

ЗНАЧЕНИЕ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ГЛИКОПРОТЕИНА-Р ДЛЯ ИНДИВИДУАЛИЗАЦИИ ФАРМАКОТЕРАПИИ ДИГОКСИНОМ: НОВЫЙ ПОДХОД К СТАРОЙ ПРОБЛЕМЕ

Сычев Д.А., Игнатьев И.В., Андреев Д.А., Пошукаева Л.Г., Колхир П.В., Жукова Э.Э., Кулес В.Г.

Филиал «Клиническая фармакология» НЦ Биомедицинских технологий РАМН; Институт клинической фармакологии НЦ ЭСМП Росздравнадзора; кафедра клинической фармакологии ММА им. И.М. Сеченова

Резюме

Цель работы — изучение влияния носительства генотипов по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1, кодирующего гликопротеин-Р, на развитие симптомов дигиталисной интоксикации и повышение концентрации дигоксина в плазме крови пациентов с постоянной формой фибрилляции предсердий. 103 больным с постоянной формой мерцательной аритмии проводили определение носительства генотипов по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1 методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Равновесную концентрацию дигоксина в плазме крови определяли методом поляризационного флуориммуноанализа у 29 пациентов. Результаты: концентрация дигоксина в плазме крови была выше у пациентов с генотипом ТТ по сравнению с уровнями дигоксина у пациентов с генотипами СС и СТ ($1,77 \pm 0,17$ vs $1,17 \pm 0,21$, $p=0,02$ и $1,77 \pm 0,17$ vs $1,37 \pm 0,30$, $p=0,037$ соответственно); симптомы гликозидной интоксикации чаще выявлялись у больных — носителей генотипа ТТ по сравнению с больными с генотипами СС и СТ (57% vs 13%, $p=0,0001$, OR=6,4 при CI в пределах от 1,9 до 21,9). Таким образом, носительство генотипа ТТ по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1, кодирующего гликопротеин-Р, ассоциируется с более частым развитием симптомов гликозидной интоксикации и высокими значениями концентрации дигоксина в плазме крови.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, дигиталисная интоксикация, гликопротеин-Р, носительство специфических генотипов, фармакотерапия, дигоксин.

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что внедрение в клиническую практику достижений в области фармакогенетики и фармакогеномики является реальной возможностью индивидуализации фармакотерапии [1, 2, 8]. При этом выявление генетических особенностей у пациентов позволяет прогнозировать характер фармакологического ответа, что дает возможность повысить эффективность и безопасность применения лекарственных средств (ЛС) [2], т.к. идентификация соответствующего аллельного варианта, ассоциированного с изменением фармакокинетики и/или фармакодинамики ЛС у больного, требует соответствующей коррекции терапии (доза, кратность введения, путь введения, замена ЛС и т.д.) [1,2].

Дигоксин широко применяется в клинической практике более двухсот лет. В настоящее время дигоксин назначается пациентам с хронической сердечной недостаточностью, с постоянной формой фибрилляции предсердий [3]. Дигоксин, будучи представителем ЛС с узкой терапевтической шириной, в 10-30% случаев вызывает нежелательные лекарственные реакции (НЛР) [5] в виде гликозидной интоксикации [14]. Известно, что риск развития гликозидной интоксикации увеличивается у пациентов пожилого и старческого возраста с гипокалиемией, находящихся в тяжелом состоянии [3, 14]. Существуют также и генетически детерминированные факторы риска раз-

вития гликозидной интоксикации [2]. Именно такими факторами является полиморфизм гена MDR1, кодирующего гликопротеин — Р. Гликопротеин — Р обеспечивает главный транспортный механизм выведения дигоксина: он осуществляет активную секрецию дигоксина в желчь и мочу [1, 2, 8, 10].

Как показали исследования последних лет, наибольшее клиническое значение имеет полиморфный маркер С3435Т гена MDR1, представляющий собой замену в нуклеотидной последовательности в положении 3435 цитозина на тимин [10]. В исследованиях *in vitro* было показано, что у носителей ТТ генотипа отмечается снижение экспрессии гена MDR1 в ряде органов: 12-перстной кишке [11, 12], лимфоцитах [5, 13], почках и печени [6, 12]. Снижение экспрессии гена MDR1 в кишечнике и почках должно приводить к снижению количества гликопротеина-Р в этих органах и, следовательно, к более полному всасыванию и замедленному выведению ЛС-субстратов гликопротеина-Р [10]. В результате, у носителей ТТ генотипа вероятно значительное повышение концентрации ЛС — субстратов гликопротеина-Р в плазме крови и, в частности, дигоксина, что может сопровождаться увеличением риска развития НЛР [7, 9, 15].

Цель исследования: изучение влияния носительства генотипов по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1 с развитием симптомов дигиталисной интоксикации и повышением концентрации дигоксина

в плазме крови у пациентов с постоянной формой фибрилляции предсердий и разработка на основании полученных данных алгоритма выбора начальной дозы дигоксина в зависимости от результатов фармакогенетических исследований гликопротеина-Р.

Материал и методы

В исследование были включены 103 больных с постоянной формой фибрилляции предсердий. Критериями включения в исследование являлись: давность мерцательной аритмии не менее 1 года, прием дигоксина в дозе 0,25 мг/сутки в течение не менее 1 месяца, наличие хронической сердечной недостаточности (ХСН) I-II функционального класса (по NYHA), стабильность состояния в течение не менее 4-х недель перед включением в исследование, подписанное информированное согласие об участии в исследовании. Критериями исключения были: нарушения функции печени, почек, гипокалиемия, ХСН III–IV ФК (по NYHA), пороки сердца (кроме относительной митральной и/или трикуспидальной недостаточности, но не более 2-й степени), острые коронарные синдромы в предшествующие 3 месяца, тяжелые сопутствующие заболевания, сахарный диабет, наличие противопоказаний к назначению дигоксина.

Клиническая характеристика включенных в исследование больных представлена в табл.1.

На момент включения в исследование средняя ФВ ЛЖ составила $36 \pm 7\%$, частота сердечных (ЧСС) сокращений в покое — 72 ± 9 уд/мин, уровень калия в плазме крови — $4,3 \pm 0,4$ моль/л, креатинина — $0,73 \pm 0,24$ моль/л. Все больные принимали дигоксин в дозе 0,25 мг/сутки (по 0,125 мг 2 раза в сутки — утром и вечером), ацетилсалициловую кислоту, ингибиторы АПФ, диуретики, бета-адреноблокаторы, по показаниям — органические нитраты.

У всех больных выявляли симптомы дигиталисной интоксикации (клиническое обследование, ЭКГ), определяли носительство генотипов по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1. У 29 из 103 больных определяли равновесную концентрацию дигоксина в плазме крови.

Заборы проб крови для определения равновесной концентрации дигоксина осуществляли утром натощак, перед очередным приемом препарата, из кубитальной вены в количестве 10 мл в сухие пробирки с гепарином. Спустя 30 мин пробы крови центрифугировали 10 минут при 3000 об/мин. Плазму объемом 2 мл переносили в пластиковые пробирки, замораживали и хранили при температуре не ниже -30°C . Концентрацию дигоксина в плазме крови определяли методом поляризационного флуоресцентного иммунологического анализа (Tdx).

Для определения носительства генотипов по полиморфному маркеру С3435Т гена MDR1, кровь по-

Таблица 1
Клиническая характеристика больных, включенных в исследование

Показатель	Значение
Всего больных	103
Мужчины	67
Женщины	36
Возраст, лет	$63,5 \pm 4,7$
Длительность фибрилляции предсердий, лет	$1,6 \pm 0,3$
С ИБС	103
со стенокардией	71
с перенесенным инфарктом миокарда	22
С ХСН:	103
I ФК	93
II ФК	10
С артериальной гипертензией	29

мещали в 1,5 мл микропробирки (тип Eppendorf) и добавляли консервант — 0,5 М этилендиаминтетраацетата двунатриевую соль (ЭДТА • Na₂) с pH 8,5 из расчета 50 мкл раствора консерванта на 1,5 мл крови. ДНК из крови выделяли стандартным фенольным методом [4]. Раствор выделенной ДНК в количестве 2 мкл использовали для полимеразной цепной реакции (ПЦР) в конечном объеме 25 мкл. Последнюю проводили с использованием стандартной Taq-полимеразы («СибЭнзим», Россия) в буфере производителя [7]. Температура отжига составляла 65°C , использованная концентрация хлорида магния — 2мМ. В результате ПЦР синтезировался фрагмент длиной в 280 пар нуклеотидов (п.н.), который затем подвергался рестрикции рестриктазой MboI («Fermentas», Литва) при температуре 37°C в буфере производителя. Разрезался фрагмент, содержащий вариант «С», в то время как фрагмент, содержащий вариант «Т», оставался нерасщепленным. В случае расщепления образовывались фрагменты длиной 133 и 147 п.н. соответственно. Результаты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле на стандартном трис-боратном буфере. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом свете (312 нм) после окрашивания раствором бромистого этидия.

Последовательности праймеров:

MDR1for 5' — GAT GGC AAA GAA ATA AAG CGA CTG — 3';

MDR1rev 5' — ACC AGC CCC TTA TAA ATC AAA CTA — 3'.

Статистический анализ проводился с использованием статистических пакетов программ Statistica v.5.5A, Biostat. Для определения статистической значимости различий частот генотипов в группах больных применялся точный критерий Фишера. Относительные риски рассчитывались с помощью стандартной программы-калькулятора. Статистическую значимость различий в концентрации дигоксина в плазме крови в группах больных определяли с помощью

Таблица 2

Выявленные симптомы гликозидной интоксикации у пациентов, включенных в исследование

Количество выявленных симптомов гликозидной интоксикации	Число пациентов (n=26)
1	13
2	11
3	2

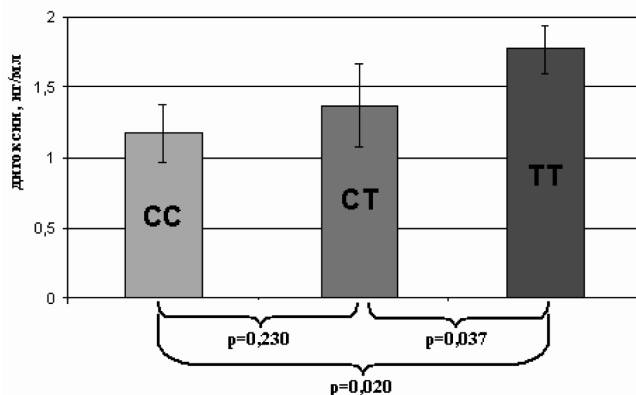


Рис. 1. Концентрация дигоксина в плазме крови пациентов с генотипами CC, CT, TT.

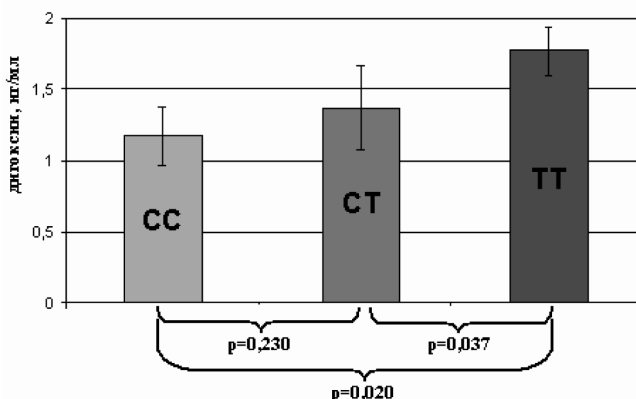


Рис. 2. Симптомы гликозидной интоксикации у пациентов из объединенной группы (генотипы CC и CT) и у пациентов с генотипом TT по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1.

непараметрического метода Манна-Уитни. Значения чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного (PPV) и отрицательного (NPV) результатов теста рассчитывались по общепринятым формулам.

Результаты

В результате клинического и ЭКГ обследования 103 пациентов, у 26 (25%) выявлены 1 и более симптомов гликозидной интоксикации: снижение аппетита, тошнота, рвота, желудочковая экстрасистолия (табл. 2).

Исходя из результатов генотипирования по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1, пациенты были разделены на 3 группы:

- пациенты с генотипом CC— 20 человек;
- пациенты с генотипом CT— 55 человек;
- пациенты с генотипом TT— 28 человек.

Из 29 больных, у которых определяли концентрацию дигоксина в плазме крови, генотип CC имели 6 пациентов, CT — 18, TT — 5. Оказалось, что равновесная концентрация дигоксина в плазме крови была выше у пациентов с генотипом TT по сравнению с уровнями последнего у пациентов с генотипами CC и CT ($1,77 \pm 0,17$ vs $1,17 \pm 0,21$, $p=0,02$ и $1,77 \pm 0,17$ vs $1,37 \pm 0,30$, $p=0,037$ соответственно), рис.1. Можно предположить, что именно повышение концентрации дигоксина в крови пациентов приводило к гликозидной интоксикации. В силу того, что различия в концентрации дигоксина в крови между носителями CC и TT генотипов были статистически незначимыми ($p=0,23$), мы сочли целесообразным при расчете ассоциации полиморфного маркера C3435T объединить эти две группы и вести расчет против генотипа TT.

Из 75 больных с генотипами CC и CT у 10 выявлены симптомы гликозидной интоксикации, а у 65 не выявлены. Из 28 больных с генотипом TT у 16 выявлены симптомы гликозидной интоксикации, а у 12 не выявлены. Симптомы гликозидной интоксикации чаще выявлялась у пациентов с генотипом TT по сравнению с объединенной группой (генотипы CC и CT): 57% vs 13%, $p=0,0001$ (рис. 2).

Мы изучили возможность выявления генотипа TT по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1 для прогнозирования развития симптомов гликозидной интоксикации. Чувствительность выявления генотипа TT для прогнозирования развития симптомов гликозидной интоксикации составила 62%, специфичность— 84%. Прогностическая ценность (PPV) положительного результата в случае выявления генотипа TT составила 57%. Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV) в случае выявления генотипов CC или CT составила 87%; относительный риск (OR) при 95% доверительном интервале = 8,7 (3,2-23,6).

Обсуждение

В нашем исследовании мы чаще выявляли симптомы гликозидной интоксикации у больных с TT генотипом. Кроме того, именно у этой группы пациентов регистрировались более высокие значения равновесной концентрации дигоксина в плазме крови, по сравнению с пациентами с генотипами CC и CT. Связь между концентрацией дигоксина в плазме крови и возникновением симптомов гликозидной интоксикации очевидна и доказана в мультицентровом исследовании DIG [14]. Поэтому полученные нами результаты можно объяснить сниженной экспрессией гена MDR1 у пациентов с генотипом TT в кишеч-

Генотип по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1

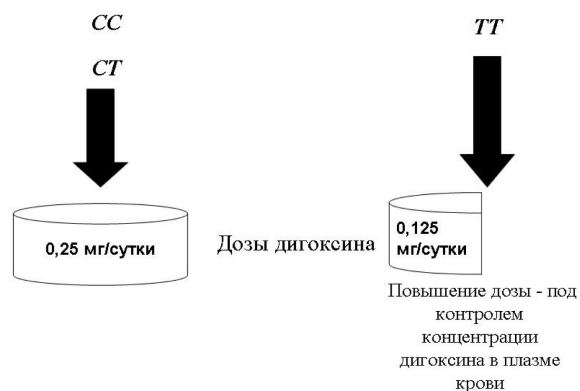


Рис. 3. Алгоритм выбора начальной дозы дигоксина в зависимости от результатов фармакогенетического исследования гликопротеина-Р: определение носительства генотипов по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1.

нике, печени и почках. Результаты нашего исследования согласуются с данными Hoffmeyer et al. (2000), Kurata et al. (2002), Verstuyft et al. (2003), которые, анализируя фармакокинетику дигоксина после его однократного приема в исследованиях на здоровых добровольцах, показали, что максимальная концентрация дигоксина в плазме крови, а также площадь под фармакокинетической кривой (AUC) достоверно больше у лиц с TT генотипом по сравнению с индивидуумами, имеющим CC генотип [6, 9, 15]. John et al. (2002) выявили более высокие значения минимальных равновесных концентраций ($C_{min,ss}$) дигоксина у здоровых добровольцев с TT генотипом при его длительном применении [7]. В отличие от перечисленных исследований, в нашей работе участвовали не здоровые добровольцы, а пациенты, длительно применяющие дигоксин, которым показан прием данного ЛС. Следует отметить, что наше исследование имело ряд ограничений, к числу которых можно

отнести следующее: было включено небольшое число пациентов с выявленными симптомами гликозидной интоксикации; не изучались другие полиморфные маркеры гена MDR1 — такие, как G2677T, G2677A, C1236T; концентрация дигоксина в плазме крови определялась не у всех пациентов. Тем не менее, на основании проведенного исследования нами был предложен алгоритм выбора начальной дозы дигоксина в зависимости от результатов фармакогенетического исследования гликопротеина-Р (рис.3). Однако для подтверждения предложенного гипотетического алгоритма необходимо проведение клинических исследований, в которых бы сравнивались эффективность и безопасность дигоксина при его назначении в средней терапевтической дозе (0,25 мг/сутки) и с учетом генотипа C3435T.

Выводы

1. У пациентов с генотипом TT по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1 отмечаются более высокие значения равновесной концентрации дигоксина в плазме крови по сравнению с пациентами с генотипами CT и CC.
2. У пациентов с генотипом TT по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1 по сравнению с пациентами, не несущими данный генотип (лица с генотипами CT и CC), чаще выявляются симптомы гликозидной интоксикации.
3. Выявление генотипа TT по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1 с чувствительностью 62% и специфичностью 84% позволяет прогнозировать развитие симптомов гликозидной интоксикации у пациентов, принимающих дигоксин в дозе 0,25 мг/сутки.
4. Фармакогенетическое исследование гликопротеина-Р в виде выявления носительства генотипов по полиморфному маркеру C3435T гена MDR1 является перспективным подходом к индивидуальной фармакотерапии дигоксином.

Литература

1. Кулес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты// М.: Реафарм, 2004, с. 113-120.
2. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике//М.: МИА, 2004. – 303 с.
3. Сидоренко Б.А., Преображенский Д.В., Шарошина И.А. и др. Место сердечных гликозидов в лечении хронической сердечной недостаточности. Часть I. Клиническая фармакология //Кардиология 2005; 4: 36-44.
4. Budowle B., Baechtel F.S. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism // Appl. Electrophor. - 1990. - Vol. 1. - P. 181-187.
5. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells// Pharmacogenetics. 2001 Jun;11(4):293-8.
6. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.
7. Johne A, Kopke K, Gerloff T, et al. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene//Clin. Pharmacol. Ther. 2002 Nov;72(5):584-94.
8. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy// Cancer Letters 234 (2006) 4–33.
9. Kurata Y, Ieiri I, Kimura M et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein// Clin. Pharmacol. Ther. 2002 Aug;72(2):209-19.
10. Marzolini, Paus, Buclin, Kim. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance// Clin. Pharmacol. Ther. 2004;75:1.
11. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M et al. Effect of the mutation (C3435T) at exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects // Clin. Pharmacol. Ther. 2002 Apr;71(4):297-303.
12. Siegmund M, Brinkmann U, Schaffeler E et al. Association of the P-glycoprotein transporter MDR1(C3435T) polymorphism with the susceptibility to renal epithelial tumors// J. Am. Soc. Nephrol. 2002 Jul;13(7):1847-54.
13. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM et al. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes// Fundam. Clin. Pharmacol. 2003 Aug;17(4):463-9.
14. Rathore S. S., Wang Y., Krumholz H. M. Sex-Based Differences in the Effect of Digoxin for the Treatment of Heart Failure// N. Engl. J. Med. 2002; 347:1403-1411, Oct 31, 2002.
15. Verstuyft C, Schwab M, Schaeffeler E et al. Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms// Eur. J. Clin. Pharmacol. 2003 Apr;58(12):809-12.

Abstract

The aim of the study was to investigate effects of glycoprotein P-coding gene MDR1 polymorphic marker C3435T on digitalis intoxication symptoms and plasma digoxin concentration increase in patient with persistent atrial fibrillation (AF). In 103 AF patients, genotyping by gene MDR1 polymorphic marker C3435T was performed in polymerase chain reaction (PCR). Balance plasma digoxin concentration was measured by polarizing fluoro-immune assay in 29 participants.

Results: Plasma digoxin concentration was higher in TT genotype patients, comparing to CC and CT genotype individuals ($1,77 \pm 0,17$ vs $1,17 \pm 0,21$, $p=0,02$; $1,77 \pm 0,17$ vs $1,37 \pm 0,30$, $p=0,037$, respectively). Glycoside intoxication syndromes were more prevalent in TT genotype than in CC and CT genotypes (57% vs 13%, $p=0,0001$, OR=6,4, CI 1,9-21,9). Therefore, TT genotype of glycoprotein P-coding gene MDR1 polymorphic marker C3435T, was associated more frequent symptoms of glycoside intoxication and higher plasma digoxin levels.

Keywords: persistent atrial fibrillation, digitalis intoxication symptoms, plasma digoxin concentration increase, effects of glycoprotein P-coding gene MDR1 polymorphic marker C3435T.

Поступила 10/07-2006