

ВОЗМОЖНОСТИ ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОГО ТЕСТИРОВАНИЯ В КАРДИОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ДАННЫХ ЭКЗОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Н.В. Щербакова, А.И. Ершова, А.А. Суворова, Э.Ю. Хлебус, А.Н. Мешков*, С.А. Бойцов

Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины

101990, Москва, Петроверигский пер., 10

Цель. Изучить, какие кардиологические препараты в настоящий момент имеют комментарии по биомаркерам и какую информацию можно получить при фармакогенетическом тестировании с использованием данных экзомного секвенирования у пациента с кардиологической патологией.

Материал и методы. Проведено секвенирование экзома случайного участника исследования АТЕРОГЕН ИВАНОВО и биоинформационный анализ полученных данных. Найденные мутации были проаннотированы с помощью программы ANNOVAR, проведено сравнение на основе пользовательских протоколов с рядом специализированных баз данных.

Результаты. Проанализировано 11 препаратов и 7 генов, варианты в которых могут повлиять на метаболизм препаратов, используемых в кардиологии. По результатам экзомного секвенирования участника нашего исследования аллельных вариантов, требующих коррекции стандартного режима дозирования и контроля эффективности, выявлено не было.

Заключение. Применение экзомного секвенирования является очередным шагом для широкого применения персонализированной терапии. Главной целью сбора и анализа фармакогенетических данных является будущая возможность оптимизации соотношения риск-польза для каждого пациента.

Ключевые слова: профилактическая медицина, генетическая диагностика, фармакогеномика, фармакогенетика, экзомное секвенирование.

Рациональная фармакотерапия в кардиологии 2014;10(6):646–650

Pharmacogenetic testing opportunities in cardiology based on exome sequencing

N.V. Shcherbakova, A.I. Ershova, A.A. Suvorova, E.Y. Hlebus, A.N. Meshkov*, S.A. Boytsov

State Research Center for Preventive Medicine. Petroverigsky per. 10, Moscow, 101990 Russia

Aim. To study what cardiac drugs currently have any comments on biomarkers and what information can be obtained by pharmacogenetic testing using data exome sequencing in patients with cardiac diseases.

Material and methods. Exome sequencing in random participant of the ATEROGEN IVANOVO study and bioinformatics analysis of the data were performed. Point mutations were annotated using ANNOVAR program, as well as comparison with a number of specialized databases was done on the basis of user protocols.

Results. 11 cardiac drugs and 7 genes which variants can influence cardiac drug metabolism were analyzed. According to exome sequencing of the participant we did not reveal allelic variants that require dose regime correction and careful efficacy control.

Conclusion. The exome sequencing application is the next step to a wide range of personalized therapy. Future opportunities for improvement of the risk-benefit ratio in each patient are the main purpose of the collection and analysis of pharmacogenetic data.

Key words: preventive medicine, genetic diagnostics, pharmacogenomics, pharmacogenetics, exome sequencing.

Ration Pharmacother Cardiol 2014;10(6):646–650

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): meshkov@lipidclinic.ru

Развитие технологий молекулярно-генетической диагностики в наши дни привело к внедрению в клиническую практику метода экзомного секвенирования. Экзомное секвенирование – современный генетический метод, позволяющий секвенировать большую часть генома, содержащего участки генов, кодирующих белки – экзоны (экзом – совокупность всех экзонов одного организма). Применение экзомного секвенирования в клинической практике – очередной этап в развитии персонализированной медицины. Фармакогенетическое тестирование – одно из составляющих персонализированной медицины, направленное на прогнозирование индивидуального фармакологического

ответа у пациента. В настоящее время для целого ряда лекарственных средств имеются данные по фармакогенетике, представленные в инструкции по применению и описанию препарата. Формированием обязательного содержания инструкции лекарственного средства занимаются государственные регулирующие органы, такие, как Министерство здравоохранения РФ, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration – FDA), Европейское медицинское агентство (EMA).

Наиболее полный список фармакогенетических биомаркеров в контексте утвержденных маркировок лекарственных средств представлены на сайте FDA. В настоящее время FDA одобрило включение фармакогенетической информации в инструкции к препаратам для более чем 150 лекарственных средств [1]. Подобные списки биомаркеров и соответствующих им препаратов также были созданы Европейским медицинским агентством и аналогичными организациями в Японии и Великобритании [2]. Целью нашей работы было изучить, какие кардиологические препараты в настоящий момент имеют комментарии по биомаркерам и какую информацию можно получить при фармакогенетиче-

Сведения об авторах:

Щербакова Наталья Владимировна – лаборант исследовательской лаборатории молекулярной генетики отдела клинической кардиологии и молекулярной генетики ГНИЦ ПМ

Ершова Александра Игоревна – к.м.н., с.н.с. той же лаборатории

Суворова Анастасия Александровна – м.н.с.

той же лаборатории

Хлебус Элеонора Юрьевна – лаборант той же лаборатории

Мешков Алексей Николаевич – к.м.н., руководитель

той же лаборатории

Бойцов Сергей Анатольевич – д.м.н., профессор, руководитель отдела клинической кардиологии и молекулярной генетики, директор ГНИЦ ПМ

ском тестировании с использованием данных экзомного секвенирования у пациента с кардиологической патологией.

Материал и методы

В рамках исследования АТЕРОГЕН ИВАНОВО [3] мы оценили возможности экзомного секвенирования в формировании фармакогенетического заключения у случайного участника из группы с сердечно-сосудистыми заболеваниями для оптимизации терапии препаратами, используемыми для лечения кардиологических заболеваний.

Генетическое исследование и биоинформационный анализ

Мы провели секвенирование экзома участника исследования и биоинформационный анализ полученных данных по методике, описанной нами ранее [3, 4]. Найденные мутации были проаннотированы с помощью программы ANNOVAR [5], было проведено сравнение на основе пользовательских протоколов с рядом специализированных баз данных, в том числе – фармакогенетической базы данных PharmGKB[6].

Этические вопросы

Клиническое исследование проведено в соответствии с этическими положениями Хельсинкской декларации и Национальным стандартом Российской Федерации

«Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice)» ГОСТ Р 52379-2005.

Все участники исследования давали информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты и обсуждение

Из группы препаратов, перечисленных в базе данных фармакогенетических биомаркеров (FDA, версия от 20 октября 2014 г.) [1], мы выбрали препараты, обозначенные в этой базе данных как препараты, используемые в кардиологии. Препараты, гены и корректируемые на основании генотипа аспекты терапии представлены в табл. 1. Проанализировано 11 препаратов и 7 генов, варианты в которых могут повлиять на метаболизм препаратов, указанных в табл. 1.

Результаты анализа вышеуказанных генов у участника исследования АТЕРОГЕН ИВАНОВО №1026 представлены в табл. 2.

Фармакогенетическое тестирование может являться обязательным для определенной группы пациентов (так называемые «сопутствующие диагностические системы») или опциональным для оценки скорости метаболизма препарата, преобразования пролекарства или других вариациях в терапевтическом ответе [7]. Все биомаркеры в ассоциации с препаратами, вошедшие в список для анализа (табл. 1), относятся к группе не обязательных к исследованию и маркированы как инфор-

Таблица 1. Гены и препараты, применяемые в кардиологии и внесенные в базу данных фармакогенетических биомаркеров FDA

Лекарственный препарат	Метаболический путь	Возможные эффекты имеющихся генетических вариантов	Изменения в тактике лечения
Карведилол, Пропранолол, Метопролол	CYP2D6	Межиндивидуальные различия в выраженности брадикардии, гипотензии, декомпенсации ХСН.	Коррекция дозы, тщательный контроль гемодинамических показателей пациента, рассмотреть назначение препаратов альтернативных метопрололу/пропранололу.
Хинидин, Пропафенон	CYP2D6	Выраженность центральных эффектов/отсутствие терапевтического эффекта.	Тщательный контроль ЭКГ-параметров. Рассмотреть возможность назначения препарата альтернативному пропафенону или возможность коррекции дозы.
Клопидогрел, Тикагрелор, Прасугрел	CYP2C19	Кровотечение или уменьшение эффективности терапии.	Рассмотреть возможность назначения препарата альтернативному клопидогрелу.
Изосорбиддинитрат, Гидралазин	NAT1-2	Разная биодоступность препарата, выраженная гипотензия/малый эффект терапии.	Тщательный контроль АД. Выбор альтернативных препаратов.
Варфарин	CYP2C9 VKORC1 PROC	Межиндивидуальные различия в необходимой дозе и темпах ее коррекции для поддержания целевых значений.	Тщательный контроль МНО. Возможна коррекция доз, согласно протоколу, основанному на генотипе.

ХСН – хроническая сердечная недостаточность; АД – артериальное давление; МНО – международное нормализованное отношение

мация, которая может быть полезна или принята к рассмотрению в отношении отдельных групп пациентов.

Большинство реакций первой фазы катализируются суперсемейством гемопротеинов цитохрома P450. В 1960-х годах было выделено большое количество изоформ цитохрома P450, позже были сформулированы широко известные сегодня принципы номенклатуры для обозначения изоформ ферментов и вариантов с нуклеотидными заменами [1]. Впервые наблюдения по вариабельности лекарственного метаболизма, связанного с полиморфизмами в гене, были продемонстрированы на ферменте CYP2D6. Люди с низкой активностью фермента («плохие метаболизаторы») в европейской популяции встречаются в 5-10% случаев [8, 9]. С развитием технологий секвенирования генов было выявлено, что пациенты с низкой активностью фермента являются гомозиготными носителями различных аллелей потери функции белка, в то время как небольшая группа пациентов ультрабыстрого метаболизма субстратов CYP2D6 является носителями множественных копий гена [10, 11]. Этот фермент ответственен за метаболизм 25-30% назначаемых лекарств, но представляет только 2-5% всех цитохромов печени [12]. Существует около 80 аллельных вариантов данного гена, но большая часть из них встречается крайне редко [13]. Количество людей с низкой и ультрабыстрой активностью фермента зависит от популяции, так, например, CYP2D6*10 среди представителей монголоидной расы встречается в 38-50%, в 3% – у европейцев и в 6% – у представителей негроидной расы [14-16]. К кардиологическим препаратам, связанным с активностью данного фермента относят пропранолол, метопролол, карведилол, пропафенон, хинидин. Возможные аспекты эффективности и риска развития побочных эффектов у пациентов с различной активностью данного фермента рассмотрены в табл. 1. По результатам экзомного секвенирования участника нашего исследования аллельных вариантов, требующих коррекции стандартного режима дозирования и контроля эффективности, выявлено не было.

Похожий путь открытия взаимодействия генетических вариантов и лекарственных препаратов был открыт для фермента CYP2C19. К настоящему моменту выделено порядка 30 аллельных вариантов этого гена [17]. Было показано, что порядка 2-6% представителей европеоидной расы и 20% представителей монголоидной расы имеют низкую активность ферментов [18]. Наибольшее количество исследований было проведено на пациентах с ишемической болезнью сердца, принимающих антиагрегантную терапию – клопидогрел [19-21]. Так, пациенты с аллелью CYP2C19*2, приводящей к дефекту сплайсинга, в меньшей степени могут активировать клопидогрел, в результате чего находятся в зоне большего риска развития повторных сердечно-сосудистых событий, в то время как пациенты с аллелью CYP2C19*17 имеют больший риск кровотечений, в связи с фенотипом связанным с ускоренным метаболизмом [13, 22]. Несмотря на тот факт, что генотип CYP2C19*2 и другие негенетические факторы объясняют лишь 12% вариабельности в ответе на терапию клопидогрелом, в 2009 году FDA изменило маркировку клопидогрела для того, чтобы подчеркнуть вклад генотипа CYP2C19 в фармакокинетику и клинический ответ на терапию этим препаратом [21, 23, 24]. Участник нашего исследования был гомозиготен по дикому типу, в связи с чем ему может быть рекомендована стандартная терапия клопидогрелом.

Активность N-ацетилтрансферазы обусловлена вариантами гена NAT2. Быстрое или медленное ацетилирование изосорбида динитрата и гидралазина приводит к их большей или меньшей биодоступности, к большему или стандартному гипотензивному эффекту соответственно. Гетерозиготные пациенты, как и в нашем случае, не требуют значимой коррекции в протоколе ведения пациентов [6].

CYP2C9 отвечает за метаболизм нескольких препаратов с узкими терапевтическими показаниями, такими, как варфарин [13]. Около 1-2% европейцев являются «плохими метаболизаторами» [24]. Большая часть ассоциаций генотип-фенотип, которые привели

Таблица 2. Результаты анализа фармакогенетических данных у участника исследования
АТЕРОГЕН ИВАНОВО №1026

Препараты	Номенклатурный вариант	Коррекция тактики терапии
Карведилол, Пропранолол, Метопролол	CYP2D6*14A/*1	Не требуется коррекции стандартной терапии
Хинидин, Пропафенон	CYP2D6*14A/*1	Не требуется коррекции стандартной терапии
Клопидогрел, Тикагрелор, Прасургрель	CYP2C19*1C/*1	Нет ограничений в применении клопидогрела
Изосорбид, Гидралазин	NAT1-2*5V/*4	Стандартный протокол терапии.
Варфарин	CYP2C9*3 VKORC1*1/*1 PROC дикий тип	Требуется более частый контроль МНО, возможна коррекция доз согласно протоколу, основанному на генотипе.

к внесению фармакогенетической информации в маркировку лекарственного средства, были получены из исследований генов-кандидатов. Подобные исследования фокусируются на вариантах в одном или нескольких генах, которые предположительно оказывают наибольшее влияние на метаболизм, распределение и механизм действия препарата. Подобный подход не позволяет выйти за рамки ранее полученных знаний в отношении предполагаемого механизма действия, так как он ограничен уже имеющимися знаниями о механизмах метаболизма препарата. Исходя из этих ограничений, были начаты исследования полногеномных ассоциаций для выявления новых значимых вариантов в развитии терапевтического эффекта и/или токсического действия препарата. Полногеномное изучение ассоциаций позволяет детально исследовать все варианты как равные в отношении их потенциального влияния на исследуемый фенотип, что позволяет выявить новые гены и пути метаболизма, приводящие к наблюдаемому эффекту. Например, ранние работы по изучению вариабельности дозы варфарина выявили, что 30% эффекта обусловлено вариантами в гене VKORC1 и 12% эффекта – вариантами в гене фермента, метаболизирующего варфарин CYP2C9 [25, 26]. Однако последующие исследования полногеномных ассоциаций показали, что наряду с вышеуказанными генами, полом и возрастом, варианты в кодирующей части гена CYP4F2 и PROC также влияют на межиндивидуальные различия [27]. В нашем исследовании мы выявили у пациента гетерозиготную аллель CYP2C9*3. Пациенту при назначении варфарина будет требоваться более частый контроль МНО и коррекция доз согласно протоколу, основанному на генотипе [24].

Заключение

Достижения в области фармакогенетики улучшили наше понимание механизма развития основных и побочных эффектов лекарственных средств, привели

к развитию фармакогенетических тест-систем и таргетной терапии. Однако остается проблемой вопрос объема и организации процесса предоставления фармакогенетической информации как пациентам, так и врачам-специалистам. На сегодня для более чем 150 лекарственных средств в инструкцию к препарату включена информация о наличии фармакогенетических данных [28]. В кардиологической практике в этот список входят 11 препаратов. Большая часть генетических вариантов находится в ферментах, метаболизирующих препараты и влияющих на степень превращения препарата в метаболиты. Для многих препаратов ответ и токсичность зависит от многих генов, и понимание взаимоотношений между генетическими вариантами пациента в ферментах, метаболизирующих препарат, и эффективностью и/или токсичностью препарата, раскроет потенциал для оптимизации терапии [13]. Еще больше информации удастся получить, когда будут завершены исследования редких вариантов в исследовании полногеномного и экзомного секвенирования, что позволит оценить вклад всей межиндивидуальной генетической вариабельности в достижении терапевтического эффекта препарата [29]. Развитие технологий секвенирования, сопровождающихся развитием биоинформационных технологий и методов хранения большого объема данных – это очередной шаг для широкого применения персонализированной терапии.

Главной целью сбора и анализа фармакогенетических данных сегодня является будущая возможность оптимизации терапии – выбора такого препарата и такого режима приема, которые позволили бы максимизировать соотношение риск-польза в отношении каждого пациента [30].

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Литература

1. US Food and Drug Administration. Table of Pharmacogenomic Biomarkers in Drug Labels. Available at: <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>. Accessed by 11.11.2014.
2. Shimazawa R., Ikeda M. Differences in pharmacogenomic biomarker information in package inserts from the United States, the United Kingdom and Japan. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2013;
3. Meshkov AN, Boytsov SA, Ershova AI, et al. The ATHEROGEN-IVANOVO trial "Investigation of the specific features of the development and progression of ATHEROsclerosis at various sites, including those with a view to the GENetic and epigenetic cardiovascular risk factors – the ESSE-IVANOVO substudy" – design, bioinformation analysis algorithms, and exome sequencing results in pilot group patients. *Profilakticheskaya Meditsina* 2013;16(6):11-20. Russian (Мешков А.Н., Бойцов С.А., Ершова А.И., и др. Исследование АТЕРОГЕН-ИВАНОВО. Изучение особенностей развития и прогрессирования атеросклероза различной локализации, в том числе с учетом генетических и эпигенетических факторов сердечно-сосудистого риска – субисследование ЭССЕ-Иваново – дизайн, алгоритмы биоинформационного анализа и результаты секвенирования экзомов пациентов пилотной группы. *Профилактическая Медицина* 2013;16(6):11-20).
4. Ershova AI, Shcherbakova NV, Suvorova AA, et al. Differential diagnosis of hereditary syndrome hypocholesterolemia using exomного секвенирования. *Ration Pharmacother Cardiol* 2014; 10 (5): 509-12. Russian (Ершова А.И., Щербакова Н.В., Суворова А.А., и др. Дифференциальная диагностика наследственного синдрома гипохолестеринемии с применением экзомного секвенирования. *Рациональная Фармакотерапия в Кардиологии* 2014; 10(5): 509-12).
5. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010;38(16):e164.
6. Whirl-Carrillo M., McDonagh E. M., Hebert J. M., et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 2012;92(4):414-7.
7. Frueh FW, Amur S, Mummaneni P, et al. Pharmacogenomic biomarker information in drug labels approved by the United States Food and Drug Administration: prevalence of related drug use. *Pharmacotherapy* 2008;28(8):992-8.
8. Evans D.A., Mahgoub A., Sloan T.P., et al. A family and population study of the genetic polymorphism of debrisoquine oxidation in a white British population. *J Med Genet* 1980;17:102-5.
9. Mahgoub A., Idle J.R., Dring L.G., et al. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet* 1977;2:584-6.
10. U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Pharmacogenomic Data Submissions. March 2005. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm126957.pdf>. Accessed by 11.11.2014.
11. Johansson I., Lundqvist E., Bertilsson L., et al. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultra rapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:11825-9.
12. Ingelman-Sundberg M. The human genome project and novel aspects of cytochrome P450 research. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;207:52-6.
13. Pinto N., Dolan E. M. Clinically Relevant Genetic Variations in Drug Metabolizing Enzymes *Curr Drug Metab* 2011;12(5):487-97.
14. Rudorfer M.V., Lane E.A., Potter W.Z. Interethnic dissociation between debrisoquine and desipramine hydroxylation. *J Clin Psychopharmacol* 1985;5:89-92.
15. Zhan M., Flaws J.A., Gallicchio L., et al. Profiles of tamoxifen related side effects by race and smoking status in women with breast cancer. *Cancer Detect Prev* 2007;31:384-90.
16. Caraco Y., Sheller J., Wood A.J. Impact of ethnic origin and quinidine coadministration on codeine's disposition and pharmacodynamic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:413-22.
17. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. Available at: <http://www.cypalleles.ki.se/>. Accessed by 11.11.2014.
18. Flockhart D.A. Drug interactions and the cytochrome P450 system. The role of cytochrome P4502C19. *Clin Pharmacokinet* 1995;29(Suppl 1):45-52.
19. Simon T., Versteuyt C., Mary-Krause M., et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 2009;360:363-75.
20. Shuldiner A.R., O'Connell J.R., Bliden K.P., et al. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 2009; 302:849-57.
21. Ellis K.J., Stouffer G.A., McLeod H.L., Lee C.R. Clopidogrel pharmacogenomics and risk of inadequate platelet inhibition: US FDA recommendations. *Pharmacogenomics* 2009;10:1799-817.
22. Sibbing D., Koch W., Gebhard D., et al. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 2010;121:512-8.
23. Geisler T., Schaeffeler E., Dippon J., et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics* 2008;9:1251-9.
24. Aithal G.P., Day C.P., Kesteven P.J., Daly A.K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-9.
25. Wadelius M., Chen L.Y., Downes K., et al. Common VKORC1 and GGX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005;5:262-70.
26. Rettie A.E., Tai G. The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv* 2006;6:223-7.
27. Takeuchi F., McGinnis R., Bourgeois S., et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet* 2009;5:e1000433.
28. Haga S.B., Mills R., Moaddeb J. Pharmacogenetic information for patients on drug labels. *Pharmacogenomics and Personalized Medicine* 2014;7:297-305.
29. Pennisi E. Genomics. 1000 Genomes Project gives new map of genetic diversity. *Science* 2010;330:574-5.
30. Conrado D.J., Rogers H.L., Zineh I., Pacanowski M.A. Consistency of drug-drug and gene-drug interaction information in US FDA-approved drug labels. *Pharmacogenomics* 2013;14(2):215-23.

Поступила: 26.11.2014

Принята в печать: 28.11.2014