

И.В. Малярчук²
Н.Г. Горovenko¹

¹ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев

²Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика, Киев

Ключевые слова: ген, генотип, ревматизм, порок клапана сердца.

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНА CYP 2C9 У ПАЦИЕНТОВ С РЕВМАТИЧЕСКИМИ ПОРОКАМИ КЛАПАНОВ СЕРДЦА

Цель работы — сравнительное изучение влияния полиморфизма гена CYP 2C9 на формирование ревматических и неревматических пороков клапанов сердца. **Методы исследования.** В исследовании включено 133 пациента с пороками клапанов сердца: мужчин 90 (67,67%), женщин — 43 (32,33%), средний возраст составил 51±1,2 года. У 30 пациентов отмечали ревматический генез пороков клапанов сердца, у 103 — неревматический генез. Генотипирование по аллельным вариантам *2 и *3 гена CYP 2C9 проводили с использованием метода аллельспецифического 5'-нуклеазного анализа. **Результаты.** Генотип «дикий тип» по аллельному варианту *2 гена CYP 2C9 отмечали достоверно чаще в группе контроля, что может свидетельствовать о снижении риска развития ревматизма с поражением сердечных клапанов в 3 раза. Частота гетерозиготного генотипа *1*2 гена CYP 2C9 была достоверно выше в группе пациентов с поражением сердечных клапанов ревматического генеза, что повышает риск формирования ревматических пороков клапанов сердца в >3 раза. **Выводы.** Проведение молекулярно-генетической диагностики для определения генотипов по аллельному варианту *2 гена CYP 2C9 позволяет выявить пациентов с повышенным риском развития ревматизма с поражением сердечных клапанов.

ВВЕДЕНИЕ

Ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков участвуют в метаболизме множества токсичных веществ окружающей среды, лекарственных препаратов, медиаторов аллергического воспаления, простагландинов, а также свободных радикалов. Детоксикация или биотрансформация ксенобиотиков представляет собой «каскадный» процесс, в котором участвует большое количество ферментов.

Первая фаза детоксикации ксенобиотиков осуществляется главным образом изоферментами семейства цитохрома P450, среди которых в биотрансформации веществ центральное место занимают CYP 1A1, CYP 2A2, CYP 2C9, CYP 2C19, CYP 2D6, CYP 2E1, CYP3A4, CYP3A5, из них CYP 2C9 играет самую важную роль. Также, энзимы субсемейства 2C цитохрома P450, в частности CYP 2C9, метаболизируют такие лекарственные препараты, как непрямые антикоагулянты, нестероидные противовоспалительные препараты, статины, антидепрессанты, блокаторы бета-адренорецепторов и некоторые другие.

Ген CYP 2C9 (OMIM *601130), локализованный на хромосоме 10q24, состоит из 50 462 пар основ, имеет 9 экзонов и кодирует энзим CYP 2C9. Сегодня идентифицировано 57 аллельных вариантов гена CYP 2C9, среди которых CYP 2C9*2

и CYP 2C9*3 характерны для европейской популяции. Аллель *1 кодирует протеин с нормальной активностью. Для аллельного варианта *2 гена CYP 2C9 (rs1799853) характерна замена цитозина (C) на тимин (T) в положении 430. Аллельный вариант *3 гена CYP 2C9 (rs1057910) содержит замену аденина (A) на цитозин (C) в положении 1075. Установлено, что аллельные варианты *2 и *3 гена CYP 2C9 характеризуются достоверным снижением ферментативной активности CYP 2C9 на 30–50 и 90% соответственно.

В настоящее время активно проводятся исследования по изучению влияния полиморфизма генов, кодирующих ферменты системы детоксикации ксенобиотиков на риск развития различных заболеваний [5, 6, 8–10].

В последнее время увеличивается количество пациентов с пороками сердечных клапанов, нуждающихся в операциях, направленных на коррекцию гемодинамических нарушений. Одной из ведущих причин нарушения функционирования клапанов, что ведет к необходимости замены их искусственными протезами, является ревматическое поражение клапанного аппарата сердца. Поэтому целью нашей работы было сравнительное изучение влияния полиморфизма гена CYP 2C9 на формирование ревматических и неревматических пороков клапанов сердца у пациентов кардиохирургического профиля.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 133 пациента с пороками клапанов сердца: мужчин 90 (67,67%), женщин — 43 (32,33%), средний возраст составил $51 \pm 1,2$ года. Из анамнеза заболевания установлено, что 30 пациентов имели ревматический генез пороков клапанов сердца (подгруппа А) и 103 — неревматический генез (подгруппа В). На проведение работы получено разрешение комитета по биоэтике Национальной медицинской академии последипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины.

Для молекулярно-генетического исследования использовали ДНК, выделенную из лейкоцитов периферической крови. Выделение ДНК осуществляли с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации). Генотипирование по аллельным вариантам *2 и *3 гена *CYP 2C9* проводили с использованием метода аллельспецифического 5'-нуклеазного анализа, согласно методике, описанной в работе [7] и оптимизированной к нашим условиям.

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере с использованием программных пакетов Statistica 6.0 и MS Excel. Для сравнения распределения частот генотипов между подгруппами исследования использовали критерий χ^2 Пирсона, критерий χ^2 Пирсона с поправкой Йетса на непрерывность (при количестве исследований < 10). Влияние генотипов на риск формирования ревматических и неревматических пороков клапанов сердца оценивали по величине отношения шансов (OR) в пределах 95% доверительного интервала (CI). Статистически достоверными считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного молекулярно-генетического исследования определены частоты генотипов по аллельным вариантам *2 и *3 гена *CYP 2C9* у 133 пациентов, перенесших операцию протезирования сердечных клапанов. Частота генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* составила: *1*1 — 78,2%, *1*2 — 21,05%, *2*2 — 0,75%.

Для аллельного варианта *3 частоты были следующими: *1*1 — 84,96%, *1*3 — 14,29%, *3*3 — 0,75%.

При проведении сравнительного анализа частот комбинаций генотипов гена *CYP 2C9* у пациентов основной группы в нашем исследовании с частотами, полученными литовскими и российскими авторами [2, 12], достоверной разницы не выявлено.

Поскольку для украинцев известны частоты генотипов по обоим аллельным вариантам гена *CYP 2C9* [1], нами проведена сравнительная оценка частот генотипов пациентов, перенесших операцию протезирования клапанов сердца, с частотами у населения Украины, которые были приняты за контроль.

Для генотипов по аллельному варианту *3 гена *CYP 2C9* не выявлено достоверной разницы в распределении частот у пациентов основной группы и группы контроля.

Результаты распределения частот генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* у пациентов основной и контрольной групп представлены в табл. 1.

Установлено, что частота гетерозиготного генотипа *1*2 по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* у пациентов с поражением клапанов сердца статистически отличается ($p < 0,05$) от таковой в группе контроля. У пациентов с поражением клапанов сердца по сравнению с группой контроля отмечена более низкая частота гомозиготного генотипа *1*1 по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9*, но данная разница не была статистически значимой.

Согласно данным проведенных исследований [8, 9, 13], полиморфизм гена *CYP 2C9* ассоциирован с развитием ревматических заболеваний. Поэтому нами был проведен сравнительный анализ частот генотипов по аллельным вариантам *2 и *3 гена *CYP 2C9* у пациентов с поражением клапанов сердца ревматического (подгруппа А) и неревматического (подгруппа В) генеза и группы контроля. Не выявлено достоверных различий в распределении частот генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* между пациентами подгруппы В и группы контроля. Также не выявлено достоверной разницы в распределении частот генотипов для аллельного варианта *3 гена *CYP 2C9* у пациентов подгрупп А, В и контрольной группы. Результаты сравнительного анализа распределения частот генотипов по ал-

Таблица 1

Распределение частот генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* у пациентов основной и контрольной групп

Генотип по аллельному варианту *2 гена <i>CYP 2C9</i>	Основная группа		Контрольная группа		Результаты статистического анализа			
	n=133	%	n=918	%	p	χ^2	OR	95% CI
*1*1	104	78,2	779	84,96	$p=0,05$	3,84	0,64	0,41–1,00
*1*2	28	21,05	121	14,29	$p < 0,05$	5,92	1,76	1,11–2,78
*2*2	1	0,75	18	0,75	$p > 0,05$	0,4	0,38	0,05–2,86

Таблица 2

Распределение частот генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* у пациентов подгруппы А и группы контроля

Генотип по аллельному варианту *2 гена <i>CYP 2C9</i>	Подгруппа А		Контрольная группа		Результаты статистического анализа			
	n=30	%	n=918	%	p	χ^2	OR	95% CI
*1*1	19	63,3	779	84,96	$p < 0,05$	10,11	0,31	0,14–0,66
*1*2	10	33,3	121	14,29	$p < 0,05$	8,29	3,29	1,51–7,20
*2*2	1	3,4	18	0,75	$p > 0,05$	0,28	1,72	0,22–13,36

лельному варианту *2 гена *CYP 2C9*, проведенного у пациентов подгруппы А и группы контроля, представлены в табл. 2.

Результаты анализа показали, что гомозиготный генотип «дикий тип» по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* отмечался достоверно чаще в группе контроля, что может свидетельствовать о снижении риска развития ревматизма с поражением сердечных клапанов в 3 раза. Частота гетерозиготного генотипа *1*2 по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* была достоверно выше в группе пациентов с поражением сердечных клапанов ревматического генеза, что повышает риск формирования ревматических пороков клапанов сердца в >3 раза (OR=3,29; 95% CI 1,51–7,20). Не найдено достоверных различий в частоте гомозиготного генотипа по замене (*2/*2) гена *CYP 2C9* у пациентов подгруппы А и группы контроля, в связи с низкой частотой выявляемости.

Полученные нами результаты подтверждают данные зарубежных ученых о роли генов системы детоксикации в развитии ревматических заболеваний [3, 4, 8]. В последнее время, помимо общепринятой аутоиммунной теории в развитии ревматических заболеваний, большое значение придается нарушениям баланса между синтезом свободных радикалов и возможностями антиоксидантной защиты организма [11]. Свободнорадикальное окисление является неотъемлемым звеном воспалительного процесса, важным этапом эндогенного метаболизма и тесно связано со многими биологическими процессами организма. Причиной повышения концентрации активных форм кислорода может быть усиление синтеза активных соединений или/и изменение активности ферментов, ответственных за их биотрансформацию. Эффективность работы системы детоксикации детерминируется индивидуальными генетическими особенностями организма, определяющими дифференциальную чувствительность индивидов к средовым факторам в форме адаптационной реакции либо дезадаптации, обуславливающей возникновение различной мультифакторной патологии, в том числе и ревматизма (острой ревматической лихорадки согласно новой классификации). Возможность выявления генетической предрасположенности, особенно в семьях с высоким риском, на основании анализа полиморфных маркеров, с целью индивидуальной первичной профилактики актуально для предиктивной медицины.

ВЫВОДЫ

Наличие гомозиготного генотипа «дикий тип» по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* достоверно снижает риск развития ревматизма с поражением сердечных клапанов в 3 раза. В тоже время наличие гетерозиготного генотипа по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* достоверно повышает этот риск в >3 раза.

Проведение молекулярно-генетической диагностики для определения генотипов по аллельному варианту *2 гена *CYP 2C9* позволяет выявить паци-

ентов с повышенным риском развития ревматизма с поражением сердечных клапанов и провести своевременную профилактику данного заболевания.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левкович Н.М., Горovenko Н.Г. (2013) Частота розповсюдження алельних варіантів *2 та *3 гена *CYP 2C9* у населення України. Одес. мед. журн., 2(136): 23–28.
2. Сироткина О.В., Улитина А.С., Тараскина А.Е. (2005) Клиническое значение аллельных вариантов гена цитохрома *CYP 2C9* при антикоагулянтной терапии варфарином. Кардиология, 4: 61–63.
3. Bohanec-Grabar P., Rozman B., Tomsic M. et al. (2008) Genetic polymorphism of *CYP 1A2* and the toxicity of leflunomide treatment in rheumatoid arthritis patients. Eur. J. Clin. Pharmacol., 64(9): 871–876.
4. Cornelis M.C., Bae S.C., Kim I. et al. (2010). *CYP 1A2* genotype and rheumatoid arthritis in Koreans. Rheumatol. Int., 30(10): 1349–1354.
5. Donner K.M., Hiltunen T.P., Suonsyrja T. et al. (2009) *CYP 2C9* genotype modifies activity of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertensive men. J. Hypertens., 27(10): 2001–2009.
6. Franken C.C., Kaiser A.F., Krucer J.C. et al. (2013) Cytochrome P450 2B6 and 2C9 genotype polymorphism—a possible cause of prasugrel low responsiveness. Thromb. Haemost., 110(1): 131–140.
7. Funk M., Endler G., Freitag R. et al. (2004) *CYP 2C9*2* and *CYP 2C9*3* alleles confer a lower risk for myocardial infarction. Clinical Chemistry, 50(12): 2395–2398.
8. Głowska F., Karażniewicz-Lada M., Grześkowiak E. et al. (2011) Clinical pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers in wild type of *Cyp2c8* and *Cyp2c9* patients with rheumatoid arthritis. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet., 36(3): 167–173.
9. Kuanprasert S., Dettrairat S., Palacajornsuk P. et al. (2009) Prevalence of *CYP 2C9* and *VKORC1* mutation in patients with valvular heart disease in northern Thailand. J. Med. Assoc. Thai., 92(12): 1597–1601.
10. Markova S.M., De Marco T., Bendjilali N. et al. (2013) Association of *CYP 2C9*2* with bosenfan-induced liver injury. Clin. Pharmacol. Ther., 94(6): 678–686.
11. Namazi M.R. (2009) Cytochrome P450 enzymes and autoimmunity: expression of the relationship and introduction of free radicals as the link. J. Autoimmune Dis., 6: 1–4.
12. Tatarūnas V., Lesauskaitė V., Veikutienė A. et al. (2011) The influence of *CYP2C9* and *VKORC1* gene polymorphisms on optimal warfarin doses after heart valve replacement. Medicina (Kaunas), 47(1): 25–30.
13. Wang M., Lang X., Cui S. et al. (2012) Clinical application of pharmacogenetic-based warfarin-dosing algorithm in patients of Han nationality after rheumatic valve replacement: a randomized and controlled trial. Int. J. Med. Sci., 9(6): 472–479.

ЧАСТОТА АЛЛЕЛЬНИХ ВАРИАНТІВ ГЕНА *CYP 2C9* У ПАЦІЄНТІВ ІЗ РЕВМАТИЧНИМИ ВАДАМИ КЛАПАНІВ СЕРЦЯ

І.В. Малярчук, Н.Г. Горovenko

Резюме. *Мета роботи* — вивчення впливу поліморфізму гена *CYP 2C9* на формування ревматичних і неревматичних вад клапанів серця. *Методи дослідження.* У дослідження включено 133 пацієнти з вадами клапанів серця: чоловіків 90 (67,67%), жінок — 43 (32,33%), середній вік становив $51 \pm 1,2$ року. У 30 пацієнтів відзначали ревматичний генез вад клапанів серця, у 103 — неревматичний генез. Генотипування за алельними варіантами *2 і *3 гена *CYP 2C9* проводили з використанням методу алельспецифічного 5'-нуклеазного аналізу. *Результати.* Генотип «дикий тип» за алельним варіантом *2 гена *CYP 2C9* відзначали достовірно частіше у групі контролю, що свідчить про зниження ризику розвитку рев-

матизму з ураженням серцевих клапанів у 3 рази. Частота гетерозиготного генотипу *1*2 гена CYP 2C9 була достовірно вищою у групі пацієнтів з ураженням серцевих клапанів ревматичного генезу, що підвищує ризик формування ревматичних вад клапанів серця у >3 рази. **Висновки.** Проведення молекулярно-генетичної діагностики для визначення генотипів за алельним варіантом *2 гена CYP 2C9 дозволяє виявити пацієнтів із підвищеним ризиком розвитку ревматизму з ураженням серцевих клапанів.

Ключові слова: ген, генотип, ревматизм, вада клапана серця.

THE FREQUENCY OF ALLELIC VARIANTS OF CYP 2C9 GENE IN PATIENTS WITH RHEUMATIC HEART VALVES

I.V. Maliarchuk, N.G. Gorovenko

Summary. *The aim of this study was to investigate the impact of CYP 2C9 polymorphism on formation of rheumatic and non-rheumatic heart valvular disease. **Materials and methods.** The study included 133 patients with heart valve replacement (67.67% male, 32.33% women, average age 51±1.2 years). 30 patients had rheumatic heart valvular disease*

*genesis and 103 patients had non-rheumatic heart valvular disease genesis. For determination of allelic variant *2 and *3 of CYP 2C9 gene the method of allele-specific PCR has been used. **Results.** Frequencies of the homozygous genotype CYP 2C9*1*1 (a «wild» type) was statistically higher in patients control group, compared to patients subgroup A, which may indicate a decrease the risk of rheumatic disease with damage of the heart valves in 3 times. Frequencies of the heterozygous genotype CYP 2C9*1*2 was statistically higher in patients subgroup A, which increases the risk of formation of rheumatic heart valves, more than 3 times. **Conclusions.** Genetic testing CYP 2C9*2 gene allows to identify patients at increased risk of developing rheumatic disease with damage of the heart valves.*

Key words: gene, genotype, rheumatic disease, heart valvular disease.

Адрес для переписки:

Малярчук Ирина Владимировна
04112, Киев, ул. Дорогожицкая, 9
НМАПО имени П.Л. Шупика,
кафедра медицинской и лабораторной генетики
E-mail: vik_10@mail.ru

РЕФЕРАТИВНА ІНФОРМАЦІЯ

Применение НПВП повышает риск венозной тромбоземболии (ВТЭ)

Подготовила О.А. Федорова

Применение НПВП может повышать риск развития ВТЭ почти в 2 раза, в том числе тромбоза глубоких вен и легочного тромбоза. Новые данные исследования ученых из Медицинского центра Бассета (Bassett Medical Center), Нью-Йорк, США, и Колледжа терапевтов и хирургов при Колумбийском университете (Columbia University College of Physicians and Surgeons), Нью-Йорк, США, опубликованы 24 сентября 2014 г. онлайн в журнале «Rheumatology».

Результаты метаанализа демонстрируют статистически достоверное повышение риска развития ВТЭ среди больных, применяющих НПВП. Лечащим врачам следует учитывать выявленную ассоциацию в клинической практике и с соответствующей настороженностью применять НПВП у пациентов с исходным высоким риском развития тромбоземболических событий.

Это первый систематический обзор и метаанализ результатов опубликованных обсервационных исследований, проведенных с целью изучения ассоциации между применением НПВП и развитием ВТЭ. Анализировали данные обсервационных исследований. Из опубликованных по данной тематике 597 исследований в метаанализ включили 6 научных работ с зарегистрированным развитием 21 401 случая ВТЭ. Оценивали: отношение шансов, относительный риск, отношение рисков или стандартизированное отношение частоты событий для случаев ВТЭ среди пациентов, принимающих НПВП, в сравнении с не применявшими их. Исследования, среди которых одно когортное (n=19 293; 215 событий) и 5 исследований случай/контроль (слу-

чаев — 21 186; контрольных наблюдений — 110 824), проведены в Великобритании, Франции, Нидерландах, Дании и Швеции в период 2007–2013 гг.

Суммарное отношение рисков среди лиц, принимавших НПВП, составило 1,8–1,8-кратное повышение риска развития ВТЭ (95% доверительный интервал (ДИ) 1,28–2,52). Среди участников исследований, принимавших селективные ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ)-2, суммарное отношение рисков составило 1,99 (95% ДИ 1,44–2,75). Оба показателя достигли уровня статистической достоверности.

Повышенный риск развития ВТЭ может быть обусловлен в большей степени эффектами ингибиторов ЦОГ-2, поскольку в отношении применения ацетилсалициловой кислоты — ингибитора ЦОГ-1 — получены данные, подтверждающие эффективность препарата в предупреждении развития ВТЭ. Механизм повышения риска развития ВТЭ остается до конца не выяснен. Получены данные об угнетении синтеза простаглицлинов — мощных ингибиторов тромбоцитарной активации — под воздействием фермента ЦОГ-2 с одновременной стимуляцией высвобождения тромбоксана — мощного стимулятора агрегации тромбоцитов — из активированных тромбоцитов. Активация и агрегация тромбоцитов может, в свою очередь, индуцировать коагуляционный каскад с дальнейшим образованием тромбов.

Авторы метаанализа убеждены, что в условиях широкого применения НПВП повышенный риск развития ВТЭ-событий может иметь особую значимость для систем здравоохранения большинства стран в мире.

Hand L. (2014) NSAIDs Linked to Increased Venous Thromboembolism Risk. Medscape, September 25 (<http://www.medscape.com/viewarticle/832286>).