Казахский национальный университет имени аль-Фараби

Факультет биологии и биотехнологии

Кафедра молекулярной биологии и генетики

Дисциплина «Фармакогенетика»

Лекция 7

Роль полиморфных вариантов генов ферментов II фазы биотрансформации

Глюкуронирование (UGT1A1), N-ацетилирование (NAT2), метилирование тиопуринов (TPMT/NUDT15), сульфатирование (SULT), EPHX1 и GST

Автор: Амирова Айгуль Кузембаевна, к.б.н., ассоциированный профессор
Электронная почта: aigul_amir@mail.ru

Цель и структура лекции

Цель: изучить генетический полиморфизм ферментов синтетической конъюгации II фазы и способы предотвращения лекарственной токсичности

01 Принципы II фазы конъюгации

Превращение липофильных метаболитов в водорастворимые конъюгаты с помощью кофакторов

02 УДФ-глюкуронилтрансфераза (UGT1A1)

Синдромы Жильбера и Криглера–Найяра, иринотекан (SN-38) и атазанавир

03 N-ацетилтрансфераза 2 (NAT2)

Быстрые и медленные ацетиляторы: нейротоксичность и гепатит на изониазиде, волчанка на гидралазине

04 Тиопурины: TPMT и NUDT15

Двойной контроль безопасности 6-меркаптопурина и азатиоприна в гематологии

05 Сульфотрансферазы и EPHX1

Роль SULT1A1/SULT1A3 (фенолы, катехоламины) и эпоксидгидролазы в детоксикации

06 Глутатион-S-трансферазы (GST)

Делеционные варианты GSTM1/GSTT1, защита от перекисного стресса и канцерогенов

Синтетическая детоксикация: классификация ферментов II фазы

Основные классы трансфераз конъюгации, эндогенные доноры функциональных групп и маркерные субстраты

Реакция конъюгации	Фермент (Ген)	Донор группы (Кофактор)	Эндогенные и лекарственные субстраты
Глюкуронирование (~35% II фазы)	УДФ-ГТ (UGT1A1, UGT2B7)	УДФ-глюкуроновая кислота (UDPGA)	Билирубин, SN-38 (иринотекан), морфин, парацетамол, ламотриджин
N-Ацетилирование	NAT2 (локус 8p22), NAT1	Ацетил-КоА	Изониазид, сульфадимидин, дапсон, прокаинамид, гидралазин
S- и O-Метилирование	TPMT, COMT (+ NUDT15)	S-аденозилметионин (SAM)	6-меркаптопурин, азатиоприн, тиогуанин (TPMT); дофамин, леводопа (COMT)
Сульфатирование	SULT1A1, SULT1A3	ФАФС (PAPS)	Фенолы, стероидные и тиреоидные гормоны, дофамин, парацетамол, миноксидил
Глутатионовая конъюгация и гидролиз эпоксидов	GSTM1, GSTT1, GSTP1; EPHX1	Восстановленный глутатион (GSH) / H_2O	Этакриновая кислота, цисплатин, бусульфан, NAPQI, ареноксиды (фенитоин)

Фармакогенетика УДФ-глюкуронилтрансферазы (ген UGT1A1, 2q37.1)

Физиологическая конъюгация билирубина и клинические формы наследственной гипербилирубинемии

Изофермент UGT1A1 в печени

- Единственный фермент человека, эффективно переводящий токсичный непрямой (неконъюгированный) билирубин в прямой водорастворимый глюкуронид
- Инактивирует стероиды, фенолы, морфин (UGT2B7 → морфин-6-глюкуронид активен!) и иринотекан

Аллели UGT1A1*28 и UGT1A1*6

- Доброкачественное снижение активности UGT1A1 до 30% от нормы; частота 5–15% в популяции
- *28: вставка TA в TATA-боксе промотора A(TA)7TAA (Европа/Казахстан); *6: замена Gly71Arg в экзоне 1 (Азия/Казахстан)

Тяжелые мутации экзонов UGT1A1

- Тип I (аутосомно-рецессивный): полное отсутствие активности → ядерная желтуха новорожденных, необходимость фототерапии и пересадки печени
- Тип II (синдром Ариаса): активность <10%, частично поддается индукции фермента фенобарбиталом через ядерный рецептор CAR

Руководство CPIC (Уровень 1A)

- Ингибитор протеазы ВИЧ атазанавир конкурентно угнетает UGT1A1; у гомозигот *28/*28 и *6/*6 вызывает тяжелую желтуху и камни в почках
- Пациентам с генотипом PM UGT1A1 рекомендуют замену атазанавира на альтернативный АРВ-препарат

Иринотекан и UGT1A1: механизм отсроченной нейтропении и диареи

Почему носители аллелей *28/*28, *6/*6 и *6/*28 нуждаются в снижении стартовой дозы химиотерапии

1. Пролекарство CPT-11

Иринотекан вводится в/в при колоректальном раке и раке желудка/поджелудочной железы

2. Активация в SN-38

Карбоксилэстеразы печени (CES1/2) отщепляют группу с ростом активности в 100–1000 раз

3. Глюкуронирование UGT1A1

В норме UGT1A1 переводит цитотоксичный SN-38 в неактивный конъюгат SN-38G

4. Энтерогепатическая рециркуляция

При дефекте *28/*28 SN-38 не инактивируется, повреждая крипты кишечника (диарея) и костный мозг

5. Коррекция дозы (DPWG / FDA)

Снижение начальной дозы на 25–30% у гомозигот *28/*28 (и компаундов *6/*28)

При дозах иринотекана ≥180 мг/м² предварительное генотипирование обоих вариантов — UGT1A1*28 и UGT1A1*6 — предотвращает тяжелую фебрильную нейтропению.

Фармакогенетика N-ацетилтрансферазы 2 (ген NAT2, 8p22)

Бимодальное распределение скорости ацетилирования изониазида, сульфаниламидов, дапсона, гидралазина и прокаинамида

Молекулярная генетика и фенотипирование NAT2

- Ген локализован на 8p22 (без интронов в кодирующей части); описано свыше 25 аллелей (*4 — дикий тип «быстрого ацетилятора»)
- Медленные аллели: NAT2*5 (c.341T>C), *6 (c.590G>A), *7 (c.857G>A); гомо-/компаунд-гетерозиготы несут фенотип медленного ацетилятора
- Кинетическое различие: период полувыведения (T1/2) изониазида у медленных ацетиляторов составляет ~3 ч, у быстрых — ~1 ч
- Классическое фенотипирование: прием сульфадимидина, дапсона или кофеина с расчетом отношения ацетилированного метаболита в моче

↔

Клинические осложнения у медленных и быстрых ацетиляторов

- У медленных ацетиляторов на изониазиде: накопление гидразина → лекарственный гепатит (DILI) в 3–4 раза чаще
- Периферические полиневриты у медленных ацетиляторов: избыток изониазида связывает и тормозит переход пиридоксина (витамина B6) в активный кофермент
- Прокаинамид и гидралазин у медленных ацетиляторов вызывают лекарственную красную волчанку и поражение печени
- У быстрых ацетиляторов (*4/*4): быстрое разрушение изониазида → риск неэффективности терапии туберкулеза (открытое бактериовыделение) и МЛУ

Межэтническая вариабельность «медленных» ацетиляторов NAT2 и дефицита UGT1A1

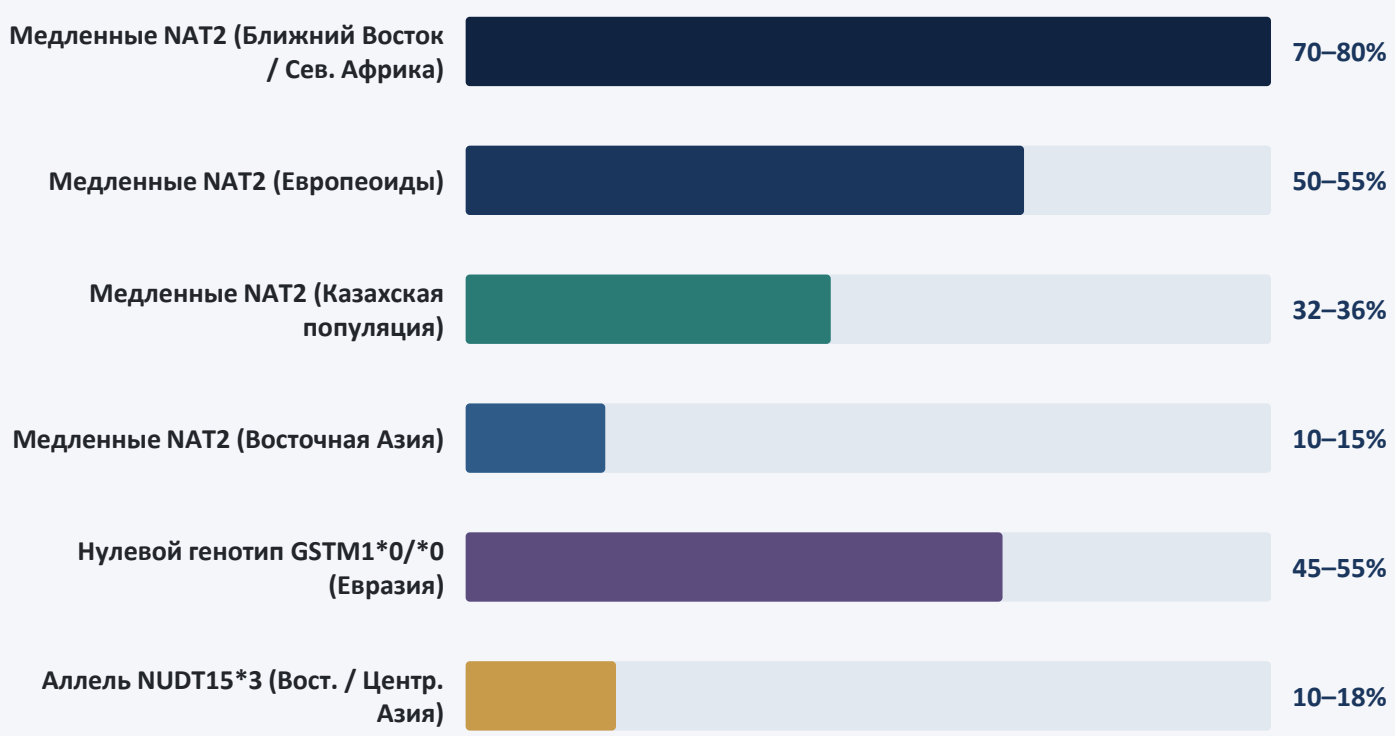
Доля лиц с медленным фенотипом ацетилирования (%) и частоты ключевых маркеров II фазы по этногеографическим группам

3 ч vs 1 ч
T1/2 изониазида (PM vs быстрый)

10–15%
Медленные ацетиляторы (Вост. Азия)

50–80%
Медленные (Европа / Бл. Восток)

Распространенность медленного фенотипа NAT2 и аллелей II фазы (%)



Внедрение во фтизиатрии и онкологии

- РКИ Azuma et al.: коррекция дозы изониазида по NAT2 (2,5 мг/кг PM; 5 мг/кг IM; 7,5 мг/кг быстрые) снизила как гепатит, так и неудачу терапии
- Наличие медленных ацетиляторов NAT2 также ассоциировано с риском рака мочевого пузыря при контакте с ароматическими аминами красителей

Метаболизм тиопуринов: двойной генетический блок TPMT и NUDT15

Почему перед назначением 6-меркаптопурина, азатиоприна и тиогуанина необходимо тестировать два гена сразу (CPIC 1A)

1. Пролекарство (6-МП / АЗА)

Применяются при ОЛЛ у детей и взрослых, лимфомах, ВЗК (болезнь Крона) и СКВ

2. Инактивация TPMT

Тиопурин-S-метилтрансфераза (6p22.3) метилирует 6-МП в неактивный 6-метил-МП

3. Образование 6-TGTP

При дефиците TPMT (*2, *3A, *3C) избыток 6-МП превращается в токсичные трифосфаты 6-TGN

4. Защита NUDT15

Фосфатаза NUDT15 (13q14.2) обезвреживает 6-TGTP, не давая ему встроиться в ДНК лейкоцитов

5. Аплазия костного мозга

Дефицит TPMT (доминирует в Европе) или NUDT15*3 (в Азии) ведет к фатальной панцитопении

В азиатских и центральноазиатских популяциях главной причиной лейкопении на тиопуринах является именно аллель NUDT15*3 (p.Arg139Cys).

Персонализация дозы 6-меркаптопурина и азатиоприна по генотипу TPMT и NUDT15

Тримодальное распределение активности (кодоминирование) и алгоритмы коррекции стартовой дозы (CPIC 2018–2026)

Фенотип пациента	Генотипы (TPMT / NUDT15)	Уровень 6-TGN	Рекомендуемая тактика дозирования
Нормальный метаболизатор (NM)	*1/*1 по обоим генам (~85–90%)	Терапевтический	Стандартная доза (6-МП 75 мг/м²/сут; азатиоприн 2–3 мг/кг/сут)
Промежуточный (IM)	Гетерозигота (*1/*3A TPMT или *1/*3 NUDT15)	Повышен на 50–100%	Снижение стартовой дозы до 30–80% от стандартной, контроль ОАК
Двойной гетерозигот (IM+IM)	*1/*дефектный сразу по TPMT и по NUDT15	Высокий риск	Дополнительное снижение стартовой дозы до 20–50% от нормы
Медленный метаболизатор (PM)	Гомозигота (*3A/*3A TPMT или *3/*3 NUDT15, ~0,3–1%)	Критический (миелотоксичность)	При неопухолевых болезнях — отмена и альтернатива; при ОЛЛ — 10% дозы 3 раза/нед

Полиморфизм сульфотрансфераз (SULT) и эпоксидгидролазы (EPHX1 / EPAX)

Роль конъюгации с сульфатом и гидратации реактивных эпоксидов в биотрансформации лекарств и токсикантов

Сульфотрансферазы (SULT1A1, SULT1A3)

- Переносят сульфогруппу от кофактора ФАФС (PAPS) на экзогенные фенолы, стероидные/тиреоидные гормоны, парацетамол и метаболиты тамоксифена
- Изоформа SULT1A3 в кишечнике и мозге сульфатирует эндогенные катехоламины (дофамин, серотонин, норадреналин)
- Полиморфизм SULT1A1*2 (c.638G>A, Arg213His) снижает термостабильность фермента; также описаны вариации числа копий гена (CNV 1–5)
- Биоактивация: миноксидил является пролекарством, требующим сульфатирования через SULT1A1 в волосяных фолликулах для стимуляции роста волос

↔

Эпоксидгидролаза (EPHX1 / EPAX, 1q42.1)

- Катализирует реакцию водной гидратации — присоединение H_2O к высокореакционным электрофильным ареноксидам и эпоксидам (образованным CYP450) с превращением в безопасные дигидродиолы
- Ключевые полиморфизмы: экзон 3 c.337T>C (Tyr113His — «медленный» аллель, активность снижена на 40–50%) и экзон 4 c.416A>G (His139Arg — «быстрый» аллель)
- При снижении активности EPHX1 (<30% нормы) эпоксиды ковалентно связываются с белками и ДНК, вызывая мутагенез и канцерогенез
- Клиника: генотип Tyr113His повышает риск синдрома гиперчувствительности и тератогенности при приеме противоэпилептических ЛС (фенитоин, карбамазепин) и дозирования варфарина

Семейство глутатион-S-трансфераз (GST): антиоксидантный щит клетки

Генетические делеции GSTM1 и GSTT1 («нулевые генотипы») и их влияние на переносимость химио- и туберкулостатиков

Конъюгация электрофилов с GSH

- Ферменты присоединяют восстановленный глутатион (GSH) к электрофильным атомам ксенобиотиков (этакриновая кислота, алкилирующие агенты)
- Защищают липиды мембран и ДНК от перекисного окисления, а гепатоциты — от реактивного метаболита парацетамола (NAPQI)

Нулевой генотип у 40–55% людей

- Полная гомозиготная делеция гена GSTM1 ведет к абсолютному отсутствию белкового продукта
- Ассоциирован с повышенным риском гепатотоксичности (DILI) при терапии туберкулеза, нейротоксичности и некоторых солидных опухолей

Нулевой генотип (15–50% в мире)

- Частота гомозиготной делеции GSTT1*0/*0 составляет ~15–20% у европеоидов и 40–50% в Восточной Азии
- Двойная делеция (GSTM1-null + GSTT1-null) многократно увеличивает частоту лекарственного поражения печени (DILI) и врожденного риска

Модуляция ответа на цитостатики

- Замена p.Ile105Val (rs1695) в активном центре GSTP1 влияет на метаболизм препаратов платины (цисплатин, оксалиплатин) и циклофосфамида
- Промоторный аллель GSTA1*B замедляет клиренс бусульфана при трансплантации костного мозга (риск веноокклюзионной болезни печени)

Баланс фаз конъюгации и окисления: метаболизм парацетамола

Почему передозировка или истощение глутатиона (GSH) превращает безопасный анальгетик в гепатотоксин

55–60% Глюкуронирование (UGT1A1 / 1A6)

- Главный безопасный путь выведения терапевтических доз у взрослых в виде водорастворимого глюкуронида
- У пациентов с синдромом Жильбера (*28/*28) емкость этого пути частично ограничена

30–35% Сульфатирование (SULT1A1 / 1A3)

- Быстро насыщаемый путь (зависит от запаса кофактора ФАФС), преобладающий у новорожденных и детей
- Совместное глюкуронирование и сульфатирование обезвреживают >90% обычной дозы

5–10% Окисление I фазы (CYP2E1)

- Образует высокотоксичный электрофильный метаболит N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI)
- Алкоголь и изониазид индуцируют CYP2E1, резко увеличивая долю NAPQI

АНТИДОТ Детоксикация GST + N-ацетилцистеин

- В норме глутатион (GSH) и ферменты GST мгновенно связывают NAPQI в меркаптуровую кислоту
- При делециях GSTM1/T1 и истощении GSH NAPQI разрушает митохондрии гепатоцитов; антидот N-ацетилцистеин восполняет запасы GSH

Онтогенетическая и гормональная регуляция ферментов II фазы

Возрастные особенности активности трансфераз у новорожденных (синдром «серого ребенка») и при беременности

Незрелость систем глюкуронирования в неонатологии

- При рождении экспрессия и активность UGT1A1 и UGT2B7 составляют <1–10% от уровня взрослого (дозревают к 3–6 месяцам жизни)
- Историческая трагедия педиатрии: назначение хлорамфеникола (левомицетина) недоношенным вызвало «синдром серого ребенка» (цианоз, коллапс) из-за неспособности конъюгации
- Морфин в неонатологии также требует кратно сниженных доз из-за незрелости UGT2B7
- Физиологическая компенсация: сульфотрансферазы (SULT) активны уже у плода, принимая на себя конъюгацию гормонов и парацетамола

↔

Индукция UGT во время беременности

- Во II и III триместрах беременности высокий уровень эстрогенов через рецептор ERα активирует промотор гена UGT1A4 в печени матери
- В результате клиренс противоэпилептического препарата ламотриджина возрастает на 100–200%, а его концентрация в крови резко падает
- Без своевременного мониторинга (ТЛМ) и планового повышения дозы у беременной возрастает риск возвращения судорожных приступов
- Сразу после родов экспрессия UGT1A4 возвращается к исходной за 1–2 недели — требуется быстрая обратная редукция дозы во избежание интоксикации

Сводный алгоритм клинического применения тестов II фазы биотрансформации

Практические рекомендации международных консорциумов (CPIC / DPWG / FDA)

Ген II фазы	Ключевые аллели риска	Лекарственный препарат	Клинический риск и действие
UGT1A1	*28/*28, *6/*6, *6/*28	Иринотекан / Атазанавир	Нейтропения и диарея (снизить дозу CPT-11 на 25–30%); желтуха (заменить атазанавир)
NAT2	*5/*5, *5/*6, *6/*7 (медл.)	Изониазид, гидралазин	Токсический гепатит и полинейропатия (снизить дозу до 2,5 мг/кг + B6)
TPMT + NUDT15	*2, *3A, *3C (TPMT); *3 (NUDT15)	6-МП, азатиоприн, тиогуанин	Фатальная панцитопения → редукция до 30–80% у IM и до 10% или замена у PM
GSTM1 / GSTT1	Двойной нулевой (*0/*0)	ПТ-терапия (туберкулез), цисплатин	Усиленный мониторинг трансаминаз (АЛТ/АСТ) при профилактике DILI
EPHX1 / SULT1A1	Tyr113His / *2 (Arg213His)	Карбамазепин / Миноксидил	Токсичность ареноксидов; вариабельный ответ миноксидила в трихологии

Контрольные вопросы и ключевые выводы

Закрепление материала лекции 7

? Контрольные вопросы

- 1. Назовите основные реакции II фазы биотрансформации и эндогенные кофакторы, участвующие в конъюгации.
- 2. Какие молекулярные дефекты лежат в основе аллелей UGT1A1*28 и UGT1A1*6? Как они влияют на терапию иринотеканом и атазанавиром?
- 3. Объясните фармакокинетические и клинические различия между «быстрыми» и «медленными» ацетиляторами NAT2 при лечении изониазидом.
- 4. Почему для безопасного назначения тиопуринов (азатиоприна, 6-МП) у пациентов Азии и РК важно тестировать не только TPMT, но и NUDT15?
- 5. Какова роль глутатион-S-трансфераз (GSTM1/GSTT1), сульфотрансфераз (SULT) и эпоксидгидролазы (EPHX1) в защите от ксенобиотиков?

✓ Ключевые выводы

- Реакции II фазы (UGT, NAT2, TPMT, SULT, GST) окончательно переводят липофильные метаболиты в экскретируемую форму.
- Тестирование UGT1A1 (*28 и *6) предупреждает тяжелую нейтропению на иринотекане и лекарственную желтуху на атазанавире.
- Сочетанное генотипирование TPMT и NUDT15 практически полностью исключает ятрогенную миелосупрессию при приеме тиопуринов.
- Фенотип медленных ацетиляторов NAT2 и нулевые генотипы GSTM1/T1 — важнейшие предикторы лекарственного гепатита на изониазиде.

Рекомендуемая литература

Источники по фармакогенетике ферментов II фазы конъюгации

1 Основная литература

- 1. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: учебное пособие. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021.
- 2. Relling M.V. et al. CPIC Guideline for Thiopurine Dosing Based on TPMT and NUDT15 Genotypes: 2018 Update // Clinical Pharmacology & Therapeutics. — 2019. — Vol. 105. — P. 1095–1105.
- 3. Gammal R.S. et al. CPIC Guideline for UGT1A1 and Atazanavir Prescribing // Clinical Pharmacology & Therapeutics. — 2016. — Vol. 99. — P. 363–369.
- 4. Azuma J. et al. NAT2 genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure // Eur. J. Clin. Pharmacol. — 2013.

2 Дополнительная литература и ресурсы

- 1. Hulshof E.C. et al. DPWG Guideline for UGT1A1 and irinotecan // European Journal of Human Genetics. — 2023.
- 2. База номенклатуры аллелей UGT: https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/
- 3. База номенклатуры NAT (Database of Arylamine N-Acetyltransferases): http://nat.mbg.duth.gr
- 4. PharmGKB Thiopurine & Irinotecan Pathways: https://www.pharmgkb.org/pathways

Благодарю за внимание! • Кафедра молекулярной биологии и генетики КазНУ