

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Восточно-Сибирский научный центр экологии человека»

Ю. И. Черняк, С. И. Колесников, Е. В. Черняк

ЦИТОХРОМ P450: ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

Учебно-методическое пособие

Второе издание, исправленное



УДК 61:577.1

ББК 28.072

Ч-49

Утверждено к печати

Научным советом 45 по медико-экологическим проблемам
здоровья (базовая организация – Федеральное государственное
бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт
медицины труда» Российской академии медицинских наук, Москва)
30 октября 2013 г.

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *Л. П. Кузьмина*
доктор медицинских наук, профессор *О. Л. Лахман*

Черняк Ю. И.

Ч-49

Цитохром P450: основные представления, методы
исследования, значение для практической медицины :
учеб.-метод. пособие / Ю. И. Черняк, С. И. Колесников,
Е. В. Черняк. – 2-е изд., испр. – Иркутск : Изд-во ИГУ,
2014. – 47 с.

ISBN 978-5-9624-0996-2

Целью разработанного учебно-методического пособия являлась попытка краткого изложения представлений о цитохром P450-зависимых монооксигеназах, основных подходах к оценке их состояния. Особое внимание уделено роли системы биотрансформации ксенобиотиков в реализации токсического действия некоторых химических соединений, ее вкладу в формирование профессиональной патологии, значимости клинического использования результатов фармакогенетических исследований, метаболизму эстрогенов и связанными с ним вопросами гормонального канцерогенеза.

Предназначено для врачей различных специальностей, преподавателей заинтересованных кафедр медицинских университетов и Институтов последипломного образования врачей, научных сотрудников учреждений медико-биологического профиля.

УДК 61:577.1

ББК 28.072

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1. Система биотрансформации ксенобиотиков	6
1.1. Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы – 1-я фаза биотрансформации ксенобиотиков	6
1.2. Реакции конъюгации – 2-я фаза биотрансформации ксенобиотиков, функциональное сопряжение между фазами	11
1.3. Индукторы и ингибиторы	13
1.4. Полиморфизм генов	15
2. Методы оценки состояния системы биотрансформации ксенобиотиков	17
2.1. Мониторинг метаболитов тестовых лекарств (ВЭЖХ)	17
2.2. Исследование полиморфизма генов (ПЦР-ПДРФ)	19
2.3. ПЦР в реальном времени	22
2.4. ДНК-чипы	23
3. Значимость цитохромов Р450 в некоторых областях практической медицины	26
3.1. Роль в механизме токсического действия ксенобиотиков. Профессиональное воздействие	26
3.1.1. Диоксины	26
3.1.2. Пары металлической ртути	29
3.2. Фенотипирование и генотипирование	31
3.3. Метаболизм эстрогенов и гормональный канцерогенез	35
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ	42
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	44

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП	–	антипирин
ВЭЖХ	–	высокоэффективная жидкостная хроматография
ПОЛ	–	перекисное окисление липидов
ПХБ	–	полихлорированные бифенилы
ПХДД	–	полихлорированные дибензодиоксины
ПХДФ	–	полихлорированные дибензофураны
НорАП	–	норантипирин
4ГАП	–	4-гидроксиантипирин
3ГМАП	–	3-гидроксиметилантипирин
ХРИ	–	хроническая ртутная интоксикация
СУР	–	принятое в современной номенклатуре обозначение цитохрома Р450
GST	–	глутатион-S-трансфераза

ВВЕДЕНИЕ

В условиях разнообразных химических воздействий на живой организм в процессе эволюции выработались системы биотрансформации ксенобиотиков, обеспечивающие сохранение и поддержание гомеостаза. В настоящее время большое значение уделяется системе биотрансформации липофильных ксенобиотиков, которая состоит из двух функционально сопряженных фаз. Первая фаза представляет собой энзиматическую биотрансформацию липофильных ксенобиотиков при участии цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, вторая – конъюгацию реактивных метаболитов и гидрофильных соединений. Нарушение согласованного процесса функционирования обеих фаз является одним из общих механизмов, приводящих к изменению гомеостаза и развитию патологических процессов.

1. СИСТЕМА БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

1.1. Цитохром P450-зависимые монооксигеназы – 1-я фаза биотрансформации ксенобиотиков

Цитохром P450-зависимые монооксигеназы локализованы в гладком эндоплазматическом ретикулуме и представляют собой полиферментный комплекс, включающий цитохромы P450 и b_5 , НАДФ·Н-цитохром P450- и НАД·Н-цитохром b_5 -редуктазы. По механизму действия цитохром P450 является монооксигеназой. Монооксигеназы функционируют таким образом, что лишь один из атомов кислорода включается в молекулу окисляемого соединения, а другой расходуется на образование воды.

Центральным звеном системы является цитохром P450, представляющий собой гемсодержащий белок. При взаимодействии с окисью углерода восстановленный цитохром (pigment – P) образует карбонильный комплекс, характеризующийся полосой поглощения 450 нм (рис. 1), что определило название фермента – P450.

В процессе функционирования цитохром P450-зависимые монооксигеназы обеспечивают активацию молекулярного кислорода. Известно, что кислород в основном триплетном состоянии инертен и не способен взаимодействовать с органическими соединениями, находящимися в синглетном состоянии. Ферментная система, содержащая цитохром P450, восстанавливает триплетный кислород, делая его реакционноспособным.

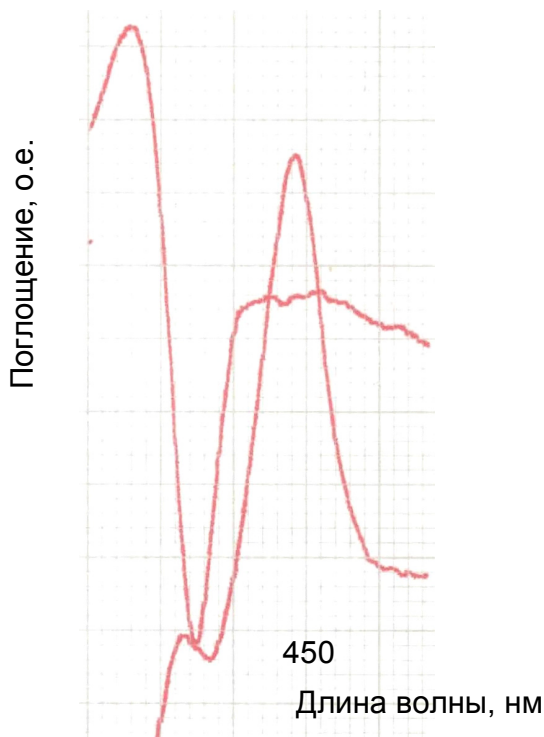


Рис. 1. Дифференциальные спектры цитохромов b_5 и P450 в микросомной фракции гомогената печени крысы

Выделяют пять стадий в процессе биотрансформации субстрата (RH) при участии цитохрома P450 [Арчаков, 1983]. На 1-й стадии (рис. 2) субстрат взаимодействует с окисленной формой цитохрома P450 (Fe^{3+}) с образованием фермент-субстратного комплекса ($RH-Fe^{3+}$). На следующем этапе комплекс восстанавливается ($RH-Fe^{2+}$) электроном, поступающим из цепи переноса при участии НАДФ·Н-цитохром P450-редуктазы и, возможно, цитохрома b_5 . Третья стадия характеризуется взаимодействием восстановленного фермент-субстратного комплекса с кислородом, в результате чего образуется оксикомплекс $RH-(FeO_2)^{2+}$. На 4-й стадии этот тройной комплекс (фермент-субстрат-кислород) восстанавливается вторым электроном, который поступает

из цепи переноса, включающей НАД·Н-цитохром b_5 -редуктазу, и цитохром b_5 . Пятая стадия характеризуется внутримолекулярными превращениями восстановленного тройного комплекса $RH-(FeO_2)^{1+}$ и его распадом с освобождением воды и гидроксированного субстрата. При этом цитохром P450 переходит в исходную форму, готовую к взаимодействию со следующей молекулой субстрата.

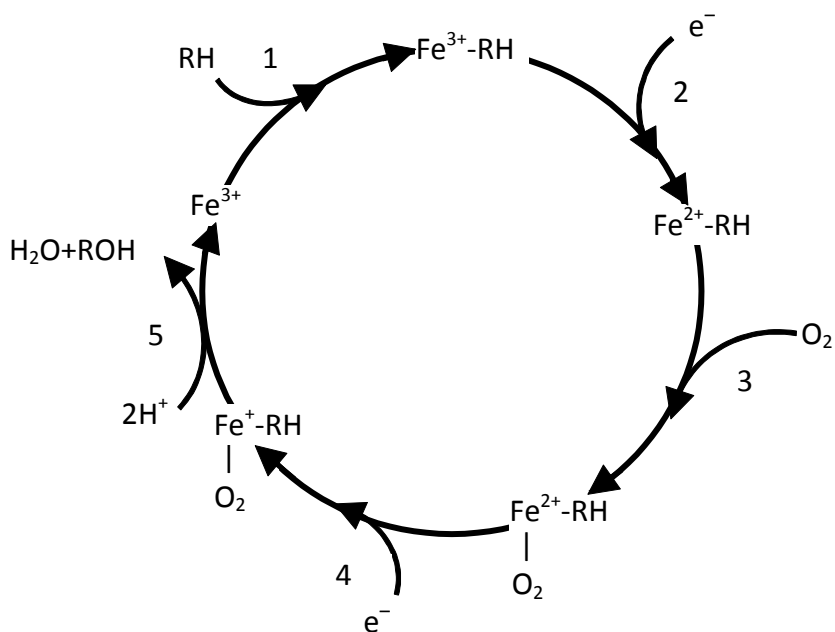


Рис. 2. Каталитический цикл функционирования цитохрома P450

Спектр катализируемых цитохромом P450 реакций включает ароматическое гидроксирование и гидроксирование боковых цепей, N-, O- и S-деалкилирование, N-оксидирование, сульфоксидирование, N-гидроксирование, окислительное дезаминирование, дегалогенизирование, десульфирование и ряд других реакций [Lewis, 2001]. Общим свойством субстратов системы является их гидрофобность, т. е. они не растворяются в воде.

Важно отметить, что функционирование микросомных монооксигеназ сопровождается образованием химически реакционных промежуточных продуктов, а их накопление создает условия для взаимодействия со структурными компонентами клетки [Гуляева, Райс, 2005]. В то же время в реакции образуются продукты неполного восстановления кислорода (одна из основных прооксидантных систем клетки). Активные формы кислорода способны инициировать реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ), следствием чего является образование различных перекисей жирных кислот (ROOH) и нарушение проницаемости биологических мембран [Окислительный стресс ..., 2006].

Компенсация названных эффектов осуществляется системой антирадикальной и антиперекисной защиты. В условиях несостоятельности названной системы возможна активация ПОЛ, что может привести к нарушению проницаемости мембран, инактивации липидзависимых ферментов, разрушению мембран. В свою очередь разрушение мембран способно вызвать инактивацию цитохрома P450 как наиболее чувствительного элемента монооксигеназной системы [Карузина, Бачманова, Арчаков, 1995].

В процессе изучения микросомных монооксигеназ была обнаружена множественность изоформ цитохрома P450 с различной, но частично перекрывающейся субстратной специфичностью [Lewis, 2001]. Это позволяет системе монооксигеназ осуществлять окисление различного рода экзогенных и эндогенных субстратов.

Последние данные свидетельствуют о том, что имеется определенное число конститутивных и индуцируемых изоформ цитохрома P450. В результате работ по расшифровке нуклеотидных последовательностей генома человека идентифицированы 57 индивидуальных форм цитохрома P450.

Цитохром P450 был обнаружен не только в печени, но и в других органах, а изучение внепеченочной экспрессии изоформ цитохрома P450 позволило сделать вывод о ее тканеспецифичности. В печени экспрессируется максимальный

спектр форм P450, в табл. 1 представлены данные о его содержании в других органах в порядке убывания.

Таблица 1

Общее содержание цитохрома P450 в некоторых тканях человека

<i>Ткань</i>	<i>Содержание цитохрома P450, нмоль/мг микросомного белка</i>
Печень	0,30–0,60
Надпочечник	0,23–0,54
Тонкая кишка	0,03–0,21
Мозг	0,1
Почки	0,03
Легкие	0,01

Примечание. Использован фрагмент таблицы из обзора [Inhibition and induction ..., 2008].

Суперсемейство генов, кодирующих различные изоформы цитохрома P450 представлено генами, расположенными в различных хромосомах. Согласно современной номенклатуре, название гена состоит из префикса *CYP* (Cytochrome P450) и номера (римская или арабская цифра), обозначающего семейство (совпадение аминокислотной последовательности кодируемых белков около 40 %). Затем следует буква, обозначающая подсемейство (55%-ная и более гомология), и арабская цифра, соответствующая той или иной изоформе, например, *CYP1A1* [Nebert, Russell, 2002]. Нередко в литературе также обозначается и соответствующий белок (продукт гена), но в этом случае символ пишется без курсива (*CYP1A1*). В связи с тем, что активность изоформ оценивается по каталитической активности в отношении того или иного модельного субстрата, используются названия, как аминопирин-N-деметилаза (N-деметилаза аминопирина), p-гидроксилаза анилина, бензпиренгидроксилаза.

Таким образом, взаимодействуя с химическими веществами, попавшими в клетку, цитохром P450-зависимые монооксигеназы превращают их в полярные, более раство-

римые соединения. Для высокомолекулярных, гидрофобных молекул эти реакции – единственные, способные перевести их из гидрофобной мембранной фазы клетки в ее водную фазу и, таким образом, вовлечь в дальнейшие превращения. Этот путь проходят как ксенобиотики, так и некоторые гидрофобные субстраты эндогенного происхождения, например, холестерин, стероидные гормоны и другие. Таким образом, биологический смысл функционирования цитохром Р450-зависимых монооксигеназ (1-й фазы биотрансформации) состоит в придании липофильным соединениям реактивных свойств, что позволяет им вступать в реакции конъюгации.

1.2. Реакции конъюгации – 2-я фаза биотрансформации ксенобиотиков. Функциональное сопряжение между фазами

Данные реакции не являются предметом нашего рассмотрения, но важны для понимания некоторых процессов. Поэтому ограничимся изложением кратких сведений о них.

Реакции конъюгации составляют 2-ю фазу биотрансформации липофильных ксенобиотиков, которые в 1-й фазе при участии цитохром Р450-зависимых монооксигеназ приобрели реактивные группы. В ходе этих реакций происходит связывание продуктов реакции с эндогенными конъюгирующими агентами, приводящее к изменению их физико-химических свойств и ограничивающее дальнейшие превращения продуктов метаболизма в организме. Как правило, конъюгаты быстро экскретируются.

Обсуждаемые реакции классифицируются по компоненту, который в качестве биосубстрата участвует в процессе конъюгации. В организме животных и человека наибольшее распространение получили следующие реакции конъюгации: с глюкуроновой кислотой, с сульфатом, с глутатионом, с аминокислотами, с глутамином, метилирование, ацетилирование [Гуляева, Райс, 2005]. Чрезвычайно важ-

ным является обстоятельство, что значительная часть реакций конъюгации протекает на мембранах эндоплазматической сети клеток, непосредственно в месте образования высокореактивных метаболитов в процессе функционирования микросомных монооксигеназ. Это позволяет при определенных уровнях свести до минимума токсическое действие продуктов биотрансформации. Согласно литературным данным, наибольшее значение отводится трем типам конъюгации: с глюкуроновой кислотой, с сульфатами и с глутатионом, которые составляют основу биохимических механизмов 2-й фазы биотрансформации химических соединений, а образование типа конъюгатов зависит от дозы ксенобиотика.

В реакции конъюгации ксенобиотики могут вступать не только после биотрансформации в цитохром P450-зависимых реакциях, но и напрямую, и затем подвергаться или не подвергаться P450-зависимому окислению. Таким образом, возникает функциональное сопряжение 1-й и 2-й фаз биотрансформации ксенобиотиков. Принципиально важно, что результатом этих превращений может быть как уменьшение, так и усиление токсичности исходной молекулы. Выделяют следующие комбинации взаимодействия фаз биотрансформации [Кинетика и динамика ..., 2008]:

1. Токсичный ксенобиотик последовательно трансформируется в менее токсичный продукт как на стадии взаимодействия с цитохром P450-зависимыми монооксигеназами, так и в реакциях конъюгации.

2. Ксенобиотик трансформируется в цитохром P450-зависимых реакциях в менее токсичный метаболит, но его токсичность возрастает в результате конъюгации.

3. Ксенобиотик трансформируется в цитохром P450-зависимых реакциях в более реактивный метаболит, но его токсичность снижается в результате конъюгации.

4. Токсичность ксенобиотика возрастает и при взаимодействии с цитохром P450-зависимыми монооксигеназами, и в реакциях конъюгации.

1.3. Индукторы и ингибиторы

Активность систем биотрансформации не является строго постоянной и зависит от ряда факторов. Чрезвычайно важной является способность ряда химических соединений, в том числе лекарственных препаратов, активно воздействовать на ферменты 1-й и 2-й фаз биотрансформации. Эти химические вещества условно можно разделить на две группы: индукторы и ингибиторы цитохром Р450-зависимых монооксигеназ.

Индукцибельность обозначает способность к увеличению активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков в ответ на внешнее воздействие в результате их дополнительного синтеза *de novo* [Ляхович, Цырлов, 1981]. Ранее предполагалось, что ксенобиотики сами являются факторами регуляции собственного метаболизма. Позднее было показано участие генетических факторов в процессе индукции, обусловленной воздействием некоторых ксенобиотиков. В литературе описано большое число химических соединений, вызывающих активацию монооксигеназ, различающихся шириной спектра действия [Inhibition and induction ..., 2008].

К настоящему времени наиболее изучен тип индукции, реализуемый при участии цитоплазматического рецептора к полиароматическим углеводородам – Ah-рецептора (AhR). Это явилось следствием усилий, направленных на понимание механизма токсического действия диоксинов. В упрощенном варианте последовательность событий, предшествующих индукции, может быть представлена следующими образом (рис. 3). Наиболее существенным моментом в патогенезе интоксикации диоксинами является их проникновение в цитоплазму клетки и связывание с Ah-рецептором [Denison, Nagy, 2003]. Далее, комплекс диоксин-Ah-рецептор связывается со вторым белком – ядерным переносчиком Ah-рецептора (Arnt), который способствует проникновению комплекса диоксин-Ah-рецептор в клеточное ядро. Там комплекс диоксина и рецепторов связывается

с определенным локусом ДНК – диоксин чувствительным элементом, после чего он функционирует как лигандоактивированный фактор транскрипции, стимулируя экспрессию генов, кодирующих структуру, по крайней мере, 20 типов белковых молекул, среди которых CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1. Следует отметить, что по настоящее время происходит уточнение и дополнение факторов, определяющих индукцию CYP1 и их роли в реализации токсических эффектов диоксинов.

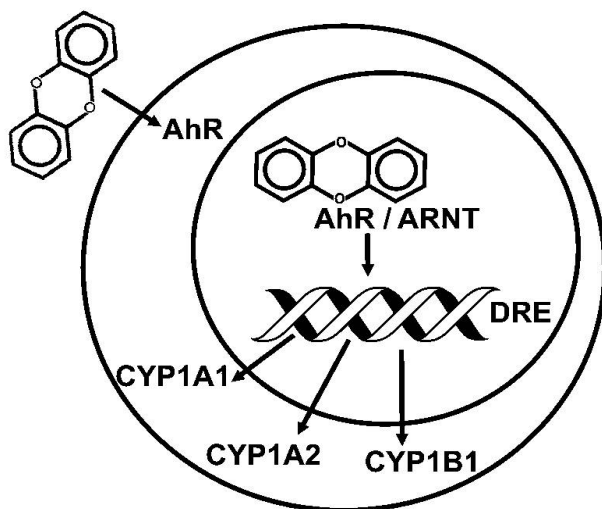


Рис. 3. Механизм Ah-рецептор-зависимой индукции диоксидами цитохромов P450

К числу ингибиторов цитохром P450-зависимых монооксигеназ относятся соединения различной природы, которые можно классифицировать по механизму их действия на элементы микросомных монооксигеназ. Выделяют следующие группы: 1) ингибиторы прямого действия (СО, антиоксиданты и др.); 2) обратимые ингибиторы непрямого действия, оказывающие влияние на микросомальные ферменты через промежуточные продукты своего метаболизма,

которые образуют комплексы с цитохромом P450 (гидразины и др.); 3) ингибиторы, разрушающие цитохром P450 (четырёххлористый углерод и др.); 4) ингибиторы, тормозящие синтез и (или) ускоряющие распад цитохрома P450 (тяжелые металлы, интерфероны и др.). Строго говоря, к истинным ингибиторам можно отнести лишь инактиваторы цитохрома P450, поскольку в других случаях механизм ингибирования связан с конкуренцией за субстрат.

Необходимо отметить, что часть реакций 2-й фазы биотрансформации также стимулируется под действием индукторов микросомных монооксигеназ. Принципиально, что в зависимости от дозы (концентрации) некоторые химические вещества могут выступать в роли, как индукторов, так и в роли ингибиторов микросомных монооксигеназ. Исходя из представлений об функциональном сопряжении двух фаз биотрансформации ксенобиотиков, индукторы или ингибиторы системы используются для того, чтобы ускорить образование малотоксичных продуктов биотрансформации или задержать образование высокотоксичных метаболитов. Предприняты попытки использования модификаторов с целью коррекции активности монооксигеназ печени у людей, например, зиксорина для снижения токсичности и повышения эффективности противоопухолевой химиотерапии [Снижение токсичности и ..., 2002].

1.4. Полиморфизм генов

Одним из факторов, определяющих значительную межиндивидуальную вариабельность в метаболизме ксенобиотиков, является генетический полиморфизм ферментов биотрансформации. В основе генетического полиморфизма лежит существование двух или более аллелей для данного гена или, в более общем виде, существование различных последовательностей данного локуса у различных индивидуумов [Гуляева, Вавилин, Ляхович, 2000]. Если частота аллеля в популяции более 1 %, эти различия расцениваются

как полиморфизм, если менее 1 % – как редкая мутация. С полиморфизмом генов ферментов биотрансформации тесно связывают индивидуальную чувствительность к генотоксическим канцерогенам, опасность развития побочного действия при лечении различными лекарствами и различную эффективность лекарственных препаратов [Nebert, Russell, 2002].

Установлены следующие варианты генетического полиморфизма ферментов биотрансформации ксенобиотиков [Кинетика и динамика ..., 2008]:

- точечные мутации, обуславливающие снижение или увеличение изменения активности функционального белка, изменение его субстратной специфичности или стабильности; иногда подобные мутации не вызывают функциональных изменений белка;

- делеции генов или мутации, результатом которых является отсутствие белка;

- увеличение числа копий генов, и, как следствие, концентрации функционального белка.

В частности, номенклатура и база данных аллелей цитохромов P450 человека, а также ассоциации с активностью кодируемых ими ферментов размещены на сайте <http://www.cypallels.ki.se>.

2. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ СОСТОЯНИЯ СИСТЕМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ КСЕНОБИОТИКОВ

Цель данного раздела заключается в краткой характеристике основных методов, позволяющих получить информацию, характеризующую состояние цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, а также на примере протоколов исследований составить представление о реализации этих методов.

2.1. Мониторинг метаболитов тестовых лекарств (ВЭЖХ)

Как уже было сказано выше, большинство изоформ цитохрома Р450 представлены в печени, что позволяет косвенно измерять их активность при мониторинге метаболитов тестовых лекарств в моче, либо исследовать кинетику выведения (кровь, слюна). К настоящему времени накоплены данные успешного использования таких подходов.

В качестве иллюстрации воспользуемся протоколом методики с антипирином (АП) в качестве тестового субстрата для оценки функционального состояния цитохром Р450-зависимых монооксигеназ [Черняк, Ицкович, Колесников, 2011]. Этот препарат уже долгое время не применяется в качестве лекарства, что в ряде случаев дает преимущество для проведения фенотипирования по сравнению с другими субстратами в связи с отсутствием естественных источников его поступления в организм.

Анализ выполняется с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием АП фармакопейной чистоты (Fluka) в дозе 18 мг/кг массы тела. АП принимается натощак, после чего в течение суток собирается моча в емкость, содержащую 200 мг $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ для

стабилизации метаболитов. Подготовку проб для жидкостной хроматографии осуществляют с использованием β -глюкуронидазы Type H-3 из *Helix pomatia* (Sigma) для проведения ферментного гидролиза конъюгированных метаболитов. Процедура экстракции метаболитов выполняется в два этапа: на первом экстрагируются 4-гидроксиантипирин (4ГАП) и норантипирин (НАП), на втором – 3-гидроксиметилантипирин (ЗГМАП) и антипирин. В качестве внутреннего стандарта мы используем фенацетин (ФЦ, Aldrich). Пробы мочи анализируются на АП, его метаболиты и ФЦ на жидкостном хроматографе "Милихром-А02" (ЭкоНова, Россия), колонка 2×75 мм, Silasorb SPH C18, 5 мкм. Детектирование проводят при длине волны 244 нм. Для получения градиента смешивают два раствора: элюент А – смесь метанола и 0,05 М фосфатного буфера, pH 6,7 (10 : 90) и элюент В – 90 % метанол; скорость потока 200 мкл/мин; температура колонки 45 °С. Для достижения полного разделения анализируемых компонентов за минимальное время сначала используем изократическое (7 % В, 10 мин), а затем градиентное элюирование, от 7 до 100 % В за 4,5 мин. Когда в некоторых образцах в области выхода пика ФЦ наблюдается сигнал неидентифицированной примеси, плохо отделяемой в приведенных условиях от пика ФЦ, проба хроматографируется повторно в изократическом режиме (20 % В, 10 мин). Это позволяет добиться полного разрешения пиков ФЦ и загрязняющего компонента. Для оценки содержания анализируемых соединений необходимо построение калибровок для их стандартов. В нашем случае калибровочные графики для АР и его метаболитов, построенные в координатах «площадь пика/площадь пика ФЦ – концентрация», представляют собой прямые линии с коэффициентами корреляции $R^2 > 0,98$. Каждый образец анализируется дважды, для статистической обработки используются средние значения определяемых показателей.

Следует отметить, что к настоящему времени рядом исследователей успешно применяется использование тестов-

вых смесей для нескольких изоформ цитохрома Р450 препаратов, что позволяет одновременно получить информацию об их активности. В случае определения содержания аналитов в крови, слюне или моче используется фармакокинетический подход, позволяющий определить период полувыведения тестового препарата, объем кажущегося распределения, клиренс элиминации и других параметров. В частности, ранее авторами было проведено исследование фармакокинетики антипирина в слюне женщин с опухолями яичников [Черняк, Черняк, Портяная, 2002].

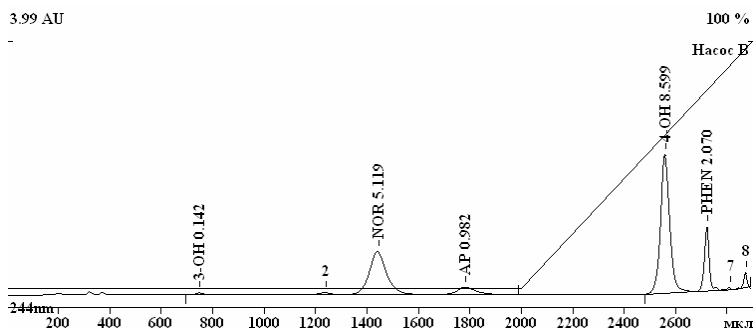


Рис. 4. Хроматограмма первого этапа (из отчета, выданного программой МультиХром-СПЕКТР)

2.2. Исследование полиморфизма генов (ПЦР-ПДРФ)

Реализация исследований полиморфизма генов стала возможной благодаря изобретению К. Муллиса полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод заключается в ферментативном циклическом синтезе в условиях *in vitro* заданных фрагментов ДНК (ампликонов). Реакционная смесь включает 4 дезоксирибонуклеотидтрифосфата (А, G, C, T), прямой и обратный праймеры (задают исследуемый фрагмент), буфер, термостабильную ДНК-полимеразу и исследуемую ДНК.

Краткий протокол может быть продемонстрирован на примере исследования двух полиморфизмов гена *CYP1A2*, которыми авторы пособия руководствуются в своей работе. На первом этапе у обследованных лиц проводится забор венозной крови, ДНК выделяется с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Последовательно выполняется ПЦР в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология) и анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Смесь для амплификации объемом 25 мкл содержит 10 пМ каждого праймера, 2,5 мкл 10-кратного буфера (Sigma-Aldrich), 2,5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 0,2 mM каждого dNTP и 1 ед. Taq-полимеразы. В работе использованы праймеры (Медиген, Новосибирск): для *CYP1A2*F* – 5'-CCC AGA AGT GGA AAC TGA GA-3' и 5'-GGG TTG AGA TGG AGA CAT TC-3', для *CYP1A2*D* – 5'-TGA GCC ATG ATT GTG GCA TA-3' и 5'-AGG AGT CTT TAA TAT GGA CCC AG-3'. Для генотипирования *CYP1A2*F* (-163C>A) используется эндонуклеаза рестрикции *ApaI* (Fermentas, Lithuania), электрофорез осуществляется в 1,5% агарозном геле; для *CYP1A2*D* (-2467delT) – рестриктазу *NdeI* (Fermentas, Lithuania), электрофорез проводится в 10%-ном полиакриламидном геле. Результаты реакции оцениваются в проходящем УФ-свете после окраски этидиум бромидом.

Следует обратить внимание на два момента. Описанный выше вариант исследования полиморфизма генов содержит этап рестрикционного анализа. Рестриктазы подбираются в зависимости от сайта рестрикции, к появлению или исчезновению которого приводит мутация. Если в одном аллеле есть сайт рестрикции, а в другом нет, то будет выявляться три полосы, одна из которых соответствует неразрезанному участку ДНК, а две других – разрезанному [Иванов, Терешин, Щербак, 2010]. Так для *CYP1A2*D* (-2467delT) длина фрагмента 167 пар нуклеотидов (пн) после рестрикции: при делеции T – 167 пн (фрагмент остается неразрезанным), при отсутствии делеции T – 148 пн +19 пн,

гетерозигота – 167 пн + 148 пн +19 пн. Не все подобные анализы требуют использования рестриктаз. Например, исследования полиморфизмов генов глутатион S-трансфераз (*GSTT1*, *GSTM1*) с помощью мультиплексной ПЦР не нуждаются в проведении рестрикционного анализа.

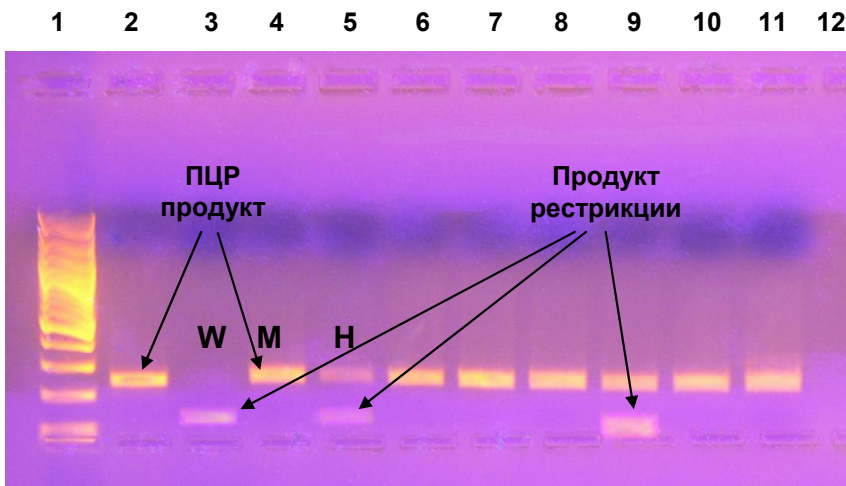


Рис. 5. Результаты анализа полиморфизма длины Рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ) гена *CYP1A2*: 1 – маркер молекулярных весов; 2, 4, 6, 7, 8, 10 и 11 – мутантный генотип – М (мутация в сайте рестрикции – рестрикция не происходит); 3 – мутация отсутствует – генотип дикого типа – W; 5 и 9 – гетерозиготный генотип – имеются все три фрагмента – H; 12 – отрицательный контроль

Исследования полиморфизма генов могут проводиться при использовании специальных наборов (часть из которых внесены в «Государственный реестр изделий медицинского назначения и медицинской техники»), либо праймеры и рестриктазы подбираются самостоятельно (из научных публикаций или банка генов), после чего отрабатываются условия проведения ПЦР и визуализации результатов. Последний вариант широко используется при проведении научных работ.

2.3. ПЦР в реальном времени

Данный метод позволяет проводить ПЦР с флуоресцентной регистрацией накопления продуктов амплификации непосредственно в ходе реакции. При этом избирательно регистрируется амплификация лишь определенных фрагментов ДНК (за счет использования трех праймеров, один из которых обеспечивает увеличение флуоресцентного сигнала). Методика может выполняться по протоколу «TagMan», либо с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя, например, SYBR GreenI. В качестве примера можно рекомендовать детальное изложение протокола последнего в сочетании с анализом кривых плавления для выявления делеций в генах *GSTM1* и *GSTT1* [Полиморфизм генов биотрансформации ..., 2011]. Кроме того, в области количественной оценки экспрессии генов метод ПЦР в реальном времени в комбинации с методом обратной транскрипции обладает множеством преимуществ перед другими методами. Особое внимание следует уделить тому, что для получения точных результатов определения уровня представленности транскриптов с использованием данного метода необходимо глубокое понимание этапа нормировки данных [ПЦР «в реальном времени» ..., 2009].

Чтобы можно было составить некоторое представление о процедуре анализа экспрессии генов, кратко изложим наш протокол для *CYP1A1*, *CYP1B1*, а также β -актина (housekeeping gene – эндогенный контроль). Цельную кровь забирают в вакутейнеры, процедуру выделения лимфоцитов осуществляют методом градиентного центрифугирования с Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, INC) в 12 мл стерильных полипропиленовых пробирках в течение 30 мин при 400 g. Фракцию лимфоцитов дважды отмывают центрифугированием по 10 мин при 250 g в растворе Хенкса (HBSS, Sigma). РНК изолируют из лимфоцитов, используя набор RNeasy mini kit (Qiagen Co.) Количественное определение РНК осуществляют с помощью Quant-iT RiboGreen RNA Reagent and Kit (Invitrogen, Ltd) с использованием флуориметра

VersaFluor (BIO-RAD). Обратную транскрипцию выполняют в амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технология) с использованием High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). Измерение уровня экспрессии генов методом ОТ ПЦР в режиме реального времени выполняют с использованием TaqMan Gene Expression Assay kit (Applied Biosystems) и TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) в 96-луночном низкопрофильном планшете в термоциклере CFX-96 (BIO-RAD): 2 мин при 50 °С, 10 мин при 95 °С, затем 40 циклов 15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С. При проведении количественного ПЦР в каждом планшете присутствуют β-актин в качестве гена эндогенного контроля, а также калибратор кДНК, полученный обратной транскрипцией объединенного образца РНК восьми доноров. Результаты выражают в относительных единицах, где значение экспрессии тестируемого гена нормализуют с экспрессией эндогенного контроля, а затем сравнивают с экспрессией калибратора, как это определено процедурой от Applied Biosystems (2001). Согласно Ct-методу вычисление уровня экспрессии производят в следующей последовательности: 1) ΔCt образца = Ct тестируемого гена – Ct эндогенного контроля; 2) $\Delta \Delta Ct$ = ΔCt образца – ΔCt калибратора; 3) уровень экспрессии: $2^{-\Delta \Delta Ct}$ – показатель уровня экспрессии гена в сравнении с экспрессией в калибраторе.

2.4. ДНК-чипы

Этот метод, вероятно, является наиболее перспективным для проведения молекулярно-генетических исследований. С его помощью возможно одновременное определение очень большого количества полиморфизмов в одной пробе. Метод реализован таким образом, что на твердом чипе в виде очень небольшого размера отдельных пятен размещается большое количество олигонуклеотидных зондов, каждый из которых обеспечивает специфическую гибридизацию с нормальными и мутантными аллелями множества различ-

ных генов. Перед проведением гибридизации осуществляется неспецифическое флуоресцентное мечение исследуемой ДНК. В случае связывания ДНК образца с зондом на чипе при проведении лазерного сканирования чипа выявляется флуоресцентный сигнал соответствующего участка чипа [Иванов, Терешин, Щербак, 2010].

Очевидно, что подходы к оценке состояния цитохром Р450-зависимых монооксигеназ не ограничиваются изложенными выше методами. В частности, в Институте биомедицинской химии им. В. Н. Ореховича РАН реализуются исследования направленные на разработку новых методов. Среди таковых следует отметить два направления.

В последнее время отрабатывается измерение содержания различных изоформ цитохрома Р450, в частности, в микросомной фракции гомогената печени мышей (тестовый биосубстрат) методом мониторинга множественных реакций при помощи масс-спектрометра с тройной квадрупольной ловушкой. Полученные результаты коррелировали с изменением ферментативной активности изученных изоформ, определенных при помощи маркерных субстратов [Москалева, Згода, Арчаков, 2011].

Названный метод заключается в регистрации нескольких продуктов фрагментации одного пептидного иона. Он обеспечивает селективность благодаря мониторингу хроматографической коэлюции множественных переходов в биологическом образце и может быть использован для качественной и количественной регистрации белков. Метод мониторинга множественных реакций позволяет значительно повысить аналитическую чувствительность и в мультиплексном режиме измерять содержание не менее 50 белковых маркеров в плазме крови с пределом детектирования на уровне 1–10 молекул в 1 мкл пробы.

Другим заслуживающим внимания направлением является разработка биосенсоров на основе электрохимических цитохром Р450-содержащих систем с целью выявления суб-

стратов и влияния лекарственных препаратов на каталитическую активность конкретных изоформ цитохрома P450. Цель таких исследований заключается в создании сенсорного устройства, пригодного для использования в персонализированной медицине. В частности, проведены эксперименты по изучению влияния некоторых лекарственных препаратов на активность CYP3A4 в системах электрод/цитохром P4503A4 [Влияние витаминов ..., 2010].

3. ЗНАЧИМОСТЬ ЦИТОХРОМОВ P450 В НЕКОТОРЫХ ОБЛАСТЯХ ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ

3.1. Роль в механизме токсического действия ксенобиотиков. Профессиональное воздействие

3.1.1. Диоксиноподобные соединения (диоксины)

Известно, что CYP1A1 и CYP1A2 рассматриваются как наиболее специфичные маркеры воздействия диоксинов для экспериментальных моделей, в сравнении с такими показателями как летальность, атрофия тимуса, потеря веса и иммунотоксичность [Цырлов, 1990]. Как следствие, их токсические эквиваленты оценивают по индукции названных изоформ. В печени грызунов наиболее токсичный диоксин – 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-*p*-диоксин (ТХДД) вызывает выраженную индукцию бензпиренгидроксилазы в 30 тыс. раз превышающую таковую после воздействия 3-метилхолантrenom – классическим индуктором подсемейства цитохромов CYP1.

Установлено, что CYP1A2 человека и крысы на 75 % идентичны и имеют сопоставимые активности. В опытах на трансгенных мышах, лишенных цитохрома P450A2 (CYP1A2-knock-out mice) показано, что CYP1A2 играет одну из ключевых ролей в реализации токсических эффектов, обусловленных воздействием диоксинов, он функционирует как диоксинсвязывающий белок, определяющий печеночную секвестрацию наиболее токсичных диоксинов – ТХДД и пентахлордibenзо-*p*-диоксин (ПeХДД) [Diliberto, Burgin, Birnbaum, 1997]. Предполагается, что индукция диоксинами

CYP1A2 приводит к дозозависимому накоплению диоксина в печени, сопровождаемому снижением его уровней во внепеченочных тканях. При этом индукция CYP1A1 приводит к активации метаболизма полихлорированных дибензофуранов (ПХДФ), полихлорированных бифенилов (ПХБ).

Индукция CYP1A2-активности может рассматриваться (с определенными ограничениями) как неинвазивный биомаркер воздействия диоксинов. Это обосновывается тем, что установленная зависимость между уровнем воздействия и индукцией CYP1A2 в печени грызунов, наблюдается в некоторых высокоэкспонированных человеческих популяциях.

Среди причин, обосновывающих целесообразность развития таких исследований, можно выделить следующие:

- поиск дешевых, альтернативных газовой хроматографии/масс-спектрометрии высокого разрешения (ГХ/МСВР), методов оценки уровня диоксинов в организме человека;

- необходимость проверки предположения о том, что практикуемое измерение содержания диоксинов в липидах сыворотки крови может значительно недооценивать тканевые уровни в органах мишенях;

- стремление реализовать подход к оценке биологического отклика организма, который определяется не только дозой токсиканта, но и активностью ферментов, вовлеченных в процесс его биотрансформации.

В 1992 году в г. Шелехове Иркутской области произошел крупный пожар на ОАО «Иркутсккабель», во время которого сгорело более 1000 т пластика, включая поливинилхлорид. Из-за угрозы взрыва пожарные не использовали дыхательное кислородное оборудование, что обусловило риск попадания в их организм больших количеств токсичных продуктов горения, включая диоксины. Было показано, что у пожарных, принимавших участие в ликвидации пожара на кабельном заводе, содержание ПХДД/ПХДФ/ПХБ превышало уровни, обнаруженные в контрольной группе, и было пропорционально стажу работы пожарными [Поли-

хлорированные дибензо-п-диоксины ..., 2012]. У бывших пожарных отмечено снижение уровней ПХДД/ПХДФ с возрастом, тогда как в целом для популяции характерно их увеличение, что свидетельствует об экспозиции диоксинами в процессе пожаротушения. К настоящему времени у значительной части пожарных сформировался неврологический синдромокомплекс в виде токсической энцефалопатии с вегетативно-сенсорной полиневропатией конечностей; в данной когорте отмечен более высокий уровень инвалидизации, чем у других пожарных в регионе. Очевидно, что диоксины не были единственной причиной отравления, но их присутствие могло усиливать действие других токсикантов [Черняк, Грассман, Колесников, 2007].

Отметим, что исследования активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков зачастую не сопровождаются оценкой вклада различных модифицирующих факторов (возраст, курение, алкоголь и т. д.), что приводит к ошибочной трактовке результатов. Нами был выполнен метаболический тест с антипирином, определено содержание диоксинов в сыворотке крови и уровень котинина в моче, содержание которого позволяет оценить интенсивность курения, в том числе пассивного. Далее с помощью регрессионного анализа была оценена зависимость показателей антипиринового теста от возраста, уровня котинина и диоксинов (содержание в сыворотке крови, либо содержание в организме). Анализ результатов свидетельствует о том, что наиболее адекватная модель получена для 3-гидроксиметилантипирина (ЗГМАП), наиболее зависимого от CYP1A2 метаболита.

Полученная для ЗНМАР модель позволила выделить вклад диоксинов в функциональную активность CYP1A2 на фоне модифицирующих ее факторов – возраста и курения. В целом этот результат не отрицает возможности использования данного показателя в качестве маркера эффекта при обследовании экспонированных диоксинами когорт [The impact of dioxins ..., 2011]. Вместе с тем, еще требуется

уточнение моделей с учетом вкладов полиморфизмов генов *CYP*, катализирующих реакции метаболизма АР.

Нами также была предпринята попытка оценки вкладов полиморфизмов гена *CYP1A2* на *CYP1A2*-зависимый метаболизм антипирина. Было показано влияние обоих изученных полиморфизмов на содержание в моче 3-гидроксиметилантипирина и, следовательно, на функциональную активность данной изоформы фермента.

В отличие от других известных профессионально экспонированных когорт пожарные подверглись воздействию диоксинов в составе комплекса токсических веществ. Выявленные к настоящему времени у значительной части пожарных синдромы могут быть следствием воздействия веществ, образовавшихся во время пожара. При этом только для некоторых из них токсичность связана с Ah-рецепторным путем. Высокая аффинность диоксинов позволяет им успешно конкурировать за Ah-рецептор, и может модифицировать токсичность других соединений, например, полициклических ароматических углеводородов, трансформация которых в активные метаболиты зависит от *CYP1A*. Ксенобиотики, имеющие низкую аффинность к AhR, реализуют свою токсичность через другие механизмы.

Подобный подход позволяет выявить взаимосвязь между индивидуальной чувствительностью к воздействию диоксинов и нарушениями здоровья. Несмотря на прошедшее с момента пожара время, оценка содержания диоксинов в организме и изменений состояния системы биотрансформации остается актуальной в связи с большим периодом полувыведения большинства конгенов диоксинов.

3.1.2. Пары металлической ртути

Несмотря на то, что ртуть не является субстратом цитохром Р450-зависимых монооксигеназ, ее действие, как и других тяжелых металлов, преимущественно направлено на гем цитохрома Р450, что частично характеризуется его пря-

мой деградацией. Последнее обуславливает ингибирование названных ферментов, что может оказать влияние на биотрансформацию эндогенных субстратов при участии широкого спектра изоформ. Доказано, что CYPs участвуют в регуляции нейротрансмиттеров и стероидов, поддержании холестерина гомеостаза в мозге. Недавние открытия указывают на их значимую роль в патогенезе нейродегенеративных и психических заболеваний: болезней Альцгеймера и Паркинсона, депрессии и шизофрении [Beaune, Lorient, 2008].

К настоящему времени недостаточно изучены патофизиологические механизмы формирования и прогрессирования тяжелого органического поражения головного мозга у больных в отдаленном периоде хронической ртутной интоксикации (ХРИ) [Современные подходы к ..., 2009]. При этом у больных регистрируются достоверные очаги субатрофии мозжечка (методом ЯМР-томографии), что расценивается как признак нейродегенеративных процессов. В совокупности вышеизложенное определило интерес к исследованию изменений активности цитохром Р450-зависимых монооксигеназ в условиях динамического обследования, а также от сочетаний генотипов полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* (особенно делеционных вариантов, которые являются факторами риска, повышающими восприимчивость к воздействию тяжелых металлов) у лиц, хронически экспонированных ртутью.

У 116 мужчин, подвергшихся хроническому воздействию ртути и распределенных в 4 группы в зависимости от наличия диагноза хроническая ртутная интоксикация, был выполнен метаболический тест с антипирином, изучено сочетание генотипов полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1*, определен уровень котинина. Ранее мы отмечали значимость учета различных модифицирующих факторов. Исследования на связанных выборках в значительной степени позволяют преодолеть обозначенную проблему. Изучение динамики изменения показателей антипиринового

теста в связанной выборке (с интервалом между обследованиями 4 года) выявило ингибирование монооксигеназной системы. Для пациентов с диагнозом ХРИ анализ выполнен также с учетом прогрессирования стадии заболевания. Угнетение метаболизма антипирина, повышенная частота сочетания генотипов GSTT1(0/0)/GSTM1(+) у пациентов с диагнозом ХРИ, специфика ингибирования ртутью СYP позволили предположить, что прогрессирование заболевания реализуется, в том числе за счет ингибирования в головном мозге изоформ цитохрома P450, катализирующих регуляцию эндогенных субстратов [Роль цитохром P450-зависимых ..., 2013].

Следует отметить, что в медицине труда проблеме индивидуальной чувствительности к воздействию некоторых токсикантов, обусловленной особенностями системы биотрансформации ксенобиотиков, уделяется внимание в работах ряда авторов, например, выполненных под руководством Л. П. Кузьминой [2009; 2011].

Химические соединения оказывают разнонаправленное влияние на ферменты биотрансформации ксенобиотиков и сопряженные с ними системы и процессы. Существенно, что такое воздействие реализуется через различные механизмы, что в определенной степени обуславливает выраженность и время проявления патогенных эффектов на здоровье. Без знания этих механизмов практически затруднено патогенетическое обоснование методов диагностики, профилактики и терапии интоксикаций.

3.2. Фенотипирование и генотипирование

В настоящее время активность некоторых изоформ цитохрома P450 или состояния 1-й фазы системы биотрансформации ксенобиотиков оценивается по фармакокинетике тестовых лекарственных препаратов, являющихся субстратами конкретных изоформ, либо исследуется профиль их метаболитов. Такой подход позволяет получить реальное

представление о величине вклада полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации, так и модифицирующих факторов. Сторонники генотипирования обращают внимание на ряд недостатков, присущих этим методам [Клиническая фармакогенетика ..., 2007]. Среди них необходимость однократного приема тестового лекарственного препарата, инвазивность при заборе крови или необходимость сбора суточной мочи, модифицирующее влияние не только полиморфизма генов, но и возраста, вредных привычек, характера питания, практическая невозможность использования для крупных популяционных исследований. Все сказанное обуславливает изменение результатов во времени.

Вместе с тем проведение фенотипирования способствует выявлению межиндивидуальных различий в скорости метаболизма тестового препарата по отношению концентрации субстрата к концентрации его метаболитов в плазме крови или моче. Это позволяет выделить группы по активности системы в целом или конкретной формы фермента.

Выделяют следующие группы [Клиническая фармакогенетика ..., 2007]:

- экстенсивные метаболизаторы (Extensive Metabolism, EM) – лица с нормальной скоростью метаболизма определенных тестовых препаратов, к которым принадлежит большинство населения;
- медленные метаболизаторы (Poor Metabolism, PM) – лица со сниженной скоростью метаболизма определенных тестовых препаратов, который характеризуется высокими значениями отношения концентрации препарата к концентрации его метаболитов.
- быстрые метаболизаторы (Ultraextensive Metabolism, UM) – лица с повышенной скоростью метаболизма определенных тестовых препаратов, что характеризуется высокими значениями отношения концентрации препарата к концентрации его метаболитов.

Перечисленные фенотипы имеют большое значение для клинической медицины. Очевидно, что для обладателей РМ фенотипа лекарственные соединения накапливаются в организме, что может привести к интоксикации. В связи с этим для таких пациентов необходимо снижение дозы. Отметим, что в случае ксенобиотиков в широком смысле, данный эффект зависит от того, что обладает большей токсичностью – исходное соединение или его метаболит. В случае если исходное соединение более токсично, то реализация эффекта осуществляется согласно изложенному выше варианту. Если более токсичен метаболит – это можно рассматривать как благоприятный вариант. Для носителей УМ фенотипа, все наоборот. Обычная доза лекарственного препарата может быть недостаточной для терапевтического эффекта, а более токсичное соединение быстро метаболизируется в менее токсичное.

Большинство лекарственных препаратов, являющихся субстратом микросомных монооксигеназ, метаболизируется при участии несколько форм СУР. По сравнению с ними лекарства, которые метаболизируются одной формой СУР, как правило, более чувствительны к взаимодействию лекарств. Для исследовательских целей оптимальный субстрат – (лекарство-зонд), которое метаболизируется преимущественно одной изоформой СУР. Таблица 2 содержит сведения о рекомендуемых субстратах, ингибиторах и индукторах некоторых форм СУР, которые могут использоваться в клинической практике для учета лекарственных взаимодействий [Inhibition and induction ..., 2008].

Фармакогенетические тесты (частный случай генотипирования) лишены вышеприведенных для фенотипирования недостатков. Генотипирование не требует приема лекарства, отличается однократным забором биологического материала, результаты не изменяются на протяжении жизни и т.д. Такие тесты (исследование полиморфизмов заинтересованных генов) направлены на выявление аллельных вариантов генов системы биотрансформации, определяющих

эффект воздействия ксенобиотиков, в том числе лекарственных соединений. Несмотря на эффективность этого подхода, вопрос о вкладе полиморфизма заинтересованных генов *CYP* в проявление фенотипа остается открытым. Для некоторых изоформ *CYP* влияние модифицирующих факторов вносит значительный вклад в ферментативную активность.

Таблица 2

In vivo субстраты, ингибиторы и индукторы некоторых изоформ *CYP*, рекомендуемые для исследований (внутреннее применение)

<i>Форма цитохрома P450</i>	<i>Субстрат</i>	<i>Ингибитор</i>	<i>Индуктор</i>
CYP1A2	Теofilлин, кофеин	Флувоксамин	Курящие относительно некурящих
CYP2B6	Эфавиренз		Рифампицин
CYP2C8	Репаглинид, росиглитазон	Гемфиброзил	Рифампицин
CYP2C9	Варфарин, толбутамид	Флуконазол, амиодарон	Рифампицин
CYP2C19	Омепразол и др. ингибиторы протонной помпы	Омепразол, флувоксамин	Рифампицин
CYP2D6	Дезипрамин, декстрометорфан, атомoksetин	Пароксетин, хинидин, флуoksetин	
CYP2E1	Хлорзоксазон	Дисульфирам	Этанол
CYP3A4/5	Мидазолам, буспирон, фелодипин	Атазанавир, кларитромицин, интраконазол	Рифампицин, карбамазепин

Примечание. Перевод таблицы 2 из обзора [Inhibition and induction ..., 2008].

Существует совокупность условий, определяющих пригодность фармакогенетических тестов для клинической практики. Одним из них является наличие значимой ассоциации между аллельным вариантом и неблагоприятным фармакологическим ответом – нежелательные лекарственные реакции или недостаточная эффективность. В частности, для *CYP2C9* фармакогенетические тесты к настоящему

времени разработаны и внедрены в клиническую практику для индивидуализации фармакотерапии [Клиническая фармакогенетика ..., 2007]. Например, назначение варфарина для профилактики и лечения тромбозов и тромбоэмболических осложнений при носительстве гетерозиготного «медленного» аллельного варианта следует начинать с дозы 2,5 мг/сут, тогда как для гомозиготного по данному аллелю варианта – с дозы 1,25 мг/сут. Следует отметить, что частота аллельных вариантов в этнических группах может влиять на значимость внедрения такого теста в определенном регионе. По оценкам, выполненным в США, экономические последствия внедрения схемы лечения варфарином с выявлением неблагоприятного генотипа CYP2C9 позволяет снизить расходы на 4700 долларов на каждые 100 пациентов, пролеченных в течение одного года.

Вероятно, высокая эффективность изложенной методики во многом обусловлена «стереоселективностью» CYP2C9, который катализирует в основном метаболизм S-варфарина – изомера, обладающего большей антикоагулянтной активностью.

3.3. Метаболизм эстрогенов и гормональный канцерогенез

Известно, что эстрогены играют важную роль в клеточной пролиферации и дифференцировке, следовательно, могут вызывать многие заболевания человека, среди которых особое место занимает гормональный канцерогенез. Доказано, что эстрогены играют ключевую роль в этиологии онкологических заболеваний женщин – рака молочной железы, эндометрия и яичников. Выделяют два типа гормонального канцерогенеза – промоторный (1-й тип) и генотоксический (2-й тип).

Первый тип гормонального канцерогенеза. Известно, что холестерин является исходным соединением для биосинтеза всех эстрогенных гормонов. На первом этапе он

преобразуется в прегненолон при участии CYP11A, на следующем этапе CYP17 катализирует синтез андрогенов. Решающей стадией превращения андрогенов в эстрогены является ароматизация А-кольца с одновременным удалением метильной группы положения С-19. Это превращение катализируется ферментом CYP19 (ароматазой) и происходит в гладком эндоплазматическом ретикулуме. Активность ароматазы находится под гормональным контролем, т.е. все стадии синтеза эстрогена регулируются.

У женщин репродуктивного возраста яичники являются основным органом биосинтеза эстрогенов, образование которых регулируется циклически гипоталамо-гипофизарной системой. Увеличение уровня секреции эстрогенов из преовуляторных фолликулов реализуется через усиление экспрессии гена *CYP19*, чему предшествует усиление связывания факторов транскрипции с промотором II этого гена [Пустыльняк, Гуляева, 2010]. В период менопаузы уровень циркулирующего тестостерона на порядок выше, чем эстрадиола. Таким образом, циркулирующие андрогены могут быть очень важны для поддержания локального уровня эстрогенов в различных тканях. У женщин в этом периоде яичники секретируют 25–35 % циркулирующего тестостерона. Основными локусами синтеза эстрогенов у женщин в период менопаузы являются жировая и мышечная ткани, кожа, кости, молочная железа и эндометрий. Экспрессия *CYP19* в этих тканях регулируется главным образом цитокинами и глюкокортикоидами через альтернативное участие промотора I4.

Характерной особенностью внегонадного синтеза эстрогенов у женщин в постменопаузе является их высокая локальная концентрация по сравнению с невысоким общим содержанием в тканях. Например, концентрации эстрадиола в опухолях молочной железы в 20 раз выше, чем в плазме крови. При этом основной вклад обусловлен жировой тканью молочной железы. Механизмы, приводящие к локальной стимуляции экспрессии ароматазы в опухолях и окру-

жающей мезенхимальной ткани, важны как для понимания причин неопластической трансформации, так и для лечения гормонзависимых опухолей. Нарушение экспрессии ароматазы играет патогенетическую роль в гормональном канцерогенезе эндометрия. В нормальной эндометрии, как правило, активность CYP19 не обнаруживается, но при гиперплазии и раке, особенно в локусах инвазии, наблюдается повышенная экспрессия гена *CYP19* и появление активности этого фермента.

Это приводит к тому, что в опухолевых тканях за счет синтеза *in situ* локальная концентрация эстрогенов преимущественно выше, чем концентрация в прилегающей не трансформированной ткани. Это в свою очередь приводит к повышенной активации эстрогеновых рецепторов, являющихся одним из наиболее важных факторов для усиления клеточной пролиферации [Пустыльняк, Гуляева, 2010].

В настоящее время для уменьшения количества эстрадиола в тканях, пораженных гормонзависимым раком, успешно используют ингибиторы ароматазы. Последние могут быть разделены на стероидные и нестероидные (ингибиторы 1-го и 2-го типа соответственно). Ингибиторы 1-го типа конкурентно и обратимо связываются с активным центром CYP19 и на период существования этой связи предотвращают формирование продукта. Ингибиторы 2-го типа (фардозол, форместан, экземестран) конкурируют с естественным субстратом ароматазы (андростендионом и тестостероном) за связывание с активным центром фермента. В этом случае происходит ковалентное связывание, которое необратимо инактивирует фермент.

Второй тип гормонального канцерогенеза – генотоксический. Этот тип связывают с образованием реактивных промежуточных метаболитов, образующихся в процессе биотрансформации эстрогенов при участии цитохромов P450.

Согласно современным представлениям, основным фактором, стимулирующим клетки гормон-чувствительных

органов и тканей репродуктивной системы (молочные железы, эндометрий, шейка матки, вульва) к патологическому росту, является не сам уровень женского полового гормона эстрадиола (определенный в биологических жидкостях), а нарушение баланса его метаболитов – эстрогенов, имеющих разную способность к активации клеточной пролиферации [Ашрафян, Киселев, Муйжнек, 2009].

Несколько изоформ цитохрома P450 играют ключевую роль в биотрансформации эстрогенов (рис. 6), поскольку катализируют их метаболизм с образованием промежуточных продуктов (2-гидрокси-, 16-гидрокси-, 4-гидроксиэстрогенов). Наиболее предпочтительными для женщины в период менопаузы являются 2-гидроксиэстрогены, образующиеся в результате окисления эстрадиола или эстрона при участии CYP1A2. Такие метаболиты обладают слабым эстрогенным действием (~48 % активности эстрадиола) и поэтому не оказывают пролиферативного действия на клетки.

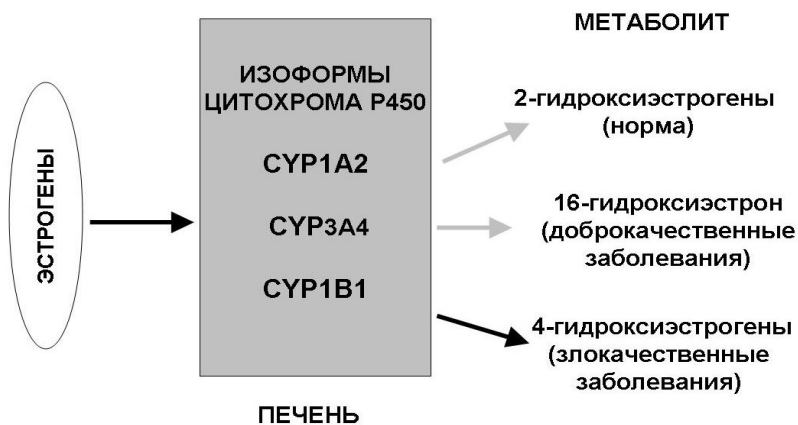


Рис. 6. Основные пути метаболизма эстрогенов

Если метаболизм эстрогенов протекает при участии *CYP3A4*, образуется 16-гидроксиэстрон или 16-гидроксиэстрадиол (эстриол). 16-гидроксиэстрон в 8 раз более активен по сравнению с эстрадиолом, а его накопление вызывает состояние гиперэстрогемии при нормальном уровне эстрадиола в крови. Эти метаболиты вызывают пролиферацию (чрезмерный рост) клеток тканей-мишеней, что способствует развитию доброкачественных новообразований, таких как миома, мастопатия и т. п. Преобладание 16-гидроксиэстрогена над 2-гидроксиметаболитами свидетельствует о высоком риске развития рака матки и молочной железы.

В том случае если метаболизм эстрогенов катализируется *CYP1B1*, образуются 4-гидроэстрогены. Несмотря на их относительно низкую активность (~79 % активности эстрадиола), они могут повреждать ДНК клетки и вызывать ее злокачественное перерождение. Именно эти метаболиты определяют образование доброкачественных и злокачественных новообразований матки, молочной железы и яичников.

На следующем этапе превращений 2-гидрокси- и 4-гидрокси-метаболиты женских половых гормонов могут превратиться или в семиквиноны, соединения, которые обладают генотоксическим действием, или, с помощью метилирования, в 2- и 4-метоксиэстрогены, соединения, абсолютно безвредные для организма.

Следует отметить, что определенные аллели или генотипы заинтересованных генов *CYPs* способны значимо повысить риск возникновения некоторых гормонозависимых злокачественных новообразований. Исследование генетических факторов предрасположенности к онкологическим заболеваниям позволяет формировать группы риска, что может способствовать выявлению заболевания на ранних стадиях или модифицировать диспансерное наблюдение и лечение пациентов.

К настоящему времени идентифицировано значительное количество полиморфных генов-кандидатов, которые могут принимать участие в формировании онкологического

риска [Имянитов, Хансон, 2007]. Предполагается, что некоторые полиморфные варианты генов системы биотрансформации ксенобиотиков детерминируют онкологический риск (табл. 3).

Таблица 3

Полиморфные гены системы биотрансформации ксенобиотиков с предполагаемой ролью в детерминации онкологического риска

<i>Ген</i>	<i>Локализация опухоли</i>
<i>GSTM1, GSTT1, GSTP1</i>	Легкие, мочевой пузырь
<i>CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1</i>	Легкие, молочная железа
<i>CYP17</i>	Молочная железа
<i>CYP19</i>	Молочная железа, эндометрий
<i>NAT1, NAT2</i>	Мочевой пузырь, толстая кишка, легкие

Примечание. Использован фрагмент таблицы из монографии Е. Н. Имянитова, К. П. Хансона [2007].

В частности, активация канцерогенов (полициклических ароматических углеводородов), содержащихся в табачном дыме, происходит в процессе метаболизма при участии цитохромов CYP1A. Индивидуумы с низкой активностью CYPs могут отличаться относительной резистентностью к канцерогенам табачного дыма. Накоплены достаточно убедительные данные об ассоциации неблагоприятного сочетания полиморфных вариантов генов *CYP1A1* и *GSTM1* с увеличением риска рака легкого.

Отметим, что в настоящее время гены системы биотрансформации ксенобиотиков не рассматриваются в числе генов, которые генетически обуславливают возникновение «наследственных раков».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитохром Р450-зависимые монооксигеназы играют ключевую роль в биотрансформации эндогенных и экзогенных субстратов, в известной степени определяя тем самым выраженность токсических эффектов ксенобиотиков, эффективность лекарственных препаратов. Изучение показателей, характеризующих состояние биотрансформации, особенно актуально для решения стратегических задач современных наук о жизни – разработки основ персонализированной и предсказательной медицины, учитывающих генетические и молекулярные особенности организма пациента.

В целом получение таких знаний направлено на индивидуализацию терапевтического воздействия для достижения максимальной эффективности и минимизации побочных эффектов, выявление предрасположенности к некоторым заболеваниям и вредным привычкам.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Биотрансформация – свойство химических веществ изменяться (трансформироваться) под влиянием биологических факторов.

Индукцибельность – обозначает способность к увеличению активности ферментов биотрансформации ксенобиотиков в ответ на внешнее воздействие в результате их дополнительного синтеза *de novo* [Гуляева, Вавилин, Ляхович, 2000].

Изоформы – множество форм фермента, катализирующие тождественные типы реакций и различающиеся аминокислотной последовательностью, субстратной специфичностью и/или регуляторными свойствами [Lewis, 2001].

Когорта – группа лиц, изначально объединенных каким-либо общим признаком, наблюдаемая в течение определенного периода времени, чтобы проследить, что с ними произойдет в дальнейшем [Ревич, 2001].

Контрольная группа – группа лиц, не подвергавшихся экспозиции или же подвергавшихся значительно меньшему уровню воздействия [Ревич, 2001].

Ксенобиотик – чужеродное химическое вещество, не присутствующее в норме в окружающей среде, например, пестициды или диоксины [Ревич, 2001].

Полиморфизм – существование двух или более аллелей для данного гена, в более общем виде, существование различных последовательностей данного локуса у различных индивидуумов [Гуляева, Вавилин, Ляхович, 2000].

Диоксины – обобщенное название 17 из 210 полихлорированных дибензо-р-диоксинов и дибензофуранов, 12 из 209 полихлорированных бифенилов, обладающих специфической, так называемой «диоксиновой», токсичностью [The 2005 World ..., 2006].

Специфичность – способность фермента дифференцировать различные субстраты [Lewis, 2001].

Субстрат – химическое соединение, которое метаболизируется в форму продукта [Lewis, 2001].

Факторы риска – факторы, которые повышают вероятность возникновения различных нарушений здоровья, в частности, развития заболеваний [Ревич, 2001].

Цитохром P450 – гемсодержащий белок, имеющий аббревиатуру CYP или P450. Множество форм обозначается CYPs или P450s [Lewis, 2001].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Арчаков А. И. Оксигеназы биологических мембран. 37-е Баховское чтение / А. И. Арчаков. – М. : Наука, 1982. – 56 с.

Ашрафян Л. А. Патогенетическая профилактика рака репродуктивных органов / Л. А. Ашрафян, В. И. Киселев, Е. Л. Муйжнек. – М. : Димитрейд График Групп, 2009. – 176 с.

Влияние витаминов группы В на монооксигеназную активность цитохрома Р450 3А4: электроанализ каталитических свойств / А. А. Махова [и др.] // Биомедицина. – 2010. – № 3. – С. 99–100.

Гуляева Л. Ф. Биологические эффекты токсических соединений : курс лекций / Л. Ф. Гуляева, Р. Х. Райс. – Новосибирск : Изд-во Новосиб. гос. ун-та, 2005. – 204 с.

Гуляева Л. Ф. Ферменты биотрансформации ксенобиотиков в химическом канцерогенезе : аналит. обзор / Л. Ф. Гуляева, В. А. Вавилин, В. В. Ляхович. – Новосибирск : Изд-во ГПНТБ СО РАН, 2000. – 85 с.

Иванов И. А. Современные лабораторные генетические методы исследования : учеб. пособие для врачей / И. А. Иванов, А. Е. Терешин, С. Г. Щербак. – СПб. : [б. и.], 2010. – 62 с.

Имянитов Е. Н. Молекулярная онкология: клинические аспекты / Е. Н. Имянитов, К. П. Хансон. – СПб. : Издат. дом СПбМАПО, 2007. – 211 с.

Карузина И. И. Самоинактивация цитохрома Р-450 в каталитическом цикле / И. И. Карузина, Г. И. Бачманова, А. И. Арчаков // Вестн. РАМН. – 1995. – № 2. – С. 17–29.

Кинетика и динамика пребывания токсических соединений в организме : учеб. пособие / В. А. Вавилин, С. И. Макарова, Г. П. Талалайченко, В. В. Ляхович ;– Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2008. – 148 с.

Клиническая фармакогенетика : учеб. пособие / Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, И. В. Игнатъев, В. Г. Кукес ; под ред. В. Г. Кукеса, Н. П. Бочкова. – М. : ГЭОТАР-Медиа, 2007. – 248 с.

Кузьмина Л. П. Роль полиморфных генов системы биотрансформации ксенобиотиков в патогенезе профессиональных аллергодерматозов / Л. П. Кузьмина, Н. И. Измерова, М. М. Коляскина // Медицина труда и пром. экология. – 2011. – № 7. – С. 17–23.

Ляхович В. В. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков / В. В. Ляхович, И. Б. Цырлов. – Новосибирск : Наука, 1981. – 242 с.

Москалева Н. Е. Масс-спектрометрическое определение содержания цитохромов P450 и их ферментативной активности / Н. Е. Москалева, В. Г. Згода, А. И. Арчаков // Биоорганич. химия. – 2011. – Т. 37, № 2. – С. 149–164.

Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты / Е. Б. Меньшикова [и др.]. – М. : Слово, 2006. – 556 с.

Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, вероятных маркеров риска онкологических заболеваний, в популяциях коренных этносов и русских Северной Сибири / Р. П. Корчагина [и др.] // Информ. вестн. ВО-ГиС. – 2011. – Т. 15, № 3. – С. 448–461.

Полихлорированные дибензо-*p*-диоксины, дибензофураны и бифенилы в сыворотке крови пожарных Иркутского региона / А. А. Шелепчиков [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2012. – № 3. – С. 53–59.

Проблема индивидуальной чувствительности в медицине труда : метод. пособие для врачей / Л. П. Кузьмина [и др.]. – М. : [б. и.], 2009. – 40 с.

Пустыльняк В. О. Молекулярные основы развития патологических процессов. Эстрогены и гормональный канцерогенез : учеб.-метод. пособие / В. О. Пустыльняк, Л. Ф. Гуляева. – Новосибирск : Новосиб. гос. ун-т, 2010. – 44 с.

ПЩР «в реальном времени» / Д. В. Ребриков [и др.]. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2009. – 223 с.

Ревич Б. А. Загрязнение окружающей среды и здоровье населения. Введение в экологическую эпидемиологию / Б. А. Ревич. – М. : Изд-во МНЭПУ, 2001. – 264 с.

Роль цитохром P450-зависимых монооксигеназ и полиморфных вариантов генов *GSTT1* и *GSTM1* в формировании поражения головного мозга у лиц, хронически экспонированных ртутью / Ю. И. Черняк, В. Б. Ицкович, О. А. Дьякович, С. И. Колесников // Бюл. экспер. биол. – 2013. – Т. 156, № 7. – С. 21–25.

Снижение токсичности и повышение эффективности противоопухолевой химиотерапии путем коррекции активности монооксигеназ печени: от эксперимента – в клинику / Т. А. Богуш, Е. А. Богуш, Л. А. Дурнов, А. Б. Сыркин // Вестн. РАМН. – 2002. – № 1. – С. 37–42.

Современные подходы к классификации профессиональной интоксикации ртутью / О. Л. Лахман [и др.] // Экология человека. – 2009. – № 12. – С. 22–27.

Цырлов И. Б. Хлорированные диоксины: биологический и медицинский аспекты / И. Б. Цырлов. – Новосибирск : Изд-во ГПНТБ СО АН СССР, 1990. – 210 с.

Черняк Е. В. Состояние 1-й фазы биотрансформации ксенобиотиков у больных опухолями яичников / Е. В. Черняк, Ю. И. Черняк, Н. И. Портяная // Сиб. онкол. журн. – 2002. – № 3–4. – С. 98.

Черняк Ю. И. Влияние генетических полиморфизмов гена *CYP1A2* на *CYP1A2*-зависимый метаболизм антипирина / Ю. И. Черняк, В. Б. Ицкович, С. И. Колесников // Бюлл. экспер. биол. – 2011. – Т. 151, № 4. – С. 427–430.

Черняк Ю. И. Влияние стойких органических загрязнителей на биотрансформацию ксенобиотиков / Ю. И. Черняк, Дж. А. Грассман, С. И. Колесников. – Новосибирск : Наука, 2007. – 134 с.

Denison M. S. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals / M. S. Denison, S. R. Nagy // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2003. – Vol. 43. – P. 309–334.

Diliberto J. J. Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin: studies using CYP1A2 knock-out-mice / J. J. Diliberto, D. Burgin, L. S. Birnbaum // Biochem. Biophys. Res. Comm. – 1997. – Vol. 236. – P. 431–433.

Dutheil F. Xenobiotic metabolizing enzymes in the central nervous system: Contribution of cytochrome P450 enzymes in normal and pathological human brain / F. Dutheil, P. Beaune, M. A. Lorient // Biochimie. – 2008. – Vol. 90. – P. 426–436.

Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status / O. Pelkonen [et al.] // Arch. Toxicol. – 2008. – Vol. 82. – P. 667–715.

Lewis D. F. V. Guide to cytochromes P450. Structure and function / D. F. V. Lewis. – London ; N. Y. : Taylor & Francis, 2001. – 215 p.

Nebert D. W. Clinical importance of the cytochrome P450 / D. W. Nebert, D. W. Russell // Lancet, 2002. – Vol. 360. – P. 1155–1162.

The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-

Like Compounds / Van den Berg M. [et al.] // Toxicol. Sci. – 2006. – Vol. 93, N 2. –P. 223–241.

The impact of dioxins on antipyrine metabolism in Russian fire-fighters exposed to combustion products during a cable factory fire / Y. I. Chernyak [et al.]// Organohalogen Compounds. – 2011. – Vol. 73. –P. 5–8.

Учебное издание

**Черняк Юрий Ильич
Колесников Сергей Иванович
Черняк Елена Владимировна**

**ЦИТОХРОМ P450:
ОСНОВНЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ,
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ЗНАЧЕНИЕ
ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ**

Учебно-методическое пособие

ISBN 978-5-9624-0996-2

Подписано в печать 22.01.2014. Формат 60x90 1/16
Усл.-печ. 3,0. Тираж 100 экз. Заказ 4

ИЗДАТЕЛЬСТВО ИГУ
664003, г. Иркутск, бульвар Гагарина, 36