

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

ПОЛИМОРФИЗМЫ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ТРАНСПОРТЕРЫ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ *ABCB1* И *ABCG2*, И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

О. П. Дрибноходова, К. О. Миронов, Е. А. Дунаева,
Г. А. Шипулин

Представлены данные литературы о влиянии генов белков-транспортёров семейства ABC на фармакокинетические особенности организма. Проведен анализ клинической значимости ряда однонуклеотидных полиморфизмов в генах *ABCB1* и *ABCG2*. Разработан и испытан набор генетических тестов для определения аллельного состояния по полиморфизмам rs1128503 (1236 T>C), rs2032582 (2677T>A/G), rs1045642 (3435 T>A/C), rs2231142 (421C>A) и rs72552713 (376 C>T) в генах *ABCB1* и *ABCG2* методом пиросеквенирования. Эти тесты могут быть использованы в научной работе и клинической практике для расчета рекомендуемых дозировок различных лекарственных средств, прогнозирования эффективности применяемых препаратов и определения групп риска развития нежелательных лекарственных реакций.

Ключевые слова: фармакогенетика; фармакокинетика; пиросеквенирование; белки-транспортёры; *ABCB1*; *ABCG2*

Развитие медицины в конце 20-го и начале 21-го веков сопровождается появлением и внедрением в клиническую практику большого числа новых лекарственных средств. Информация о состоянии систем транспорта и метаболизма лекарственных средств позволяет предсказывать индивидуальную эффективность препарата и риск развития побочных эффектов, выбирать оптимальный препарат из нескольких аналогов и подбирать его дозы, а также рассчитывать эффекты от взаимодействия лекарств при их совместном назначении.

Для решения этих задач необходимо знать, какие транспортёры и ферменты вовлечены в фармакокинетику анализируемых препаратов, зависимость их активности от различных факторов и состояние этих систем у пациента [1, 9]. В настоящее время описаны аллели генов ферментов биотрансформации и белков-транспортёров, которые различаются по активности соответствующих белков.

Белки-транспортёры отвечают за перенос различных соединений через клеточную мембрану. Изменение активности транспортёров под действием различных соединений или в результате генетических особенностей может приводить к изменению эффективности лекарственных препаратов, переносимых этими транспортёрами [40].

Известно большое число транспортёров, различающихся по экспрессии в разных тканях, регуляции, механизму транспорта, субстратам и ингибиторам, одна-

ко наибольшее клиническое значение имеют две группы транспортных белков — гены *SLC* и *ABC* [28, 40].

ATP-binding Cassette (*ABC*) Transporters — суперсемейство трансмембранных белков, переносящих различные соединения через клеточные мембраны за счет гидролиза АТФ. К *ABC*-транспортёрам относится 7 семейств, объединяющих 48 генов. Они выводят из клеток широкий круг эндо- и экзогенных соединений (ионы, сахара, липиды, стеролы, желчные кислоты, ксенобиотики, лекарственные препараты), регулируют транспорт различных веществ через гистогематические барьеры, снижают нагрузку вредных веществ на организм. Побочным результатом защитной функции является выведение из организма различных лекарств [11]. Изменение активности *ABC*-транспортёров является причиной возникновения различных моногенных болезней [муковисцидоз (ген *ABCC7*), танжерская болезнь (*ABCA1*), х-сцепленная адренолейкодистрофия (*ABCD1*)], предрасположенности к ряду онкологических заболеваний, а также развития нежелательных лекарственных реакций или лекарственной устойчивости к широкому спектру препаратов [11, 17].

В большинстве органов на плазматической мембране экспрессируется несколько типов транспортёров, и эффективность переноса лекарств определяется координацией функций поглощающих и выводящих транспортёров. Если активность транспортёров эффлюкса в выводящих органах (печень, почки) снижается, то снижается и клиренс переносимых ими лекарственных средств. Их концентрация в плазме возрастает, в ре-

¹ ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3А.

зультате чего может увеличиться эффективность лекарства или развиваться токсическое действие. Если в органе-мишени увеличивается активность поглощающих транспортеров или снижается активность выводящих транспортеров, растёт концентрация лекарства в ткани. Изменение локальной концентрации в органе может не приводить к изменению концентрации в плазме, но иметь клиническое значение. Кроме того, снижение активности эффлюкса может привести к нарушению тканевых барьеров [31].

Ген *ABCB1* (ATP-binding cassette, subfamily B, member 1), также известный как ген множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*), кодирует трансмембранный белок р-гликопротеин. Р-гликопротеин является одним из важнейших транспортеров ксенобиотиков, экспрессирующимся во многих органах и тканях, в том числе в кишечнике, почках, печени, мозге [21]. Он переносит более 100 различных лекарственных препаратов, в том числе сердечные гликозиды, блокаторы медленных кальциевых каналов, статины, цитостатики, противоретровирусные препараты, антибиотики. Р-гликопротеин может ограничивать всасывание лекарств при применении внутрь, выводя их обратно в просвет кишечника, обеспечивает экскрецию лекарственных средств с желчью и мочой, является одним из важнейших транспортеров гематоэнцефалического барьера. Нарушение его активности может приводить к сильному повышению концентрации некоторых лекарств в мозге, что имеет клиническое значение при назначении противоэпилептических и психотропных препаратов [1, 3, 17, 46].

ABCB1 участвует в выведении многих соединений через почки, поэтому изменение его активности может быть связано с развитием нефротоксичности. Например, обнаружено, что измененные варианты *ABCB1* чаще встречаются у пациентов с почечной недостаточностью через 6 мес после трансплантации печени при лечении такролимусом (частота аллеля 1236Т у пациентов с почечной недостаточностью составила 63 %, в контроле — 37,5 %; 2677Т — 63 % и 36 % соответственно; а 3435Т — 60 и 39 %) [22]. При снижении активности *ABCB1* выше риск развития нефро- и нейротоксичности при лечении циклоспорином [3].

В кодирующей последовательности гена *ABCB1* известно не менее 70 однонуклеотидных полиморфизмов, наибольший интерес представляют полиморфизмы rs1128503 (1236 Т>С), rs2032582 (2677 Т>А/С), rs1045642 (3435 Т>А/С) [1]. Полиморфизмы гена *ABCB1* могут влиять не только на эффективность и токсичность лекарств, но и на предрасположенность к развитию различных заболеваний, в том числе онкологических.

Полиморфизм rs1128503 приводит к замене тимина в 1236 положении на цитозин (рисунок). Замена не отражается на аминокислотной последовательности белка (Gly412Gly), однако приводит к нарушению котрансляционного фолдинга шестого трансмембранного домена, участвующего в связывании субстрата [17, 39]. Наибольшая частота предкового аллеля С наблюдается в популяциях африканского происхождения, наименьшая — в популяциях азиатского происхождения. Европейские популяции занимают промежуточное положение (табл. 1). Частоты аллеля С у различных популяций на территории России отличаются незначительно, независимо от их этнической принадлежности. Например, у русских жителей Томска доля аллеля С составляет 55 %, у русского населения Чукотского АО — 52 %, у эвенов 46 %, у чукчей 41 % [2, 5].

Несмотря на то, что полиморфизм rs1128503 является синонимичным, имеются данные о его влиянии на риск развития ряда заболеваний и эффективность терапии (табл. 2). В работе [10] показано, что наличие аллеля Т коррелирует с ранней стадией болезни и меньшей скоростью прогрессирования и является независимым прогностическим фактором меньшего риска смерти при раке кишечника. Однако в работах разных авторов наблюдаются противоречия, например, в работе [36] сообщается, что гомозиготы ТТ предрасположены к развитию рака кишечника с микросателлитной нестабильностью (отношение шансов (OR) 3,2). Вероятность достижения большого молекулярного ответа при лечении иматинибом хронического миелолейкоза коррелировала с числом аллелей Т в локусе 1236 (большого молекулярного ответа достигли 85 % гомозигот ТТ и 41 % гомозигот СС). Однако повыше-

Таблица 1. Распространение аллелей полиморфизмов гена *ABCB1* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>)

| rs | Аллель | Популяции | | | | | |
|------------|--------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | европейские | | африканские | | азиатские | |
| | | Наибольшая частота | Наименьшая частота | Наибольшая частота | Наименьшая частота | Наибольшая частота | Наименьшая частота |
| rs 1128503 | С | 61,4 | 45,5 | 93,3 | 75 | 43,3 | 29,1 |
| | Т | 54,5 | 38,6 | 25 | 6,7 | 70,9 | 56,7 |
| rs2032582 | А | 4,3 | 0 | 17 | 0 | 15,2 | 0 |
| | Т | 48,6 | 33,9 | 12,5 | 1,7 | 61,6 | 40,9 |
| | С | 61,9 | 51,4 | 98,3 | 79 | 59,1 | 23,6 |
| rs1045642 | С | 54,8 | 37,5 | 92,9 | 79,2 | 63,1 | 47,7 |
| | Т | 62,5 | 45,2 | 20,8 | 7,1 | 52,3 | 36,9 |

ние эффективности лекарственных средств у носителей аллеля Т может приводить к увеличению риска развития нежелательных лекарственных реакций. Например, у них выше частота нефротоксичности, вызванной такролимусом [22].

Полиморфизм rs2032582 приводит к замене гуанина в 2677 положении на тимин или аденин (рисунок). Частота аллелей 2677G, 2677T и 2677A в разных этнических группах сильно различается. Аллель G наиболее распространен в африканских популяциях, наименее — в азиатских, аллель T имеет обратный паттерн распределения. Европеоидные популяции занимают промежуточное положение. Аллель A обнаруживается в некоторых популяциях различного происхождения, его частота в европейских популяциях составляет около 4 % (табл. 1). Кроме того, в этом положении известна активирующая мутация G2677C. Все четыре варианта нуклеотидной последовательности гена кодируют разные аминокислоты (в 893 положении белка могут находиться аланин, серин, треонин или пролин). Замены приводят к изменению конформации белка и нарушению его активности и субстратной специфичности, причем разные замены приводят к разным структурным изменениям [38].

На территории России наиболее распространен аллель G, хотя его частота различается в зависимости от этнического состава популяций. Так, у русского населения Томска она составляет 51 %, у тувинцев — 47 %, у этнических киргизов (Томская область) — 57 – 59 %. Аллель A встречается у русского населения с низкой частотой (около 2 %), с несколько большей — у монголоидных популяций, например, у тувинцев (до 9 %) [5].

Полиморфизм rs2032582 коррелирует с эффективностью различных препаратов и риском развития и особенностями течения многих заболеваний (табл. 2). Например, показано, что гомозиготы TT имеют больший риск развития рака кишечника с микросателлитной нестабильностью (OR = 3,6) [36]. При хроническом миелолейкозе наличие аллеля G коррелировало с меньшим уровнем ответа (78 % при генотипах TT и TA; 47 % при генотипах GG, GA и GT) [16]. Показано, что у пациентов с раком яичников с минимальной остаточной болезнью < 1 см, гомо- и гетерозиготных по аллелям T и A, после лечения карботакселем и карбоплатином риск рецидива на 49 % ниже, чем при генотипе GG [24].

Полиморфизм rs1045642 приводит к замене цитозина на тимин в 3435 положении (рисунок). Предковый аллель C наиболее распространен в популяциях африканского происхождения, в азиатских и европейских популяциях его частота значительно ниже (табл. 1). Частота аллеля C на территории России значительно варьирует в зависимости от конкретных популяций. Например, среди русского населения Ленинградской области частота аллеля C составила 61 % [6], среди русского населения Томска — 43 % [5], а у рус-

ских Чукотского АО — 50 % [2]. В популяциях монголоидного происхождения частота аллеля C значительно ниже, чем у русского населения. Так, у коренных жителей Чукотского АО (чукчи и эвены) доля аллеля C составляет 36 % [2].

Нуклеотидная замена является синонимичной (Pе1154Pе), однако приводит к нарушению кинетики фолдинга белка [17, 27, 39]. В работе [17] показано, что задержка синтеза полипептидной цепи приводит к нарушению конформации участка связывания субстрата, изменению субстратной специфичности белка и его чувствительности к ингибиторам. Кроме того, имеются данные, что аллель T экспрессируется менее эффективно [21].

Полиморфизм C3435T часто рассматривается как предиктивный фактор риска развития многих заболеваний (онкологических, эпилепсии, язвенного колита и др.), а также как маркер эффективности терапии и клинического исхода [17]. Кроме того, этот полиморфизм коррелирует с особенностями течения различных заболеваний и эффективностью и безопасностью лекарственных препаратов (табл. 2). Например, показано, что у гомозигот TT ниже риск развития метастазов в лимфатических узлах при раке кишечника (OR = 4,45) [10]. У больных хроническим миелолейкозом с генотипом CC и особенно с гаплотипом 1236T-2677G-3435C по этому полиморфизму наблюдается большая вероятность развития первичной устойчивости при лечении иматинибом [32].

У гомозигот TT наблюдается более полное всасывание и замедленное выведение статинов, что способствует большему снижению содержания общего холестерина и липопротеинов низкой плотности [8, 31]. У носителей аллеля T эффективнее лечение ингибиторами протеаз ВИЧ, ниже частота устойчивости к противосудорожным средствам [31]. Однако снижение активности транспорта приводит к увеличению риска развития нежелательных лекарственных реакций, например, к повышению риска развития почечной недостаточности при лечении циклоспорином A или такролимусом [22, 31]. При лечении сердечными гликозидами при генотипе TT по полиморфизму C3435T наблюдаемая концентрация дигоксина в плазме крови на 30 % выше, чем при генотипе CC, а риск развития гликозидной интоксикации в 4,4 раза больше [7, 8].

Однако эти результаты подтверждаются не всеми авторами, например, в работе [49] сообщается о зависимости фармакокинетики дигоксина от генотипа по гаплотипам ABCB1, но не по отдельным полиморфизмам, хотя такие различия могут быть обусловлены особенностями этнического состава анализируемых популяций и размерами и составом выборок — 103 пациента с постоянной формой мерцательной аритмии из России в работе [8] и 20 здоровых добровольцев из Китая в работе [49]. Это делает необходимым дополнительные клинические исследования для определения возможности практического применения геноти-

пирования *ABCB1* для определения дозирования дигоксина и других его субстратов [7].

Анализируемые однонуклеотидные полиморфизмы наследуются в составе одного гаплотипа, наиболее частыми комбинациями аллелей являются ТТТ и СГС. Каждый дополнительный измененный аллель приводит к большему выражению функциональных различий. Имеются данные, что гаплотип ТТТ коррелирует с риском развития болезни Крона и рака кишечника с микросателлитной нестабильностью [27, 36]. В работе [35] гаплотип ТТТ был выявлен у 24 % пациентов с раком кишечника и 3 % лиц контрольной группы. У носителей гаплотипа ТТ по полиморфизмам 2677 и 3435 выше уровень иматиниба в плазме крови (уровня 1000 нг/мл достигают 60 % пациентов с гаплотипом ТТ и 36 % при других гаплотипах) [16].

Ген *ACBG2* (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2), ранее называвшийся *BCRP* (breast cancer resistance protein) был обнаружен в 1998 г. в клетках рака молочной железы при селекции на устойчивость к доксорубину в присутствии ингибитора р-гликопротеина верапамила [15].

Транспортер *ABCG2* переносит различные соединения независимо от их структуры и заряда, в том числе многие лекарства (сульфаты эстрогенов, но не свободные эстрогены, производные тамоксифенов, фитоэстрогены, флавоноиды, gefitinib, imatinib, docosorubicin, mitoxantron, anthracycline) и их метаболиты [42]. Он является мощным транспортером уратов, нарушение активности *ABCG2* приводит к повышению уровня мочевой кислоты в плазме крови и повышению риска развития подагры [14, 33]. Кроме того, *ABCG2* определяет секрецию различных веществ, в том числе витаминов (рибофлавина) и лекарств в молоко [48]. Этот ген экспрессируется в эпителиальных клетках различных органов — печени, почках, тонком кишечнике, участвует в образовании гистогематических барьеров.

Показано, что наличие в клетке активного *ABCG2* эффективно защищает ее в системе *in vitro* от действия нилотиниба (устойчивость повышается в 8,8 раз), дасатиниба (устойчивость повышается в 7,8 раз) и в меньшей степени бозотиниба (устойчивость повышается в 1,6 раза), в то время как *ABCB1* не влияет на устойчивость к бозотинибу и оказывает минимальный

Таблица 2. Клиническая значимость полиморфизмов гена *ABCB1*

| Полиморфизм | Аллель или генотип | Клиническое значение | Источники |
|-------------------------|--------------------|--|------------------|
| rs1128503 1236 T>C | ТТ | Выше эффективность иринотекана, митоксантрона, митотрексана, иматиниба. | [21], [16], [20] |
| | ТТ | Выше риск развития рака кишечника. | [36] |
| | Т- | Более легкое течение рака кишечника. | [10] |
| | Т- | Выше риск развития почечной недостаточности после трансплантации печени при лечении такролимусом. | [22] |
| | СС | Ниже выживаемость при остром миелолейкозе. | [20] |
| | СС | Выше продолжительность жизни при раке простаты при лечении доцетакселем и талидомидом. | [41] |
| rs2032582 2677T>A/G | GG | Ниже скорость развития нейропатии при лечении талидомидом и доцетакселем. | [41] |
| | GG | Выше продолжительность жизни при раке простаты при лечении доцетакселем и талидомидом. | [41] |
| | GG | Ниже выживаемость при остром миелолейкозе. | [20] |
| | GG | Выше риск рецидива после лечения рака яичников паклитакселем и карбоплатином. | [24] |
| | Т- | Ниже вероятность первичной устойчивости к иматинибу. | [32] |
| | Т- | Выше риск развития почечной недостаточности после трансплантации печени при лечении такролимусом. | [22] |
| | А- | Выше уровень ответа при лечении хронического миелолейкоза иматинибом. | [34] |
| | ТТ | Выше риск развития рака кишечника. | [36] |
| rs1045642 3435 T>A/C | ТТ | Выше чувствительность к митоксантрону и этопозиду при остром миелолейкозе. | [20] |
| | ТТ | Выше риск развития рака кишечника. | [27], [35] |
| | ТТ | Ниже риск метастазирования в лимфатические узлы при раке кишечника. | [10] |
| | ТТ | Выше риск развития гликозидной интоксикации при лечении дигоксином. | [8] |
| | ТТ | Выше риск развития почечной недостаточности при лечении циклоспорином А. | [31] |
| | Т- | Выше эффективность действия ряда статинов, стероидов, иматиниба. | [31] |
| | Т- | Выше риск развития почечной недостаточности после трансплантации печени при лечении такролимусом. | [22] |
| | СС | Выше вероятность первичной устойчивости к иматинибу при лечении хронического миелолейкоза. | [32] |
| | СС | Выше риск развития бронхиальной астмы и развития терапевтически резистентной астмы. Выше потребность в системных глюкокортикоидах. | [6] |

эффект на действие нилотиниба (устойчивость повышается в 1,3 раза) и несколько больший — на действие дасатиниба (устойчивость повышается в 3,7 раза) [23]. Есть данные, что *ABCG2* может обеспечивать устойчивость к иматинибу стволовых клеток, несущих филадельфийскую хромосому, что может объяснять их малую чувствительность к иматинибу [29].

Полиморфизмы гена *ABCG2*, изменяющие его экспрессию, активность или субстратную специфичность, могут влиять на эффективность лекарств, риск развития нежелательных лекарственных реакций, а также на предрасположенность к развитию различных заболеваний (табл. 3).

В кодирующей последовательности гена *ABCG2* известно более 20 однонуклеотидных полиморфизмов, из которых наибольшее внимание исследователей привлекают два наиболее распространенных (rs2231142 и rs2231137). Кроме того, интерес представляют полиморфизмы, приводящие к образованию стоп-кодона, и, соответственно, отсутствию функционального белка (rs72552713, rs3201997).

Полиморфизм rs2231142 (421C>A) приводит к замене цитозина в 421 положении на аденин (рисунок). Частота аллеля А варьирует от 0 % в некоторых африканских популяциях до 37,5 % в азиатских. Частота аллеля А у европеоидного населения составляет 4,5 – 12 %. Нуклеотидная замена приводит к замене глутамина в 141 положении на лизин, что снижает стабильность белка и приводит к его ускоренной деградации [18].

При полногеномном скрининге ассоциаций (GWAS) обнаружена корреляция этого полиморфизма с риском развития подагры (для каждого аллеля А OR = 1,74) [14]. В исследованиях *in vitro* показано, что этот полиморфизм снижает транспорт уратов на 54 % [47].

Имеются данные, что у носителей аллеля А наблюдается большая продолжительность жизни при раке простаты по сравнению с гомозиготами по дикому типу (средняя выживаемость 7,4 и 5,3 лет, соответственно) [19]. Кроме того, у гетерозигот уровень аккумуляции гефитиниба выше, чем у пациентов с генотипом СС [30].

Полиморфизм rs72552713 (376 C>T) приводит к замене глутамина в 126 положении на стоп-кодон и отсутствию активного белка [42]. Наибольшая частота аллеля Т наблюдается в азиатских популяциях (2 %), рисунок.

У носителей аллеля Т повышен риск развития гиперурикемии (OR = 5,97) и больше вероятность развития подагры [33]. У гомозигот ТТ нарушается гомеостаз порфиринов, повышен риск развития протопорфирии [44].

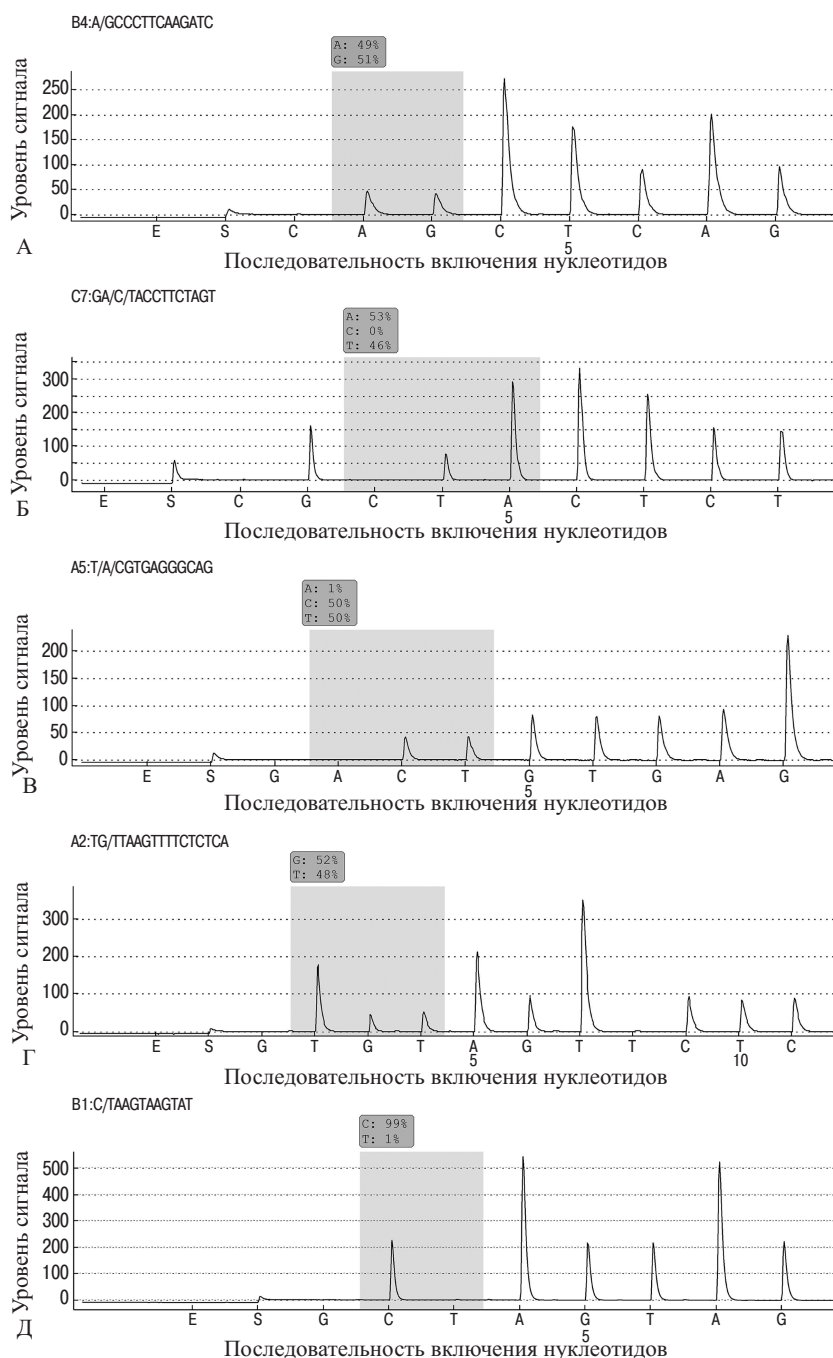
Показано что эффективность применения митоксантрона при лечении рассеянного склероза увеличивается при снижении активности транспортеров эффлокса: у носителей “быстрого” генотипа по генам *ABCB1* и *ABCG2* уровень ответа на терапию составил 63 %, “промежуточного” — 80 %, “медленного” — 85 %, причем к моменту развития клинического ответа у носителей медленного генотипа была меньшая кумулятивная доза [12].

В ходе многочисленных исследований установлено, что полиморфизмы в генах *ABCB1* и *ABCG2* связаны с различными клинически значимыми состояниями. В большинстве случаев наличие менее активного аллеля транспортеров эффлокса коррелирует с повышением эффективности многих лекарственных препаратов и большей выраженностью ответа на лечение.

Однако вместе с этим у носителей менее активных аллелей выше риск развития нежелательных лекарственных реакций, особенно при применении лекарст-

Таблица 3. Клиническая значимость полиморфизмов гена *ABCG2*

| Полиморфизм | Аллель или генотип | Клиническое значение | Источники |
|-----------------------|--------------------|--|------------------|
| rs2231142 421C>A | AA | Выше концентрация в плазме крови иматиниба, розувастатина, дифломотека-на, сульфасалазина, гефитиниба. | [31], [45], [43] |
| | AA | Выше вероятность достижения полного молекулярного ответа при лечении иматинибом. | [25] |
| | AA | Повышен уровень мочевой кислоты в плазме. | [33] |
| | A- | Повышена биодоступность топотекана. | [18] |
| | AA | Повышена чувствительность к нилотинибу, дасатинибу, бозотинибу <i>in vitro</i> . | [23] |
| | A- | Большая продолжительность жизни при раке простаты. | [19] |
| | A- | Риск развития диареи при лечении гефитинибом. | [13] |
| rs72552713 376 C>T | АС | Выше риск развития подагры, эффективность выведения уратов снижена в 2 раза. | [14], [47] |
| | СС | Выше риск развития диареи при лечении ритуксимабом с доксорубицином, винкристином или преднизолоном при диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфоме. | [26] |
| | Т- | Повышен уровень мочевой кислоты в плазме, выше риск развития подагры. | [33] |
| | Т- | Нарушен транспорт метотрексата и гематопорфирина. | [44] |



Пример детекции полиморфизмов в генах *ABCB1* и *ABCG2* с использованием системы генетического анализа PyroMark Q24.

А – полиморфизм rs1128503, гетерозигота СТ (секвенирование в обратном направлении).

Б – полиморфизм rs2032582, гетерозигота АТ (гетерозигота по двум редким аллелям, секвенирование в обратном направлении)

В – полиморфизм rs1045642, гетерозигота СТ (секвенирование в прямом направлении).

Г – полиморфизм rs2231142, гетерозигота СА (секвенирование в обратном направлении).

Д – полиморфизм rs72552713, гомозигота СС (секвенирование в прямом направлении).

венных средств с узким терапевтическим диапазоном, и выше предрасположенность к развитию некоторых заболеваний, в том числе онкологических.

Это свидетельствует о том, что при назначении лекарственных препаратов необходимо учитывать индивидуальные особенности систем транспорта и биотрансформации пациента в совокупности с информа-

цией о фармакокинетических параметрах применяемых препаратов.

Методика детекции полиморфизмов

Для определения индивидуальных фармакокинетических особенностей нами разработана группа генетических тестов, включающая наборы для определения функционального состояния системы биотрансформа-

ции, расчета оптимальной дозировки варфарина [4], а также группа тестов для анализа полиморфизмов в генах транспортеров.

Разработанный нами профиль генетического исследования “Транспорт лекарств” (набор реагентов “ФАРМА-скрин-транспорт” производства ФБУН “Центральный НИИ эпидемиологии”) включает пять вышеописанных полиморфизмов в двух генах транспортных белков семейства *ABC* (*rs1128503*, *rs2032582* и *rs1045642* в *ABCB1*, *rs2231142* и *rs72552713* в *ABCG2*). Для определения генотипов по анализируемому в профиле локусам используется метод пиросеквенирования. Анализ проводится на приборах серии PyroMark (“Qiagen”, Германия) [4].

Пиросеквенирование — метод определения нуклеотидной последовательности в режиме реального времени, основанный на детекции пирофосфата, образующегося при элонгации цепи ДНК в результате синтеза второй цепи ДНК на матрице одноцепочечной ДНК [37]. В результате ферментативного превращения пирофосфата возникает хемилюминесцентный сигнал, который регистрируется CCD-камерой прибора-пиросеквениатора и отображается в виде пиков на графике (пирограмме). Высота пиков пропорциональна количеству нуклеотидов, встроившихся во вновь синтезированную, комплементарную ДНК-матрицу, цепь ДНК.

Для анализа каждого полиморфизма используется пара амплифицирующих праймеров, обеспечивающих амплификацию участка ДНК, включающего детектируемый локус, и один секвенирующий праймер для элонгации ДНК при пиросеквенировании. Один из амплифицирующих праймеров несет биотин для получения одноцепочечной ДНК и ее фиксации на носителе во время пиросеквенирующего синтеза. Для проведения пиросеквенирования используется амплификат, полученный в результате ПЦР, и секвенирующий праймер. В реакции пиросеквенирующего синтеза участвуют четыре фермента (ДНК-полимераза, АТФ-сульфурилаза, люцифераза, апираза). Субстратами для ферментов служат ДНК-матрица, нуклеотиды, аденозин-5'-фосфосульфат и люциферин. Добавление нуклеотидов в реакцию осуществляется последовательно в соответствии с нуклеотидной последовательностью анализируемого генетического локуса. В течение реакции комплементарная цепь ДНК достраивается и в соответствии с детектируемыми сигналами на пирограмме определяется нуклеотидная последовательность исследуемого генетического локуса. Этот метод позволяет быстро и надежно определять аллельное состояние анализируемого генетического полиморфизма [4].

Для каждого анализируемого полиморфизма подобраны амплифицирующие и секвенирующие праймеры в соответствии с требованиями к системам PyroMark, оптимизированы условия полимеразной цепной реакции и последующего пиросеквенирования. Тестирова-

ние разработанных систем проводили на образцах ДНК человека. Всего было протестировано по 20 – 35 образцов ДНК для каждого полиморфизма. Для полиморфизмов *rs1128503*, *rs1045642* и *rs2231142* выявлены все три возможных генотипа, для полиморфизма *rs72552713* обнаружена только гомозигота СС, что связано с низкой распространенностью аллеля Т в анализируемой популяции. Для полиморфизма *rs2032582*, кроме двух частых аллелей, обнаружен редкий аллель А. Примеры пирограмм, полученных при тестировании, представлены на рисунке. Таким образом, разработанные системы позволяют идентифицировать наличие изучаемых полиморфизмов в гомозиготном или гетерозиготном состоянии.

Профиль генетического исследования “Транспорт лекарств”, предназначенный для определения аллельного состояния пяти полиморфных локусов в генах *ABCB1* и *ABCG2*, может использоваться как в научных целях, так и для разработки индивидуализированного подхода к назначению некоторых лекарственных препаратов (например, дигоксина, циклоспорина), определения групп риска развития ряда онкологических синдромов, заболеваний, связанных с нарушением обмена, а также для прогнозирования эффективности и безопасности терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. П. Бочков, В. П. Пузырев, С. А. Смирнихина, *Клиническая генетика*, ГЭОТАР-Медиа, Москва (2011).
2. И. В. Игнатъев, *Автореф. дис. канд. биол. наук*, Москва (2007).
3. *Клиническая фармакогенетика*, В. Г. Кукес, Н. П. Бочков (ред.), ГЭОТАР-Медиа, Москва (2007).
4. К. О. Миронов, Е. А. Дунаева, О. П. Дрибноходова, Г. А. Шипулин, *Современные медицинские технологии*, № 6, 39 – 41 (2011).
5. Я. Р. Пельс, А. В. Марусин, М. Г. Спиридонова, В. А. Степанов, *Мол. биол.*, **41**(6), 982 – 988 (2007).
6. М. А. Симакова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Санкт-Петербург (2011).
7. Д. А. Сычев, И. В. Игнатъев, Д. А. Андреев и др., *Рос. кардиол. журн.*, **60**(4), 64 – 68 (2006).
8. Д. А. Сычев, И. В. Игнатъев, Н. А. Гасанов, В. Г. Кукес, *Pacific medical Journal*, № 4, 21 – 26 (2006).
9. Д. А. Сычев, О. В. Муслимова, Е. В. Гаврисюк и др., *Справочник заведующего КДЛ*, № 3, 22 – 33 (2011).
10. E. Balcerczak, M. Panczyk, S. Piaskowski, et al., *Int. J. Colorectal Dis*, **25**(10), 1167 – 1176 (2010).
11. S. Choudhuri, C. D. Klaassen, *Int. J. Toxicol.*, **25**(4), 231 – 259 (2006).
12. S. Cotte, N. von Ahnen, N. Kruse, et al., *Brain*, **132**(9), 2517 – 2530 (2009).
13. G. Cusatis, V. Gregorc, J. Li, et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **98**(23), 1739 – 1742 (2006).
14. A. Dehghan, A. Köttgen, Q. Yang, et al., *Lancet*, **372**(9654), 1953 – 1961 (2008).
15. L. A. Doyle, W. Yang, L. V. Abruzzo, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**(26), 15665 – 15670 (1998).
16. S. Dulucq, S. Bouchet, B. Turcq, et al., *Blood*, **112**(5), 2024 – 2027 (2008).
17. K. L. Fung, M. M. Gottesman, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1794**(5), 860 – 871 (2009).

18. T. Furukawa, K. Wakabayashi, A. Tamura, et al., *Pharm. Res.*, **26**(2), 469 – 479 (2009).
19. E. R. Gardner, C. M. Ahlers, S. Shukla, *BJU Int.*, **102**(11), 1694 – 1699 (2008).
20. H. Gréen, I. J. Falk, K. Lotfi, et al., *Pharmacogenomics J.*, 2010, Epub ahead of print.
21. A. Hamidovic, K. Hahn, J. Kolesar, *J. Oncol. Pharm. Pract.*, **16**(1), 39 – 44 (2010).
22. A. F. Hawwa, P. J. McKiernan, M. Shields, et al., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68**(3) 413 – 421 (2009).
23. C. Hegedüs, C. Özvegy-Laczka, Á. Apáti, et al., *Br. J. Pharmacol.*, **158**(4), 1153 – 1164. (2009).
24. S. E. Johnatty, J. Beesley, J. Paul, et al., *Clin. Cancer Res.*, **14**(17), 5594 – 5601 (2008).
25. D. H. Kim, L. Sriharsha, W. Xu, et al., *Clin. Cancer Res.*, **15**(14), 4750 – 4758 (2009).
26. I. S. Kim, H. G. Kim, D. C. Kim, et al., *Cancer Sci.*, **99**(12), 2496 – 2501 (2008).
27. Ch. Kimchi-Sarfaty, A. H. Marple, Sh. Shinar, et al., *Pharmacogenomics*, **8**(1), 29 – 39 (2007).
28. D. L. Kroetz, S. W. Yee, K. M. Giacomini, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **87**(1), 109 – 116 (2010).
29. C. Lemos, G. Jansen, G. J. Peters, *Br. J. Cancer.*, **98**(5), 857 – 862 (2008).
30. J. Li, G. Cusatis, J. Brahmer, et al., *Cancer Biol Ther.*, **6**(3), 432 – 438 (2007).
31. K. Maeda, Y. Sugiyama, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **23**(4), 223 – 235 (2008).
32. M. Maffioli, M. Camós, A. Gaya, et al., *Leuk. Res.*, **35**(8), 1014 – 1019 (2011).
33. H. Matsuo, T. Takada, K. Ichida, et al., *Sci. Transl. Med.*, **1**(5), 5 – 11 (2009).
34. L. N. Ni, J. Y. Li, K. R. Miao, et al., *Med. Oncol.*, **28**(1), 265 – 269 (2011).
35. M. Panczyk, E. Balcerczak, S. Piaskowski, et al., *Int. J. Colorectal Dis.*, **24**(8), 895 – 905 (2009).
36. U. Potocnik, D. Glavac, M. Dean, *Cancer Genet. Cytogenet.*, **183**(1), 28 – 34 (2008).
37. M. Ronaghi, M. Uhlén, P. Nyrén, *Science*, **281**(5375), 363 – 365 (1998).
38. A. Sakurai, Y. Onishi, H. Hirano, et al., *Biochemistry*, **46**(26), 7678 – 7693 (2007).
39. Z. E. Sauna, C. Kimchi-Sarfaty, S. V. Ambudkar, M. M. Gottesman, *Cancer Res.*, **67**(20), 9609 – 9612 (2007).
40. S. Shugarts, L. Z. Benet, *Pharmaceutical research*, **26**(9), 2039 – 2054 (2009).
41. T. M. Sissung, C. E. Baum, J. Deeken, et al., *Clin. Cancer Res.*, **14**(14), 4543 – 4549 (2008).
42. Y. Sugimoto, S. Tsukahara, E. Ishikawa, J. Mitsuhashi, *Cancer Sci.*, **96**(8), 457 – 465 (2005).
43. N. Takahashi, M. Miura, S. A. Scott, et al., *J. Hum. Genet.*, **55**(11), 731 – 737 (2010).
44. A. Tamura, M. Watanabe, H. Saito, et al., *Mol. Pharmacol.*, **70**(1), 287 – 296 (2006).
45. B. Tomlinson, M. Hu, V. W. Lee, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, **87**(5), 558 – 562 (2010).
46. M. Uhr, A. Tontsch, C. Namendorf, et al., *Neuron.*, **57**(2), 203 – 209 (2008).
47. O. M. Woodward, A. Kottgen, J. Coresh, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(25), 10338 – 10342 (2009).
48. Ch.-P. Wu, A. M. Calcagno, S. V. Ambudkar, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **1**(2), 93 – 105 (2008).
49. P. Xu, Z. P. Jiang, B. K. Zhang, et al., *Pharmacology*, **82**(3), 221 – 227 (2008).

Поступила 02.12.11

POLYMORPHISM OF ABCB1 AND ABCG2 GENES ENCODING DRUG TRANSPORTERS AND THEIR INVESTIGATION BY PYROSEQUENCING

O. P. Dribnokhodova, K. O. Mironov, E. A. Dunaeva, and G. A. Shipulin

Central Research Institute of Epidemiology, ul. Novogireevskaya 3a, Moscow, 111123, Russia

Published data on the effect of transporter propeins of the ABC family in the features of drug pharmacokinetics in the human organism are reviewed. Clinical significance of mononucleotide polymorphisms in *ABCB1* and *ABCG2* genes is analyzed. A set of genetic tests based on pyrosequencing for determining the allele state in rs1128503 (1236 T>C), rs2032582 (2677T>A/G), rs1045642 (3435 T>A/C), rs2231142 (421C>A), and rs72552713 (376 C>T) polymorphisms in *ABCB1* and *ABCG2* genes has been developed and verified. These tests can be used in both research work and clinical practice for calculating recommended doses of various drugs, predicting their therapeutic efficacy, and determining groups of risk with respect to the development of undesired secondary reactions.

Key words: Pharmacogenetics; pharmacokinetics; pyrosequencing; transporter proteins; *ABCB1*; *ABCG2*