

В.Й. Кресюн ^{*},
В.В. Філюк ^{**},
П.Б. Антоненко ^{*},
К.К. Рогач ^{**},
Ю.М. Даниленко ^{**},
Г.В. Мозолевич ^{**}

ГЕНОТИП ЦИТОХРОМУ-450 2С9 У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ

Одеський національний медичний університет ^{*}
кафедра загальної та клінічної фармакології
(зав. - д. мед. н., чл.-кор. НАМН України В.Й. Кресюн)
Одеський обласний протитуберкульозний диспансер ^{**}
(гол. лікар – почесний лікар України В.В. Філюк)
Одеса, 65000, Україна
Odesa national medical university ^{*}
general and clinical pharmacology department
Odesa regional antituberculous dispensary ^{**}
Odesa, 65000, Ukraine
e-mail: peterantonenko@yandex.ua

Ключові слова: ген CYP2C9, поліморфізм, генотип, туберкульоз

Key words: CYP2C9 gene, polymorphism, genotype, tuberculosis

Реферат. Генотип цитохрома-450 2С9 у больных туберкулезом. Кресюн В.И., Філюк В.В., Антоненко П.Б., Рогач К.К., Даниленко Ю.Н., Мозолевич Г.В. Целью данной работы было исследование полиморфизма генотипа цитохрома-450 (СУР) 2С9 СУР2С9 на юге Украины у больных туберкулезом и сравнение с аналогичными показателями контрольной группы на примере Одесского региона. С помощью ПЦР (полимеразно-цепной реакции) и эндонуклеазного анализа был исследован полиморфизм СУР2С9. Образцы крови были получены от больных с впервые диагностированным туберкулезом легких на базе Одесского областного противотуберкулезного диспансера и здоровых доноров в Одесской областной станции переливания крови в 2010-2012 гг. Согласно генотипа СУР2С9 из 55 больных туберкулезом 67,3% индивидов были носителями гомозиготного дикого типа гена СУР2С9*1/*1, по 21,8% и 3,6% - гетерозиготных генотипов СУР2С9*1/*2 и СУР2С9*1/*3. Только 7,2% индивидов относились к носителям генотипа медленных метаболитаторов - СУР2С9*2/*2, *2/*3, *3/*3. В общем, мутантные аллели СУР2С9*2 и СУР2С9*3 встречались у больных туберкулезом мужского пола в 1,8 раза чаще, чем среди здоровых добровольцев того же пола. Больные туберкулезом возрастом более 30 лет почти в 3 раза чаще имели мутантный аллель СУР2С9*2, чем представители контрольной группы.

Abstract. Genotype of cytochrome-450 2C9 in patients with tuberculosis. Kresyun V.I., Filyuk V.V., Antonenko P.B., Rogach K.K., Danylenko Yu.M., Mozolevych G.V. The aim of present work was to investigate CYP2C9 polymorphism in the south of Ukraine in TB-patients and comparing with the same data of control group by the example of Odessa region. Gene CYP2C9 polymorphism was studied with the help of PCR (polymerase chain reaction) and endonuclease analysis. The blood samples were obtained from patients with new cases of pulmonary TB from Odessa regional antituberculous dispensary and healthy donors in Odessa district station of blood transfusion in the year 2010-12. According to genotype of CYP2C9 of 55 TB-patients, 67,3% persons were the carriers of homozygote wild gene CYP2C9*1/*1, 21,8 and 3,6% - heterozygote genes CYP2C9*1/*2 and CYP2C9*1/*3. Only 7,2% individuals belonged to carriers of slow metabolizers genotype - CYP2C9*2/*2, *2/*3, *3/*3. In general, the mutated alleles CYP2C9*2 and CYP2C9*3 in TB-males were observed by 1,8 times more frequently than among healthy donors of the same gender. TB-patients older than 30 years more frequently had mutated allele CYP2C9*2, almost by 3 times than individuals from control group.

Згідно з сучасними літературними даними, цитохром 2С9 (СУР2С9) бере участь у метаболізмі пероральних цукрознижуючих засобів (глібурид, бугамід), непрямих антикоагулянтів (варфарин), нестероїдних протизапальних засобів (диклофенак, целекоксиб), антагоністів ангіотензин II рецептора (лозартан) [2]. З іншого боку, є

низка препаратів, що можуть впливати на активність цитохрому СУР2С9, зокрема і протитуберкульозні препарати рифампіцин, ізоніазид [10].

Різні етнічні групи можуть мати різну поширеність повільних метаболізаторів, і після отримання однакових доз певних лікарських

препаратів різний відсоток хворих у кожній популяції досягне терапевтичного рівня препарату в організмі. Тому загальна ефективність рекомендованих доз може відрізнятись у різних етнічних групах. Таким чином, ефективність стандартної дози у пацієнтів в різних популяціях треба перевірити [7].

Водночас у літературі майже відсутні дані щодо поширеності поліморфізму гена *CYP2C9* в Україні як серед здорових людей, так і серед хворих. Тому метою цієї роботи було дослідження поліморфізму гена *CYP2C9* на півдні України у хворих на туберкульоз і порівняння з аналогічними результатами контрольної групи на прикладі Одеського регіону.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Зразки крові були отримані від 55 хворих на туберкульоз легень, що вперше діагностований, в Одеському обласному протитуберкульозному диспансері в 2012 р., серед яких 27 (49,1 %) жінок, решта - 28 (50,9%) – склали чоловіки. Вік хворих становив від 19 до 73 років (середній вік – 37,6 року). Для контролю використовували зразки крові, що були отримані від 181 здорового донора в Одеській обласній станції переливання крові в 2010-11 рр., серед яких 81 (44,8 %) жінка, решта - 100 (55,2%) –чоловіки. Вік донорів становив від 17 до 62 років (середній вік – 33,8 року). ДНК матеріал був екстрагований з крові донорів з використанням набору ДНК-сорбБ (АмпліСенс, Російська Федерація). Генотип *CYP450 2C9* за допомогою полімеразно-ланцю-

гової реакції (ПЛР) та ендонуклеазного аналізу за методом Sullivan-Klose T.H. et al., 1996 [9]. Для ПЛР-ампліфікації *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* дві пари відповідних специфічних праймерів. ПЛР продукти *CYP2C9*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 алелі *CYP2C9*2* при застосуванні *AvaII* або алелі *CYP2C9*3* при застосуванні *NsiI*. 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 у 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. Статистичний аналіз було проведено із залученням Microsoft Excel і χ^2 -критерію.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Відповідно до генотипу *CYP2C9* з 55 хворих на туберкульоз 67,3% індивідів були носіями гомозиготного дикого типу гена *CYP2C9*1/*1* (табл. 1). Також 21,8% і 3,6% хворих були носіями гетерозиготних генів *CYP2C9*1/*2* і *CYP2C9*1/*3*. Носіями гомозиготного мутантного гена *CYP2C9*3/*3* було 3,6%, гетерозиготний мутантний ген *CYP2C9*2/*3* спостерігали також у 3,6% індивідів (табл. 2). Хворих з гомозиготним мутантним геном *CYP2C9*2/*2* не було зафіксовано.

Таблиця 1

Генотип і алелі гена *CYP2C9* серед хворих на туберкульоз (кількість)

Генотип (n=55)					
<i>CYP2C9*1/*1</i>	<i>CYP2C9*1/*2</i>	<i>CYP2C9*1/*3</i>	<i>CYP2C9*2/*2</i>	<i>CYP2C9*2/*3</i>	<i>CYP2C9*3/*3</i>
37	12	2	0	2	2
Алель (n=110)					
<i>CYP2C9*1</i>		<i>CYP2C9*2</i>		<i>CYP2C9*3</i>	
88		14		8	

Серед здорових донорів дещо частіше зустрічались носії гомозиготного дикого типу гена *CYP2C9*1/*1* – 76,1%, водночас рідше зустріча-

лись носії варіантних генотипів - *CYP2C9*2/*2*, *CYP2C9*2/*3* або *CYP2C9*3/*3* – 2,7% проти 7,2% у хворих на туберкульоз [5].

Поширеність генотипів *CYP2C9* серед здорових донорів і хворих на туберкульоз (%)

Результати	Генотип					
	<i>CYP2C9</i> *1/*1	<i>CYP2C9</i> *1/*2	<i>CYP2C9</i> *1/*3	<i>CYP2C9</i> *2/*2	<i>CYP2C9</i> *2/*3	<i>CYP2C9</i> *3/*3
Здорові донори	76,1	10,6	10,6	0,9	0,9	0,9
Хворі на туберкульоз	67,3	21,8	3,6	0	3,6	3,6

Загалом, з досліджених 110 алелей *CYP2C9* 80,0% становила алель *CYP2C9**1, по 12,7% і 7,3% становили алелі *CYP2C9**2 і *CYP2C9**3 відповідно. Водночас серед здорових донорів 86,7% були носіями дикої алелі *CYP2C9**1, по 6,6% - мутованих алелей *CYP2C9**2 і *CYP2C9**3.

Згідно з літературними даними, пацієнти з генотипом *CYP2C9**1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3 потребують зниження дози варфарину на 19,6%, 33,7%, 36,0%, 56,7% і 78,1% відповідно відносно генотипу *CYP2C9**1/*1 [8]. Згідно з Vacis Tatarūnas et al., 2011 зниження дози варфарину у пацієнтів з генотипом *CYP2C9**1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3 на 2,7%, 26,7%, 51,5%, 61,5% відповідно відносно генотипу *CYP2C9**1/*1 [1]. Отже, генотипи *CYP2C9**2/*2, *2/*3, *3/*3 відзначались найбільшим зниженням ферментної активності, тому умовно носіїв вищезгаданих генотипів можна зарахувати до повільних метаболізаторів.

Серед чоловіків носії гомозиготного типу дикого гена *CYP2C9**1/*1 становили більшість, а саме 60,7%. Носії гетерозиготного типу немутованого гена – *CYP2C9**1/*2 або *CYP2C9**1/*3 становили 25,0% і 3,6%. Носіями генотипів, що відповідали за повільний тип метаболізму, було 10,2% чоловіків. Серед жінок також переважали носії гомозиготного типу дикого гена *CYP2C9**1/*1 – 74,1%; близько 18,5 і 3,7% становили носії гетерозиготного типу немутованого гена – *CYP2C9**1/*2 або *CYP2C9**1/*3 відповідно. Нарешті, 3,7% жінок були носіями генотипів, що відповідали за повільний тип метаболізму. Вірогідної гендерної різниці щодо поширеності генотипу *CYP2C9* не було відзначено, водночас відзначалась тенденція до більшої поширеності генотипів швидкого метаболізму серед жінок відносно чоловіків.

При порівнянні поширеності генотипу *CYP2C9* серед здорових добровольців і хворих на туберкульоз відзначалась дещо більша частка носіїв генотипів, що відповідали за повільний

тип метаболізму, серед хворих на туберкульоз (2,7% проти 7,3%). Водночас при порівнянні поширеності генотипу *CYP2C9* з урахуванням гендерних відмінностей відзначалось більша поширеність генотипу *CYP2C9**1/*1 серед здорових добровольців, особливо жіночої статті, а також більша поширеність генотипів, що відповідають за повільний тип метаболізму серед хворих на туберкульоз, особливо чоловічої статті ($p > 0,05$) (рис. 1). Серед хворих на туберкульоз чоловічої статті в 2,5 разу частіше зустрічалась алель *CYP2C9**2 і спостерігався генотип *CYP2C9**1/*2, ніж серед чоловіків контрольної групи ($p < 0,05$). Загалом мутантні алелі *CYP2C9**2 і *CYP2C9**3 зустрічались у хворих на туберкульоз чоловічої статі в 1,8 разу частіше, ніж серед здорових добровольців тієї ж статі ($p < 0,05$). Також вищезазначені мутантні алелі спостерігались дещо частіше серед жінок, які хворіли на туберкульоз, ніж у здорових жінок (14,8% проти 7,7%, $p > 0,05$).

Серед хворих різних вікових категорій кількість носіїв генотипу *CYP2C9**1/*1 коливалась від 60,0% (41-50 років) до 75,0% (21-30 років). У контрольній групі поширеність вищезазначеного генотипу коливалась від 70,3% (31-40 років) до 92,9% (до 20 років). У хворих на туберкульоз поширеність генотипів, що відповідають за повільний тип метаболізму, була найбільшою у віковій категорії 31-40 років – 27,3% проти 2,7% у контрольній групі ($p < 0,05$). Серед хворих на туберкульоз після 30 років була дещо більша кількість носіїв мутантних алелей *CYP2C9**2 і *CYP2C9**3, ніж серед хворих віком до 30 років (21,0% проти 15,2%, $p > 0,05$) (рис. 2). Водночас у контрольній групі це співвідношення становило, навпаки, 12,5% проти 14,2%). Хворі на туберкульоз віком понад 30 років майже в 3 рази частіше мали мутантну алель *CYP2C9**2, ніж особи контрольної групи ($p < 0,05$).

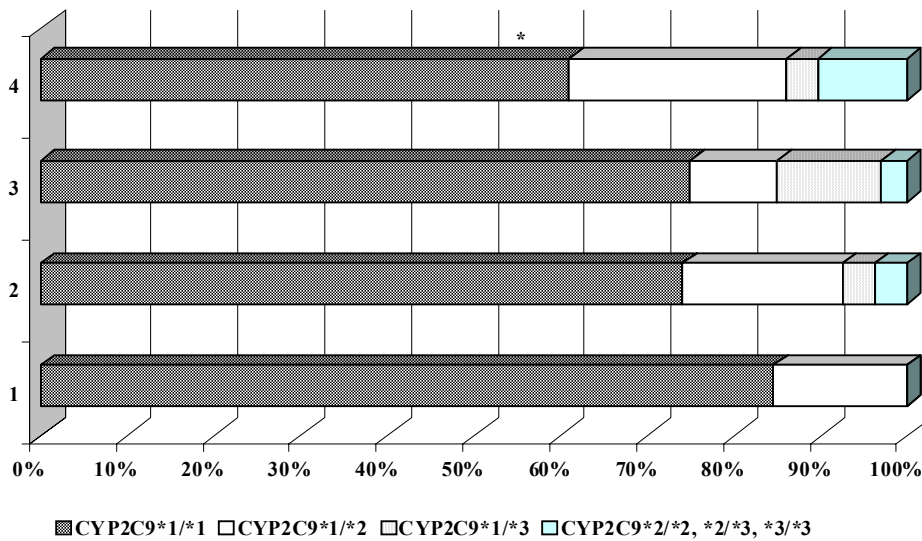


Рис. 1. Поширення генетичного поліморфізму гена *CYP2C9* серед здорових донорів жіночої (1) або чоловічої статі (3) та хворих на туберкульоз жіночої (2) або чоловічої статі (4)

Примітка: * - $p < 0,05$ (відносно відповідної контрольної групи)

Обговорення. Проведений аналіз засвідчив, що у хворих на туберкульоз легень дещо частіше зустрічались носії мутантних алелей і рідше – носії дикої алелі, ніж серед здорових добровольців. Швидкі метаболізатори частіше спостерігались серед жінок, ніж серед чоловіків, причому як здорових, так і хворих на туберкульоз. Мутантні алелі *CYP2C9*2* і *CYP2C9*3* зустрічались у хворих на туберкульоз чоловічої статі в 1,8 разу частіше, ніж серед здорових добровольців тієї ж статі ($p < 0,05$). Також відзначалось певне зростання кількості носіїв дикої алелі

*CYP2C9*1* серед здорових добровольців зі збільшенням віку. Водночас серед хворих на туберкульоз відзначали збільшення кількості носіїв мутантної алелі *CYP2C9*2* зі збільшенням віку, порівняно з контрольною групою. Отже, можна зробити висновок, що приналежність до чоловічої статі, наявність туберкульозної інфекції і старший вік є факторами, що пов'язані з більшою поширеністю мутантних алелей гена *CYP2C9*. Тому у цих категорій можна очікувати уповільнення метаболізму різних ксенобіотиків і збільшення їх токсичності.



Рис. 2. Поширеність алелей гена *CYP2C9* серед здорових (1,3) і хворих на туберкульоз (2,4) у різних вікових групах – до 30 років (1,2) і після 30 років (3,4)

Примітка: * - $P < 0,05$ (відносно відповідної контрольної групи)

Важливо враховувати, що носії повільного типу метаболізму згідно з поліморфізмом гена CYP2C9 мають уповільнений метаболізм пероральних антикоагулянтів (варфарин), багатьох нестероїдних протизапальних засобів (целекоксиб, диклофенак, ібупрофен тощо), що сприяє підвищенню їх токсичності й підвищує ризик розвитку небажаних побічних ефектів, зокрема розвитку геморагій, ураженню шлунково-кишкового тракту [4, 6]. Цікаво, що згідно з літературними даними наявність алелі CYP2C9*3 у чоловіків збільшує ризик розвитку інфаркту міокарда і зниження ризику колоректального раку [3, 5]. Також можливо, що зазнаючи впливу найбільш ефективних протитуберкульозних препаратів (ізоніазид, рифампіцин), поліморфізм CYP2C9, у свою чергу, може визначати кон-

центрацію і дію вищевказаних протитуберкульозних препаратів.

ВИСНОВКИ

1. Серед хворих на туберкульоз 80,0% становила дика алель CYP2C9*1, по 12,7% і 7,3% становили мутовані алелі CYP2C9*2 і CYP2C9*3, що асоціюються з уповільненням метаболізму ксенобіотиків.

2. Мутантні алелі CYP2C9*2 і CYP2C9*3 зустрічались у хворих на туберкульоз чоловічої статі в 1,8 разу частіше, ніж серед здорових добровольців тієї ж статі.

3. Хворі на туберкульоз віком понад 30 років майже в 3 рази частіше мали мутантну алель CYP2C9*2, ніж особи контрольної групи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Антоненко П.Б. Поліморфізм генотипу цитохрому -450 2C9 в Одеському регіоні / П.Б. Антоненко, В.Й. Кресюн // Актуальні проблеми сучасної медицини : Вісник Укр. медичної стомат. академії. - 2011. - Т. 11, вип. 4, ч. II. - С. 51-55.

2. Кресюн В.И. Фармакогенетические основы взаимодействия организма и лекарств / В.И. Кресюн, Ю.И. Бажора. – Одесса: Одес. гос. мед. ун-т, 2007. – 164 с.

3. Cigarette Smoking, Genetic Variants in Carcinogen-metabolizing Enzymes, and Colorectal Cancer Risk / Sean P. Cleary, Michelle Cotterchio, Ellen Shi, Steven Gallinger [et al.] // Am. J. Epidemiol. – 2010. – Vol. 172, N 9. – P. 1000–1014.

4. Genetic predisposition to acute gastrointestinal bleeding after NSAIDs use / Carmen Martínez, Gerardo Blanco, José M Ladero, Elena García-Martín [et al.] // Br. J. Pharmacol. – 2004. – Vol. 141, N 2. – P. 205–208.

5. Impact of CYP2C8 and 2C9 polymorphisms on coronary artery disease and myocardial infarction in the LURIC cohort / E. Haschke-Becher, J. Kirchheiner, O. Trummer, G. Grünbacher [et al.] // Pharmacogenomics. – 2010. – N 10. – P. 1359-1365.

6. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis / J.D. Lindh, L. Holm, M.L. Andersson, A. Rane // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2009. – Vol. 65, N 4. – P. 365-375.

7. Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: integrating pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations / T. Gumbo, A. Louie, W. Liu [et al.] // Antimicrobial Agents Chemotherapy. – 2007. – Vol. 51, N 7. - P. 2329–2336.

8. The influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on optimal warfarin doses after heart valve replacement / V. Tatarūnas, V. Lesauskaitė, A. Veikutienė [et al.] // Medicina. Kaunas. – 2011. – Vol. 47, N1. – P. 25-30.

9. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism / T.H. Sullivan-Klose, B.I. Ghanayem, D.A. Bell [et al.] // Pharmacogenetics. – 1996. – Vol. 6, N 4. – P. 341-349.

10. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development / S.F. Zhou, Z.W. Zhou, L.P. Yang, J.P. Cai // Curr. Med. Chem. – 2009. – Vol. 16, N 27. – P. 3480-3675.

REFERENCES

1. Antonenko PB, Kresyun VY. PolImorfIzm genotipu tsitohromu -450 2S9 v Odeskomu regioni. Aktualni problemi suchasnoyi meditsini: Visnik Ukr. medichnoyi stomat. akademiyi. 2011;11(4):51-55.

2. Kresyun VI, Bazhora YuI. Farmakogeneticheskie osnovyi vzaimodeystviya organizma i lekarstv. Odessa: Odes gos med un-t. 2007;164.

3. Sean P Cleary, Michelle Cotterchio, Ellen Shi, Steven Gallinger. Cigarette Smoking, Genetic Variants in Carcinogen-metabolizing Enzymes and Colorectal Cancer Risk. Am J Epidemiol. 2010;172(9):1000–14.

4. Carmen Martínez, Gerardo Blanco, José M Ladero, Elena García-Martín Genetic predisposition to acute

gastrointestinal bleeding after NSAIDs use. Br J Pharmacol. 2004;141(2):205–8.

5. Haschke-Becher E, Kirchheiner J, Trummer O, Grünbacher G. Impact of CYP2C8 and 2C9 polymorphisms on coronary artery disease and myocardial infarction in the LURIC cohort. Pharmacogenomics. 2010;10:1359-65.

6. Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A. Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis. Eur J Clin Pharmacol. 2009;65(4):365-75.

7. Gumbo T, Louie A, Liu W. Isoniazid bactericidal activity and resistance emergence: integrating

pharmacodynamics and pharmacogenomics to predict efficacy in different ethnic populations. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2007;51(7):2329–36.

8. Tatarūnas V, Lesauskaitė V, Veikutienė A. The influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on optimal warfarin doses after heart valve replacement. *Medicina*. Kaunas. 2011;47(1):25-30.

9. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics*. 1996;6(4):341-9.

10. Zhou SF, Zhou ZW, Yang LP, Cai JP. Substrates, inducers, inhibitors and structure-activity relationships of human Cytochrome P450 2C9 and implications in drug development. *Curr Med Chem*. 2009;16(27):3480-3675.

