

AN IMPACT OF *CYP3A4 *1B* POLYMORPHISM ON RIFAMPICIN METABOLISM

H. O. Poludenko, P. B. Antonenko

Odesa National Medical University, Odesa

Abstract

Until now, the enzyme systems responsible for biotransformation of the antituberculous drug rifampicin remain unknown. The aim of research was an investigation of the candidate enzymes involved in the biotransformation of rifampicin using the computer system PASS and an experimental study concerning the effect of the polymorphism of the biotransformation gene *CYP3A4 *1B* on the level of rifampicin in the blood of patients with pulmonary tuberculosis (PTB).

The probability (Pa) of certain pharmacological activity and the effect on putative enzyme systems of the human body of rifampicin has been calculated by the PASS method. Polymerase chain reaction revealed the polymorphism of the *CYP3A4 *1B* gene among healthy volunteers as well as patients with PTB.

With a high degree of probability, according to PASS calculations, it was predicted that rifampicin undergo metabolism with the CYP3A4 enzyme - probability (Ra) were 0.891. According to the genotype *CYP3A4 *1B*, 95.3% of the healthy donors carried a homozygous wild-type gene (i.e., had high enzymatic activity) - AA genotype; the rest 4.7% - were carriers of the heterozygous AG genotype (moderate enzyme activity). The polymorphism of *CYP3A4 *1B* genotypes and alleles in the south-west of Ukraine was close to the results obtained in European countries. 91.4% and 8.6% of the patients with PTB had AA and AG genotype, correspondently. Thus, among the patients with PTB, the AG genotype was more often

observed than among healthy volunteers. There was no significant difference in rifampicin concentration among PTB-patients concerning *CYP3A4 * 1B* polymorphism.

Key words: *CYP3A4*, polymorphism, rifampicin, tuberculosis.

УДК [615+577.21]: 616-002.5: 615.28

ЗНАЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА *CYP3A4 * 1B* ДЛЯ МЕТАБОЛИЗМА РИФАМПИЦИНА

Г. О. Полуденко, П. Б. Антоненко

Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

Резюме

До сих пор неизвестны ферментные системы, ответственные за биотрансформацию противотуберкулезного препарата рифампицина. Целью нашей работы было исследование кандидатов-ферментов, участвующих в биотрансформации рифампицина, с использованием компьютерной системы PASS и экспериментальное исследование влияния полиморфизма биотрансформационного гена *CYP3A4 * 1B* на уровень рифампицина в крови пациентов с туберкулезом легких (ТЛ).

Метод PASS был рассчитан на вероятность (Ра) определенной фармакологической активности рифампицина и его влияние на предполагаемые ферментные системы человеческого организма. Полимеразная цепная реакция выявила полиморфизм гена *CYP3A4 * 1B* среди здоровых добровольцев, а также больных с ТЛ.

С высокой степенью вероятности, согласно расчетам PASS, было предсказано, что рифампицин подвергается метаболизму под действием фермента *CYP3A4* - вероятность (Ра) составила 0,891. Согласно генотипу *CYP3A4 * 1B*, 95,3% здоровых доноров переносили гомозиготный ген дикого типа (то есть имели высокую ферментативную активность) - генотип *AA*; остальные 4,7% - были носителями гетерозиготного *AG* генотипа (умеренная активность ферментов). Полиморфизм генотипов *CYP3A4 * 1B* и аллелей на юго-западе Украины близок к результатам, полученным в европейских странах. 91,4% и 8,6% пациентов с ТЛ имели генотип *AA* и *AG*, соответственно. Таким образом, генотип *AG* чаще наблюдался у пациентов с ТЛ,

чем у здоровых добровольцев. Не было существенной разницы в концентрации рифампицина у больных ТЛ в отношении полиморфизма *CYP3A4 * 1B*.

Ключевые слова: *CYP3A4*, полиморфизм, рифампицин, туберкулез.

ЗНАЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ *CYP3A4 * 1B* ДЛЯ МЕТАБОЛІЗМУ РИФПІЦИНУ

Г. О. Полуденко, П. Б. Антоненко

Одеський національний медичний університет, м.Одеса, Україна

Резюме

Дотепер невідомі ферментні системи, відповідальні за біотрансформацію протитуберкульозного препарату рифампіцину. Метою нашої роботи було дослідження кандидатів-ферментів, що беруть участь в біотрансформації рифампіцину, з використанням комп'ютерної системи PASS і експериментальне дослідження впливу поліморфізму біотрансформаційного гена *CYP3A4 * 1B* на рівень рифампіцину в крові пацієнтів з туберкульозом легень (ТЛ).

Метод PASS був розрахований на ймовірність (Ра) певної фармакологічної активності рифампіцину і його вплив на передбачувані ферментні системи людського організму. Полімеразна ланцюгова реакція виявила поліморфізм гена *CYP3A4 * 1B* серед здорових добровольців, а також хворих з ТЛ.

З високим ступенем ймовірності, згідно з розрахунками PASS, було передбачено, що рифампіцин піддається метаболізму під впливом ферменту *CYP3A4* - ймовірність (Ра) склала 0,891. Згідно генотипу *CYP3A4 * 1B*, 95,3% здорових донорів переносили гомозиготний ген дикого типу (тобто мали високу ферментативну активність) - генотип *AA*; інші 4,7% - були носіями гетерозиготного *AG* генотипу (помірна активність ферментів). Поліморфізм генотипів *CYP3A4 * 1B* і алелей на південному заході України близький до результатів, отриманих в європейських країнах. 91,4% і 8,6% пацієнтів з ТЛ мали генотип *AA* і *AG*, відповідно. Таким чином, генотип *AG* частіше спостерігався у пацієнтів з ТЛ, ніж у здорових добровольців. Не було суттєвої різниці в концентрації рифампіцину у хворих ТЛ стосовно поліморфізму *CYP3A4 * 1B*.

Ключові слова: *CYP3A4*, поліморфізм, рифампіцин, туберкульоз

Туберкульоз (ТБ) залишається важливою проблемою для країн Східної Європи. Згідно даних ВООЗ 85% випадків ТБ на Європейському континенті припадає на пострадянські країни [1]. ТБ в цих країнах відрізняється більш тяжким перебігом і несприятливими наслідками захворювання. Це пояснюється різними чинниками, в тому числі і відсутністю індивідуального підходу до фармакотерапії хворих. Раніше вже було доведено значення поліморфізму гену біотрансформації *CYP2C9* у хворих на ТБ на концентрацію протитуберкульозних препаратів в крові, на ефективність і безпечність лікування ТБ [2]. Відомо, що 25-деацетилрифампіцин є найбільш визнаним метаболітом найбільш ефективного протитуберкульозного антибіотика рифампіцину. Водночас малознаними залишаються ферментні системи, що відповідають за біотрансформацію рифампіцину. Згідно даних літератури фермент цитохром (CYP) 3A4/5 приймає участь у метаболізмі понад третини лікарських препаратів [3]. Активність ферменту у значній мірі визначається поліморфізмом відповідних генів *CYP3A4*.

Мета роботи - пошук ферментів-кандидатів, які приймають участь у біотрансформації рифампіцину, за допомогою комп'ютерної системи PASS та експериментальне дослідження впливу поліморфізму гену біотрансформації *CYP3A4*1B* на вміст рифампіцину в крові хворих на ТБ легень.

Матеріали та методи дослідження

Розрахунок біологічної активності рифампіцину за допомогою PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances – прогноз спектрів біологічної активності органічних сполук) було проведено у Відділі молекулярної структури і хемоінформації Фізико-хімічного інституту НАН України ім. Богатського в 2015 г. Метод дозволяє вираховувати ймовірність (P_a) певної фармакологічної активності, вплив на певні ферментні системи організму людини [4]. Показник P_a від 0,7 до 1,0 свідчить про високу ймовірність активності, що базується на спорідненості дослідженої молекули з вже відомими сполуками; показник від 0,5 до 0,7 також прогнозує достатню ймовірність активності, яка не пов'язана з вже існуючими препаратами.

За допомогою полімеразно-ланцюгової реакції було визначено поліморфізм гену *CYP3A4*1B* з використанням праймерів *CYP3A4FC* (wild type), *CYP3A4FV* (variant) та *CYP3A4R* [5]. Зразки крові були отримані у 127 здорових добровольців в Одеській обласній станції переливання крові і у 105 хворих на туберкульоз легень (ТБ), що вперше діагностовано, в 2014 р. Рівень ізоніазиду, рифампіцину, дієнових кон'югатів (ДК), каталази вивчали через 2, 4, 6 і 24 год після застосування препаратів у кожного

пацієнта. Всі хворі на туберкульоз отримували у складі комплексної терапії рифампіцин внутрішньо з розрахунку 8-12 маси тіла (загалом 450-600) на добу згідно наказу МОЗ України від 09.06.2006 р. № 384 [6].

Отримані результати та їх обговорення

Згідно отриманих даних, у рифампіцину крім відомих «протитуберкульозної», «протибактеріальної» активності високою є ймовірність «протирадикальної» (0,756) і «протицелюлозної» (0,661) активності (рис. 1). У рифампіцину прогнозується здатність пригнічувати ліпооксигеназу (0,551), що передбачає протиалергічну дію препарату. З високим ступенем ймовірності прогнозується метаболізм рифампіцину за участю ферменту CYP3A4 (0,891). Неочікувано виявився прогноз здатності рифампіцину пригнічувати активність CYP2C9 (0,544), хоча згідно літературних даних рифампіцин навпаки є індуктором CYP2C9. Можливо вказаний ефект має дозозалежну дію (наприклад, мала доза активує, а велика пригнічує активність ферменту).

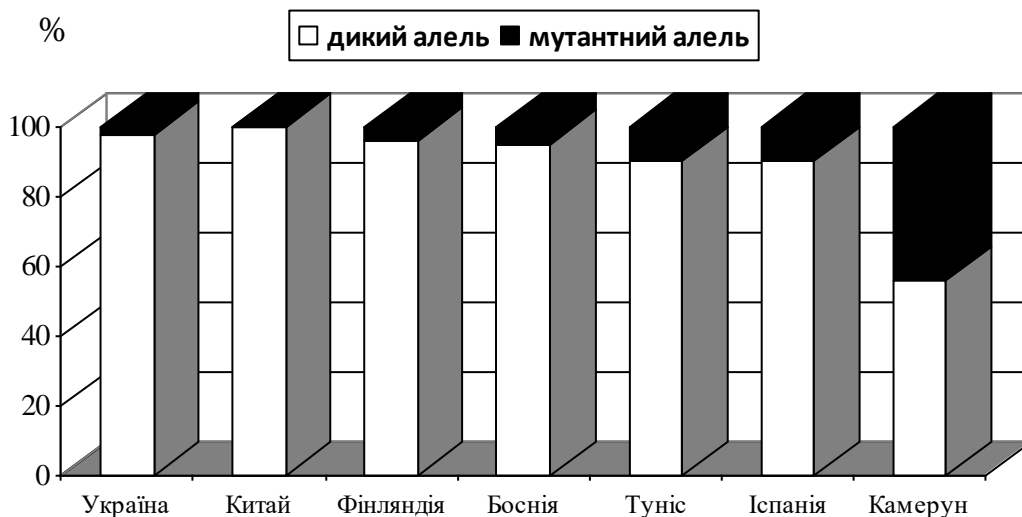


Рис. 1 Фармакологічні ефекти рифампіцину згідно PASS розрахунку

Відповідно до генотипу *CYP3A4*1B* зі 127 здорових донорів 121 індивід (95,3 %) був носієм гомозиготного дикого типу гену (тобто, мав високу ферментативну активність) - генотип *AA*; 6 осіб (4,7 %) досліджених були носіями гетерозиготного генотипу *AG* (помірна ферментативна активність). Значної різниці між отриманими даними і розрахованими за формулою Харді-Вайнберга не було. Поліморфізм генотипів і алелів *CYP3A4 *1B* на південному-заході України був близьким до результатів досліджень в країнах Європи.

Частота дикого алелю в Україні (97,6%) була близька до європейських країн, зокрема Фінляндії, Боснії (95-96%) (рис. 2). Дещо частіше дикий алель зустрічався на Далекому Сході (наприклад, в Китаї до 100%), рідше в країнах Північної Африки (Туніс) і Іспанії (коло 90%) [7-10]. Найбільш низькою є поширеність дикого алелю спостерігалась в країнах Західної Африки (Камерун). Поширеність мутантного алелю на південному заході України становила 2,4%, що було дещо нижче, ніж в Фінляндії і Боснії (коло 4-5%), Тунісі і Іспанії (9-10%). Мутантний алель був відсутній у мешканців Китаю, і в той же час, спостерігався у 56% представників Західної Африки.

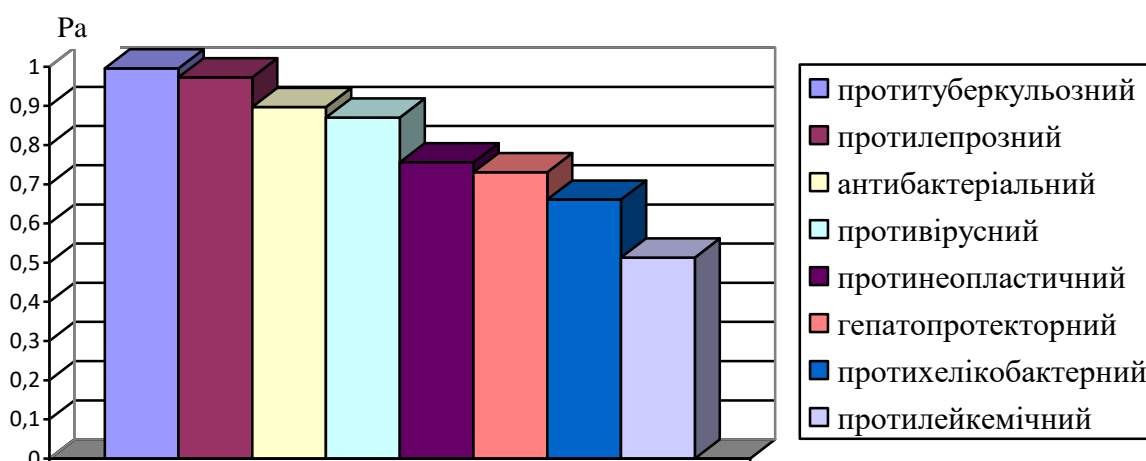


Рис. 2 Поширеність алелів *CYP3A4*1B* в різних країнах світу

Серед 105 хворих на туберкульоз легень генотип *AA* і *AG* мали 96 (91,4%) і 9 (8,6%) хворих відповідно. Не було виявлено жодного індивіда, який мав би комбінацію мутантних генів – *GG* (низька ферментативна активність). Таким чином, серед хворих на ТБ легень дещо частіше спостерігались носії генотипу *AG*, ніж серед здорових добровольців ($P > 0,05$).

Згідно отриманих даних достовірних відмінностей у концентрації рифампіцину у хворих на ТБ легень стосовно поліморфізму *CYP3A4 *1B* не було відзначено (табл. 1).

Водночас спостерігалась у носіїв генотипу *AA* спостерігалась дещо вище концентрація рифампіцину, ніж у носіїв генотипу *AG*. Можливо це пов'язано з відсутністю носіїв варіантного алелю в гомозиготному стані (*GG*), в якого зазвичай відзначається найнижча ферментативна активність. З іншого боку, отримані дані співпадають з літературними даними щодо невизначеної ролі поліморфізму гену *CYP3A4 *1B* для ферментативної активності *CYP3A4* [3]. Подальші дослідження мають

з'ясувати значення поліморфізму інших генів, таких як *CYP3A4 *1G* та **22* для виникнення туберкульозу і концентрації рифампіцину в крові хворих на ТБ.

Таблиця 1

Концентрація рифампіцину в крові хворих на туберкульоз з урахуванням поліморфізму *CYP3A4*1B*

Генотип <i>CYP3A4*1B</i>	Концентрація рифампіцину в крові (мг/кг) після введення (Mean±SED)			
	2 год.	4 год.	6 год.	24 год.
AA	11,79±2,53	16,25±3,92	11,01±2,04	7,26±1,60
AG	11,05±0,48	15,03±0,97	9,50±0,64	6,79±1,20

Висновки

1. З високим ступенем ймовірності згідно розрахунків PASS прогнозується метаболізм рифампіцину за участю ферменту *CYP3A4*.

2. Поліморфізм генотипів і алелів *CYP3A4 *1B* на південному-заході України був близьким до результатів досліджень в країнах Європи.

3. Серед хворих на ТБ легень дещо частіше спостерігались носії генотипу *AG*, ніж серед здорових добровольців

4. Відмінностей у концентрації рифампіцину у хворих на ТБ легень стосовно поліморфізму *CYP3A4 *1B* не було відзначено.

Перелік літератури:

1. Tuberculosis / WHO regional office for Europe; available <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/tuberculosis-read-more>

2. Antonenko P.B. Polymorphism of the biotransformation gene cytochrome P-450 2C9 in patients with tuberculosis / P.B. Antonenko, V.I. Kresyun // Molecular genetics, microbiology and virology. – 2014. – Vol. 29, N 3. – P. 110–114.

3. Wang D. The Making of a CYP3A Biomarker Panel for Guiding Drug Therapy / D. Wang, W. Sadee // J. Pers. Med. – 2012. – Vol. 2, N 4. – P. 175–191.

4. Filimonov D.A. PASS: Computerized prediction of biological activity spectra for chemical substances / D.A. Filimonov, V.V. Poroikov // Bioactive Compound Design: Possibilities for Industrial Use. – Oxford : BIOS Scientific Publishers, 1996. – P. 47-56.

5. Estrogen, Metabolism–Related Genes and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study / L.L. Marchand, T. Donlon, L.N. Kolonel [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2005. – Vol. 14, N 8. – P. 1998-2003.

6. Про затвердження протоколу надання медичної допомоги хворим на туберкульоз. – Київ, 2006. – 87 с.

7. Cytochrome and sulfotransferase gene variation in north African populations / A. Fernández-Santander, A. Novillo, M. Gaibar [et al.] // *Pharmacogenomics.* – 2016. – Vol. 17, N 13. – P. 1415-1423.

8. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations / O.D. Reyes-Hernández, I. Lares-Asseff, M. Sosa-Macias [et al.] // *Pharmacology.* – 2008. – Vol. 81. – P. 97–103.

9. Gervasini G. Differences in CYP3A5 *3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and other Caucasian populations / G. Gervasini, S. Vizcaino, C. Gasiba // *Ther. Drug Monit.* – 2005. – Vol. 27. – P. 819–821.

10. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: Evidence for an allelic variant with altered catalytic activity / F. Sata, A. Sapone, G. Elizondo [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2000. – Vol. 67. – P. 48–56.

References

1. Tuberculosis / WHO regional office for Europe; available <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/tuberculosis-read-more>

2. Antonenko P.B. Polymorphism of the biotransformation gene cytochrome P-450 2C9 in patients with tuberculosis / P.B. Antonenko, V.I. Kresyun // *Molecular genetics, microbiology and virology.* – 2014. – Vol. 29, N 3. – P. 110–114.

3. Wang D. The Making of a CYP3A Biomarker Panel for Guiding Drug Therapy / D. Wang, W. Sadee // *J. Pers. Med.* – 2012. – Vol. 2, N 4. – P. 175–191.

4. Filimonov D.A. PASS: Computerized prediction of biological activity spectra for chemical substances / D.A. Filimonov, V.V. Poroikov // *Bioactive Compound Design: Possibilities for Industrial Use.* – Oxford : BIOS Scientific Publishers, 1996. – P. 47-56.

5. Estrogen, Metabolism–Related Genes and Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study / L.L. Marchand, T. Donlon, L.N. Kolonel [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2005. – Vol. 14, N 8. – P. 1998-2003.

6. Order from Ministry of Healthcare of Ukraine № 384 since 09.06.2006. “*Pro zatverdjenya protocolu nadanya medichnoy dopomogu chvorum na tuberculos*” ["About approval of the protocol of medical aid for tuberculosis patients"]. - Kyiv, 2006. – 87 p (Ukr.).
7. Cytochrome and sulfotransferase gene variation in north African populations / A. Fernández-Santander, A. Novillo, M. Gaibar [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2016. – Vol. 17, N 13. – P. 1415-1423.
8. A comparative study of CYP3A4 polymorphisms in Mexican Amerindian and Mestizo populations / O.D. Reyes-Hernández, I. Lares-Asseff, M. Sosa-Macias [et al.] // *Pharmacology*. – 2008. – Vol. 81. – P. 97–103.
9. Gervasini G. Differences in CYP3A5 *3 genotype distribution and combinations with other polymorphisms between Spaniards and other Caucasian populations / G. Gervasini, S. Vizcaino, C. Gasiba // *Ther. Drug Monit.* – 2005. – Vol. 27. – P. 819–821.
10. CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: Evidence for an allelic variant with altered catalytic activity / F. Sata, A. Sapone, G. Elizondo [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2000. – Vol. 67. – P. 48–56.