плазмі і тканинах.

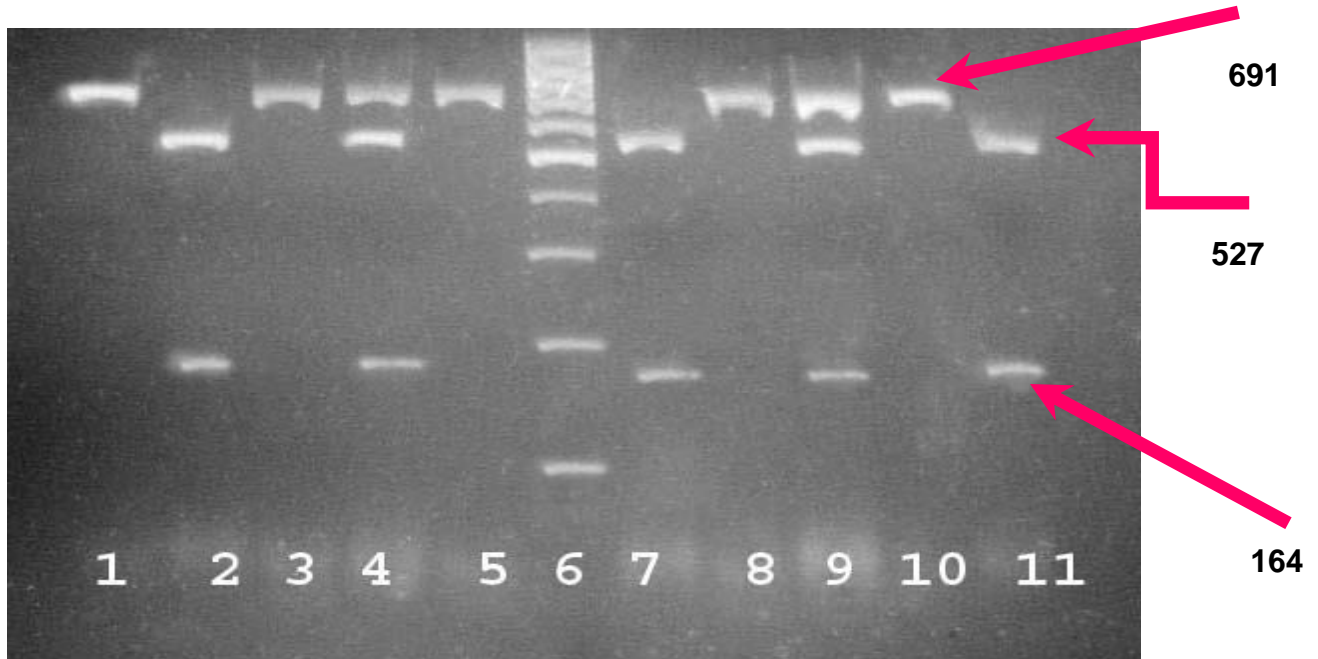
Генетичні відмінності генів транспортерів можуть значно змінити розподілення і дію ліків, і відповідно збільшити ризик токсичності.

Відомо, що існують значні міжетнічні відмінності щодо питомої ваги окремих груп метаболізаторів (надшвидких / швидких / помірних / повільних), що буде визначати розбіжності у ефективності та безпечності окремих ЛЗ. Тому доцільним є проведення національних досліджень поліморфізму окремих генів, які контролюють процеси біотрансформації ліків. Так, у 2014 р. було проведено порівняння поліморфізму генів біотрансформації CYP2C19 і 2C9 південно-західного регіону України (на прикладі Одеської області) щодо аналогічних показників інших країн. Було встановлено, що згідно з генотипом CYP2C19 79 % індивідів мали генотип швидких метаболізаторів, 20 % — помірних і 1 % — повільних метаболізаторів. В європейських країнах поширеність швидких метаболізаторів становить 68,2–76,6 %, в Азії (наприклад, у Південній Кореї) — близько 40 %.

Відповідно до генотипу CYP2C9, у південно-західному регіоні України близько 76 % індивідів були носіями генотипу швидких метаболізаторів, 22 % — помірних метаболізаторів, 2 % — повільних метаболізаторів. Для європейських країн відповідні показники становили 62–86, 29–34 і 2–5 % відповідно; в Азії (Іран) — 41, 47 і 11 % відповідно. Отже, отримані результати свідчать про близькість частоти швидких метаболізаторів у південно-західного регіону України з європейськими країнами, а також значні відмінності з країнами Азії.

Визначення генотипу *CYP2C9*

Для виявлення мutowаних алелів *2 и *3 використовували дві пари відповідних праймерів. ПЛР продукти піддавались дії відповідних рестриктаз. Оскільки місце рестрикції відсутнє в мутантних алелях, ПЛР продукти уникали рестрикції відповідними ферментами.



1, 3, 5, 8, 10 – нема рестрикції і алелі *2; 2, 7, 11 – є рестрикція і алель *2, нема *1; 4, 9 – є алелі з/без рестрикції

ПРОДУКТИ РЕСТРИКЦІЇ *AvaII*

За допомогою рестрикції ферменту *AvaII* (що свідчить про наявність алелів *1 або *3) відбувалось розділення ДНК-фрагментів в 691 п.н. на 2 фрагменти – 527 і 164 п.н., відсутність розділення – про наявність мутантного алелю *2.

Продукти рестрикції (п.н.)

Алель	Ендонуклеаза	
	<i>AvaII</i>	<i>NsiI</i>
*1	527+164	112+29
*2	691	112+29
*3	527+164	141

При перегляді існуючих протоколів лікування МОЗ України для депресивних станів, виразкової хвороби шлунка, туберкульозу було з'ясовано, що лише в протоколі лікування депресивних станів (наказ МОЗ України № 1003 від 25.12.2014 р.) вказується характер зміни концентрації антидепресантів унаслідок пригнічення ферментних систем печінки. Причому інформація стосується не лише антидепресантів, але й інших ЛЗ

Незважаючи на сучасні досягнення, у клінічній фармакогенетиці існує чимало труднощів. Досі не вистачає даних, що підтверджують доцільність рутинного фармакогенетичного скринінгу. Так, у багатьох опублікованих дослідженнях питання фармакогенетики були другорядними, тому значна кількість робіт базується на недостатній кількості зразків.

По-друге, кінцевою крапкою в оцінці генетичного поліморфізму були фармакокінетичні дані, отримані за умов введення одного препарату у здорових людей, що не є репрезентативним для повсякденної клінічної практики. Вдочас поступово збільшується кількість досліджень, де фармакогенетичні питання є першочерговими.

Рекомендації з корекції дози в основному стосуються тих пацієнтів, у яких генотип відомий. Сьогодні таких хворих мало, це переважно пацієнти, які пройшли генотипування після незрозумілих небажаних ефектів або відсутності терапевтичної дії.

Однак разом зі зменшенням вартості фармакогенетичного тестування і збільшенням кількості лабораторій з можливістю генотипування, кількість таких пацієнтів буде зростати.

Рекомендації DPWG стосуються, головним чином, комбінації одного генетичного поліморфізму з одним ЛЗ. Проте дуже часто спостерігається поєднання кількох генетичних варіацій, що значно знижує цінність визначення одиночного генетичного поліморфізму. Наприклад, ізольований поліморфізм генів CYP2C9 і VKORC1 може пояснити варіативність дози варфарину у 18 і 37 % випадків відповідно, а одночасне визначення поліморфізму обох генів дозволяє пояснити до 50 % випадків зміни дози варфарину. Таким чином, у майбутньому необхідно провести вивчення комбінацій рідкісних генотипів на більшій кількості людей.

Ще однією проблемою є взаємодія ген–ЛЗ і ЛЗ–ЛЗ. Досі дослідження стосувалися лише взаємодії між самими ЛЗ. Однак з урахуванням даних фармакогенетики цей підхід может стати невірним. Наприклад, взаємодія між інгібітором CYP2C9 і ЛЗ, що є субстратом CYP2C9, у помірних метаболізаторів, згідно із CYP2C9, може потребувати диференційованого підходу, порівняно з повільними метаболізаторами. Тому комбінації ген–ЛЗ і ЛЗ–ЛЗ можуть мати величезне значення для виписування і застосування ліків. Роботи у цьому напрямку вже почали з'являтися у літературі.

Тим не менш, фармакогенетичні дослідження є фундаментом для подальшого запровадження індивідуальної фармакотерапії хворих з урахуванням їх генетичного паспорта, що, у свою чергу, сприятиме збільшенню ефективності та зменшенню токсичності лікарських препаратів.

Генотип *CYP450 2C9* визначали за допомогою ПЛР та ендонуклеазного аналізу за методом Sullivan-Klose T.H. et al. (1996) [304]. Автори пропонують використовувати три праймери. Для ПЛР-ампліфікації *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* дві пари відповідних специфічних праймерів – для першої алелі (прямий праймер TACAААTACAATGAAAATATCATG і зворотній праймер СТААСААССАGACTCATAATG), для другої алелі (прямий праймер ААТААТААТATGCACGAGGGTCCAGAGATGC і зворотній праймер GATACTATGAATTTGGGACTTC). ПЛР продукти *CYP2C1*2* і *CYP2C9*3* були піддані рестрикції за допомогою ферментів (рестриктаз) *AvaII* і *NsiI* відповідно. Оскільки місце рестрикції відсутнє в мутантних алелях, ПЛР продукти уникали рестрикції відповідними ферментами, що свідчило про наявність алеля *CYP2C9*2* при застосуванні *AvaII* або алеля *CYP2C9*3* при застосуванні *NsiI*.

На рис. 3.4 зображено результати електрофорезу гена *CYP2C9*. Літерою М позначено маркери молекулярної ваги, які дозволяють визначити молекулярну вагу фрагментів, що ампліфікуються.

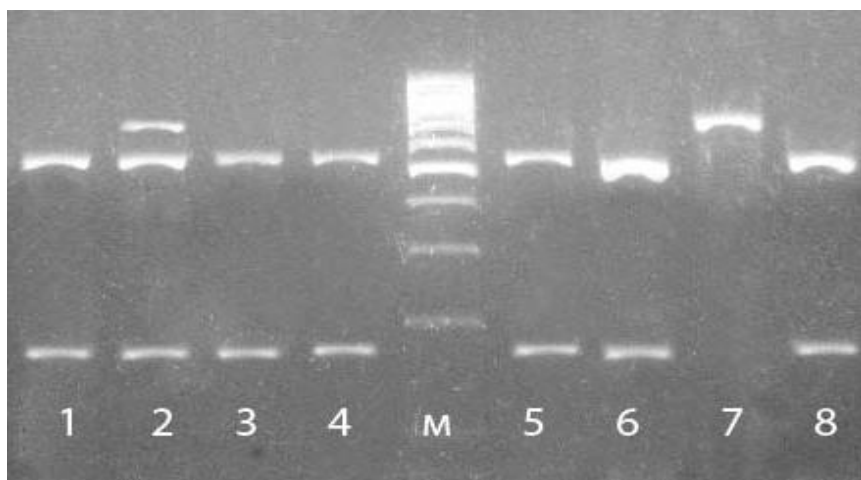


Рис. 3.4. Електрофореграма визначення поліморфізму гена *CYP2C9* (*AvaII*).

За умов рестрикції за допомогою ферменту *AvaII* (наявні алелі *CYP2C9*1* або *CYP2C9*3*) або ферменту *NsiI* (наявні алелі *CYP2C9*1* або *CYP2C9*2*) відбувалось розділення ДНК-фрагментів в 691 п.н. на 2 фрагменти – 527 і 164 п.н., а також ДНК-фрагмент 141 п.н. на 2 фрагменти – 112 і 29 п.н., відповідно. Наприклад, на доріжці 2 ампліфікувалися фрагменти, що, згідно маркерів молекулярної ваги, складаються з 164, 527 і 691 п.н. Отже, це фореграма осіб, які мали один алель, що зазнав рестрикції (алель *1 або *3), і один алель, що не зазнав рестрикції (алель *2). На доріжці 7 нема слідів рестрикції, отже присутня лише алель *2 (генотип *2/*2). На інших доріжках – 1,3,4,5,6,8 - ампліфікувалися фрагменти 164 і 527 п.н. Отже, ці зразки містять алелі, які зазнали рестрикції, тобто алель *2 відсутній, натомість є алелі *1 і/або *3. Для з'ясування наявності алеля *3 проводять рестрикцію за допомогою ендонуклеази *NsiI*.