



¹ Республиканская
клиническая
больница
им. Г.Г. Куватова

² Башкирский
государственный
медицинский
университет

Полиморфный вариант С3435Т гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 у больных с трансплантированной почкой

С.Н. Ожгихин¹, Д.Х. Калимуллина², Э.Д. Валеева¹, И.Р. Курбангулов¹

Адрес для переписки: Дилара Хатимовна Калимуллина, dilaramd@gmail.com

Представлены результаты исследования, проведенного с целью выявления факторов риска развития нефропатии трансплантата. У 61 больного с пересаженной почкой изучен полиморфный вариант С3435Т гена множественной лекарственной устойчивости MDR1. Установлено, что хроническая нефропатия трансплантата чаще развивалась у больных с генотипом ТТ полиморфного варианта С3435Т гена MDR1 в сравнении с пациентами, имеющими генотип СС и СТ.

Ключевые слова: трансплантация почки, нефропатия трансплантата, полиморфные варианты, ген MDR1

Введение

В настоящее время во всем мире наблюдается увеличение в общей численности населения доли лиц пожилого возраста. В этой связи возрастает частота хронической болезни почек (ХБП), которая развивается при таких распространенных среди пожилых людей заболеваниях, как инсулиннезависимый диабет, артериальная гипертензия, кардиальная патология, а также характерной для этого возраста полипрагмазии [1–3].

Продление жизни пациентам с пятой стадией ХБП, улучшение качества их жизни возможно только методами заместительной почечной терапии [4]. Трансплантация почки бесспорно считается наиболее эффективным способом лечения больных с терминальной уремией, но доступность этого вида заместительной почечной терапии ограничена дефицитом трупных

донорских органов [5]. Ежегодно в России выполняется 1300–1350 трансплантаций органов, в том числе около 1000 трансплантаций почки, а количество больных с функционирующим трансплантатом на конец 2011 г. составило 5932 (41,5 человек на 1 млн населения) [6]. Пятилетняя выживаемость почечного трансплантата, по данным отчета Российского регистра заместительной почечной терапии за 1998–2011 гг., составляет 82,3% при пересадке трупной почки и 91,5% от живого родственного донора [7]. Основная причина гибели трансплантированной почки в отдаленные сроки после операции – отторжение трансплантата, что проявляется постепенно прогрессирующим снижением его функции. Полноценное функционирование почечного трансплантата после аллотрансплантации почки обеспечивается правильно подоб-

ранной многокомпонентной иммуносупрессивной терапией [8]. Циклоспорин А – основной лекарственный препарат, который используется для профилактики и лечения реакции отторжения трансплантата. Однако вопрос об оптимальных режимах дозирования этого препарата до сих пор остается предметом дискуссии, поскольку недостаточная доза циклоспорина А повышает риск отторжения, а передозировка ведет к развитию циклоспориновой нефротоксичности [9–11].

В последние годы изучается влияние полиморфных вариантов генов на фармакокинетику лекарственных средств. Особый интерес в этом отношении представляет ген множественной лекарственной устойчивости MDR1 (multidrug resistance), локализованный на хромосоме 7 (7q21.1). MDR1 кодирует Р-гликопротеин, который выполняет разнообразные функции. В желудочно-кишечном тракте Р-гликопротеин играет роль своеобразного насоса, «выкачивающего» лекарственные средства из клетки в просвет кишечника. В гепатоцитах он способствует выведению ксенобиотиков в желчь. В почечных канальцах участвует в активной секреции ксенобиотиков в мочу [12]. Субстратами Р-гликопротеина являются многие широко применяемые лекарственные препараты: циклоспорин А [13, 14], такролимус [15], блокаторы H₁-гистаминовых рецепторов [16, 17],



цитостатики, противовирусные препараты, антагонисты кальция, статины, макролиды и др. [12].

Мутации в некоторых сайтах гена MDR1 могут приводить к изменению профиля перекрестной устойчивости клеток, то есть к изменениям в связывании определенных субстратов [18]. Полиморфный вариант С3435Т в 26-м экзоне гена MDR1 в гомозиготном состоянии приводит к резкому снижению экспрессии и функциональной активности Р-гликопротеина и, как следствие, к увеличению уровня субстрата в плазме.

Для индивидуализации иммуносупрессивной терапии наиболее перспективными являются молекулярно-генетические методы, в частности исследование полиморфных локусов гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 [12, 19, 20, 21]. В трансплантологии исследование полиморфных вариантов гена множественной лекарственной устойчивости MDR1 проведено у больных с пересадкой сердца [13, 22]. Однако в нефротрансплантологии подобные исследования единичны и носят противоречивый характер. По мнению ряда авторов, у больных, подвергшихся трансплантации почки, генотип ТТ полиморфного локуса С3435Т гена MDR1 ассоциирован с более высокими уровнями такролимуса в плазме крови [15].

Материал и методы

С целью оценки некоторых молекулярно-генетических факторов риска развития хронической трансплантационной нефропатии у 61 взрослого пациента после аллотрансплантации почки проведен углубленный молекулярно-генетический анализ полиморфного варианта С3435Т гена MDR1. Материалом для молекулярно-генетического исследования послужили образцы ДНК, выделенные из лимфоцитов периферической венозной крови методом фенольно-хлороформной экстракции [23]. Анализ полиморфного локуса гена MDR1 проводили методом полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на термоциклере в автоматическом режиме с ис-

Таблица 1. Характеристика молекулярно-генетического маркера, использованного в исследовании

Наименование локуса	Последовательность олигонуклеотидных праймеров	Способ анализа	Номенклатура аллелей – размер фрагментов
MDR1 С3435Т	TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG	Метод полимеразной цепной реакции, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов, маркер Kzo 9I	СС – 65 + 145 пн СТ – 62 + 145 + 207 пн ТТ – 207 пн

пользованием локуспецифических олигонуклеотидных праймеров и соответствующих рестриктаз [24] (табл. 1).

Группу сравнения составили 100 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу, возрасту и национальности с основной группой.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью биометрических методов анализа [25]. Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента. Частоту генотипов (Pi) и аллелей (pi) определяли стандартным способом, как $P = N_i / N$, где N_i – число i-тых генотипов (аллелей), N – объем выборки (число проанализированных хромосом). Разницу в распределении частот генотипов между группами рассчитывали с использованием критерия χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность с помощью программы RxC-статистика (Rows and Columns) и Statistica 6,0. Для оценки относительного риска заболевания по конкретному аллелю или генотипу использовали вычисление показателя отношения шансов [26], проводился расчет доверительного интервала для отношения шансов.

Результаты и их обсуждение

Возраст реципиентов почечного трансплантата колебался от 18 до 56 лет (в среднем $34,7 \pm 1,44$ года). Доля больных в возрасте от 21 до 25 лет составила 18,6%. Причиной терминальной уремии более чем у половины (65,6%) пациентов был хронический гломерулонефрит. Аллотрансплантация почки была произведена 47 пациентам, 14 пациентам пересажена родственная почка. Большинству (n = 59, 96,7%) пациентов проведена одна аллотрансплантация почки, одно-

му пациенту – две и одному – три. Диагноз хронической нефропатии трансплантата в соответствии с общепринятой классификацией Banff 97 подтверждался клиническими, лабораторными и инструментальными данными, а также гистологическим исследованием биоптата почечного трансплантата.

При сравнении распределения частот различных генотипов полиморфного локуса С3435Т гена MDR1 выявлено, что генотип ТТ в группе реципиентов почечного трансплантата определялся в 1,5 раза реже (30,26%), чем в группе контроля (47,33%) ($p = 0,029$). Распределение гетерозиготного генотипа СТ в обеих сравниваемых группах оказалось практически одинаковым (48,21 и 46,56%). Генотип СС у пациентов после аллотрансплантации почки встречался в 3,5 раза чаще (21,43 против 6,11% в группе контроля) ($p = 0,0038$) (табл. 2).

По нозологиям реципиенты почечного трансплантата с различными генотипами практически не отличались, но сроки развития пятой стадии ХБП у пациентов с генотипом СС оказались статистически значимо короче, чем у больных с генотипом СТ ($p < 0,05$). Достоверных различий в данных лабораторных и инструментальных исследований у реципиентов с различными генотипами гена MDR1 не обнаружено. Проведено сравнение доз циклоспорина А, необходимых для достижения средней терапевти-

Таблица 2. Частота генотипов полиморфного локуса С3435Т гена MDR1 у реципиентов почечного трансплантата и в группе контроля

Генотип	Реципиенты, %	Контроль, %	χ^2	p
ТТ	30,36	47,33	4,78	0,029
СТ	48,21	46,56	0,01	1,0
СС	21,43	6,11	8,39	0,0038



Таблица 3. Дозы циклоспорина, получаемые пациентами в зависимости от генотипа гена MDR1

Генотип	Доза циклоспорина А, мг/сут							
	100–150		151–200		201–250		251 и выше	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
ТТ (n = 14)	3	21,43	4	28,57	5	35,78	2	14,28
СТ (n = 21)	5	22,73	14	63,64	2	9,09	1	4,54
СС (n = 10)	5	50,00	3	30,00	2	20,00	0	0

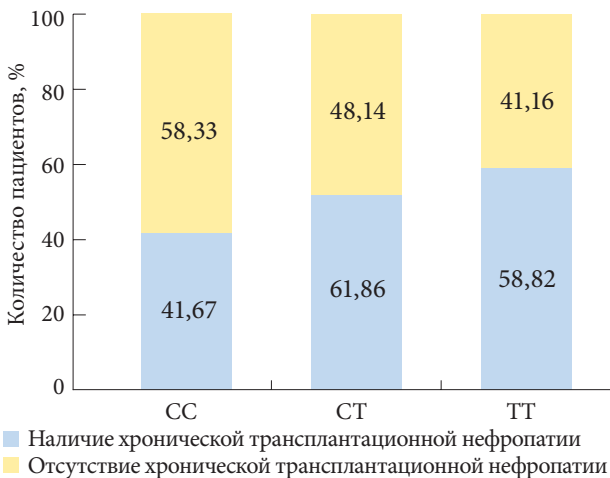


Рисунок. Частота развития хронической трансплантационной нефропатии у реципиентов с различным генотипом гена MDR1

ческой концентрации в крови (С3 – 400 нг/мл, С0 – 100 нг/мл) при различных генотипах по полиморфному локусу С3435Т гена MDR1. Установлено, что через один год после трансплантации почки для достижения рекомендуемой концентрации циклоспорина А в крови доза препарата у реципиентов с генотипом ТТ составила в среднем $210,6 \pm 14,56$ мг. Значимо меньше была доза препарата у пациентов с генотипом СС – $170,0 \pm 12,94$ мг ($p < 0,05$) в сравнении с реципиентами, имеющими генотип ТТ. При генотипе СТ доза циклоспорина А имела промежуточное значение – $181,5 \pm 9,07$ мг (табл. 3).

В то же время при анализе доз циклоспорина А для достижения необходимой концентрации в сыворотке крови обнаружено, что у пациентов с генотипом СС доза препарата была наиболее низкой, а хроническая трансплантационная нефропатия встречалась реже по сравнению с реципиентами, имеющими генотип СТ или ТТ. Однако дозы препарата циклоспорина А у реципиентов с генотипом СС были достаточными для предотвращения отторжения трансплантата.

Полученные данные можно объяснить тем, что генотип СС характеризуется повышенной выработкой белка-переносчика Р-гликопротеина и ускоренным выведением из клетки экотоксикантов, к которым относятся и лекарственные препараты, в том числе циклоспорин А. Для генотипа ТТ свойственна пониженная выработка Р-гликопротеина. Это может обуславливать накопление препарата в тканях и внутри клеток, вследствие чего концентрация препарата в крови снижается, что ведет к необходимости повышения дозы циклоспорина и увеличению риска развития хронической трансплантационной нефропатии при сравнении с генотипами СТ и СС ($\chi^2 = 1,93, p = 0,059$).

Хроническая трансплантационная нефропатия диагностирована при всех генотипах полиморфного локуса С3435Т гена MDR1. Наиболее часто хроническая трансплантационная нефропатия развивалась у пациентов с генотипом ТТ – в 58,33% случаев, при генотипе СС – в 41,67% и генотипе СТ – в 51,86% случаев ($\chi^2 = 0,086, p = 0,66$) (рисунок).

У пациентов с генотипом СС, то есть с нормальным уровнем

Р-гликопротеина и ускоренным выведением препарата из клетки в кровь, доза циклоспорина А для достижения терапевтической концентрации была самой низкой. Риск развития хронической трансплантационной нефропатии у таких пациентов уменьшался. Реципиентам с генотипом ТТ для достижения рекомендованной концентрации препарата в крови требовались более высокие дозы циклоспорина А, у них чаще развивалась хроническая трансплантационная нефропатия.

Таким образом, исследования генетических особенностей человека, в частности полиморфных вариантов гена MDR1, представляют практический интерес для клиницистов. Изучение полиморфных вариантов гена MDR1 у реципиентов почечного трансплантата позволяет корректировать дозу циклоспорина А и уменьшить риск развития хронической трансплантационной нефропатии.

Выводы

Среди реципиентов почечного трансплантата по сравнению со здоровыми лицами статистически реже встречались пациенты с генотипом ТТ полиморфного локуса С3435Т гена множественной лекарственной устойчивости MDR1. Хроническая нефропатия трансплантата чаще развивалась у пациентов с генотипом ТТ полиморфного локуса С3435Т гена MDR1 в сравнении с пациентами, имеющими генотип СС и СТ. Доза циклоспорина А, назначаемая для достижения адекватной иммуносупрессивной терапии под контролем рекомендуемой концентрации препарата в крови, при генотипе ТТ была выше, чем при генотипе СС. 🌐

Литература

1. Ермоленко В.М. Хронический гемодиализ. М.: Медицина, 1982.
2. Николаев А.Ю., Ермоленко В.М. Особенности течения острого повреждения почек и хронической болезни почек в пожилом возрасте // Клиническая нефрология. 2014. № 5. С. 56–59.
3. Тонелли М., Риелла М. Хроническая болезнь почек и старение популяции // Нефрология и диализ. 2014. Т. 16. № 1. С. 6–10.
4. Крылова М.И., Ермоленко В.М., Шутов Е.В. Качество жизни у больных с терминальной уремией на лечении гемодиализом и перитонеальным диализом // Нефрология и диализ. 2010. Т. 12. № 3. С. 192–196.
5. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Состояние заместительной терапии больных с хронической почечной недоста-



- точностью в Российской Федерации в 1998–2007 гг. // Нефрология и диализ. 2009. Т. 11. № 3. С. 144–233.
6. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Заместительная терапия больных с хронической почечной недостаточностью в Российской Федерации в 1998–2011 гг. (Отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии. Часть первая) // Нефрология и диализ. 2014. Т. 16. № 1. С. 11–127.
 7. Бикбов Б.Т., Томилина Н.А. Заместительная терапия больных с хронической почечной недостаточностью методами перитонеального диализа и трансплантации почки в Российской Федерации в 1998–2011 гг. (Отчет по данным Российского регистра заместительной почечной терапии. Часть вторая) // Нефрология и диализ. 2014. Т. 16. № 2. С. 192–227.
 8. Моисеев С.В. Циклоспорин: связь между фармакокинетикой и клинической эффективностью // Клиническая фармакология и терапия. 2004. Т. 13. № 1. С. 44–48.
 9. Ватазин А.В., Пасов С.А., Щербакова Е.О. и др. Применение циклоспорина А у больных после пересадки трупной почки // Трансплантология и искусственные органы. 1998. № 1. С. 3–8.
 10. Вознесенская Т.С. Эффективность и токсичность циклоспорина А. Мониторинг концентрации // Нефрология и диализ. 2005. Т. 7. № 2. С. 135–139.
 11. Ким И.Г. Отдаленные результаты трансплантации почки и факторы риска хронического отторжения: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 1999.
 12. Сычев Д.А., Игнатьев И.В., Раменская Г.В. и др. Значение полиморфизма гена MDR1, кодирующего гликопротеин-P, для индивидуальной фармакотерапии // Клиническая фармакология и терапия. 2005. Т. 14. № 1. С. 92–95.
 13. Balram C., Sharma A., Sivathasan C., Lee E.J. Frequency of C3435T single nucleotide MDR1 genetic polymorphisms in an Asians population: phenotypic- genetic correlates // Br. J. Clin. Pharmacol. 2003. Vol. 56. № 1. P. 78–83.
 14. Bonhomme-Faivre L., Devocelle A., Saliba F. et al. MDR1 C3435T polymorphism influence cyclosporine a dose requirement in liver-transplant recipients // Transplantation. 2004. Vol. 78. № 1. P. 21–25.
 15. Macphee I.A., Fredericks S., Tai T. et al. Tacrolimus pharmacogenetics: polymorphisms associated with expression of cytochrome p4503F5 and P-glycoprotein correlate with dose requirement // Transplantation. 2002. Vol. 74. № 11. P. 1486–1489.
 16. Drescher S., Schaeffeler E., Hitzl M. et al. MDR1 gene polymorphisms and disposition of the P-glycoprotein substrate fexofenadine // Br. J. Clin. Pharmacol. 2002. Vol. 53. № 5. P. 526–534.
 17. Yi S.Y., Hong K.S., Lim H.S. et al. A variant 2677A allele of the MDR1 gene affects fexofenadine disposition // Clin. Pharmacol. Ther. 2004. Vol. 76. № 5. P. 418–427.
 18. Gros P., Buschman E. The mouse multidrug resistance gene family: structure and functional analysis // Int. Rev. Cytol. 1993. Vol. 137C. P. 169–197.
 19. Бакиров А.Б., Калимуллина Д.Х., Викторова Т.В. и др. Клинико-генетические ассоциации у больных множественной миеломой // Гематология и трансфузиология. 2004. № 4. С. 13–17.
 20. Валеева Э.Д., Калимуллина Д.Х., Курбангулов И.Р., Викторова Т.В. Иммуносупрессивная терапия при аллотрансплантации почки и полиморфизм гена множественной лекарственной устойчивости // Академический журнал Западной Сибири. 2006. № 1. С. 5–6.
 21. Sweet D.H., Bush K.T., Nigam S.K. The organic anion transporter family from physiology to ontogeny and the clinic // Am. J. Physiol. Renal. Physiol. 2001. Vol. 281. № 2. P. 197–205.
 22. Chowbay B., Cumaraswamy S., Cheung Y.B. et al. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on cyclosporine disposition in heart transplant recipients // Pharmacogenetics. 2003. Vol. 13. № 2. P. 89–95.
 23. Mathew C.G. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods Mol. Biol. 1985. Vol. 2. P. 31–34.
 24. Ito S., Ieiri I., Tanabe M. et al. Polymorphism of the ABC transporter genes, MDR1, MRP1 and MRP2/cMOAT, in healthy Japanese subjects // Pharmacogenetics. 2001. Vol. 11. № 2. P. 175–184.
 25. Животовский Л.А. Популяционная биометрия. М.: Наука, 1991.
 26. Shlesselman S. Case-control studies: design, conduct, analysis. N.Y.: Oxford University Press, 1982. P. 58–96.

C3435T Polymorphism of the Multidrug Resistance MDR1 Gene in Patients with Kidney Transplants

S.N. Ozhgikhin¹, D.Kh. Kalimullina², E.D. Valeyeva¹, I.R. Kurbangulov¹

¹ Republican Clinical Hospital named after G.G. Kuvatov

² Bashkir State Medical University

Contact person: Dilara Khatimovna Kalimullina, dilaramd@gmail.com

The results of the study investigating risk factors for development of transplant nephropathy are presented. In particular, a rate of C3435T polymorphism of the multidrug resistance MDR1 gene was examined in 61 patients with kidney transplant. It was found that chronic transplant nephropathy was more frequent in patients with TT genotype in C3435T polymorphism of the MDR1 gene compared to CC and CT genotype.

Key words: kidney transplantation, transplant nephropathy, polymorphism, MDR1 gene