Казахский национальный университет имени аль-Фараби

Факультет биологии и биотехнологии

Кафедра молекулярной биологии и генетики

Дисциплина «Фармакогенетика»

Лекция 2

Фармакогенетические исследования. Фазы биотрансформации лекарственных средств

Пути транспорта и ADME, I и II фазы метаболизма ксенобиотиков, методы фенотипирования и генотипирования, фенотипы метаболизаторов

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

Цель и структура лекции

Цель: изучить этапы фармакокинетики (ADME), двухфазную систему биотрансформации и подходы к фено- и генотипированию

01 Механизмы всасывания ЛС

Пассивная и облегченная диффузия, фильтрация, активный транспорт и пиноцитоз

02 Распределение и выведение

Связывание с альбуминами плазмы, тканевые депо, эффект первого прохождения и клиренс

03 I фаза биотрансформации

Реакции окисления, восстановления и гидролиза; образование активных и токсичных метаболитов

04 II фаза биотрансформации

Реакции конъюгации: глюкуронирование, ацетилирование, сульфатирование и метилирование

05 Фено- и генотипирование

Маркерные субстраты, метаболическое отношение (MR) и ПЦР-диагностика аллелей

06 Фенотипы метаболизма

Экстенсивные (NM), медленные (PM), промежуточные (IM) и ультрабыстрые (UM) метаболизаторы

Основные этапы фармакокинетики лекарственного средства (ADME)

Последовательность процессов от поступления препарата в организм до его окончательной элиминации

1 1. Всасывание (Absorption)

Прохождение через слизистую ЖКТ, кожу или капилляры в системный кровоток

2 2. Распределение (Distribution)

Обратимое связывание с белками плазмы и проникновение в органы-мишени через барьеры

3 3. Метаболизм (Metabolism)

Химическое превращение в печени и кишечнике под действием ферментов I и II фаз

4 4. Выведение (Excretion)

Экскреция исходного вещества и полярных метаболитов почками, с желчью и легкими

Каждый этап ADME контролируется полиморфными генами мембранных транспортеров и ферментов биотрансформации.

Основные механизмы всасывания и трансмембранного переноса ЛС

Физико-химические и белок-опосредованные пути преодоления клеточных мембран

Механизм переноса	Энергозатраты (АТФ)	Направление по градиенту	Свойства ЛС и генетический контроль
Пассивная диффузия	Без затрат АТФ	По градиенту концентрации	Липофильные неионизированные молекулы; скорость прямо пропорциональна площади и pKa
Фильтрация через поры	Без затрат АТФ	По градиенту давления/конц.	Мелкие гидрофильные молекулы и ионы (<100–200 Да) через межклеточные контакты
Облегченная диффузия	Без затрат АТФ	По градиенту концентрации	При участии специфических белков-переносчиков SLC (возможно насыщение)
Активный транспорт	Затрата энергии АТФ / ионных градиентов	Возможен против градиента	Полиморфные транспортеры ABC (P-gp) и SLC (OATP, OCT); конкурентное ингибирование
Пиноцитоз (эндоцитоз)	Затрата энергии АТФ	Против градиента	Крупные полипептиды, белки (инсулин, моноклональные антитела) и жирорастворимые витамины

Распределение в тканях и пресистемный метаболизм ЛС

Факторы, определяющие долю свободной активной фракции и оральную биодоступность

Связывание с белками крови и распределение

- Кислотные препараты связываются преимущественно с альбумином плазмы (варфарин до 99%)
- Основные липофильные ЛС связываются с α1-кислым гликопротеином и липопротеидами
- Фармакологически активна только свободная (несвязанная) фракция, способная проникать в ткани
- Гематоэнцефалический и плацентарный барьеры защищены насосами оттока (P-gp, BCRP)

↔

Пресистемный метаболизм (First-Pass Effect)

- При пероральном приеме ЛС из кишечника поступает по воротной вене сначала в печень
- Значительная часть дозы биотрансформируется в энтероцитах (CYP3A4) и гепатоцитах до системного кровотока
- Снижает биодоступность пропранолола, верапамила, лидокаина, нитроглицерина и морфина
- При циррозе печени или генетическом дефиците ферментов биодоступность таких ЛС резко возрастает

Функциональные исходы биотрансформации ксенобиотиков

Превращение лекарственных веществ в печени не всегда означает их немедленную инактивацию

1 Детоксикация и инактивация

- Классический исход для большинства активных лекарств
- Увеличение полярности и потеря сродства к рецептору обеспечивают быструю экскрецию с мочой

2 Биоактивация пролекарств

- Неактивное исходное вещество превращается ферментами в активный метаболит
- Примеры: эналаприл → эналаприлат, клопидогрел → активный тиол, кодеин → морфин, тамоксифен → эндоксифен

3 Образование активных метаболитов

- Исходный препарат активен, но его метаболиты сохраняют или усиливают фармакологический эффект
- Пример: диазепам → дезметилдиазепам и оксазепам (удлинение времени действия препарата)

4 Токсификация (летальный синтез)

- Образование реактивных электрофильных метаболитов, в десятки раз токсичнее исходного ЛС
- Пример: окисление парацетамола через CYP2E1 с образованием гепатотоксичного NAPQI

Двухфазная концепция биотрансформации по Р. Уильямсу (1959)

Последовательная функционализация (I фаза) и синтетическая конъюгация (II фаза) молекул ЛС

I фаза (Функционализация / несинтетическая)

- Включает реакции окисления (CYP450, ФМО, МАО), восстановления и гидролиза (эстеразы)
- В молекулу вводятся или демаскируются полярные группы: -OH, -NH_2, -SH, -COOH
- Протекает преимущественно в мембранах гладкого эндоплазматического ретикулума гепатоцитов
- Подготавливает липофильный субстрат к ферментативному присоединению конъюгата

↔

II фаза (Конъюгация / синтетическая)

- Присоединение эндогенных полярных молекул к функциональной группе метаболита I фазы
- Основные пути: глюкуронирование (UGT), ацетилирование (NAT), метилирование (TPMT, COMT), сульфатирование (SULT), конъюгация с глутатионом (GST)
- Резко увеличивает молекулярную массу и водорастворимость конъюгата
- Практически всегда приводит к инактивации и быстрому выведению почками или с желчью

Основные реакции I и II фаз биотрансформации ЛС

Биохимическая классификация ферментов и кофакторов превращения лекарственных соединений

Фаза	Тип реакции	Основные ферменты	Примеры лекарственных субстратов
I фаза	Окисление (гидроксилирование, деалкилирование)	Монооксигеназы CYP450, алкогольдегидрогеназа	Варфарин, кодеин, омепразол, метопролол, этанол
I фаза	Восстановление (нитро-, азо- и N-оксидных групп)	Нитро- и азоредуктазы микросом и микробиоты	Хлорамфеникол (левомицетин), пронтозил, преднизон
I фаза	Гидролиз (эфирные и амидные связи)	Эстеразы (бутирилхолинэстераза), амидазы, пептидазы	Суксаметоний, новокаин, ацетилсалициловая кислота
II фаза	Глюкуронирование и сульфатирование	UGT (УДФ-глюкуронилтрансфераза), SULT	Билирубин, SN-38 (иринотекан), морфин, парацетамол
II фаза	Ацетилирование, метилирование и GSH-конъюгация	NAT2, TPMT, COMT, глутатион-S-трансферазы (GST)	Изониазид, 6-меркаптопурин, дофамин, эпоксиды, NAPQI

Методы фармакогенетических исследований: фенотипирование vs генотипирование

Два взаимодополняющих подхода к оценке индивидуальной активности систем биотрансформации

Фармакокинетическое фенотипирование

- Прием тест-препарата (маркерного субстрата) или коктейля субстратов (например, кофеин, лозартан, омепразол, декстрометорфан)
- Измерение отношения концентраций метаболита и исходного ЛС в крови/моче (метаболическое отношение MR)
- Плюс: отражает реальную текущую активность с учетом ингибиторов, диеты и болезней печени (феноконверсии)
- Минус: инвазивность, зависимость от функции почек, риск НЛР от тест-дозы

↔

Молекулярно-генетическое генотипирование

- Выявление полиморфных аллелей ДНК в крови или буккальном соскобе (ПЦР-РВ, микрочипы, секвенирование)
- Плюс: не требует приема лекарств, стабильно всю жизнь, применимо до начала терапии и у тяжелых больных
- Позволяет прогнозировать фенотип по номенклатуре звездных аллелей (PharmVar / CPIC)
- Ограничение: не выявляет внешние причины феноконверсии (лекарственные ингибиторы, воспаление)

Генетические фенотипы скорости биотрансформации ЛС (CPIC)

Зависимость концентрации препарата в плазме и риска НЛР от активности ферментов

Фенотип метаболизатора	Типичный генотип (диплотип)	Фармакокинетика активного ЛС	Клинические последствия и тактика
Экстенсивные / Нормальные (EM / NM)	Два функциональных аллеля (*1/*1, дикий тип)	Нормальная скорость клиренса, целевое терапевтическое окно	Стандартный режим дозирования эффективен и безопасен
Медленные (PM — Poor)	Два дефектных/нулевых аллеля (*4/*4, *5/*5)	Резкое замедление клиренса, рост Cmax и T1/2 в 3–5 раз	Высокий риск токсичности (НЛР) → снижение дозы или замена ЛС; нет активации пролекарств
Промежуточные (IM — Intermediate)	Гетерозиготы (*1/*4) или два гипоморфных аллеля (*10/*10)	Умеренное замедление метаболизма, склонность к кумуляции	Тщательное титрование дозы, умеренное снижение дозы для препаратов с узким окном
Быстрые / Ультрабыстрые (RM / UM)	Дупликация/мультипликация (*1/*1xN) или промотор (*17/*17)	Стремительный клиренс, субтерапевтическая концентрация в крови	Отсутствие эффекта активных ЛС; при приеме пролекарств (кодеин) — интоксикация метаболитом

Влияние фенотипа метаболизма на системную экспозицию (AUC) ЛС

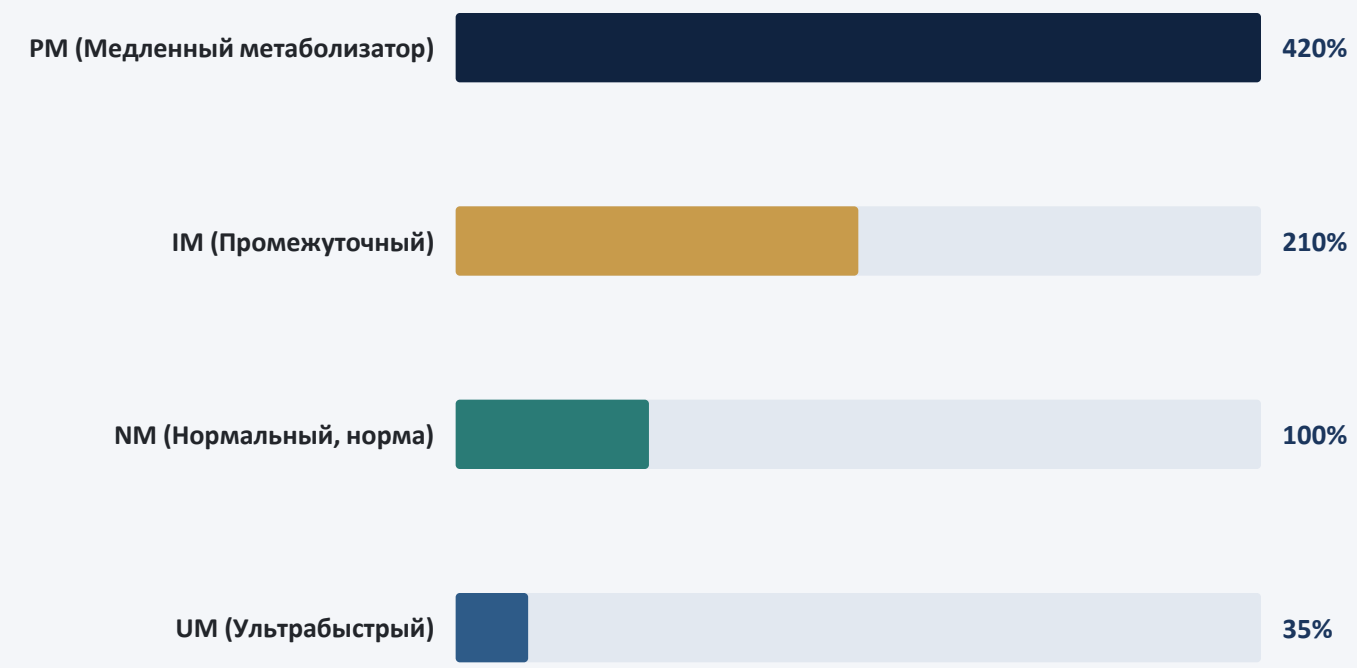
Кратность изменения площади под фармакокинетической кривой активного субстрата CYP2D6 и частоты фенотипов

4,2x
Рост AUC у PM

5–10%
Доля PM CYP2D6 (Европа)

1–29%
Доля UM в популяциях

Относительная системная экспозиция AUC (% от нормы NM)



Интерпретация графика

- У медленных метаболизаторов (PM) стандартная доза создает 4-кратную передозировку
- У ультрабыстрых метаболизаторов (UM) активный препарат выводится раньше развития эффекта
- Для пролекарств (кодеин, клопидогрел, тамоксифен) вектор риска обратный: угроза токсичности у UM, неэффективность у PM

Клинические последствия полиморфизма генов фармакокинетики

Четыре сценария нарушения баланса эффективности и безопасности терапии (по В.Г. Кукесу и Д.А. Сычеву)

1 Серьезные НЛР (госпитализация)

- Резкое накопление токсичных доз препаратов с узким терапевтическим окном
- Пример: кровотечения на варфарине (CYP2C9*3), агранулоцитоз на тиопуринах (TPMT)

2 Несерьезные, но частые НЛР

- Снижение приверженности пациентов к длительной терапии хронических болезней
- Пример: головокружение и брадикардия на метопрололе у медленных метаболизаторов CYP2D6

3 Первичная неэффективность ЛС

- Невозможность образования активного метаболита из пролекарства у носителей PM
- Пример: тромбоз стента на клопидогреле (CYP2C19*2/*2) и рецидив на тамоксифене

4 Ассоциация с риском болезней

- Ферменты I и II фаз метаболизируют не только ЛС, но и эндогенные метаболиты и канцерогены
- Пример: делеция GSTM1 и полиморфизмы NAT2 влияют на чувствительность к токсикантам среды

Принципы трансляции генетического теста в клиническую практику

Алгоритм выбора альтернативного пути терапии при выявлении дефектных аллелей ADME

1 1. Оценка диплотипа

Определение суммы баллов активности (Activity Score) двух аллелей

2 2. Учет ко-терапии

Исключение феноконверсии из-за сопутствующих ингибиторов или индукторов CYP

3 3. Коррекция дозы

Снижение дозы на 25–50% у PM для активных ЛС или повышение/замена у UM

4 4. Обход фермента

Выбор ЛС, элиминируемого другим путем (тикагрелор вместо клопидогрела)

Наибольшее клиническое значение среди ферментов имеют гены CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, DPYD, UGT1A1, TPMT и NAT2.

Ключевые клинически значимые полиморфизмы генов метаболизма и транспорта

Фармакогены с доказанным влиянием на выбор режима дозирования (уровень 1A PharmGKB)

Ген (Белок)	Роль в ADME	Примеры ЛС	Клинический эффект полиморфизма
CYP2D6	I фаза окисления	Кодеин, тамоксифен, метопролол, антидепрессанты	Нет эффекта пролекарств у PM; интоксикация кодеином у UM; рост риска НЛР
CYP2C9	I фаза окисления	Варфарин, фенитоин, НПВС, глипизид	Аллели *2/*3 замедляют клиренс S-варфарина → высокий риск кровотечений
CYP2C19	I фаза окисления	Клопидогрел, омепразол, вориконазол	При *2/*3 пролекарство клопидогрел не активируется → тромбоз стента
NAT2 / UGT1A1 / TPMT	II фаза конъюгации	Изониазид, иринотекан, азатиоприн	Токсический гепатит (NAT2), нейтропения (UGT1A1*28), панцитопения (TPMT)
ABCB1 / SLCO1B1	Транспортеры ЛС	Дигоксин, симвастатин, циклоспорин	Изменение всасывания в кишечнике и печеночного захвата → миопатия на статинах

Контрольные вопросы и ключевые выводы

Закрепление материала лекции 2

? Контрольные вопросы

- 1. Охарактеризуйте пять основных механизмов всасывания ЛС и роль эффекта первого прохождения (пресистемного метаболизма).
- 2. В чем состоит различие химических процессов I фазы (функционализация) и II фазы (конъюгация) биотрансформации?
- 3. Приведите примеры ситуаций, когда в процессе метаболизма образуются активные или токсичные метаболиты.
- 4. Сравните методы фармакогенетического фенотипирования и генотипирования: преимущества и ограничения каждого подхода.
- 5. Опишите четыре фенотипа метаболизаторов (EM/NM, PM, IM, UM) и объясните разницу их клинического риска для активных ЛС и пролекарств.

✓ Ключевые выводы

- Судьба лекарства в организме складывается из четырех процессов ADME, каждый из которых генетически детерминирован.
- Двухфазная система биотрансформации превращает липофильные ксенобиотики в полярные водорастворимые конъюгаты для экскреции.
- Фенотипирование отражает реальную ферментативную активность (с учетом ингибиторов), а генотипирование — врожденный статус на всю жизнь.
- Выделение групп NM, PM, IM и UM позволяет заблаговременно предотвратить токсичность и терапевтическую неудачу.

Рекомендуемая литература

Источники по биотрансформации ЛС и фармакогенетическим исследованиям

1 Основная литература

- 1. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. Метаболизм лекарственных средств: научные основы персонализированной медицины. — М.: ГЭОТАР-Медиа.
- 2. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., Кукес В.Г. Клиническая фармакогенетика: учебное пособие. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021.
- 3. Харкевич Д.А. Фармакология: учебник для вузов (главы по фармакокинетике и биотрансформации). — М.: ГЭОТАР-Медиа.
- 4. Williams R.T. Detoxication Mechanisms: The Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances and Other Organic Compounds. — Wiley.

2 Дополнительная литература и ресурсы

- 1. Caudle K.E. et al. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results (CPIC Consensus) // Genetics in Medicine. — 2017. — Vol. 19. — P. 215–223.
- 2. PharmGKB Drug Metabolism Pathways: https://www.pharmgkb.org/pathways
- 3. PharmVar Star Allele Nomenclature: https://www.pharmvar.org
- 4. База лекарственных взаимодействий Flockhart CYP450 Table: https://drug-interactions.medicine.iu.edu

Благодарю за внимание! • Кафедра молекулярной биологии и генетики КазНУ