

На правах рукописи

Щепотина Елена Георгиевна

Полиморфизм генов цитохромов P450 подсемейства 3A,
прегнанового X рецептора и вариабельность активности CYP3A

03.00.04 - биохимия

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и биофизики Сибирского отделения Российской академии медицинских наук

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор
Вавилин Валентин Андреевич

Научный консультант: доктор биологических наук,
академик РАМН
Ляхович Вячеслав Валентинович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
Гимаутдинова Ольга Ивановна

доктор медицинских наук,
Максимов Владимир Николаевич

Ведущая организация: Институт цитологии и генетики
СО РАН

Защита состоится «__» _____ 2008 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 001.034.01 в Государственном учреждении Научно-исследовательском институте биохимии СО РАМН по адресу: 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2, тел. 8(383)3335481.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Государственного учреждения Научно-исследовательского института биохимии Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Автореферат разослан «__» _____ 2008г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

Русских Г.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Хорошо известно, что реакция на воздействие химических факторов, в том числе, на прием лекарственных препаратов, индивидуальна и зависит от образа жизни, возраста, пола, этнической принадлежности, состояния здоровья, питания, взаимодействий применяемых лекарств, особенностей метаболизма. По некоторым оценкам, от 50 до 90% варибельности ответов на воздействие ксенобиотиков определяется генетическими особенностями индивидов (Ozdemir et al., 2000). Актуальность проблемы безопасности взаимодействия организма с химическими агентами окружающей среды возрастает с расширением числа используемых химических соединений, внедрением в клиническую практику новых лекарственных средств. Химические соединения, поступив в организм, подвергаются метаболизму посредством системы ферментов биотрансформации ксенобиотиков. Активность этих ферментов определяет протекание процесса обезвреживания токсичных соединений и их метаболитов. Основные процессы обезвреживания протекают в печени, где содержание ферментов метаболизма чужеродных соединений превалирует. Особо стоит выделить роль суперсемейства цитохромов P450, отвечающих за первый этап биотрансформации. В частности, подсемейство CYP3A, которое составляет в печени 30% от остальных CYP, и метаболизирует порядка 50% лекарственных препаратов (Bertz and Granneman, 1997; Guengerich, 2003). CYP3A участвуют также в различных метаболических реакциях стероидных гормонов (Shou et al., 1997; Stevens et al., 2003), поддерживая гормональный баланс, нарушение которого играет важную роль в развитии ряда заболеваний, таких как рак предстательной железы, рак молочной железы, гипертензия, синдром Кушинга.

У человека подсемейство цитохромов P450 3A включает четыре фермента: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43, содержание которых превалирует в печени, кроме CYP3A43, который в большей степени представлен в предстательной железе. Ферменты подсемейства имеют перекрывающуюся субстратную специфичность, что затрудняет оценку их индивидуального вклада в метаболизм ксенобиотиков (Williams et al., 2002). Для всех членов подсемейства характерно гидроксилирование стероидов по 6 β -положению. Это свойство позволяет определять активность ферментов CYP3A неинвазивным способом: по эндогенным кортизолу и его 6 β -гидроксилированному метаболиту, отношение концентраций которых является признанным биомаркером активности CYP3A (Waxman et al., 1994; Furuta et al., 2003).

Метаболический полиморфизм подсемейства был известен еще в середине 1980-х г.г., но надежда его объяснить появилась с открытием генетического полиморфизма CYP3A в 1998 году. В настоящее время известно более 200 полиморфных вариантов и мутаций в генах CYP3A (www.cypalleles.ki.se; www.pharmgkb.org). Несмотря на долгий поиск причин варибельности активности CYP3A, до сих пор нет однозначного ответа на вопрос, что приводит к значительным межиндивидуальным различиям в ферментативной активности, достигающим нескольких десятков раз (Yamamoto et al., 2000). В гене CYP3A4 не обнаружено полиморфного варианта, определяющего подобную варибельность активности фермента. Для CYP3A5 наблюдается

бимодальное распределение активности белка, которое объясняется наличием аллеля *3С. Данный аллель вносит определенный вклад в активность всего подсемейства, но не определяет все межиндивидуальные различия (Hustert et al., 2001; Kuehl et al., 2001; Sim, 2007). Не так давно выявлен вариант *CYP3A7*2*, белок которого *CYP3A7.2* более активен *in vitro*, чем аллозим «дикого» типа *CYP3A7.1* (Rodriguez-Antona et al., 2005). В гене *CYP3A43* выявлены три полиморфных варианта белок-кодирующей области, один из которых приводит к редуцированному белку (Cauffiez et al., 2004), но полиморфизму *CYP3A43* посвящено мало работ, и его влияние на ферментативную активность не изучено.

В последние годы оценка функциональных проявлений открываемых мутаций проводится *in vitro*, если проводится вообще. В то же время, работы, посвященные изучению влияния генетических факторов на активность *CYP3A* у человека и лабораторных животных *in vivo*, представлены не для всех полиморфных вариантов. Поэтому изучение активности *CYP3A* по эндогенным субстратам и поиск ассоциаций генетического полиморфизма с активностью может принести новые знания в понимание роли генетических факторов в формировании активности всего подсемейства. Причина вариабельности активности *CYP3A*, возможно, кроется не только в изменениях нуклеотидных последовательностей генов подсемейства, но и в регуляции их транскрипционной активации. Поэтому комплексное изучение полиморфизма *CYP3A* и их генов-регуляторов, основным из которых является прегнановый X рецептор, может прояснить генетическую основу вариабельности ферментативной активности *CYP3A*.

Другим важным фактором изменения ферментативной активности *CYP3A* является возраст. Отличия метаболизма ксенобиотиков, обусловленные возрастом, наиболее отчетливо проявляются у новорожденных и лиц пожилого возраста. Недостаточно развитая система метаболизма чужеродных соединений у детей младшего возраста делает их особенно чувствительными к ряду токсикантов. В литературе отсутствуют данные об изменении метаболической активности *CYP3A* у детей раннего детства. Поскольку ферментативная активность способна существенно изменяться в течение коротких отрезков онтогенеза, изучение возрастной динамики активности также может привести к идентификации важных факторов в регуляции *CYP3A*.

Многими исследователями для обнаружения и выявления мутаций используется метод секвенирования ДНК, который требует специального дорогостоящего оборудования и реактивов и не всегда доступен большинству лабораторий для рутинного генетического анализа. Для выявления известных мутаций широко используется метод анализа полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ), а также метод конформационного полиморфизма одностранных фрагментов ДНК (SSCP), который позволяет обнаружить как новые, так и уже известные мутации. Несмотря на то, что полиморфизм *CYP3A* изучается многими исследователями, для ряда полиморфных вариантов не предложены способы их детекции методами ПДРФ и SSCP, а для изучения полиморфизма генов *PXR* и *CYP3A43* не найдена

информация об их использовании. Поэтому оптимизация методов ПДРФ и SSCP в изучении генов *CYP3A* и *PXR* имеет существенное значение.

Цель исследования: изучение влияния полиморфизма генов *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*, *PXR* на вариабельность активности *CYP3A*.

Задачи исследования:

1. Изучить ферментативную активность *CYP3A* по содержанию эндогенных кортизола и 6 β -гидрокортизола в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в возрастной период от 1 года до 14 лет.
2. Оптимизировать способы выявления полиморфных вариантов генов *CYP3A* и *PXR* методами полимеразной цепной реакции, полиморфизма длины рестрикционных фрагментов и конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК.
3. Изучить частоту встречаемости полиморфных вариантов и мутаций генов *CYP3A4* (*1B, *2, *5, *17, -11129_-11128insTGT), *CYP3A5* (*3C, *6), *CYP3A7* (*2), *CYP3A43* (*1B, *2A) и *PXR* (-1570C>T, -205_-200delGAGAAG, c.106G>A, g.4444A>G) у здоровых европеоидов.
4. Проанализировать ассоциации генотипов *CYP3A* и *PXR* с активностью *CYP3A*.

Научная новизна. Впервые изучено изменение активности *CYP3A*, оцененной по 6 β -гидроксилированию кортизола, в возрастной период с 1 г. до 14 лет у европеоидов. Впервые выявлено, что основной рост активности происходит в первые два с половиной года жизни, а после 5 лет темпы ее роста снижаются.

Предложено выявлять полиморфные варианты и мутации *CYP3A4* (*1B, *2, *5, *17), *CYP3A5* (*3C, *6), *CYP3A7* (*2), *CYP3A43* (*1B, *2A), *PXR* (g.106G>A, g.4444A>G, -1570C>T) методом ПЦР-ПДРФ, вставку *CYP3A4* -11129_-11128insTGT методом SSCP и делецию *PXR* -205_-200delGAGAAG полимеразной цепной реакцией с дальнейшим разделением продуктов в 12% полиакриламидном геле.

Впервые охарактеризована частота встречаемости аллелей генов *CYP3A4* (*17, *5, -11129_-11128insTGT), *CYP3A5* (*3C, *6), *CYP3A7* (*2), *CYP3A43* (*1B, *2A), *PXR* -205_-200delGAGAAG и нуклеотидных замен *PXR* (g.106G>A, g.4444A>G, -1570C>T) у европеоидов России. Частота встречаемости изученных полиморфных вариантов и мутаций не отличается от частоты встречаемости в других популяциях европеоидов.

Впервые в России проведен анализ сравнения показателя активности *CYP3A*, оцененного по 6 β -гидроксилированию кортизола, у носителей разных генотипов *CYP3A* и *PXR*. В группе гетерозигот *CYP3A5**1A/*3C среднее значение показателя активности *CYP3A* в 3,15 раза выше относительно группы гомозигот *CYP3A5**3C/*3C ($p=0,014$). В группе комбинации гомозигот *CYP3A5**3C/*3C и *CYP3A7**1/*1 среднее значение показателя активности *CYP3A* в 3,08 раза ниже относительно группы комбинации гетерозигот *CYP3A5**1/*3C и *CYP3A7**1/*2 ($p=0,031$). В группе комбинации генотипов *CYP3A4**1/*1B, *CYP3A5**1/*3C, *CYP3A7**1/*2 показатель активности *CYP3A* в

4,11 раза выше по сравнению с группой комбинации генотипов *CYP3A4*1/*1*, *CYP3A5*3C/*3C*, *CYP3A7*1/*1* ($p=0,042$).

Практическая значимость. Предложенные способы детекции полиморфных вариантов генов *CYP3A* и *PXR* могут быть использованы в исследованиях, посвященных изучению функциональных проявлений полиморфных вариантов, в исследованиях по выявлению маркеров предрасположенности к каким-либо заболеваниям, связанным с метаболическими путями, в которые вовлечены *CYP3A* и *PXR*, в популяционно-генетических исследованиях. Данные о частотах распределения изученных аллелей могут служить материалом для сравнения результатов в популяционных исследованиях другими авторами.

Данные об индивидуальной активности ферментов *CYP3A* могут иметь важную ценность при назначении лекарственных препаратов и при определении их терапевтических доз. Знания об особенностях ферментативной активности *CYP3A* особенно важны при комплексной лекарственной терапии для предупреждения нежелательных реакций, которые могут возникать при взаимодействии лекарственных препаратов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Распределение активности цитохромов P450 3A в возрастной группе от 1 года до 14 лет является полимодальным и позволяет выделить фенотипы со сниженной, средней и повышенной активностью. Активность *CYP3A* увеличивается с возрастом, максимально выражен прирост активности в период от 1 года до 2,5 лет.
2. В группе гетерозигот *CYP3A5*1A/*3C* наблюдаются более высокие значения показателя активности *CYP3A*, относительно группы гомозигот *CYP3A5*3C/*3C*. В группе комбинации гетерозигот *CYP3A5*1/*3C* и *CYP3A7*1/*2* – более высокие значения показателя активности, относительно группы комбинации гомозигот *CYP3A5*3C/*3C* и *CYP3A7*1/*1*.
3. Распределение полиморфных вариантов генов подсемейства и гена прегнанового X рецептора между фенотипическими группами (сниженная, средняя, повышенная активность) не имеет закономерности. Это свидетельствует об отсутствии сильного влияния полиморфизма изученных генов на ферментативную активность *CYP3A*, оцененную по б β -гидроксилированию кортизола.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации изложены на V Молодежной научной конференции СО РАМН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины» (Новосибирск, 2004), 8-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2004), Московской конференции вычислительной молекулярной биологии (МССМВ'05) (МГУ, 2005), XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006» (Москва, 2006), 10-й Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино,

2006), 9-й Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2006), Общероссийской IV научной школе молодых ученых по Экологической генетике (Санкт-Петербург, 2007), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008).

Вклад автора. Автором лично выполнен весь объем биохимического и молекулярно-генетического анализов. Выполнена высокоэффективная жидкостная хроматография с предварительной пробоподготовкой методом жидкостной экстракции и всеми сопутствующими модификациями методов. Проведен анализ полиморфных вариантов и мутаций генов *CYP3A* и *PXR* и их отбор в исследование. Выполнены компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей, дизайн праймеров, полимеразная цепная реакция, ферментативный гидролиз, анализ полиморфизма однонитевых фрагментов ДНК, подготовка проб к секвенированию. Все полученные данные проанализированы автором самостоятельно с помощью статистических методов.

Подготовка образцов к секвенированию проведена совместно с к.б.н. Катохиным А.В. (ИЦИГ СО РАН). Секвенирование образцов проводили в ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>). Забор клинического материала осуществляли сотрудники ДГКБ №1 г. Новосибирска под руководством к.м.н. Мананкина Н.А.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 9 работ, из них 3 в рецензируемой печати.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста, включая 11 таблиц, 33 рисунка. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 240 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на выборке здоровых европеоидов г. Новосибирска от 1 г. до 14 л. (n=145). Методом градиентной ВЭЖХ анализировали содержание 6 β -гидрооксикортизола (6 β -ОНСЛ) и кортизола (СЛ) в моче (n=48), по отношению их концентраций оценивали активность *CYP3A*. Гормоны предварительно экстрагировали методом жидкостной экстракции. Нами внесены модификации в пробоподготовку и собственно хроматографию относительно исходного метода Lykkesfeldt et al. (1994).

Молекулярно-генетический анализ *CYP3A* и *PXR* проводили на образцах ДНК, выделенных стандартным фенол-хлороформным методом из лейкоцитов периферической крови (n=145). ПЦР проводили по собственным методикам для вариантов *CYP3A4*1B*, *2, -11129_-11128insTGT, *CYP3A5*3C*, *6, *CYP3A7*2*, *CYP3A43*2A*, *PXR* с.106G>A, g.4444G>A, -1570C>T, -205_-200delGAGAAG, кроме *CYP3A4*5*, *CYP3A4*17* (Hsieh et al., 2001) и *CYP3A43*1B* (Cauffiez et al., 2004). Фрагменты ПЦР разделяли в 1,5-2% агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Полиморфные варианты выявляли методами ПДРФ и SSCP. Для аллелей *CYP3A4*1B* и *3A5*3C* использовали опубликованные методики ПДРФ

(Schaik et al., 2000, 2002, соотв.), для остальных оптимизировали метод самостоятельно.

Фрагменты ферментативного гидролиза разделяли в 8% ПААГ в трис-боратном буфере. Вариант *PXR* -205_200delGAGAAG выявляли ПЦР с дальнейшим разделением продуктов в 12% ПААГ в трис-боратном буфере. Все фрагменты окрашивали бромистым этидием и сканировали в УФ-свете. Длину идентифицировали с помощью маркеров точных длин ДНК.

Вариант *CYP3A4* -11129_-11128insTGT выявляли методом нерадиоактивного SSCP: к 10 мкл раствора, содержащего 95% формамид, 10 mM NaOH, 0,05% ксилен цианол, 0,05% бромфеноловый синий, добавляли 10 мкл продукта ПЦР, инкубировали в течение 5 мин при 95°C и быстро охлаждали на льду, денатурированные продукты разделяли в 12% ПААГ, содержащем 10% глицерин, в трис-боратном буфере при 10°C. Фрагменты окрашивали нитратом серебра (Bassam et al., 1994).

Анализ последовательностей исследуемых генов, включая поиск сайтов узнавания эндонуклеазами рестрикции исследуемых областей генов, проводили с помощью программы Vector NTI Suite 8. Сравнение последовательностей генов *CYP3A* (NG_000004) проводили с помощью программы ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). Дизайн праймеров осуществляли с помощью программы FastPCR (http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/bare-1_html/oligos.htm).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью ППП STATISTICA v.6.0 (StatSoft Inc., США). Распределение генотипов проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга. При проведении попарного сравнения частот аллелей исследованных вариантов генов между собственными и литературными данными использовали критерий χ^2 . Анализ различий независимых групп осуществляли с помощью критериев Манна-Уитни для двух групп и Краскела-Уоллиса для трех и более групп. Анализ связи признаков проводили с помощью метода Спирмена. Статистически значимым принимали уровень $p < 0,05$.

Характеристика исследуемых вариантов генов *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43* и *PXR* представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика изученных вариантов *CYP3A4*, *A5*, *A7*, *A43* и *PXR*

Вариант	Функциональное проявление
<i>CYP3A4</i> *1B (-392A>G)	Замена в нифедипин-чувствительном элементе.
<i>CYP3A4</i> *2 (c.664T>C)	Ser222Pro. Снижает скорость метаболизма нифедипина в 6-9 раз и тестостерона по 6 β -положению <i>in vitro</i> .
<i>CYP3A4</i> *5 (c.653C>G)	Pro218Arg в сайте связывания эритромицина.
<i>CYP3A4</i> *17 (c.566T>C)	Phe189Ser. Ser189 снижение активности <i>in vitro</i> .
<i>CYP3A4</i> -11129_-11128insTGT	Нарушение фактора стимуляции USF1 и снижение активности энхансера на 36%.
<i>CYP3A5</i> *3C (g.6986A>G)	Дефект сплайсинга, преждевременный стоп-кодон.

Вариант	Функциональное проявление
<i>CYP3A5</i> *6 (g.14690G>A)	Образуется транскрипт с делецией 7 экзона, неактивный белок.
<i>CYP3A7</i> *2 (g.1226C>G)	Thr409Arg. Приводит к повышению активности <i>in vitro</i> .
<i>CYP3A43</i> *1B (c.1047C>T)	Синонимичная замена.
<i>CYP3A43</i> *2A c.74delA	Сдвиг рамки считывания, преждевременный стоп-кодон.
<i>PXR</i> c.106G>A	Gly36Arg в области AF-1. Нарушает активирование рецептора.
<i>PXR</i> -1570C>T	Замена в 5'UTR. Может влиять на регуляцию транскрипции.
<i>PXR</i> -205_-200 delGAGAAG	Делеция 6 п.н. в промоторе hPAR-2, нарушает сайт связывания с HNF1.
<i>PXR</i> g.4444A>G	Asp163Gly.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В мировой популяции человека наблюдаются более чем 50-кратные различия в количествах белка *CYP3A4* между индивидами, которые приводят к более чем 20-кратным различиям в клиренсе лекарств (Eichelbaum and Burk, 2001), но до сих пор в литературе обсуждаются причины такой вариабельности. В формировании активности предположительно участвует не только полиморфизм самих генов *CYP3A*, но и их генов-регуляторов, таких как *PXR*, в меньшей степени *CAR*, *VDR*, а также *HNF*, который одновременно является и транскрипционным регулятором *PXR*, *CAR* и др. (Watt and Duncan, 2003). Функционирование транскрипционных факторов определяет как конститутивную, так и индуцибельную экспрессию *CYP3A*. В нашей работе мы проанализировали связь активности *CYP3A* и полиморфизма генов *CYP3A* и *PXR* в группе здоровых европеоидов г.Новосибирска.

Активность *CYP3A*

Модификация методов экстракции и ВЭЖХ. В исходном методе (Lykkesfeldt et al, 1994) описана твердофазная экстракция на колонках. При использовании колонок Sep Pack C₁₈ мы наблюдали потерю β-ОНСЛ при промывке колонок водой и слишком прочную фиксацию кортизола и внутреннего стандарта сорбентом, для количественного смыва которых требовался большой объем элюента, следствием чего была значительная потеря времени на высушивание образцов. Замена твердофазной экстракции жидкостной повысила эффективность экстракции всех трех определяемых соединений.

Изменения в проведении ВЭЖХ заключались в изменении профиля градиента, который позволил лучше разделять пики кортизола и внутреннего стандарта, в качестве которого мы использовали метилпреднизолон. Типичные хроматограммы разделения гормонов с известными концентрациями и проб мочи представлены на рисунке 1.

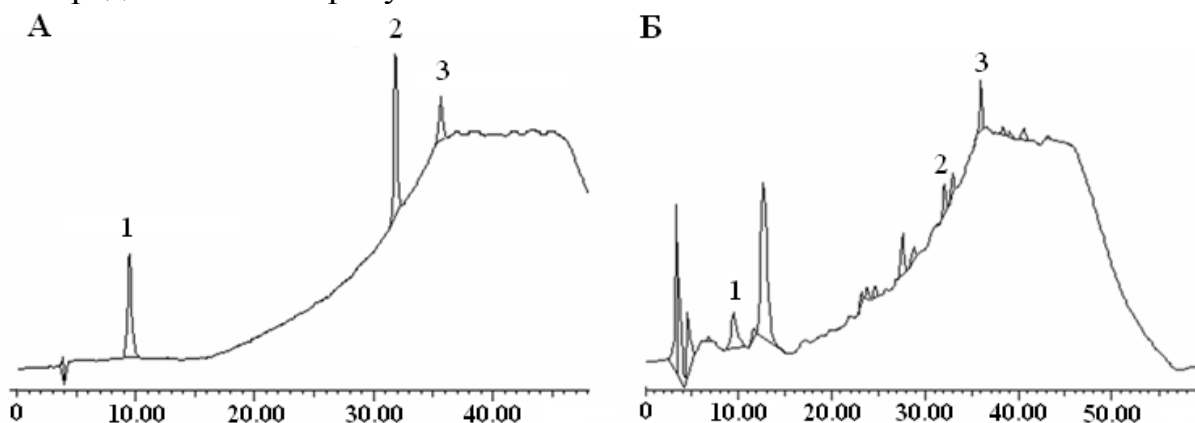


Рисунок 1. Типичная хроматограмма гормонов с известными концентрациями (А) и экстракта мочи (Б)

Времена выхода: (1) 6β-гидрокортизол – 9,60 мин., (2) кортизол – 31,90 мин., (3) метилпреднизолон – 35,60 мин.

Распределение показателя активности СУРЗА в выборке детей от 1 года до 14 лет и его динамика с возрастом. Значения показателя активности СУРЗА распределялись в выборке неравномерно от 0,303 до 49,0. Тест Шапиро-Уилка на нормальность распределения показал, что распределение показателя активности отлично от нормального ($p < 0,0001$) (рис. 2А). Поэтому в качестве меры центральной тенденции и меры изменчивости мы использовали медиану и процентилю, соответственно (Ме [25я; 75я процентилю]).

На гистограмме выделяются три основные моды, между ними располагаются антимоды, которые разделяют выборку на группы со сниженной, средней и повышенной активностью (I, II, III, соответственно). При сравнении этих групп с использованием критерия Краскела-Уоллиса выявлено, что они сильно различаются между собой ($p = 0,0004$) (рис. 2Б).

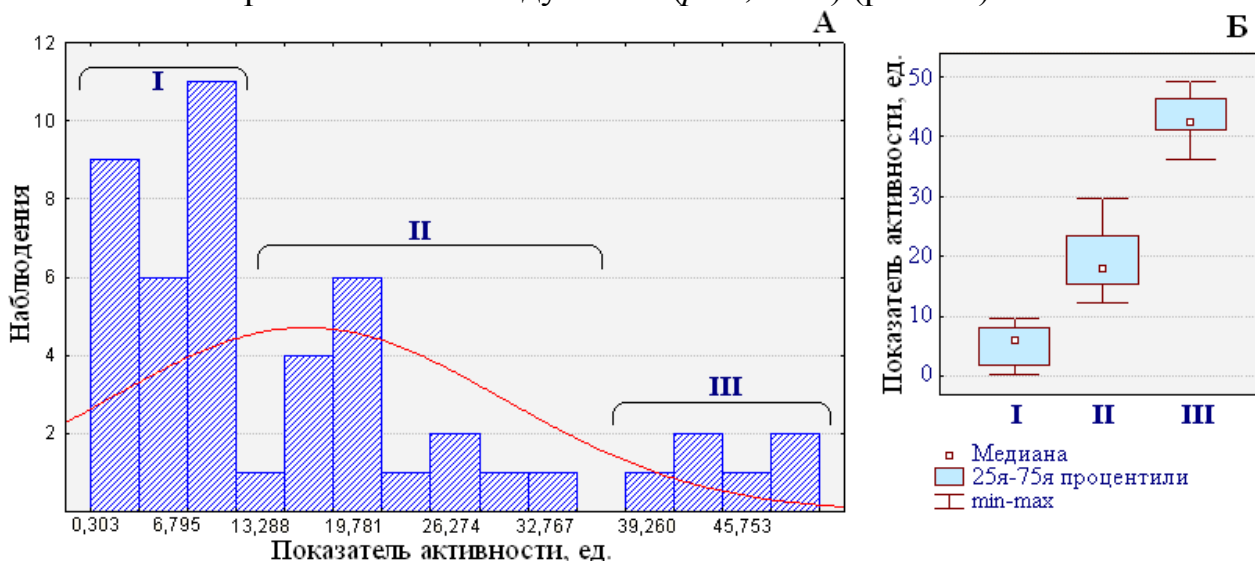


Рисунок 2. Распределение показателя активности СУРЗА

Анализ фактора пола в качестве возможной причины полиморфного распределения показателя активности выявил отсутствие различий между мальчиками и девочками ($p=0,754$) (таблица 2). Среднее значение показателя активности в выборке составило 9,65 [5,31; 18,73].

Таблица 2

Показатель активности СУРЗА				
Выборка	Число наблюдений	Показатель активности		p
		Me	25 ^я и 75 ^я процентиля	
Вся выборка	48	9,65	5,31; 18,73	—
Девочки	35	9,26	4,00; 23,00	0,754
Мальчики	13	9,67	6,37; 18,00	

Примечание: p – уровень значимости различий между мальчиками и девочками по критерию Манна-Уитни. Me – медиана.

Другим фактором, который мог обусловить полимодальный характер распределения показателя активности СУРЗА, является возраст. При анализе зависимости показателя активности от возраста выявлено увеличение показателя активности в период от 1 года до 5 лет ($r=0,367$, $p=0,042$); наибольший рост показателя активности СУРЗА наблюдается в группе от 1 года до 2,5 лет ($r=0,628$, $p=0,016$) (рис. 3). В период с 5 до 14 лет изменений в показателе активности СУРЗА не выявлено.

Таким образом, активность СУРЗА увеличивается с возрастом, основной прирост наблюдается в первые два с половиной года жизни.

Поскольку показатель активности СУРЗА зависел от возраста, особенно в первые 2,5 года жизни, была проанализирована его вариабельность в узких возрастных интервалах, равных одному году, чтобы уменьшить влияние этого фактора (рис. 4).

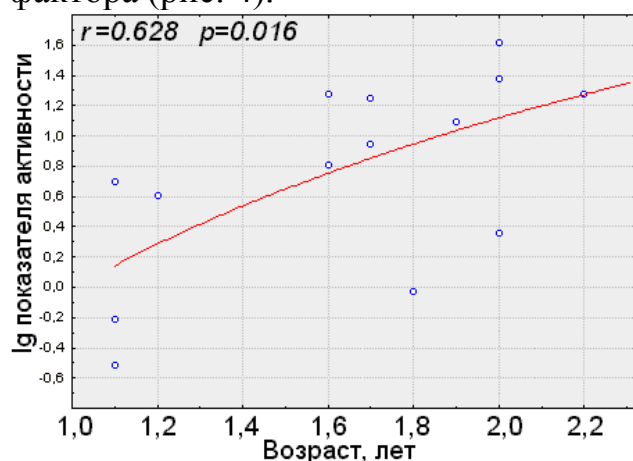


Рисунок 3. График рассеяния при анализе корреляционной связи между показателем активности СУРЗА и возрастом в группах от 1 г. до 2,5 лет

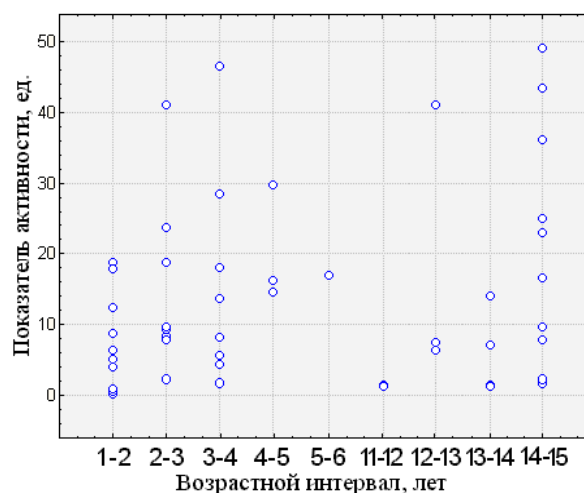


Рисунок 4. Вариабельность активности СУРЗА в узких возрастных интервалах

Распределение показателя активности СУРЗА показывает, что даже в таких узких возрастных интервалах наблюдается выраженная вариабельность активности СУРЗА (рис. 4). Существенно, что и у детей старшего возраста (14-15 лет), когда уже не отмечается статистически достоверной зависимости показателя активности СУРЗА от возраста, вариабельность активности СУРЗА достигает десятков раз (таблица 3). Это свидетельствует о том, что в ее формирование вносят вклад генетические факторы.

Таблица 3

Вариабельность показателя активности СУРЗА в разные возрастные периоды

Возрастная группа	N	Me [25я ,75я процентиля]	Минимум	Максимум	Кратность между крайними значениями, разы
1-2 лет	10	5,69 [0,94; 12,32]	0,30	18,70	62,33
2-3 лет	9	9,62 [8,26; 18,75]	2,27	41,17	18,14
3-4 лет	8	10,91 [4,92; 23,23]	1,83	46,39	25,35
4-5 лет	3	16,30 [14,55; 29,78]	14,55	29,78	2,05
12-13 лет	3	7,41 [6,37; 41,15]	6,37	41,15	6,46
13-14 лет	3	7,04 [1,37; 14,09]	1,37	14,09	10,28
14-15 лет	10	19,82 [7,74; 36,18]	1,75	49,00	28,00
Вся группа	48	9,65 [5,31; 18,73]	0,30	49,00	163,33

Примечание: N – число наблюдений. Me – медиана.

Поскольку результаты по активности свидетельствуют о важном вкладе генетических факторов, в дальнейшем исследовании были проанализированы ассоциации ферментативной активности с аллельными вариантами регуляторной области *СУРЗА4*, белок-кодирующих областей *СУРЗА5*, *СУРЗА7*, *СУРЗА43*, а также ключевого фактора транскрипции *PXR*.

Оптимизация методов выявления полиморфных вариантов генов *СУРЗА* и *PXR*

Предварительно была проведена работа по оптимизации методов выявления полиморфных вариантов, поскольку не для всех мутаций в литературе предложены методы их детекции с помощью ПЦР-ПДРФ и SSCP. Для полиморфных вариантов, которые мы выявляли методом ПЦР-ПДРФ, в таблице 4 описаны используемые нами эндонуклеазы рестрикции и представлена характеристика фрагментов, образующихся при ферментативном гидролизе.

Таблица 4

Разработанные и оптимизированные методики ПДРФ для выявления полиморфных вариантов и мутаций *СУРЗА* и *PXR*

Вариант	Фермент	Сайт узнавания	Длина фрагментов при гидролизе	
			«дикий» тип	мутантный
<i>СУРЗА4*1B</i>	PstI	<i>CTGCA^G</i>	224, 33, 114	24, 200, 33, 114
<i>СУРЗА4*2</i>	BstDEI	<i>CT^NAG</i>	129, 146, 19	129, 165

Продолжение таблицы 4

Вариант	Фермент	Сайт узнавания	Длина фрагментов при гидролизе	
			«дикий» тип	мутантный
<i>CYP3A4*5</i>	BamHI	<i>G[^]GATCC</i>	197, 251	448
<i>CYP3A4*17</i>	Hpy188III	<i>TC[^]NNGA</i>	396, 52	115, 281, 52
<i>CYP3A5*3C</i>	SspI	<i>AAT[^]ATT</i>	53, 148, 20	53, 168
<i>CYP3A5*6</i>	BstDEI	<i>CT[^]NAG</i>	50, 103, 25, 231	50, 128, 231
<i>CYP3A7*2</i>	AcuI	<i>CTGAAG(N)₁₆[^]</i>	253	40, 213
<i>CYP3A43*1B</i>	Bst2UI	<i>CC[^]WGG</i>	21, 217, 24, 92	21, 241, 92
<i>CYP3A43*2A</i>	Zsp2I	<i>ATGCA[^]T</i>	108	22, 86
<i>PXR c.106G>A</i>	BstDEI	<i>CT[^]NAG</i>	173, 8, 197, 58	22, 151, 8, 197, 58
<i>PXR -1570 C>T</i>	Bst6I	<i>CTCTTCN[^]</i>	195, 13	208
<i>PXRg.4444A>G</i>	AccB1I	<i>G[^]GYRCC</i>	134	115, 19

Примечание: Жирным цветом обозначены значимые фрагменты для выявления генотипа. N – любой из нуклеотидов, W = A или T; Y = C или T; R = A или G.

Выявление аллеля *CYP3A4*1B*. Аллель *CYP3A4*1B* выявляли методом ПДРФ с использованием эндонуклеазы SspI (Schaik et al., 2000). При воспроизведении ПЦР с праймерами, предложенными van Schaik и соавт. (2000), кроме целевого фрагмента мы наблюдали неспецифически амплифицируемые фрагменты, от которых не удалось избавиться изменением концентраций компонентов реакционной смеси и температурного режима.

Причиной этого, видимо, служит высокая гомология последовательностей генов *CYP3A*. В работе Раменской и соавт. (2002) также предложен способ детекции *CYP3A4*1B*. Сравнение последовательностей генов с помощью программы ClustalW, показало, что последовательности праймеров, предложенные Schaik и Раменской частично повторяются в трех генах *CYP3A4*, *3A5*, *3A7* (рис. 5А). Вследствие этого, кроме отжига на последовательности *CYP3A4*, праймеры, вероятно, могут отжигаться и на *CYP3A5* и *CYP3A7*. Интересно отметить, что в работе Раменской не было найдено ни одного аллеля *CYP3A4*1B* среди 290 европеоидов, хотя его частота в разных популяциях европеоидов составляет около 3% (Ingelman-Sundberg et al., 2007).

Для выявления *CYP3A4*1B* мы предложили использовать систему вложенных праймеров. Были подобраны праймеры для *CYP3A4* в наиболее негомологичной области генов *CYP3A*, для амплификации фрагмента длиной 1544 п.н. (рис. 5Б) – матрицы для синтеза фрагмента длиной 371 п.н., который в свою очередь подвергали гидролизу PstI. На рис. 5В представлены электрофореграммы разделения продуктов ПЦР и ПДРФ при выявлении *CYP3A4*1B*.

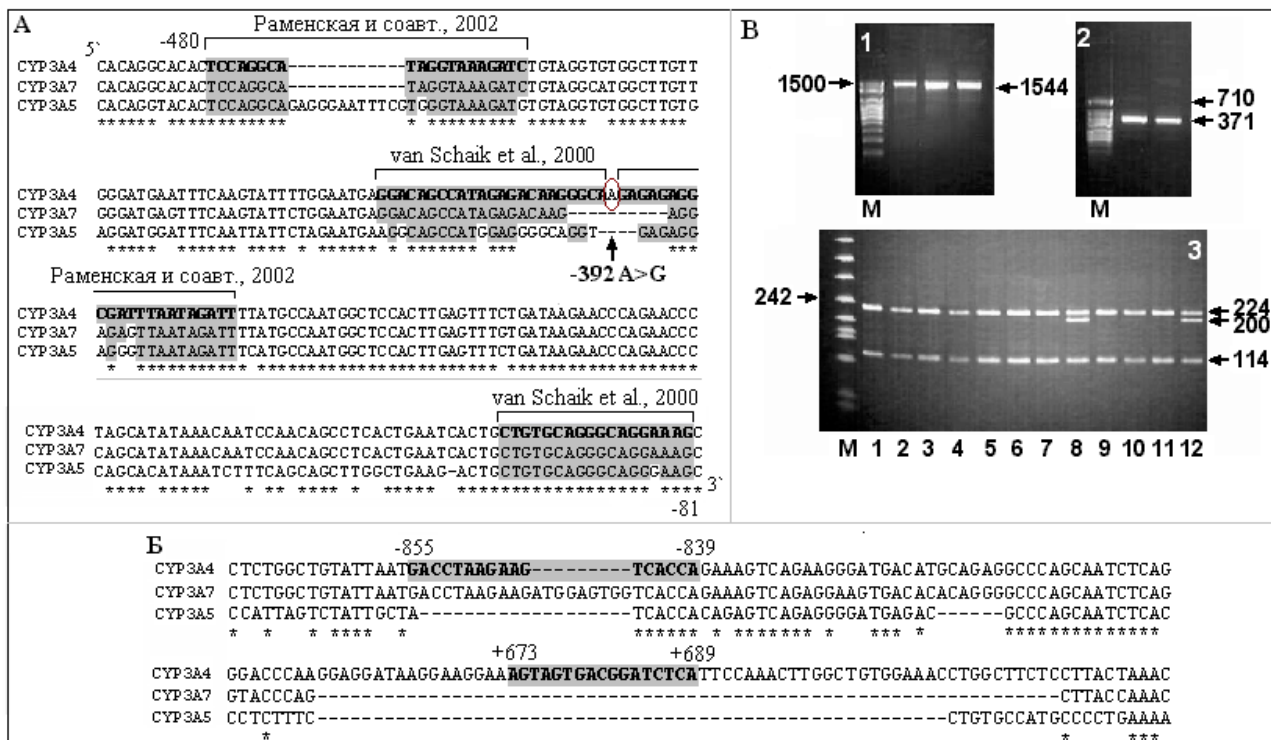


Рисунок 5. Сравнительный анализ фрагментов последовательностей генов CYP3A4, 3A5 и 3A7 (А, Б) и электрофореграммы разделения продуктов ПЦР и ферментативного гидролиза PstI при выявлении аллеля *CYP3A4*1B* (В)

А - выделены праймеры, предложенных Schaik et al. (2000) и Раменской и соавт. (2002). Б – праймеры, предложенные нами для амплификации фрагмента длиной 1544 п.н. Знаком «*» отмечены совпадающие нуклеотиды во всех трех генах. В – электрофореграмма 1 - продукты первой ПЦР; 2 – продукты второй ПЦР; 3 – гидролиз, дорожки 1-7 и 9-11 – гомозиготы по аллелю *CYP3A4*1*, дорожки 8 и 12 – гетерозиготы *CYP3A4*1/*1B*. М – маркер молекулярного веса ДНК.

Выявление *CYP3A4* -11129_-11128insTGT. В 2004 г. Matsumura и соавт. обнаружен и охарактеризован полиморфный вариант в конститутивном печеночном энхансерном модуле *CYP3A4* – вставка TGT в положении -11129_-11128. Авторами работы данный вариант предложено выявлять аллель-специфичной ПЦР, используя для синтеза мутантного фрагмента праймер с последним модифицированным нуклеотидом на 3'-конце. При использовании аллель-специфичной ПЦР могут возникать спорные вопросы в идентификации генотипа: велика вероятность синтеза фрагмента с использованием праймера даже с модифицированными последним и третьим с конца нуклеотидами. Поэтому мы предлагаем выявлять *CYP3A4* insTGT методом SSCP. На рис. 6 представлены типичные электрофореграммы разделения денатурированных продуктов ПЦР. Фрагменты, имеющие отличающуюся электрофоретическую подвижность, секвенированы, было подтверждено, что они действительно представляют вставку TGT (рис. 6). В исследовании были обнаружены только гетерозиготы по варианту -11129_-11128insTGT *CYP3A4*, это видно из результата секвенирования (рис.6), и отражено в наложении сиквенса двух последовательностей, один из которых имеет вставку, а другой является фрагментом «дикого» типа.

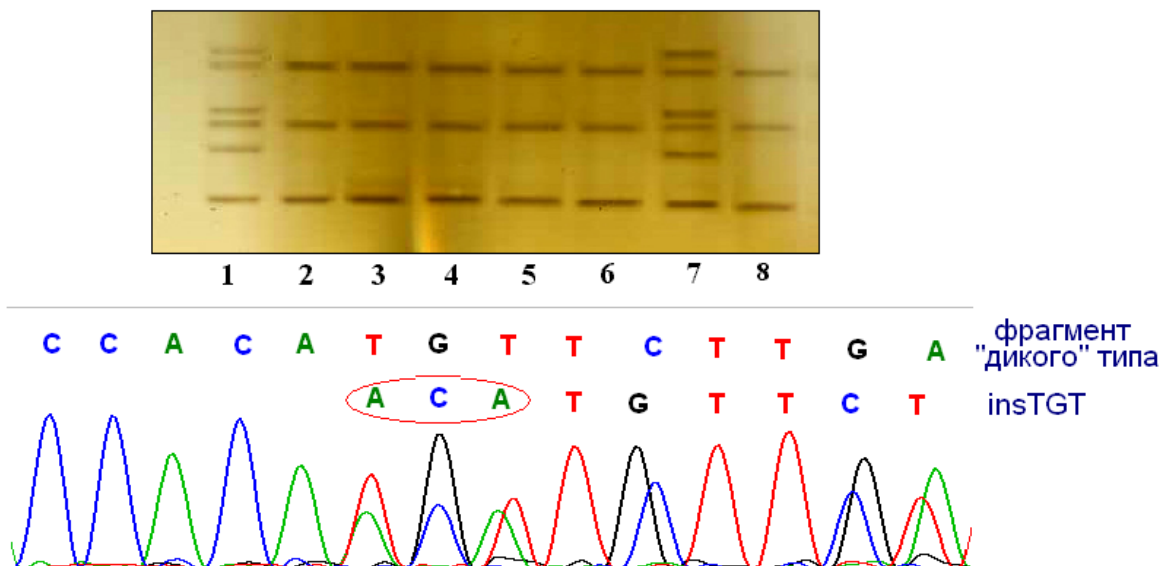


Рисунок 6. Электрофореграммы разделения денатурированных продуктов (SSCP-анализ) и результат секвенирования фрагмента, содержащего вставку *CYP3A4* - 11129_11128insTGT

Дорожки 1 и 7 – гетерозиготы, дорожки 2-6, 8 гомозиготы «дикого» типа. М – маркер молекулярного веса ДНК. Фрагменты окрашены нитратом серебра. Результат секвенирования гетерозиготного варианта представлен с праймера R.

Выявление аллеля *CYP3A5*3C*. Для выявления аллеля *CYP3A5*3C* мы использовали эндонуклеазу рестрикции *SspI*, которую ранее применяли для детекции данного полиморфного варианта в работах van Schaik и соавт. (2002) и Hesselink и соавт. (2003). В результате амплификации с оригинальными праймерами получали фрагмент длиной 221 п.н., который подвергали ферментативному гидролизу эндонуклеазой рестрикции *SspI*.

На рис. 7 представлена типичная электрофореграмма разделения продуктов ПЦР и ферментативного гидролиза *SspI*. Фрагменты длиной 20 и 53 п.н. не видны из-за низкого молекулярного веса.

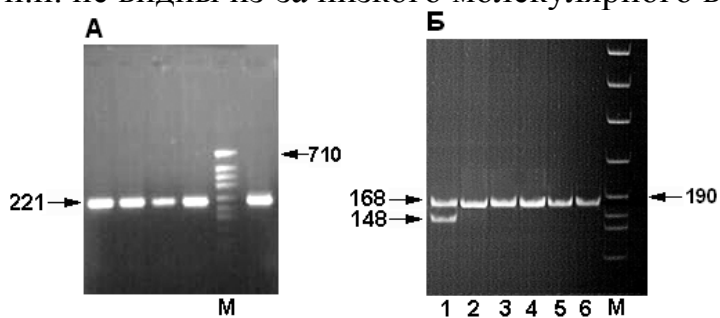


Рисунок 7. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР (А) и ферментативного гидролиза *SspI* (Б) при выявлении аллеля *CYP3A5*3C*

Б: дорожки 2-6 – гомозиготы по аллелю *CYP3A5*3C*; дорожка 1 – гетерозигота *CYP3A5*1A/*3C*. М – маркер молекулярного веса.

Выявление аллеля *CYP3A7*2*. Для выявления аллеля *CYP3A7*2* (с.1226C>G) использовали эндонуклеазу рестрикции *AclI*. В ходе ПЦР с оригинальными праймерами синтезировался фрагмент длиной 253 п.н., который затем подвергали ферментативному гидролизу. На рис. 8 представлены типичные электрофореграммы разделения продуктов ПЦР и ферментативного гидролиза при выявлении аллеля *CYP3A7*2*. Фрагмент длиной 40 п.н. не виден из-за низкой молекулярной массы.

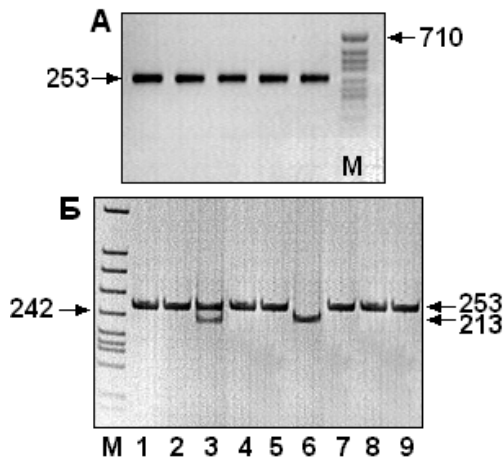


Рисунок 8. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР (А) и ферментативного гидролиза *AclI* (Б) при выявлении аллеля *CYP3A7*2*
 Б: дорожки 1, 2, 4, 5, 7-9 – гомозиготы по аллелю *CYP3A7*1*, дорожка 6 – гомозигота по аллелю *CYP3A7*2*; дорожка 3 – гетерозигота *CYP3A7*1/*2*.
 М – маркер молекулярного веса ДНК.

Выявление *CYP3A43*1B*. Для амплификации интересующего фрагмента последовательности гена *CYP3A43* использовали праймеры, предложенные Cauffiez и соавт. (2004) для обнаружения мутаций методом SSCP. Для выявления аллеля использовали метод ПДРФ-анализа. Фрагменты, синтезирующиеся в ходе ПЦР подвергали ферментативному гидролизу эндонуклеазой рестрикции *Bst2UI*. На рис. 9 представлены типичные электрофореграммы разделения продуктов ПЦР и ферментативного гидролиза при выявлении аллеля *CYP3A43*1B*.

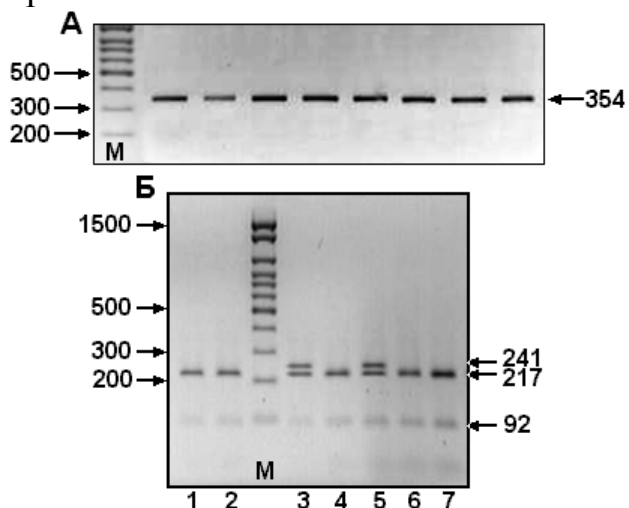


Рисунок 9. Электрофореграммы разделения продуктов ПЦР (А) и ферментативного гидролиза *Bst2UI* (Б) при выявлении аллеля *CYP3A43*1B*
 Б: дорожки 1, 2, 4, 6, 7 – гомозиготы по аллелю *CYP3A43*1*; дорожки 3, 5 – гетерозиготы *CYP3A43*1/*1B*. М – маркер молекулярного веса ДНК.

Выявление -1570C>T *PXR*. Для амплификации интересующего фрагмента гена *PXR* использовали оригинальные праймеры с модифицированным нуклеотидом для возникновения сайта узнавания эндонуклеазой *Bst6I*. На рис. 10 представлена типичная электрофореграмма разделения продуктов и ферментативного гидролиза при выявлении мутации -1570C>T *PXR*.

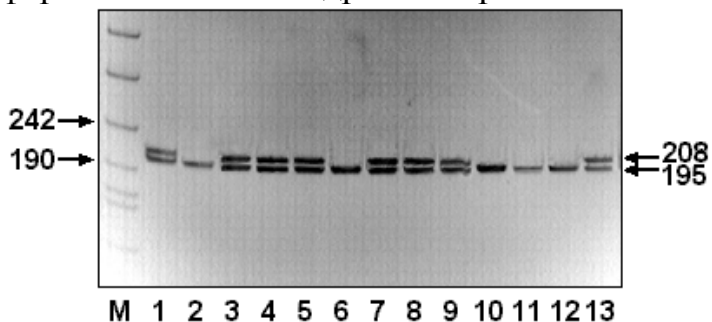


Рисунок 10. Электрофореграмма разделения продуктов ферментативного гидролиза *Bst6I* при выявлении -1570C>T *PXR*
 Дорожки 2, 6, 10-12 – гомозиготы «дикого» типа; дорожки 1, 3-5, 7-9, 13 – гетерозиготы -1570C/Т. М – маркер молекулярного веса.

Выявление делеции -205_-200delGAGAAG PXR. Делецию GAGAAG выявляли полимеразной цепной реакцией с дальнейшим разделением продукта амплификации в 12% полиакриламидном геле. В ходе ПЦР с использованием оригинальных праймеров синтезировались фрагменты длиной 153/147 п.н. На рис. 11 представлена типичная электрофореграмма разделения продуктов ПЦР.

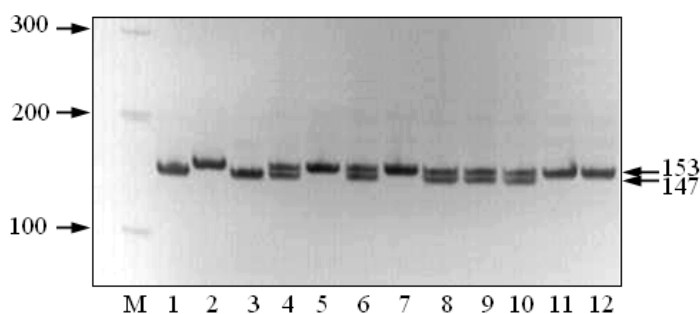


Рисунок 11. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР при выявлении -205_-200delGAGAAG PXR

Дорожки 2,5,7,11,12 – гомозиготы «дикого» типа. Дорожки 4, 6, 8-10 – гетерозиготы. Дорожки 1, 3 – гомозиготы по delGAGAAG PXR. М – маркер молекулярного веса.

Выявление с.106G>A PXR. Для выявления нуклеотидной замены с.106G>A, использовали метод ПДФ-анализа. В ходе ПЦР с использованием оригинальных праймеров синтезировался фрагмент длиной 436 п.н., который подвергали ферментативному гидролизу BstDEI. На рис. 12 представлена типичная электрофореграмма разделения продуктов ПЦР и ферментативного гидролиза при выявлении с.106G>A PXR.

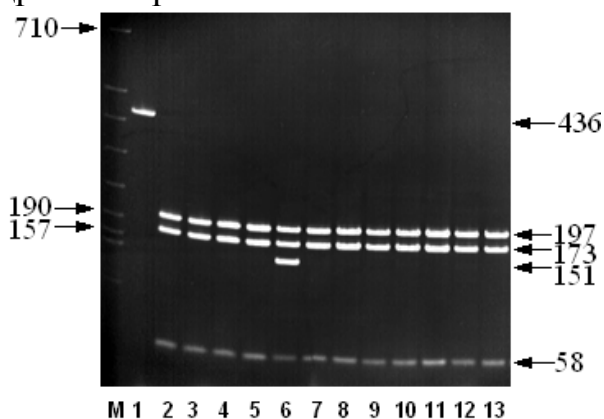


Рисунок 12. Электрофореграмма разделения продуктов ПЦР (дорожка 1) и ферментативного гидролиза BstDEI (дорожки 2-13) при выявлении с.106G>A PXR. Дорожки 2-5 и 7-13 – гомозиготы с.106G. Дорожка 6 – гетерозигота с.106A. М – маркер молекулярного веса ДНК.

Характеристика изученных полиморфных вариантов генов CYP3A и PXR у здоровых европеоидов г. Новосибирска

В исследуемой группе здоровых европеоидов наблюдаемое распределение генотипов соответствовало ожидаемому при соблюдении равновесия Харди-Вайнберга: CYP3A4*1B $P=0,934$, insTGT $P=0,932$, CYP3A5*3C $P=0,464$, CYP3A7*2 $P=0,569$, CYP3A43*1B $P=0,976$, *2A $P=0,947$, PXR -1570C>T $P=0,073$, -205_-200delGAGAAG $P=0,276$, с.106G>A $P=0,930$.

При сравнении частот встречаемости аллелей среди европеоидов Западной Сибири и европеоидов других популяций в большинстве вариантов не было выявлено различий (табл. 5).

Таблица 5

Сравнение частот встречаемости вариантов генов *CYP3A* и *PXR* у европеоидов Западной Сибири и других популяций

Аллель	Частота встречаемости мутантного аллеля					P
	Зап. Сибири		Литературные данные			
	N	% мут.	N	% мут.	Ссылка	
<i>CYP3A4*1B</i> (-392A>G)	290	2,96	118	4,20 (фин.)	Sata et al., 2000	0,738
			196	3,57	Garsa et al., 2005	0,935
			520	3,10	Spurdle et al., 2002	0,897
			546	3,60	Ball et al., 1999	0,755
<i>CYP3A4*2</i> (c.664T>C)	290	0,00	110	2,70 (фин.)	Sata et al., 2000	—
<i>CYP3A4*5</i> (c.653C>G)	140	0,00	38	0,00	Eap et al., 2004	—
<i>CYP3A4*17</i> (c.566T>C)	140	0,00	48	2,10	Dai et al., 2001	—
<i>CYP3A4</i> -11129_-11128 insTGT	264	1,51	500	3,10 (фр.)	Matsumura et al., 2004	0,264
<i>CYP3A43*1B</i> (g.33518C>T)	210	12,00	98	10,40 (фр.)	Cauffiez et al., 2004	0,436
<i>CYP3A43*2A</i> (g.8340delA)	140	6,80	98	5,20 (фр.)	Cauffiez et al., 2004	0,321
<i>CYP3A5*6</i> (g.14690G>A)	140	0,00	1000	0,10 (нем.)	Schaik et al., 2002	—
			308	0,00	Roy et al., 2005	—
<i>CYP3A5*3C</i> (g.6986A>G)	290	93,11	190	93,69	Garsa et al., 2005	0,803
			1000	91,70 (нем.)	Schaik et al., 2002	0,514
<i>CYP3A7*2</i> (g.1226C>G)	290	7,58	202	8,00 (исп.)	Rodriguez-Antona et al., 2005	0,891
<i>PXR</i> -1570C>T	290	43,79	254	42,13	www.pharmgkb.org	0,702
			80	50,00	King et al., 2007	0,330
<i>PXR</i> -205_- 200 delGAGAAG	290	41,08	152	39,00	King et al., 2007	0,511
<i>PXR</i> c.106G>A	290	1,10	228	1,64	www.pharmgkb.org	0,535
<i>PXR</i> g.4444A>G	140	0,00	418	0,00	Hustert et al., 2001	—

Примечание: N – число исследованных аллелей.

Интересно отметить, что в работе Matsumura et al. (2004) частота встречаемости *CYP3A4* -11129_-11128insTGT в два раза выше в популяции европеоидов Франции (3,10%) относительно наших данных (1,51%) (табл. 5), впрочем, различия не достигают статистически значимого уровня ($p=0,264$). Учитывая, что количество обследованных в выборках европеоидов Зап. Сибири

и Франции отличаются практически в два раза ($n=264$ и 500 , соответственно), можно предположить, что различия могут быть значимыми при исследовании более обширной выборки методом SSCP, при сравнении с данными Matsumura et. al. (2004). Так, предполагая, что среди 1000 аллелей при выявлении методом SSCP будут наблюдаться 15 аллелей мутантного типа, а при выявлении методом аллель-специфичной ПЦР – 32 аллеля мутантного типа, можем получить статистически значимые различия между этими выборками ($p=0,014$).

Выявление ассоциаций между изученными полиморфными вариантами и активностью CYP3A

При анализе ассоциаций полиморфных вариантов и их комбинаций с показателем активности CYP3A не было выявлено статистически значимых ассоциаций для вариантов *CYP3A4*1B*, *CYP3A7*2*, -11129_-11129insTGT, *3A43*1B*, **2A*, *PXR* с.106G>A, -1570C>T, -205_-200delGAGAAG (таблица 6).

Таблица 6

Распределение показателя активности CYP3A в группах генотипов изученных аллельных вариантов

Вариант	Генотипы сравнения		<i>p</i> тест Манна-Уитни (два генотипа)	<i>p</i> тест Краскела-Уоллиса (три генотипа)
<i>CYP3A4*1B</i>	*1/*1	*1/*1B	0,069	—
<i>CYP3A4</i> -11129_-11128insTGT	-/-	-/insTGT	0,600	—
<i>CYP3A7*2</i>	*1/*1	*1/*2	0,346	—
<i>CYP3A43*1B</i>	*1/*1	*1/*1B	0,328	—
<i>CYP3A43*2A</i>	*1/*1	*1/*2A	0,918	—
<i>PXR</i> -1570C>T	CC	CT	0,163	0,151
	CC	TT	0,757	
	CT	TT	0,129	
<i>PXR</i> -205_-200delGAGAAG	-/-	-/del	0,117	0,174
	-/-	del/del	0,928	
	-/del	del/del	0,193	

Несмотря на отсутствие статистически значимых различий в распределении генотипов по группам с разной скоростью метаболизма кортизола, следует отметить особенности их распределения. При анализе распределения полиморфных вариантов регуляторной области *CYP3A4*, наблюдается увеличение гетерозигот по аллелю *CYP3A4*1B* в группах со средней и повышенной активностью, по сравнению с группой со сниженной активностью, и наоборот, гетерозиготы по аллельному варианту *CYP3A4* -11129_-11128insTGT находятся только в группах со сниженной и средней активностью (рис. 13А). При анализе распределения полиморфных вариантов, белок-кодирующей области *CYP3A7*, *CYP3A43* и интрона *CYP3A5*, наблюдается увеличение гетерозигот по аллелю *CYP3A7*2* и уменьшение гомозигот по аллелю *CYP3A7*1*, а также увеличивается количество гетерозигот относительно гомозигот по аллелю *CYP3A5*3C* в направлении от группы со сниженной активностью к группе с повышенной активностью. Распределение генотипов по

аллелям *CYP3A43*1B* и *CYP3A43*2A* в группах с различной активностью не имеет закономерности (рис. 13Б).

При анализе распределения полиморфных вариантов регуляторной и белок-кодирующей областей *PXR* было отмечено снижение количества гомозигот по дикому аллелю *PXR* и увеличение количества гетерозигот по аллельным вариантам *PXR-1570C>T* и *-205_-200delGAGAAG* в направлении от группы со сниженной активностью к группе с повышенной активностью (рис. 13В).

Выявлены статистически значимые отличия в распределении полиморфных вариантов *CYP3A5*3C*, *CYP3A7*2*, *CYP3A4*1B* в группах с разной активностью *CYP3A* (таблица 7). Установлено статистически значимое увеличение в 3,15 раза среднего значения показателя активности *CYP3A* в группе гетерозигот *CYP3A5*1A/*3C* относительно группы гомозигот *CYP3A5*3C/*3C* ($p=0,014$) (таблица 7).

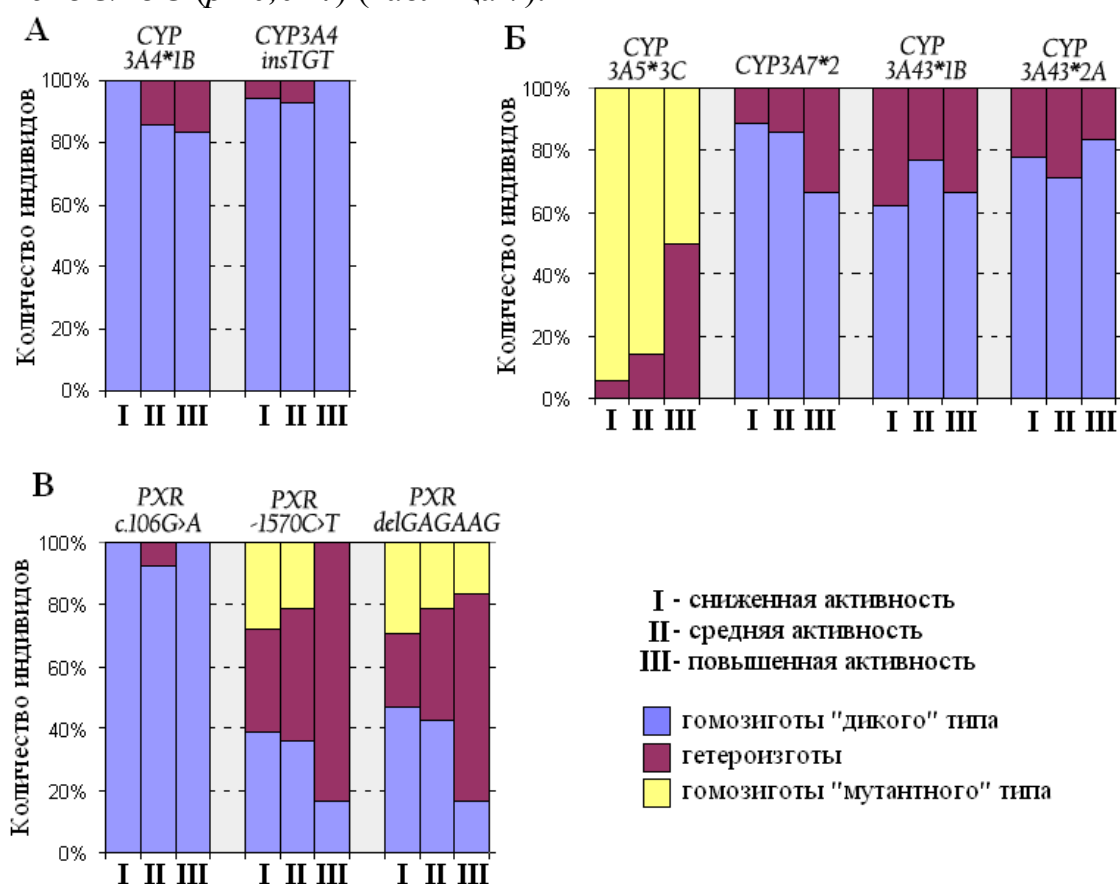


Рисунок 13. Распределение генотипов аллельных вариантов регуляторной области *CYP3A4* (А), белок-кодирующей области *CYP3A7*, *CYP3A43* и интрона *CYP3A5* (Б), регуляторной и белок-кодирующей областей прегнанового X рецептора (В) в группах с различной активностью *CYP3A*

При анализе комбинаций генотипов аллелей *CYP3A5*3C* и *CYP3A7*2* наблюдается уменьшение показателя активности *CYP3A* в группе гомозигот *CYP3A5*3C/*3C* и *CYP3A7*1/*1* по сравнению с группой гетерозигот *CYP3A5*1/*3C* и *CYP3A7*1/*2* ($p=0,031$) (таблица 7). Различия между группами по медианам составляют 3,08 раз.

При анализе комбинаций генотипов аллелей *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3C* и *CYP3A7*2* наблюдается увеличение показателя активности CYP3A в группе генотипов *CYP3A4*1/*1B*, *CYP3A5*1/*3C*, *CYP3A7*1/*2* по сравнению с группой генотипов *CYP3A4*1/*1*, *CYP3A5*3C/*3C*, *CYP3A7*1/*1* ($p=0,042$) (таблица 7). При этом различия между группами достигают 4,11 раз.

Стоит заметить, что различия между группами не могут быть оценены только при сравнении их средних величин. Для комплексной оценки использовали критерий Манна-Уитни для сравнения двух групп генотипов, включающий в себя анализ характера распределения показателя активности CYP3A в каждой из групп (таблица 7).

Таблица 7

Характеристика распределения показателя активности в группах с разными генотипами

Генотипы и их комбинации	Медиана	25я процентиль	75я процентиль	<i>p</i>
<i>CYP3A5</i>				
<i>*3C/*3C</i>	9,443	5,967	16,766	0,014
<i>*1/*3C</i>	29,778	8,737	43,545	
<i>CYP3A5+CYP3A7</i>				
<i>*3C/*3C+*1/*1</i>	9,443	6,357	16,643	0,031
<i>*1/*3C+*1/*2</i>	29,118	8,737	41,167	
<i>CYP3A4+CYP3A5+CYP3A7</i>				
<i>*1/*1+*3C/*3C+*1/*1</i>	9,261	5,577	16,889	0,042
<i>*1B/*1B+*1/*3C+*1/*2</i>	38,083	29,778	46,389	

Примечание: *p* – уровень значимости различий по критерию Манна-Уитни.

В целом можно заключить, что несмотря на выявленные ассоциации между генотипами и их комбинациями аллельных вариантов *CYP3A5*3C*, *CYP3A7*2*, *CYP3A4*1B* с показателем активности CYP3A, характер распределения полиморфных вариантов в разных фенотипических группах (когда гетерозиготный генотип встречается во всех фенотипических группах), все же свидетельствует об отсутствии сильного влияния генетического полиморфизма на вариабельность активности CYP3A.

Изучение полиморфизма цитохромов P450 подсемейства 3A и их регуляторных генов, несомненно, является важной задачей в поиске причин вариабельности ферментативной активности подсемейства. Знания об активности CYP3A особенно важны при назначении лекарственных препаратов и при выборе их дозировки, особенно при комплексной лекарственной терапии для предотвращения нежелательных лекарственных реакций, возникающих при взаимодействии соединений. Мы выявили статистически значимые ассоциации между некоторыми полиморфными вариантами и их комбинациями с ферментативной активностью CYP3A. Тем не менее, совокупность литературных данных и наблюдаемое распределение показателя активности CYP3A в собственном исследовании позволяют прийти к заключению, что в отличие от классических примеров фенотипического полиморфизма, когда

можно определенно говорить о «быстром» и «медленном» типе метаболизма, для СYP3A ситуация является иной. Возможно в будущем, с учетом большего числа полиморфных вариантов генов информативность генотипирования возрастет. Однако распределение полиморфных вариантов генов подсемейства 3A и прегнанового X рецептора между фенотипическими группами (сниженная, средняя, повышенная активность) свидетельствует об отсутствии сильного влияния полиморфизма изученных генов на ферментативную активность СYP3A, оцененную по 6 β -гидроксилированию кортизола.

ВЫВОДЫ

1. Активность цитохромов P450 подсемейства 3A в выборке здоровых европеоидов от 1 до 14 лет имеет полимодальное распределение, разделяющее выборку на группы со сниженной, средней и повышенной активностью. Между мальчиками и девочками различия показателей активности в этом возрастном интервале отсутствуют ($p=0,754$).
2. Активность цитохромов P450 3A у детей увеличивается с возрастом. Наибольшая сила связи между показателем активности СYP3A и возрастом наблюдается в группе от 1 года до 2,5 лет ($r=0,628$, $p=0,016$).
3. Разработаны способы выявления полиморфных вариантов генов *CYP3A4* (*2, *17), *CYP3A5* (*6), *CYP3A7* (*2), *CYP3A43* (*1B, *2A), *PXR* (-1570C>T, с.106G>A, g.4444A>G) методом полиморфизма длины рестриционных фрагментов, *PXR* -205_-200delGAGAAG полимеразной цепной реакцией и *CYP3A4* -11129_-11128insTGT методом конформационного полиморфизма однонитевых фрагментов.
4. Отсутствуют значимые различия в показателях активности СYP3A между группами генотипов каждого из вариантов: *CYP3A4* -11129_-11129insTGT, *CYP3A43**1B, *CYP3A43**2A, *PXR* с.106G>A, *PXR* -1570C>T, *PXR* -205_-200delGAGAAG в выборке здоровых европеоидов.
5. В группе гетерозигот *CYP3A5**1A/*3C среднее значение показателя активности СYP3A выше в 3,15 раза относительно группы гомозигот *CYP3A5**3C/*3C ($p=0,014$).
6. В группе комбинации гомозигот *CYP3A5**3C/*3C и *CYP3A7**1/*1 среднее значение показателя активности СYP3A в 3,08 раза ниже относительно группы комбинации гетерозигот *CYP3A5**1/*3C и *CYP3A7**1/*2 ($p=0,031$). В группе комбинации генотипов *CYP3A4**1/*B, *CYP3A5**1/*3C, *CYP3A7**1/*2 среднее значение показателя активности СYP3A в 4,11 раз выше, чем в группе комбинации гомозигот *CYP3A4**1/*1, *CYP3A5**3C/*3C, *CYP3A7**1/*1 ($p=0,042$).

Список опубликованных работ по теме диссертации

1. Вавилин В.А., Щепотина Е.Г., Мананкин Н.А., Казначеева Л.Ф., Ляхович В.В. Активность СYP3A у детей. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2004. – Т. 138. – № 9. – С. 272-274.
2. Щепотина Е.Г., Никишина М.В., Вавилин В.А., Ляхович В.В. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов гена цитохрома P450 3A43 и определение частоты встречаемости аллеля *CYP3A43*1B* у европеоидов Западной Сибири. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2005. – Т. 140. – № 12. – С. 681-684.
3. Щепотина Е.Г., Вавилин В.А., Горева О.Б., Ляхович В.В. Некоторые мутации экзона 7 гена *CYP3A4* и их влияние на 6 β -гидроксилирование кортизола. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2006. – Т. 141. - №6. – С. 649-651.
4. Щепотина Е.Г. Активность цитохрома P450 3A у детей разного возраста. // Материалы V молодежной научной конференции СО РАМН «Фундаментальные и прикладные проблемы современной медицины», Новосибирск, 2004, с. 144-146.
5. Щепотина Е.Г. Фенотипирование цитохрома P450 3A4 (*CYP3A4*) у детей. // Материалы 8-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2004, с. 72-73.
6. Щепотина Е.Г. Влияние на активность СYP3A некоторых аллелей и их частоты встречаемости у здоровых европеоидов Западной Сибири. // Материалы 9 Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье», СПб, 2006, с. 408-409.
7. Щепотина Е.Г. Частоты встречаемости аллелей **1B* и **2* цитохрома P450 3A4 (*CYP3A4*) и их влияние на активность фермента. // Тезисы докладов XIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006», Москва, 2006, с.256-257.
8. Щепотина Е.Г. Влияние на активность фермента мутаций гена цитохрома P450 3A4 **2*, **5*, **17* и их частоты встречаемости. // Материалы 10-й Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино, 2006. с. 104.
9. Щепотина Е.Г., Вавилин В.А. Влияние полиморфизма генов цитохромов P450 3A и прегнанового X рецептора и возраста на активность СYP3A. // Материалы IV съезда Российского общества биохимиков и молекулярных биологов, Новосибирск, 2008, с. 221.

Список используемых сокращений

5'UTR – 5' нетранслируемая область

6 β -OHCL – 6 β -гидрокортизол

AF-1 – лиганд-независимый домен PXR

c. – положение нуклеотида в кДНК последовательности (напр., с.653T)

g. – положение нуклеотида в геномной последовательности (напр. g.6986A)

CAR – конститутивный андростановый рецептор

HNF – ядерный фактор печени

VDR – рецептор витамина D

CLEM – конститутивный печеночный энхансерный модуль

CYP – цитохром P450

PXR – прегнановый X рецептор

SSCP – конформационный полиморфизм однонитевых фрагментов ДНК

ПДРФ – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов

Автор благодарит коллег за помощь, оказанную в процессе работы, в частности, к.б.н. Никишину М.В. за консультации по методам ПЦР и ПДРФ, д.м.н. Вавилина В.А. за помощь в освоении метода ВЭЖХ и за руководство работой, коллектив ЦКП «Секвенирование ДНК» СО РАН (г. Новосибирск, <http://sequest.niboch.nsc.ru>) и лично к.б.н. Катохина А.В. (ИЦИГ СО РАН) за помощь в секвенировании образцов ДНК, а также коллектив ДГКБ №1 г. Новосибирска за предоставление клинического материала.

Соискатель

Щепотина Е.Г.