

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ НАН БЕЛАРУСИ»

УДК 577.112.083 +577.113+575.174.015.3

ГАЙДУКЕВИЧ
ИРИНА ВИТАЛЬЕВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА *CYP2C9*
ЧЕЛОВЕКА И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНОВ *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* И *MDR1***

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

по специальности 03.01.04 – биохимия

Минск, 2018

Научная работа выполнена в Государственном научном учреждении «Институт биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси»

Научный руководитель: **Гилеп Андрей Александрович**,
кандидат химических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории
молекулярной диагностики и биотехнологии
Института биоорганической химии НАН
Беларуси

Официальные оппоненты: **Титовец Эрнст Петрович**,
доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник РНПЦ
неврологии и нейрохирургии

Фалетров Ярослав Вячеславович,
кандидат химических наук, ведущий
научный сотрудник лаборатории биохимии
лекарственных препаратов НИИ физико-
химических проблем Белорусского
государственного университета

Оппонирующая организация: Белорусский государственный
технологический университет

Защита состоится «7» февраля 2019 г. в 10:00 на заседании совета по защите диссертаций Д 01.21.01 при Институте биоорганической химии НАН Беларуси по адресу: 220141 г. Минск, ул. акад. Купревича, 5/2, e-mail: litvin@iboch.bas-net.by, тел.: +375(17)3698615.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Я. Коласа Национальной академии наук Беларуси.

Автореферат разослан «29» декабря 2018 г.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций Д 01.21.01
доктор химических наук



Р.П. Литвиновская

ВВЕДЕНИЕ

Фармакотерапия в настоящее время играет одну из ведущих ролей в лечении различных заболеваний и состояний человека, однако ее эффективность у разных людей сильно варьирует. Нежелательные побочные реакции и всё чаще встречающиеся случаи фармакорезистентности приводят к увеличению сроков лечения, хронификации болезни и в некоторых случаях к смерти. Кроме того, продолжительное и неэффективное лечение влечет серьезные финансовые издержки для пациентов, их родственников и экономики государства в целом. Особенно остро проблема неэффективности лекарственной терапии стоит в психиатрии. Только 30-60% больных адекватно отвечают на терапию антипсихотиками, антидепрессантами и др., 40% – проявляют фармакорезистентность, что создает определенные трудности в их лечении, а в ряде случаев приводит к необратимым побочным эффектам или смерти.

Около 90% психотропных лекарственных средств (ЛС) подвергается в организме человека биотрансформации с участием цитохромов P450 (CYP), в частности CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2, CYP3A4, характеризующихся высокой степенью генетического полиморфизма, что и влияет на каталитические свойства данных ферментов и, как следствие, на эффективность фармакотерапии. Транспорт психотропных ЛС через гематоэнцефалический барьер осуществляется преимущественно Р-гликопротеином (MDR1), который также характеризуется высокой степенью генетического полиморфизма, влияющего как на уровень экспрессии данного транспортера, так и на его функциональные характеристики. В связи с этим учет генетических данных пациента при назначении лекарственной терапии в психиатрии приобретает особую важность. Для этого необходима разработка молекулярно-диагностических методик для выявления аллельных вариантов генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* и *MDR1*.

Одной из наиболее эффективных моделей для изучения влияния генетического полиморфизма отдельных CYP на межлекарственные и белок-белковые взаимодействия является *in vitro* система, содержащая высокоочищенные рекомбинантные CYP и другие белки человека. Это делает необходимым разработку эффективных подходов к выделению и характеристике физико-химических и каталитических свойств отдельных полиморфных изоформ CYP человека.

Настоящая работа посвящена получению и характеристике физико-химических и каталитических свойств рекомбинантного CYP2C9 человека и его природных полиморфных изоформ, а также разработке методик детекции полиморфизмов ключевых генов ферментов биотрансформации (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2*) и транспорта (*MDR1*) психотропных лекарственных средств.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами, темами. Тема диссертационной работы соответствует приоритетным направлениям научных исследований Республики Беларусь на 2016-2020 годы (постановление Совета Министров Республики Беларусь от 12 марта 2015 г. № 190): 2. Химический синтез и продукты; 3. Биологические системы и технологии; 4. Медицина и фармация.

Диссертационная работа является логическим продолжением структурно-функциональных исследований монооксигеназных ферментативных систем, а также исследований взаимосвязи генетических маркеров с фенотипическими проявлениями, проводимых в лаборатории молекулярной диагностики и биотехнологии Института биоорганической химии НАН Беларуси. Исследования по теме диссертационной работы выполнены в рамках задания Д02 «Разработать и освоить технологию производства набора реагентов для молекулярной диагностики нарушений метаболизма лекарственных средств» (№ госрегистрации 20150169) подпрограммы «Диагностикумы» Государственной программы по развитию импортозамещающих производств фармацевтических субстанций, готовых лекарственных и диагностических средств в Республике Беларусь на 2010-2014 годы и на период до 2020 года; задания 9.1 «Разработка технологий получения высокоочищенных препаратов рекомбинантных ферментов и создание производственно-технологического участка по их выпуску» подпрограммы «Малотоннажная биотехнология» Государственной программы «Инновационные биотехнологии» (№ госрегистрации 20131769).

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы - установление структурно-функциональных характеристик полиморфных форм *CYP2C9* человека и комплексное определение значимых молекулярно-диагностических маркеров в генах метаболизма (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2*) и транспорта (*MDR1*) психотропных лекарственных средств у пациентов с психическими заболеваниями.

Указанная цель достигалась решением следующих задач:

1. Осуществить молекулярное клонирование, гетерологическую экспрессию, очистку и характеристику физико-химических и каталитических свойств *CYP2C9**1, *CYP2C9**2 и *CYP2C9**3 человека.

2. Изучить влияние ингибиторов цитохромов P450 в ряду азолсодержащих ксенобиотиков (противогрибковых лекарственных препаратов и фунгицидов) на функциональные свойства полиморфных форм *CYP2C9* человека.

3. Оценить эффекторное действие микросомального цитохрома *b₅* человека на полиморфные формы *CYP2C9* человека.

4. Разработать методики определения полиморфизмов генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* и *MDR1* человека.

5. Провести генетическое типирование контрольной группы и группы пациентов с психическими заболеваниями (шизофрения, депрессия, эпилепсия, аутизм) по полиморфизмам генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* и *MDR1*.

Объект исследования – рекомбинантный цитохром *CYP2C9* человека и его полиморфные формы; ДНК здоровых людей и пациентов с психиатрическими заболеваниями (шизофрения, депрессия, эпилепсия, аутизм).

Предмет исследования – методики получения рекомбинантных ферментов, физико-химические и каталитические свойства *CYP2C9* человека и его полиморфных форм; методики определения полиморфизма генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* и *CYP1A2*, *MDR1*, участвующих в метаболизме и транспорте психотропных лекарственных средств.

Научная новизна:

1. Созданы новые экспрессионные конструкции для получения рекомбинантных *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* человека в *E.coli*.

2. Впервые проведен комплексный анализ взаимодействия азолсодержащих ксенобиотиков (лекарственных средств и фунгицидов) с активным центром полиморфных изоформ *CYP2C9*, что позволяет учитывать эти данные при совместном назначении нескольких лекарственных средств.

3. Разработана система высокопроизводительного скрининга ингибиторов каталитической активности *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* на основе флуоресцентного анализа.

4. Впервые показано разное эффекторное действие цитохрома *b₅* на полиморфные изоформы *CYP2C9*1*, *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* человека, что объясняет различие в эффективности метаболизма лекарственных средств полиморфными изоформами *CYP2C9* в организме человека.

5. Разработаны оригинальные методики определения полиморфизма генов *MDR1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* и *CYP1A2* на основе ПЦР анализа, с использованием которых проведено генетическое типирование пациентов с психическими заболеваниями и контрольной группы, что позволило разработать персонализированный подход к назначению психотропных лекарственных средств.

Положения, выносимые на защиту:

1. Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, очистка и характеристика физико-химических и каталитических свойств полиморфных форм *CYP2C9* человека.

2. Выявление различий в аффинности белок-лигандных взаимодействий ингибиторов цитохромов P450 в ряду азолсодержащих ксенобиотиков (противогрибковых лекарственных препаратов и фунгицидов) с активным центром полиморфных форм *CYP2C9*.

3. Различное эффекторное действие цитохрома *b₅* на полиморфные формы *CYP2C9* человека.

4. Методики определения полиморфизма генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2*, *MDR1* на основе ПЦР анализа и комплексное определение этих полиморфизмов у пациентов, принимающих лекарственные средства.

Личный вклад соискателя. Планирование экспериментальной работы, постановка задач, обсуждение полученных результатов и подготовка материалов к публикации осуществлялись совместно с научным руководителем к.х.н. А.А. Гилепом. Соискателем самостоятельно выполнена работа по систематизации и анализу литературных источников; экспериментальная работа по оптимизации условий определения полиморфизмов генов белков системы транспорта и метаболизма психоактивных лекарственных средств методом ПЦР; выполнен весь объем молекулярно-генетической диагностики (выделение ДНК из буккального эпителия, анализ генетического полиморфизма); исследования, связанные с гетерологической экспрессией, очисткой, направленным мутагенезом, физико-химической характеристикой полиморфных форм *CYP2C9*. Исходные плазмидные конструкции получены к.х.н. А.А. Гилепом. Работы по ВЭЖХ анализу продуктов реакций, катализируемых *CYP2C9*, проводились при участии н.с. И.П. Грабовец. МАЛДИ-масс-спектрометрический анализ проводился при участии н.с. Т.В. Шкель. Компьютерное моделирование проводилось при участии к.х.н. Я.В. Диченко. Интерпретация генетических данных по фармакогенетике, а также составление методических рекомендаций и инструкций по применению в области персонализации психофармакотерапии проводилось совместно с сотрудниками РНПЦ психического здоровья д.м.н., доцентом Т.В. Докукиной и н.с. М.В. Махровым.

Апробация результатов диссертации. Результаты работы представлены на международных и республиканских мероприятиях: Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), IV Международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул» (Минск, 2012), международном молодежном научном форуме «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), 38 Конгрессе ФЕБС «Механизмы в биологии» (Санкт-Петербург, 2013), IV международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2014), VI Международной научно-практической молодежной конференции «Научные стремления 2015» (Минск, 2015), XII всероссийской школе молодых психиатров (Суздаль, 2015), Научно-практической конференции «Научное наследие профессора Б.А. Лебедева» (Санкт-Петербург, 2015), Международной конференции «10th East-West Immunogenetics Conference» (Вроцлав, 2016), VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва, 2017).

Опубликованность результатов. По материалам диссертации опубликованы 24 печатные работы, в том числе 5 статей в научных журналах,

соответствующих пункту 18 Положения о присуждении учёных степеней и присвоении учёных званий в Республике Беларусь (4,3 авторских листа), 3 статьи в других научных журналах (1,92 авторских листа), тезисы 9 докладов (1,1 авторских листа), 1 учебно-методическое пособие (2,46 авторских листа), 2 инструкции по применению (0,72 авторских листа), 4 нормативных документа Республики Беларусь (2,6 авторских листа). Общий объем опубликованных материалов составляет 13,1 авторских листа.

Получено свидетельство о регистрации компьютерной программы «Информационная система для интерпретации результатов фармакогенетического тестирования пациентов при психических и поведенческих расстройствах «Фармакогенетика»» № 994 от 07.12.2017. Практическая значимость работы подтверждается актами внедрением данной компьютерной программы в РНПЦ психического здоровья (Минск, Беларусь) и в УЗ «Гродненский областной клинический центр «Психиатрия-Наркология» (Гродно, Беларусь).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, трех глав, заключения, библиографического списка, приложений. Работа изложена на 171 страницах машинописного текста, содержит 48 рисунков, 26 таблиц. Библиографический список включает 184 цитируемых источника и 24 публикации соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **первой главе** приводится обзор литературы об основных этапах биотрансформации ЛС в организме человека, а также об основных ферментах биотрансформации ЛС - цитохромах P450. Приведена общая характеристика цитохромов P450, участвующих в I фазе биотрансформации ЛС и информация о различных факторах, влияющих на каталитическую активность данных ферментов. Подробно рассмотрен вопрос о влиянии генетического полиморфизма ключевых ферментов биотрансформации и транспорта лекарственных препаратов на эффективность лекарственной терапии, в том числе корректирующей работу центральной нервной системы.

Во **второй главе** рассмотрены методы получения высоко очищенного препарата рекомбинантного CYP2C9 человека и его природных полиморфных изоформ CYP2C9*2 (R144C) и CYP2C9*3 (I359L), а также методы белковой инженерии, спектральные, физико-химические и аналитические методы, которые позволили провести комплексную оценку физико-химических и каталитических свойств полученных гемопротеидов. В данной главе также приводится описание молекулярно-биологических методов (полимеразная цепная реакция, рестрикционный анализ, секвенирование и др.), которые были использованы для

молекулярной диагностики генетического полиморфизма генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* и *MDR1*.

В третьей главе приводятся основные результаты экспериментальной работы, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, и проводится их обсуждение.

Молекулярное клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение, очистка, спектральные и лиганд-связывающие характеристики CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3.

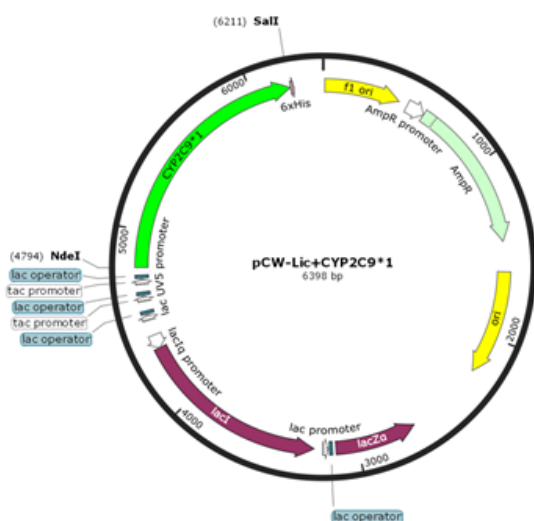
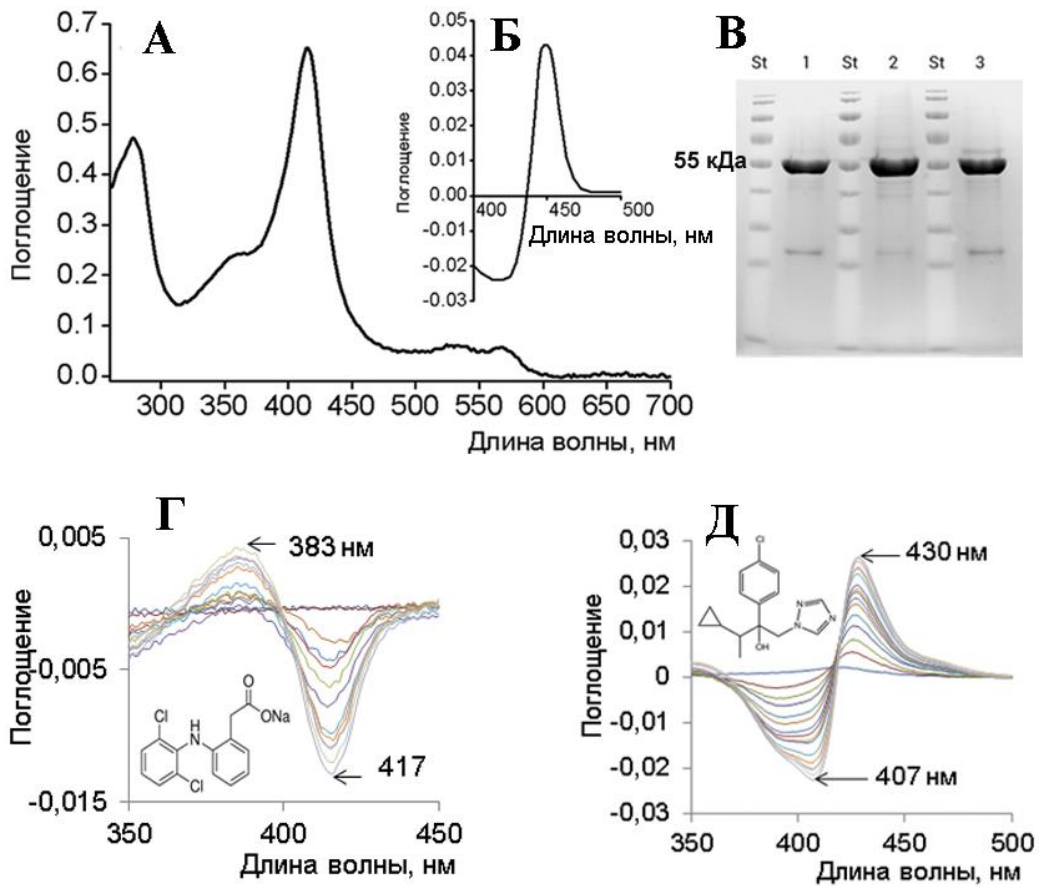


Рисунок 1. - Векторная конструкция, содержащая кДНК CYP2C9

Н-концевой мембранный сегмент (MDSLVLVLCVLSCLLLLWLWRQS) заменяли на последовательность МАККТ, а для упрощения процедуры выделения с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni^{2+} -NTA-агарозе, в С-концевую последовательность CYP2C9 вводили шесть дополнительных остатков гистидина, соединенных с последовательностью белка Ser-Thr линкером. Получение природных полиморфных форм CYP2C9*2 и CYP2C9*3 осуществляли с помощью сайт-направленного мутагенеза с использованием в качестве матрицы экспрессионной плазмиды pCW-lic-CYP2C9*1. Таким образом, получены оригинальные конструкции для гетерологической экспрессии полиморфных изоформ CYP2C9 человека. Подбор параметров культивирования клеточной культуры *E.coli* DH5a, трансформированной экспрессионной плазмидой pCW-lic-CYP2C9, позволил установить оптимальные условия гетерологической экспрессии белков: при температуре 22°C, скорости вращения 100 об/мин в течение 48 ч. Наблюдался высокий уровень экспрессии белка в активной P450 форме – не менее 170 нмоль с 1 литра культуральной среды. Полученные препараты рекомбинантных гемопротеидов обладают высокой чистотой (>95%), соответствующим молекулярным весом (54,4 кДа), характерными спектральными свойствами шести-координированной низко-спиновой формы цитохрома P450 (рисунок 2).

Ферментативная активность CYP2C9 может модулироваться генетическим полиморфизмом, определяя тем самым эффективность фармакотерапии. Среди европейской популяции наиболее часто встречаются фармакологически значимые аллельные варианты CYP2C9*2 (R144C) - 8-13% и CYP2C9*3 (I359L) - 6-10%. Для получения генетической конструкции для экспрессии CYP2C9*1 кДНК *CYP2C9*1* клонировалась в вектор pCW-lic (рисунок 1). Для получения растворимой формы CYP2C9 и достижения высокого уровня экспрессии



А – спектр поглощения окисленной формы СУР2С9*1; Б – разностный спектр восстановленной дитионитом натрия формы СУР2С9*1 в присутствии насыщающей концентрации СО; В – электрофореграмма ферментных препаратов СУР2С9 в 12% ПААГ в денатурирующих условиях: St – стандарт молекулярных масс (#26616, Thermo Scientific), 1–3 – препараты СУР2С9*1, СУР2С9*2, СУР2С9*3 соответственно;

Г – дифференциальный спектр СУР2С9*1 при спектрофотометрическом титровании диклофенаком (I тип спектрального ответа); Д – дифференциальный спектр СУР2С9*1 при спектрофотометрическом титровании ципроконазолом (II тип спектрального ответа)

Рисунок 2. – Характеристика очищенных препаратов полиморфных изоформ СУР2С9

Каталитические особенности СУР2С9 и его полиморфных изоформ.

Для оценки каталитической активности СУР2С9 в качестве модельного субстрата использовали диклофенак. Оценку каталитической активности с диклофенаком проводили в реконструированной *in vitro* системе, содержащей высокоочищенный рекомбинантный СУР2С9 человека и НАДФН цитохром Р450-редуктазу крысы, НАДФН-регенерирующую систему и субстрат. Все три изоформы СУР2С9 (СУР2С9*1, СУР2С9*2 и СУР2С9*3) обладают характерической каталитической активностью СУР2С9 человека в отношении данного субстрата (таблица 1). В ходе катализа наблюдается образование одного продукта – 4'-гидроксидиклофенака.

Таблица 1. – Ферментативная активность рекомбинантных изоформ CYP2C9

Изоформа CYP2C9	Ферментативная активность, нмоль ^х нмоль ⁻¹ ×мин ⁻¹	Относительная ферментативная активность, %
CYP2C9*1	4,25 ± 1,66	100
CYP2C9*2	5,25 ± 0,41	123
CYP2C9*3	1,54 ± 0,028	36

Полученные результаты согласуются с литературными данными (J.Miners, 1998) о значительном снижении ферментативной активности CYP2C9*3 (I359L). При этом мы не наблюдали снижения каталитической активности CYP2C9*2 по отношению к диклофенаку в сравнении с CYP2C9*1, описанной ранее авторами (J. Kirchheiner, 2007). Из наших данных следует, что наблюдаемый *in vivo* эффект снижения активности CYP2C9*2 в сравнении с CYP2C9*1 не связан с эффективностью катализа единичной молекулой CYP2C9 и, по-видимому, обусловлен снижением внутриклеточной стабильности фермента при аминокислотной замене R144C.

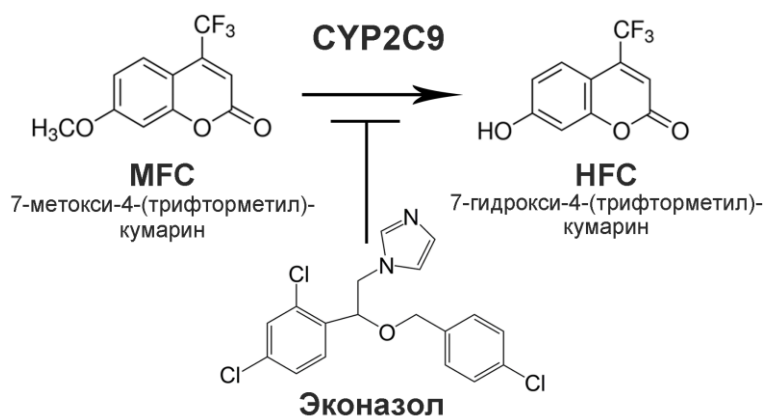


Рисунок 3. - Реакция превращения MFC в HFC, катализируемая CYP2C9

Для оценки ингибирующего действия различных химических соединений на каталитическую активность CYP2C9 и его полиморфных форм нами была разработана система высокопроизводительного скрининга ингибиторов, в основе которой лежит реакция превращения профлуорогенной субстрата 7-метокси-4-(трифторметил)-кумарина (MFC) во флуоресцирующий продукт 7-гидрокси-4-(трифторметил)-кумарин (HFC) (рисунок 3). Разработанная система позволяет с использованием минимального количества фермента (0,0165 нмоль в сравнении с 0,5 нмоль для системы оценки ферментативной активности с помощью ВЭЖХ) оценивать эффекторное действие различных соединений на ферментативную активность CYP2C9. Разработанная тест-система позволила в качестве примера оценить ингибирующее действие эконазола на ферментативную активность CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Все три полученные изоформы CYP2C9 являются активными по отношению к профлуорогенному субстрату MFC, что делает их пригодными для осуществления высокопроизводительного скрининга ингибиторов и модуляторов каталитической активности полиморфных изоформ CYP2C9 методом флуоресценции.

Для оценки ингибирующего действия различных химических соединений на каталитическую активность CYP2C9 и его полиморфных форм нами была разработана система высокопроизводительного скрининга ингибиторов, в основе которой лежит реакция превращения профлуорогенной субстрата 7-метокси-4-(трифторметил)-кумарина (MFC) во флуоресцирующий продукт 7-гидрокси-4-(трифторметил)-кумарин (HFC) (рисунок 3). Разработанная система позволяет с использованием минимального количества фермента (0,0165 нмоль в сравнении с 0,5 нмоль для системы оценки ферментативной активности с помощью ВЭЖХ) оценивать эффекторное действие различных соединений на ферментативную активность CYP2C9. Разработанная тест-система позволила в качестве примера оценить ингибирующее действие эконазола на ферментативную активность CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Все три полученные изоформы CYP2C9 являются активными по отношению к профлуорогенному субстрату MFC, что делает их пригодными для осуществления высокопроизводительного скрининга ингибиторов и модуляторов каталитической активности полиморфных изоформ CYP2C9 методом флуоресценции.

Влияние цитохрома b_5 на эффективность диклофенак-4-гидроксилирующей активности СYP2C9. Цитохром b_5 в больших количествах присутствует в клетках печени человека, являясь неотъемлемым компонентом микросомальных систем, (среди которых присутствует СYP2C9) и способен модулировать каталитическую активность ряда СYP. Единичные мутации в некоторых СYP могут приводить к изменению эффекторного действия цитохрома b_5 , при этом влияние цитохрома b_5 на полиморфные изоформы СYP2C9 не изучалось. Эффект цитохрома b_5 на диклофенак-4-гидроксилирующую активность СYP2C9 оценивался в реконструированной *in vitro* системе, содержащей высокоочищенный рекомбинантный препарат изоформы СYP2C9 человека, микросомальный цитохром b_5 человека и НАДФН цитохром Р450-редуктазу крысы, НАДФН-регенерирующую систему и субстрат диклофенак. Значения активности представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Ферментативная активность изоформ СYP2C9 при добавлении различных концентраций цитохрома b_5

Концентрация цитохрома b_5 , мкм	Соотношение концентраций СYP2C9:цитохром b_5	Активность СYP2C9*1, нмоль ⁻¹ ×нмоль ⁻¹ ×мин ⁻¹ (%)*	Активность СYP2C9*2, нмоль ⁻¹ ×нмоль ⁻¹ ×мин ⁻¹ (%)*	Активность СYP2C9*3, нмоль ⁻¹ ×нмоль ⁻¹ ×мин ⁻¹ (%)*
0	1:0	3,70 ± 0,06 (100)	5,11 ± 1,33 (100)	1,36 ± 0,73 (100)
0,25	2:1	3,58 ± 0,05 (97)	6,11 ± 0,63 (120)	0,68 ± 0,02 (50)
0,5	1:1	3,88 ± 0,03 (105)	6,22 ± 0,12 (121)	0,59 ± 0,01 (43)
1	1:2	3,49 ± 0,04 (94)	5,22 ± 0,64 (102)	0,17 ± 0,02 (13)

* в скобках указано процентное изменение активности каждой изоформы СYP2C9 по отношению к активности в отсутствие цитохрома b_5

Как видно из таблицы 2, цитохром b_5 не оказывает существенного влияния на диклофенак-4-гидроксилирующую активность СYP2C9*1 при соотношении концентраций СYP2C9:цитохрома b_5 2:1–1:1–1:2. Аналогичная картина наблюдается при оценке влияния цитохрома b_5 на активность СYP2C9*2. Следует отметить, что цитохром b_5 незначительно стимулирует ферментативную активность СYP2C9*2 при количественном соотношении концентраций СYP2C9:цитохрома b_5 2:1–1:1. Нами впервые показано, что при добавлении цитохрома b_5 в реакционную смесь каталитическая активность СYP2C9*3 существенно снижается при увеличении концентрации цитохрома b_5 . Полученные данные могут объяснять существенно сниженную активность СYP2C9*3 *in vivo*. Факт стимуляции активности СYP2C9*2 и ингибирования активности СYP2C9*3 цитохромом b_5 согласуется с данными, полученными на других ферментах в

работе Н. Zhang (2015), в которой было показано, что влияние цитохрома b_5 на активность полиморфных CYP1A2, 2B6 и 2E1 зависит от положения аминокислотной замены. Можно предположить несколько механизмов ингибирования активности CYP2C9*3 в присутствии цитохрома b_5 . Цитохром b_5 действует главным образом как аллостерический регулятор, а не как донор второго электрона, и даже при небольшом избытке цитохрома b_5 по отношению к CYP2C9*3 (соотношение CYP2C9*3:цитохром b_5 – 1:2) индуцирует структурные перестройки CYP2C9*3, приводя к изменениям в уже нарушенной в результате аминокислотной замены I359L геометрии активного сайта, что, в свою очередь, нарушает способность активного центра фермента связываться с субстратом. Другим объяснением существенного снижения активности CYP2C9*3 при добавлении цитохрома b_5 может быть то, что аминокислотная замена I359L нарушает электростатический потенциал на поверхности белковой молекулы в районе проксимальной области, содержащей остаток Arg125, который входит в состав функционального сайта связывания с редокс-партнерами. Это, в свою очередь, препятствует связыванию CPR с CYP2C9*3 в присутствии цитохрома b_5 .

Влияние азолсодержащих ксенобиотиков на диклофенак-4-гидроксилирующую активность CYP2C9. Помимо белковых компонентов, модулировать ферментативную активность CYP способны низкомолекулярные соединения, выступающие, как правило, в качестве конкурентных ингибиторов. Наиболее известными ингибиторами CYP являются N-содержащие гетероциклические соединения, источником которых для человека являются противогрибковые ЛС и пестициды (ингибиторы стероид-14 α -деметилазы грибов). Ввиду межвидового структурного сходства цитохромов P450, азолы также могут неспецифически взаимодействовать с цитохромами P450 человека, модулируя их активность.

С целью оценки влияния генетического полиморфизма CYP2C9 на прочность связывания отдельных азолсодержащих ксенобиотиков с CYP2C9 нами проведено комплексное сравнительное исследование по оценке связывания различных пестицидов и противогрибковых лекарственных средств с активным центром CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3 методом спектрофотометрического титрования (таблица 3).

Таблица 3. – Параметры, характеризующие взаимодействие азолсодержащих соединений с полиморфными изоформами CYP2C9

Азолсодержащее соединение	CYP2C9*1	CYP2C9*2	CYP2C9*3
	$K_d \pm \sigma$, мкМ	$K_d \pm \sigma$, мкМ	$K_d \pm \sigma$, мкМ
Кетоконазол	0,14 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Миконазол	0,20 ± 0,06	0,27 ± 0,10	0,58 ± 0,03
Клотримазол	0,33 ± 0,07	0,23 ± 0,08	0,32 ± 0,01
Эконазол	0,15 ± 0,01	0,41 ± 0,09*	0,055 ± 0,008**
Вориконазол	11,85 ± 2,9	2,9 ± 0,5	1180 ± 230***
Имидазол	142,81 ± 6,18	66,0 ± 28,5*	88,00 ± 5,65
Флуконазол	н/о	н/о	н/о
Тебуконазол	0,76 ± 0,01	0,66 ± 0,02	2,6 ± 0,4***
Пенконазол	2,3 ± 0,5	0,48 ± 0,09	3,7 ± 0,5**
Диниконазол	1,79 ± 0,60	0,07 ± 0,02	2,3 ± 0,7
Дифеноконазол	0,19 ± 0,06	0,08 ± 0,02	1,0 ± 0,2***
Ципроконазол	1,85 ± 0,23	0,12 ± 0,01*	1,0 ± 0,2
Триадимефон	10,3 ± 2,4	4,62 ± 0,33	8,2 ± 1,7
Эпоксиназол	18,4 ± 2,3	11,00 ± 0,51	15,3 ± 1,2

σ - стандартное отклонение; K_d - константа диссоциации комплекса лиганд-белок; н/о - нет спектрального ответа; * и ** - достоверное отличие от CYP2C9*1 и CYP2C9*2 соответственно ($p < 0,05$) (ANOVA / Sheffe test)

Как видно из таблицы 3, аминокислотные замены R144C (CYP2C9*2) и I359L (CYP2C9*3) приводят к значительным изменениям в прочности связывания азолов с активным центром данных ферментов. В случае азолсодержащих лекарственных средств мутация I359L (CYP2C9*3) оказывает более выраженный эффект по сравнению с мутацией R144C (CYP2C9*2). Так в случае с эконазолом мы наблюдали значимое понижение аффинности к CYP2C9*2 по сравнению с CYP2C9*1 ($p = 0,0075$) и повышение аффинности к CYP2C9*3 по сравнению с CYP2C9*2 ($p = 0,0031$); кетоконазол, миконазол и клотримазол не характеризуются статистически значимыми отличиями в аффинности к изоформам CYP2C9. Вориконазол характеризуется примерно в 5 раз более высокой аффинностью к CYP2C9*2 (2,9 мкМ) по сравнению с CYP2C9*1 (11,85 мкМ), при этом аффинность к CYP2C9*3 оказалась сниженной примерно в 100 раз по сравнению с CYP2C9*1 ($p = 0,00017$) и CYP2C9*2 ($p = 0,00017$). При этом отношение аффинности вориконазола и миконазола к активному центру CYP2C9*1 согласуется с данными, полученными в экспериментах на микросомах печени (Niwa и соавт., 2005). Следует отметить, что нам не удалось выявить взаимодействия флуконазола ни с одной из изоформ CYP2C9. При исследовании взаимодействия азолсодержащих пестицидов с полиморфными изоформами CYP2C9 выявлено, что мутация I359L (CYP2C9*3) достоверно снижает аффинность гемопротеида к тебуконазолу и дифеноконазолу по сравнению с CYP2C9*1 ($p = 0,0203$) и CYP2C9*2 ($p = 0,0176$), и пенконазолу по сравнению с CYP2C9*2 ($p = 0,0266$). Замена R144C (CYP2C9*2) приводит к существенному повышению аффинности к ципроконазолу по сравнению с CYP2C9*1 ($p = 0,0098$).

Для подтверждения данных спектрофотометрического титрования нами проведена оценка влияния эконазола, как наиболее аффинного, и вориконазола, как наименее аффинного лиганда, на диклофенак-4-гидроксилирующую активность полиморфных изоформ CYP2C9. Показано, что вориконазол в концентрации до 50 мкМ существенно не влияет на активность CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. CYP2C9*1 теряет 50% своей каталитической активности при концентрации эконазола 0,5 мкМ; при концентрации эконазола 50 мкМ активность CYP2C9*1 снижается в 50 раз. В случае CYP2C9*2 потеря 50% активности наблюдается при концентрации эконазола 5 мкМ, что в 10 раз больше, чем у CYP2C9*1. При 50 мкМ эконазола CYP2C9*2 активен на 7%. CYP2C9*3 теряет 50% активности при концентрации эконазола 2 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации эконазола приводит к полному подавлению активности CYP2C9*3 (рисунок 4). В результате проведенных экспериментов показано, что эконазол существенно ингибирует диклофенак-4-гидроксилирующую активность CYP2C9, и ингибирующий эффект наиболее выражен у изоформы CYP2C9*3, что согласуется с данными спектрофотометрического титрования (таблица 3). Таким образом, показано, что генетический полиморфизм CYP2C9 значительно влияет на параметры связывания ингибиторов с активным центром данного фермента, и данное влияние индивидуально для каждого конкретного соединения.

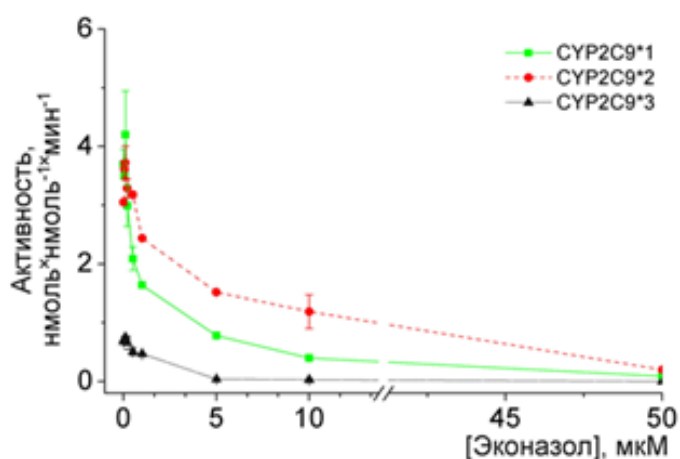


Рисунок 4. - Активность полиморфных изоформ CYP2C9 в присутствии эконазола в диапазоне концентраций 0,05–50 мкМ

Определение генетического полиморфизма ключевых компонентов системы биотрансформации и транспорта лекарственных средств с помощью методов молекулярной диагностики. С целью исследования генетической структуры белорусской популяции по полиморфизмам генов ключевых компонентов системы биотрансформации и транспорта лекарственных средств нами разработаны методики определения наиболее часто встречающихся в европейской популяции полиморфизмов генов белков I фазы биотрансформации лекарственных средств (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A2) и гена множественной лекарственной устойчивости *MDR1* человека, методом ПЦР (таблица 4). Оценка чувствительности, специфичности, воспроизводимости разработанных методик показала, что они обладают высокой чувствительностью, являются

высокоточными, воспроизводимыми, и соответствуют критериям, необходимым для применения в рутинной лабораторной практике.

Таблица 4. – Перечень, эффект и методы определения исследуемых генетических полиморфизмов

Полиморфизм	Эффект	Метод определения
CYP2C9*2 (rs1799853)	сниженная ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>AvaII</i>
CYP2C9*3 (rs1057910)	сниженная ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>KpnI</i>
CYP2C19*2 (rs4244285)	сниженная ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>SmaI</i>
CYP2C19*3 (rs4986893)	сниженная ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>BamHI</i>
CYP2C19*17 (rs12248560)	повышенная ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>SfaNI</i>
CYP2D6*4 (rs3892097)	отсутствует ферментативная активность	ПЦР+ПДРФ <i>BstNI</i>
CYP1A2*1F (rs762551)	повышенная индукция	ПЦР+ПДРФ <i>ApaI</i>
C3435T (rs1045642)	повышение экспрессии	ПЦР+ПДРФ <i>MboI</i>

Определение генетического полиморфизма ферментов биотрансформации и транспорта лекарственных средств. С использованием разработанных методик нами прогенотипировано более 200 здоровых добровольцев и более 900 пациентов, проходящих медикаментозный курс лечения в ГУ «Республиканский научно-практический центр психического здоровья» с диагнозами эпилепсия, шизофрения, депрессия, аутизм и др. (таблица 5 и 6).

Таблица 5. – Распределение минорных аллелей исследуемых полиморфизмов в белорусской популяции

Полиморфизм	Группа	N, чел	Минорный аллель	Частота, %	
				Европейская популяция	Белорусская популяция
CYP2C9*2 (rs1799853)	контроль	240	T	8-13	13
	пациенты	945			10
CYP2C9*3 (rs1057910)	контроль	244	C	6-10	6
	пациенты	966			6
CYP2C19*2 (rs4244285)	контроль	227	A	11-16	12
	пациенты	942			13
CYP2C19*3 (rs4986893)	контроль	230	A	0-2	0
	пациенты	243			0
CYP2C19*17 (rs12248560)	контроль	230	T	18-32,8	29
	пациенты	692			32
CYP2D6*4 (rs3892097)	контроль	223	A	18-22	17
	пациенты	392			18
CYP1A2*1F (rs762551)	контроль	232	C	29-33	34
	пациенты	692			34
MDR1 C3435T (rs1045642)	контроль	235	C	43-62	45
	пациенты	813			46

Таблица 6. – Распределение частот генотипов по исследуемым полиморфизмам в белорусской популяции

Полиморфизм	Группа	N, чел	Генотип, % (n)			Соответствие распределению Харди-Вайнберга	
						χ^2	p
			CC	CT	TT		
CYP2C9*2 (rs1799853)	контроль	240	75 (180)	24 (58)	1 (2)	1,32	0,25
	пациенты	945	81 (766)	17 (164)	2 (15)	3,17	0,07
			AA	AC	CC		
CYP2C9*3 (rs1057910)	контроль	244	89 (217)	11 (27)	0	0,837	0,36
	пациенты	966	89 (856)	11 (110)	0	3,52	0,06
			GG	GA	AA		
CYP2C19*2 (rs4244285)	контроль	227	78 (177)	20 (46)	2 (4)	0,249	0,617
	пациенты	942	76 (718)	21 (199)	3 (25)	5,89	0,015
			GG	GA	AA		
CYP2C19*3 (rs4986893)	контроль	230	100 (230)	-	-	-	-
	пациенты	243	100 (243)	-	-	-	-
			CC	CT	TT		
CYP2C19*17 (rs12248560)	контроль	230	50 (114)	42 (98)	8 (18)	0,235	0,62
	пациенты	692	45 (314)	45 (309)	10 (70)	0,22	0,636
			GG	GA	AA		
CYP2D6*4 (rs3892097)	контроль	223	71(158)	24(53)	5(12)	6,3	0,013
	пациенты	692	67 (465)	29 (199)	4 (28)	1,3	0,25
			CC	CA	AA		
CYP1A2*1F (rs762551)	контроль	232	10(24)	47(109)	43(100)	0,51	0,47
	пациенты	692	11 (82)	46 (328)	43(309)	0,12	0,71
			CC	CT	TT		
MDR1 C3435T (rs1045642)	контроль	235	18(42)	55(129)	27(64)	2,72	0,099
	пациенты	813	22 (182)	47 (381)	31(250)	2,56	0,109

В результате проведенного генотипирования было установлено, что частота встречаемости полиморфизма *CYP2C19*3* в белорусской популяции составляет 0% и, в связи с этим, его определение в скрининговых исследованиях является экономически нецелесообразным. Полученные генетические данные были применены в РНПЦ психического здоровья для коррекции лекарственной терапии обследованным пациентам. Клинический анализ результатов персонализированного подхода к назначению психотропных ЛС позволил разработать алгоритм интерпретации фармакогенетических данных, который лег в основу компьютерной программы «Информационная система для интерпретации результатов фармакогенетического тестирования пациентов при психических и поведенческих расстройствах «Фармакогенетика»». Методики детекции полиморфизмов *CYP2C9* и *CYP2C19* использованы для разработки наборов реагентов для ПЦР-диагностики полиморфизмов гена *CYP2C19* «SNP *CYP2C19*» (ТУ ВУ 100185129.158-2016) и полиморфизмов гена *CYP2C9* «SNP *CYP2C9*» (ТУ

ВУ 100185129.159-2016), предназначенных для молекулярной диагностики аллельного состояния генов CYP2C9 и CYP2C19 человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработан оригинальный способ получения рекомбинантных ферментных препаратов CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3, который включает в себя особые условия культивирования рекомбинантных штаммов *E.coli*, содержащих уникальные экспрессионные векторные системы для гетерологической экспрессии CYP2C9 человека, сочетание хроматографических методов, что позволило получить ферментные препараты в активной P450 форме в количестве не менее 170 нм на литр культуральной среды и чистотой конечных препаратов более 95%. Полученные белки являются функционально-активными и используются для оценки межбелковых и межлекарственных взаимодействий [1, 2, 4, 5, 9, 11, 12, 23, 24].

2. Проведена комплексная сравнительная оценка взаимодействия азолсодержащих ксенобиотиков (противогрибковых лекарственных средств пестицидов) с активным центром CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3. Показано, что аффинность изученных соединений может быть различной по отношению к изоформам CYP2C9, причем эти различия индивидуальны для каждого соединения [4, 5, 12, 17, 23].

3. Разработана эффективная система высокопроизводительного скрининга ингибиторов каталитической активности CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3 на основе флуоресцентного анализа, которая может быть использована для оценки ингибирующего действия различных химических соединений на каталитическую активность CYP2C9 и его полиморфных изоформ [4, 5, 24].

4. Впервые показано, что микросомальный цитохром b_5 оказывает ингибирующее действие на реакции, катализируемые CYP2C9*3. При добавлении в реакционную смесь цитохрома b_5 в диапазоне соотношений концентраций CYP2C9:цитохром b_5 от 2:1 до 1:2 диклофенак-4-гидроксилирующая активность CYP2C9*3 снижается до 13%, что объясняет снижение ферментативной активности CYP2C9*3 *in vivo* [2, 5].

5. Разработаны уникальные ПЦР-методики детекции однонуклеотидных замен в генах CYP2C9 (*2 (rs1799853) и *3 (rs1057910)), CYP2C19 (*2 (rs4244285), *3 (rs4986893) и *17 (rs12248560)), CYP2D6 (*4 (rs3892097)), CYP1A2 (*1F (rs762551)), MDR1 (C3435T (rs1045642)), характеризующиеся оптимальными последовательностями олигонуклеотидов, параметрами проведения ПЦР и рестрикционного анализа. Разработанные методики позволили установить генетическую структуру белорусской популяции по перечисленным генетическим

полиморфизмам (протестировано более 1000 человек). Полученные данные легли в основу компьютерной программы «Информационная система для интерпретации результатов фармакогенетического тестирования пациентов при психических и поведенческих расстройствах «Фармакогенетика» [3, 6–8, 10, 13–16, 18–22].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Полученные высокоочищенные белковые препараты рекомбинантных цитохромов CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3 человека и данные об их функциональных особенностях могут быть использованы для характеристики белок-белковых и межлекарственных взаимодействий.

2. Разработанные наборы реагентов для ПЦР-диагностики полиморфизмов гена CYP2C19 «SNP CYP2C19» и полиморфизмов гена CYP2C9 «SNP CYP2C9» могут быть использованы в лабораторной практике для молекулярной диагностики аллельного состояния генов CYP2C9 и CYP2C19 человека.

3. Разработанные и утвержденные Министерством здравоохранения РБ инструкции по применению *метода определения полиморфизма гена MDR1 у пациентов, страдающих расстройствами шизофренического спектра и метода персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9* могут использоваться врачами-психиатрами-наркологами для выбора необходимого ЛС и назначения его правильной дозировки.

4. Разработанная компьютерная программа «Информационная система для интерпретации результатов фармакогенетического тестирования пациентов при психических и поведенческих расстройствах «Фармакогенетика»» внедрена в лечебно-профилактические учреждения психиатрического профиля и используется для персонализированного подбора лекарственной терапии психотропными ЛС.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Клонирование, гетерологическая экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3 человека / И.В. Гайдукевич, А.А. Гилеп, Т.С. Черкесова, С.А. Усанов // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2012. – №3. – С. 105-111.

2. Thermodynamics of interactions between mammalian cytochromes P450 and b5 / E. Yablokov, A. Florinskaya, A. Medvedev, G. Sergeev, N. Strushkevich, A. Luschik, T. Shkel, I. Haidukevich, A. Gilep, S. Usanov, A. Ivanov // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2017. – Vol. 619. – P. 10-15.

3. Молекулярное типирование CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 и MDR1 в персонализации психофармакотерапии / И.В. Гайдукевич, М.В. Махров, А.А. Гилеп, Т.В. Докукина // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия химических наук. – 2015. – №3. – С. 82-90.

4. Особенности взаимодействия азолсодержащих соединений с полиморфными изоформами CYP2C9 / И.В. Гайдукевич, Т.А. Сушко, А.М. Тумилович, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // Доклады НАН Беларуси. – 2018. – Т.62, №2. – С.170-177.

5. Different inhibitory effects of azole-containing drugs and pesticides on CYP2C9 polymorphic forms: an *in vitro* study / I.V. Haidukevich, T.A. Sushko, A.M. Tumilovich, I.P. Grabovec, S.A. Usanov, A.A. Gilep // Toxicology in Vitro. – 2018. – Vol.50. - P.249-256.

Статьи в других научных журналах

6. Возможности оптимизации терапии противоэпилептическими средствами с использованием фармакогенетических биомаркеров / Т.В. Докукина, Т.С. Голубева, М.В. Махров, Ф.П. Хлебоказов, И.В. Гайдукевич, Н.Н. Мисюк, А.А. Гилеп, П.П. Королевич // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2015. – Том 7, №4. – С. 22-28.

7. Эффективность фармакотерапии пациентов с шизофренией, шизотипическими и бредовыми расстройствами в зависимости от результатов фармакогенетического тестирования / Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, Е.А. Шеремет, К.С. Жаранков, В.Н. Шаденко // Психическое здоровье. – 2016 г. – №2 (117). – С. 59-64.

8. Вариабельность и значение генетических особенностей при выборе лекарственных средств в психиатрической практике / Т.В. Докукина, М.В. Махров, Т.С. Голубева, И.В. Гайдукевич, А.А. Гилеп, Г.В. Сергеев // Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. – 2016. – №4(15). – С.41-48.

Тезисы докладов и материалы конференций

9. Доклиническая оценка метаболизма лекарственных средств / А.А. Гилеп, А.В. Янцевич, И.В. Гайдукевич, Т.А. Сушко, Д.В. Муха, С.А. Усанов // Материалы Московской международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», 20-22 марта 2012 г. / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И.Менделеева. – Москва, 2012. – С. 155.

10. Гайдукевич, И.В. Полиморфизм гена CYP2C9 как объект для фармакогенетического тестирования / И.В. Гайдукевич, А.М. Тумилович, А.А. Гилеп // Материалы IV Международной научной конференции «Химия, структура и функция биомолекул», Минск, 17-19 октября 2012 г. / Институт биоорганической химии НАН Беларуси; редкол.: С.А. Усанов [и др.]. – Минск, 2012. – С.39-40.

11. Гайдукевич, И.В. Получение высокоочищенных рекомбинантных белков CYP2C9*1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3 [Электронный ресурс] / И.В. Гайдукевич // Материалы международного молодежного научного форума «Ломоносов-2012», секция «Биохимия» 9-13 апреля 2012 г. / МГУ им. М.В.Ломоносова : редкол.: А.И. Андреев [и др.]. – М.: МАКС Пресс, 2012. – С. 48-49. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

12. Human recombinant polymorphic variants of CYP2C9 and CYP2C19 and its application to pharmacogenetic studies / I.V. Haidukevich, T.A. Sushko, A.M. Iosko, A.O. Veremeichik, A.A. Gilep, S.A Usanov // Abstracts of the 38th FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Congress, Saint Petersburg, Russia, July 6-11, 2013 / FEBS Journal. – 2013. – Vol. 280 (Suppl. 1). – P. 334-335.

13. Махров, М.В. Применение фармакогенетических технологий в психиатрической практике / М.В. Махров, И.В. Гайдукевич // Материалы VI Международной научно-практической молодежной конференции «Научные стремления 2015» 25-27 марта 2015 / ООО «Лаборатория интеллекта» и Центр молодежных инноваций; редкол.: Ю.М. Сафонова [и др.]. – Минск: «Энциклопедикс», 2015. – 212 с.

14. Значение фармакогенетического тестирования при индивидуализации антипсихотической терапии / М.В. Махров, П.П. Королевич, А.В. Роменский, И.В. Гайдукевич // XII всероссийская школа молодых психиатров: сборник трудов конференции, Суздаль, Россия, 19-24 апреля 2015 / Российское общество психиатров; редкол.: Л.Н. Горобец, М.А Парпара. – Суздаль, 2015. – С.43-46.

15. Возможности фармакогенетических технологий в современной психиатрической практике/ М.В. Махров, Т.В. Докукина, Е.А. Шеремет, А.А. Гилеп, И.В. Гайдукевич // «Научное наследие профессора Б.А. Лебедева»: тезисы научно-практической конференции, Санкт-Петербург, 15-16 апреля 2015 года / Российское общество психиатров; редкол.: Н.Г. Незнанов, Н.Н. Петрова. – Санкт-Петербург, 2015. – С.133-135.

16. Endocrine disorders and psychiatry: drug discovery and pharmacogenomics/ A.A. Gilep, I.V. Haidukevich, N.V. Strushkevich, V.A. Kopats, M.V. Machrov, T.V. Dokukina, S.A. Usanov// Proceedings of the 10th Jubilee East–West Immunogenetics Conference, Wrocław, April 21-23, 2016 / Arch. Immunol. Ther. Exp. – Vol. 64 (Suppl. 1) – Wrocław, 2016. – P.3-4.

17. Влияние генетического полиморфизма CYP2C9 и CYP2C19 на ингибиторный потенциал азолсодержащих лекарственных препаратов и пестицидов / И.В. Гайдукевич, Т.А. Сушко, А.М. Тумилович, И.П. Грабовец, А.А. Гилеп, С.А. Усанов // VIII Российский симпозиум «Белки и пептиды»: научные труды форума, Москва, Россия, 18–22 сентября 2017 г. / ИБХ РАН; редкол.: В.Т. Иванов [и др.]. – Москва, 2017. – С. 137.

Учебно-методические издания

18. Интерпретация результатов фармакогенетического тестирования у пациентов с психическими и поведенческими расстройствами при назначении психотропных лекарственных средств: учеб.-метод. пособие / Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, А.И. Старцев, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет, А.С. Пинчук, А.В. Роменский, К.С. Жаранков. – Минск: Мисанта, 2016. – 56 с.

Инструкции по применению

19. Метод определения полиморфизма гена MDR1 у пациентов, страдающих расстройствами шизофренического спектра : инструкция по применению № 114-1015 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 04.11.2015 г. / сост. Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет, А.С. Пинчук, А.В. Роменский, К.С. Жаранков. – Минск : РНПЦ психического здоровья, 2015. – 9 с.

20. Метод персонализации фармакотерапии расстройств шизофренического спектра путем определения полиморфизмов генов CYP2D6, CYP1A2, CYP2C9: инструкция по применению № 097-1117 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 01.12.2017 г. / сост. Т.В. Докукина, А.А. Гилеп, Т.С. Голубева, М.В. Махров, И.В. Гайдукевич, С.А. Марчук, Е.А. Шеремет. – Минск : РНПЦ психического здоровья, 2017. – 10 с.

Научно-техническая документация

21. Набор реагентов для ПЦР-диагностики полиморфизмов гена CYP2C19 «SNP CYP2C19»: ТУ ВУ 100185129.158-2016 / А.А. Гилеп, Н.П. Башко, И.В. Гайдукевич, А.М. Тумилович. – Введ. 06.12.2016. – Минск : Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 2016. – 17 с.

22. Набор реагентов для ПЦР-диагностики полиморфизмов гена CYP2C9 «SNP CYP2C9»: ТУ ВУ 100185129.159-2016/ А.А. Гилеп, Н.П. Башко, И.В. Гайдукевич, А.М. Тумилович. – Введ. 06.12.2016. – Минск : Институт биоорганической химии НАН Беларуси, 2016. – 17 с.

23. Лабораторный технологический регламент на изготовление ферментного препарата цитохрома P450 2C9 (изоформы *1, *2, *3) человека и методические рекомендации по определению взаимодействия данных ферментов с ингибиторами №6/2015 / А.А. Гилеп, И.В. Гайдукевич, С.А. Усанов// Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2015. – 21 с.

24. Высокопроизводительный скрининг ингибиторов каталитической активности CYP2C9.1, CYP2C9.2 и CYP2C9.3: методические рекомендации (для служебного пользования): утв. зав. ЛМДБ 22.12.2017 / А.А. Гилеп, И.В. Гайдукевич // Институт биоорганической химии НАН Беларуси. – Минск, 2017. - 20 с.

Гайдукевич Ирина Витальевна

Структурно-функциональная характеристика CYP2C9 человека и молекулярная диагностика полиморфизма генов *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* и *MDR1*

Ключевые слова: цитохром P450, CYP2C9*2, CYP2C9*3, генетический полиморфизм, фармакогенетика, персонализированная медицина, психиатрия.

Цель исследования: установление структурно-функциональных характеристик полиморфных форм CYP2C9 человека и комплексное определение значимых молекулярно-диагностических маркеров метаболизма и транспорта лекарственных средств у пациентов с психическими заболеваниями.

Методы исследования и аппаратура: биохимические и молекулярно-биологические методы. Амплификаторы Bio-Rad T100 и PTC200, Biometra T-1 Thermocycler, 7500/StepOne Real Time PCR system, генетический анализатор AB 3130, гель-документирующая система VilberLourmat Infinity, шейкер-инкубатор Infors HT Multitron Pro, гомогенизатор EmulsiFlex C5, спектрофотометры Shimadzu UV-3000, Cary UV-Vis-NIR, NanoDrop 2000, система для ВЭЖХ Agilent 1200 Series L, MALDI-TOF масс-спектрометр Microflex LRF system.

Полученные результаты и их новизна: получены в высокоочищенном состоянии гомогенные белковые препараты CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3. Проведен комплексный анализ взаимодействия азолсодержащих лекарственных средств и пестицидов с активным центром полиморфных изоформ CYP2C9. Впервые показано различие в эффекторном действии цитохрома *b₅* на полиморфные изоформы CYP2C9 человека. Разработаны оригинальные методики определения полиморфизма генов ключевых компонентов биотрансформации и межклеточного транспорта лекарственных средств (*MDR1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* и *CYP1A2*) и проведено комплексное определение этих полиморфизмов в группе здоровых людей и группе людей с психическими заболеваниями. Разработаны наборы реагентов для ПЦР-диагностики полиморфизмов гена *CYP2C19* и *CYP2C9*.

Рекомендации по использованию: полученные рекомбинантные полиморфные изоформы CYP2C9 человека могут быть использованы для исследования межбелковых и межлекарственных взаимодействий. Разработанные методики детекции полиморфизма генов белков системы биотрансформации и межклеточного транспорта лекарственных средств легли в основу инструкций по применению (утв. Минздравом Республики Беларусь), учебно-методического пособия, а также компьютерной программы, внедренной в лечебный процесс учреждений здравоохранения психиатрического профиля Республики Беларусь.

Область применения: биохимия, молекулярная биология, психиатрия.

Гайдукевіч Ірына Вітальеўна

Структурна-функцыянальная характарыстыка CYP2C9 чалавека і малекулярная дыягностыка генетычнага палімарфізму генаў *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* і *MDR1*

Ключавыя словы: цытахром P450, CYP2C9*2, CYP2C9*3, генетычны палімарфізм, фармакагенетыка, персаналізаваная медыцына, псіхіятрыя.

Мэта работы: ўсталяванне структурна-функцыянальных характарыстык паліморфных формаў CYP2C9 чалавека і комплекснае вызначэнне значных малекулярна-дыягнастычных маркераў метабалізму і транспарту лекавых сродкаў.

Метады даследавання і апаратура: біяхімічныя і малекулярна-біялагічныя метады. Ампліфікатары Bio-Rad T100 ды PTC200, Biometra T-1 Thermocycler, 7500/StepOne Real Time PCR system, генетычны аналізатар ABI 3130, сістэма для гель-дакументавання VilberLourmat Infinity, шейкер-інкубатар Infors HT Multitron Pro, гамагенізатар EmulsiFlex C5, спектрафатометры Shimadzu UV-3000, Cary UV-Vis-NIR, NanoDrop 2000, сістэма для ВЭВХ Agilent 1200 Series L, MALDI-TOF мас-спектрометр Microflex LRF system.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: атрыманы ў высокаачышчаным стане гамагенныя бялковыя прэпараты CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3. Праведзены комплексны аналіз ўзаемадзеяння азолзмяшчаючых лекавых сродкаў і пестыцыдаў з актыўнымі цэнтрамі паліморфных ізаформаў CYP2C9. Упершыню паказана адрозненне ў эфектарным дзеянні цытахрома b5 на паліморфныя ізаформы CYP2C9 чалавека. Распрацаваны арыгінальныя метадыкі вызначэння палімарфізму генаў ключавых кампанентаў біятрансфармацыі і міжклеткавага транспарту лекавых сродкаў (*MDR1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* і *CYP1A2*) і праведзена комплекснае вызначэнне гэтых палімарфізмаў ў групе здаровых людзей і групе людзей з псіхічнымі захворваннямі. Распрацаваны наборы рэагентаў для ПЦР-дыягностыкі палімарфізмаў генаў *CYP2C19* і *CYP2C9*.

Ступень выкарыстання: атрыманыя рэкамбінантныя паліморфныя ізаформы CYP2C9 чалавека могуць быць выкарыстаны для даследавання паміжбялковых і паміжлекавых узаемадзеянняў. Распрацаваныя метадыкі дэтэкцыі палімарфізму генаў бялкоў сістэмы біятрансфармацыі і міжклеткавага транспарту лекавых сродкаў ляглі ў аснову інструкцый па ўжыванні (зацв. Міністэрствам аховы здароўя Рэспублікі Беларусь), вучэбна-метадычнага дапаможніка, а таксама камп'ютэрнай праграмы “Фармакагенетыка”, укаранёнай у лячэбны працэс устаноў аховы здароўя псіхіятрычнага профілю Рэспублікі Беларусь.

Галіна ужывання: біяхімія, малекулярная біялогія, псіхіятрыя.

Haidukevich Irina Vital'evna

Structural and functional characteristics of human CYP2C9 and molecular diagnostics of *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A2* and *MDR1* gene polymorphism

Keywords: cytochrome P450, CYP2C9*2, CYP2C9*3, genetic polymorphism, pharmacogenetics, personalized medicine, psychiatry.

The aim of the study: the establishment of structural and functional characteristics of polymorphic forms of human CYP2C9 and comprehensive identification of significant molecular diagnostic markers of the drug metabolism and transport in patients with mental illness.

Methods and equipment: biochemical and molecular biological methods. Thermocyclers Bio-Rad T100 and PTC200, Biometra T-1 Thermocycler, 7500 / StepOne Real Time PCR system, genetic analyzer AB 3130, gel-documenting system VilberLourmat Infinity, shaker-incubator Infors HT Multitron Pro, homogenizer EmulsiFlex C5, spectrophotometers Shimadzu UV-3000, Cary UV-Vis-NIR, NanoDrop 2000, HPLC system Agilent 1200 Series L, MALDI-TOF mass spectrometer Microflex LRF system.

Results and their novelty: homogeneous protein preparations of human CYP2C9*1, CYP2C9*2, CYP2C9*3 were obtained in a highly purified state. A comprehensive analysis of the interaction ofazole-containing drugs and pesticides with the active site of polymorphic CYP2C9 isoforms was carried out. For the first time it was shown that addition of cytochrome *b*₅ resulted in a decrease of CYP2C9*3 activity to diclofenac in a concentration-dependent manner. Original methods for determining gene polymorphism of key components of biotransformation and intercellular transport of drugs (*MDR1*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP1A2*) were developed and a comprehensive genotyping of these polymorphisms was carried out in a group of healthy people and a group of people with mental diseases. Reagent kits for PCR diagnostics of polymorphisms of the *CYP2C19* and *CYP2C9* gene were developed.

Degree of use: the obtained recombinant polymorphic isoforms of human CYP2C9 can be used to investigate protein-protein and drug-drug interactions. Developed methods for detecting genetic polymorphism of drug-metabolizing CYP450 and MDR1 formed the basis for instructions for use (approved by the Ministry of Health of the Republic of Belarus), for tutorial, and a computer program 'Pharmacogenetics', implemented in the medical process of mental health institutions of the Republic of Belarus.

Fields of use: biochemistry, molecular biology, psychiatry.

