

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«СТАВРОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

Царукян Анна Акоповна

**ЭТНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ВАРФАРИНА  
У ЖИТЕЛЕЙ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ:  
КЛИНИЧЕСКИЕ И ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ**

14.03.06 – Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель  
доктор медицинских наук, профессор  
В.А.Батурин

Волгоград - 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА (обзор литературы).....	11
1.1. Факторы, определяющие ответ организма на медикаментозную терапию.....	11
1.2. Система метаболизма лекарственных средств.....	12
1.3. Этнические аспекты результативности лекарственного воздействия.....	19
1.4. Генетический полиморфизм <i>CYP2C9</i> : этническая вариабельность и клиническое значение.....	23
1.5. Генетический полиморфизм <i>CYP2D6</i> : этническая вариабельность и клиническое значение.....	34
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Этническая и демографическая характеристика исследуемых групп населения Ставропольского края.....	45
2.2. Сравнительный проспективный анализ антикоагуляционной активности варфарина у больных с фибрилляцией предсердий.....	48
2.3. Определение показателя МНО.....	51
2.4. Исследование распространенности «медленных» аллельных вариантов генов <i>CYP2C9</i> ( <i>CYP2C9*2</i> , <i>CYP2C9*3</i> ) и <i>CYP2D6</i> ( <i>CYP2D6*3</i> , <i>CYP2D6*4</i> , <i>CYP2D6*5</i> ) среди населения Ставропольского края.....	51
2.4.1. Характеристика здоровых лиц, включенных в исследование межэтнической распространенности аллельных вариантов гена <i>CYP2C9</i> в Ставропольском крае.....	52

2.4.2. Характеристика здоровых лиц, включенных в исследование межэтнической распространенности аллельных вариантов гена <i>CYP2D6</i> в Ставропольском крае.....	54
2.4.3. Реактивы и препараты для выделения ДНК, проведения ПЦР и анализа продуктов амплификации .....	55
2.4.4. Определение аллельных вариантов <i>CYP2C9*2</i> и <i>CYP2C9*3</i> .....	57
2.4.5. Определение аллельных вариантов <i>CYP2D6*3</i> , <i>CYP2D6*4</i> .....	60
2.5. Статистическая обработка результатов исследования.....	63
ГЛАВА 3. Этнические особенности антикоагуляционной активности варфарина в Ставропольском крае.....	65
3.1. Сравнительный анализ антикоагуляционной активности варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий представителей трех этнических групп: славян, армян и карачаевцев.....	65
3.2. Этнические особенности генетического полиморфизма <i>CYP2C9</i> в Ставропольском крае .....	69
3.2.1. Проверка соответствия соотношения генотипов <i>CYP2C9</i> в изученных выборках закону Харди-Вайнберга.....	70
3.2.2. Изучение распространенности аллелей <i>CYP2C9*2</i> , <i>CYP2C9*3</i> и генотипов <i>CYP2C9</i> у представителей славянской, армянской и карачаевской этнических групп населения Ставропольского края.....	76
3.3. Этнические особенности генетического полиморфизма <i>CYP2D6</i> в Ставропольском крае.....	84
3.3.1. Проверка соответствия соотношения генотипов <i>CYP2D6</i> в изученных выборках закону Харди-Вайнберга.....	84
3.3.2. Изучение частот аллелей и генотипов по аллельным вариантам <i>CYP2D6*3</i> и <i>CYP2D6*4</i> у представителей славянской, армянской и карачаевской этнических групп Ставропольского края.....	90
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	108

ВЫВОДЫ.....	110
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	112
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	113
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	115

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Многочисленные исследования, проведенные, как за рубежом, так и в РФ, продемонстрировали гетерогенность фармакологического ответа в различных этнических группах. Эти работы представляют важный клинический интерес, поскольку они позволяют определять своеобразие эффектов лекарственных средств в отдельно взятых популяциях, населяющих различные регионы мира или отдельной страны. При рассмотрении вопросов этнической фармакологии у больных артериальной гипертензией афроамериканцев и европеоидов установлены различия антигипертензивного эффекта ингибиторов АПФ (Чазова И.Е., 2000; Вилкинсон Я. Б., 2005). Одними из первых работ по этнофармакологии в нашей стране, были исследования, посвященные изучению различий частот фенотипов скорости ацетилирования в этнических группах коренных народов Крайнего Севера и Дальнего Востока (Дьяченко В.Г., с соавт., 1997; Чижова Г.В., с соавт., 2001; Сулейманов С.Ш., с соавт., 2003). Широко известны исследования по изучению частот полиморфных аллелей и генотипов системы биотрансформации и транспортеров (Кукес В.Г., Сычев Д.А., 2007; Ляхович В.В., с соавт., 2004).

Одним из наиболее изученных препаратов с позиций фармакогенетики является непрямой антикоагулянт варфарин. Хорошо описана во многих работах этническая вариативность чувствительности к непрямым антикоагулянтам в различных популяциях (Scordo M.G., et al., 2001; Кукес В.Г., с соавт., 2005; 2007; Siguret V., et al., 2007; Limdi N.A., et al., 2008; Курбанов Р.Д., с соавт., 2012). Установлено, что индивидуальные особенности дозирования варфарина обусловлены полиморфизмом генов, контролирующих процессы фармакокинетики и фармакодинамики препарата, при этом клинически наиболее значимыми по влиянию на эффективность варфарина, являются полиморфизмы генов *CYP2C9* и *VKORC1* (Jeffrey J.W. et al., 2012).

Регион Северного Кавказа, и, в частности, Ставропольский край с позиций этнической фармакологии для исследователей представляет особый интерес, поскольку этносфера Ставрополя исторически сложилась как полиэтническая и мультикультурная (Шаповалов В.А., 2006). Важно отметить, что ранее были установлены этнические различия в действии антигипертензивных препаратов у жителей региона Кавказских Минеральных Вод (Батурин В.А., Яковлева Н.В., 2006). Выявлены различия в скорости ацетилирования изониазида у армян, русских, карачаевцев, даргинцев, проживающих на территории Ставропольского края (Левченко В.И., 2003).

В контексте сказанного представляет научный интерес изучение этнических аспектов действия варфарина и оценка генетических особенностей полиморфизма ферментов биотрансформации (CYP2C9) у жителей Ставропольского края, относящихся к трем наиболее многочисленным этническим группам: славянской, армянской и карачаевской.

### **Степень разработанности**

Одним из главных факторов, определяющих фармакологический эффект большинства ЛС, являются генетические особенности конкретного пациента. Наиболее существенные результаты были достигнуты в изучении клинического значения полиморфизма генов, контролирующей функцию ферментов метаболизма ЛС, при этом генетический полиморфизм установлен для многих изоферментов цитохрома P450, в том числе для CYP2C9, ведущее значение которого определено для биотрансформации непрямых антикоагулянтов. Межэтнические различия генетического полиморфизма CYP2C9 были установлены во многих регионах мира. Продолжение исследований в этом направлении позволяет заблаговременно определить индивидуальные различия в результатах терапии, что сможет повысить ее эффективность и избежать развития нежелательных лекарственных реакций. Подобный подход является одним из способов прогнозирования фармакологического эффекта ЛС, в связи с чем является актуальной задачей современного здравоохранения.

## **Цель исследования**

Оптимизировать применение варфарина у представителей трех наиболее многочисленных этнических групп Ставропольского края: славянской (этнические русские и украинцы), армянской и карачаевской на основании изучения антикоагуляционной активности препарата и генотипирования *CYP2C9*.

## **Задачи исследования**

1. Провести сравнительный анализ антикоагуляционной активности варфарина у больных трех наиболее многочисленных этнических групп жителей Ставропольского края (славян, армян, карачаевцев), получающих варфарин в комплексной терапии фибрилляции предсердий.
2. Провести генотипирование *CYP2C9* для изучения распространенности «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* и формируемых ими генотипов у здоровых представителей исследуемых этнических групп, проживающих в районах Ставропольского края.
3. Провести сравнительный анализ результатов генотипирования *CYP2D6* и *CYP2C9* путем дополнительного изучения распространенности «медленных» полиморфных маркеров *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* и формируемых ими генотипов у здоровых представителей исследуемых этносов.
4. Разработать рекомендации по повышению эффективности и безопасности терапии варфарином для пациентов, проживающих в Ставропольском крае.

## **Научная новизна**

Впервые проведена оценка антикоагуляционной активности варфарина у больных с фибрилляцией предсердий в трех этнических группах жителей Ставропольского края (славян, армян, карачаевцев). Впервые выявлены этнические особенности результативности терапии варфарином у армян, славян и карачаевцев. Показано, что представители армянского этноса нуждаются в более низкой суточной дозе варфарина, вместе с тем, они быстрее достигают целевых

значений МНО (2 - 3). У армян гораздо чаще по сравнению с карачаевцами и славянами отмечались эпизоды увеличения МНО выше 3.

Впервые определены частоты аллелей и генотипов для генов *CYP2C9* и *CYP2D6* в трех этнических группах Ставропольского края (славяне, армяне, карачаевцы), выявлены этнические различия в их распространенности: установлена большая частота *CYP2C9\*2* у славян и армян по сравнению с карачаевцами, с преобладанием *CYP2C9\*3* у армян. Максимальная частота «медленного» аллельного варианта *CYP2D6\*4* установлена в группе карачаевцев.

Установлено, что наибольшее количество генотипов «медленных» окислителей *CYP2C9* выявлено в группе армян и наименьшее среди изученных этнических групп – у карачаевцев. В то же время, частота носителей генотипов «медленных» окислителей *CYP2D6* преобладала у карачаевцев, и была наименьшей у армян. Славяне и в первом и во втором случае занимают промежуточное положение.

### **Практическая значимость**

Представители армянской этнической группы имеют более высокий риск развития осложнений при терапии варфарином, чем славяне и карачаевцы, что необходимо учитывать при разработке стандартов по использованию лекарственных средств в Ставропольском крае.

Проведение фармакогенетического исследования *CYP2C9* показано больным с высоким риском развития НЛР, а именно представителям армянской этнической группы для выбора индивидуального режима дозирования варфарина в рамках оценки эффективности и безопасности терапии.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Больным с фибрилляцией предсердий, являющимся представителями армянской этнической группы, для достижения целевых значений МНО требуются меньшие дозы варфарина по сравнению со славянами и карачаевцами.

2. У больных, являющихся представителями армянского этноса, на фоне терапии варфарином чаще, чем у карачаевцев и славян определялись эпизоды увеличения МНО выше 3, что может быть сопряжено с высоким риском неконтролируемой коагулопатии у лиц армянской этнической группы.
3. Частота «медленного» полиморфного маркера *CYP2C9\*3*, оказывающего влияние на манифестацию геморрагического синдрома, была наибольшей в этнической группе армян Ставропольского края (15,8%) по сравнению со славянами (6,3%) и карачаевцами (10%).
4. Распределение частот аллелей (*CYP2D6\*4*) и генотипов *CYP2D6* (*CYP2D6\*1/\*4*), ассоциирующихся с низкой активностью фермента, а, следовательно, и со сниженной скоростью биотрансформации ЛС-субстратов *CYP2D6*, свидетельствует о возможности повышенной чувствительности представителей карачаевцев к ЛС-субстратам *CYP2D6*.
5. Всем больным, являющимся представителями армянской этнической группы, с целью снижения риска развития геморрагических осложнений перед назначением варфарина показано проведение генотипирования по *CYP2C9*, в связи с чем исследование представляется необходимым включить в перечень тарифов на оплату медицинской помощи в сфере ОМС в Ставропольском крае.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 138 страницах и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, описание материала и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение, выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 39 отечественных и 168 зарубежных источников. Работа иллюстрирована 5 рисунками и 51 таблицей.

### **Апробация материалов исследования**

Основные положения диссертации доложены на I Съезде терапевтов СКФО (г.Ставрополь), май 2012 г.; IX Межрегиональной научно-практической

конференции РНМОТ (г.Пятигорск), апрель, 2013; XX юбилейном Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», г.Москва, 2013 г. (I место в рамках конкурса научных работ молодых ученых); II Съезде терапевтов СКФО (г.Ставрополь), сентябрь 2014 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 15 печатных работ, в том числе 4 статьи в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

# ГЛАВА 1. ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО ОТВЕТА

## (обзор литературы)

### 1.1. Факторы, определяющие ответ организма на медикаментозную терапию

Результат взаимодействия ЛС с организмом во многом зависит от индивидуальных особенностей фармакокинетики, которая определяется активностью системы биотрансформации ксенобиотиков (Середенин С.Б., 2004; Кукес В.Г., Сычев Д.А., 2006, 2007). При этом основным показателем, определяющим эффект ЛС, является его концентрация в области мишени действия (плазме крови). Следовательно, именно работа системы детоксикации ксенобиотиков, а точнее, различных факторов, воздействующих на неё, определяет уровень концентрации ЛС в плазме крови (Ingelman-Sundberg M., et al., 1999; Marzolini C., et al., 2004; Xie H.G., et al., 2002). В роли этих факторов выступают пол, возраст, масса тела, тип и степень тяжести заболевания, особенности питания, дополнительно применяемые лекарственные препараты, а также генетические особенности конкретного пациента (Середенин С.Б., 2004; Кукес В.Г., с соавт., 2007).

С позиции сегодняшних знаний о механизмах взаимодействия ЛС с организмом генетически обусловленные индивидуальные различия в эффектах лекарств следует рассматривать как очевидную закономерность, поскольку все процессы фармакодинамики и фармакокинетики ЛС опосредованные рецепторами, ионными каналами, переносчиками, ферментами метаболизма - ДНК – зависимы, что и формирует их индивидуальность. В реальной практике ответ на ЛС определяется совокупностью генетических факторов и факторов внешней среды, которые, в свою очередь, способны модифицировать генетически зависимые свойства организма (Середенин С. Б., 2004). При этом можно ожидать

вариативности как эффекта лекарственных средств, так и изменений риска осложнений фармакотерапии.

## 1.2. Система метаболизма лекарственных средств

Реакция организма на поступление лекарственного препарата проявляется в виде последовательности химических процессов, что приводит к нейтрализации и элиминации ЛС.

В настоящее время выделяют следующие фазы детоксикации или элиминации ксенобиотиков и в т.ч. ЛС (Кукес В.Г., с соавт., 2004):

**0 фаза** - предотвращение всасывания ксенобиотиков в кишечнике (гликопротеин-Р);

**I фаза** - представляет собой реакции, в процессе которых ксенобиотики переходят в более гидрофильные соединения, за счет присоединения или освобождения активных функциональных групп (например, -ОН, -NH<sub>2</sub>, -SH), осуществляемые, главным образом, посредством изоферментов цитохрома Р-450;

**II фаза** - представляет собой синтетические реакции, т.е. соединение (конъюгацию) ксенобиотиков и/или их метаболитов с эндогенными веществами, в результате чего образуются гидрофильные конъюгаты;

**III фаза** - активная секреция ксенобиотиков и/или их метаболитов в мочу или желчь, осуществляемая гликопротеином-Р, а также транспортерами органических анионов и катионов.

Результатом биотрансформации является изменение фармакологической активности препарата, при этом ЛС подвергаются воздействию ферментов I и (или) II фаз метаболизма и транспортеров ЛС.

## **Цитохром P-450: основные свойства и роль суперсемейства в метаболизме ксенобиотиков**

Цитохром P-450 относится к числу наиболее интенсивно изучаемых ферментов не только в связи с его важной ролью в организме, но и в связи с особенностями его строения и механизма функционирования. Он представляет собой группу гемсодержащих ферментов, функционирующих в комплексе с соответствующими редуктазами, локализованными в мембранах эндоплазматического ретикулума, главным образом, клеток печени и желудочно-кишечного тракта. Энзимы семейства P-450 играют важную роль в метаболизме как эндогенных соединений (стероиды, желчные кислоты, жирные кислоты, простагландины (тромбоксан A<sub>2</sub>, простаглицлин I<sub>2</sub>), лейкотриены, биогенные амины), так и экзогенных: лекарственные средства, яды, продукты промышленного загрязнения, пестициды, канцерогены, мутагены и т.п. Общим для цитохромов P-450 является наличие нековалентно связанного гема: они являются мембранными белками, первично связанными с внутриклеточными мембранами. Наряду с печенью, где находится наибольшее количество цитохрома P-450, он обнаружен также в кишечнике, надпочечниках, почках, легких, некоторых отделах головного мозга, коже, плаценте, миокарде (Lewis D.F.V., et al., 1999). Важнейшим свойством цитохрома P-450 является его способность метаболизировать практически все известные химические соединения в процессе первой фазы метаболизма ксенобиотиков. При этом наиболее значимым типом реакций является гидроксилирование. Эффективность действия ЛС, нежелательные реакции и эффекты взаимодействий ЛС определяются уровнем ферментативной активности цитохромов.

Все формы цитохромов P-450 взаимодействуют с 2 атомами кислорода. Один атом активируется для включения в молекулу субстрата (цитохромы входят в класс ферментов, называемых монооксигеназами), а второй участвует в образовании воды, и, таким образом, формируется гидроксилированный продукт. Превалирующее большинство цитохромов P-450 принадлежит к

микросомальному классу и обнаруживается в мембранах эндоплазматического ретикулума. Эти ферменты синтезируются на мембраносвязанных полирибосомах и включаются в липидный бислой через узнающие системы. Электроны к ним поступают через флавопротеин НАДФ-Н цитохром Р-450-редуктазу или через цитохром b5 (Середенин С. Б., 2004; Каркищенко Н.Н., с соавт., 2007; Кукес В.Г., с соавт., 2008).

В отличие от других гемопротеинов, обладающих, как правило, в клетке лишь одной активностью и строго определенной функцией, Р450 наряду с монооксигеназной может проявлять и оксидазную активность, генерируя активные формы кислорода в виде суперокисного и гидроксильного радикалов, перекиси водорода. В связи с этим в литературе иногда Р-450 называют оксидазой со смешанной функцией.

В настоящее время выделено более 1000 изоформ цитохрома Р-450, называемых изоферментами. По классификации D.W.Nebert (1987), основанной на дивергентной эволюции и гомологии нуклеотидов (аминокислотной последовательности), было принято в суперсемействе Р-450 различать семейства, подсемейства и индивидуальные гены. Цитохромы Р450, имеющие более 40% гомологии аминокислотных последовательностей объединяют в одно семейство, а имеющие более 55% гомологии – в одно подсемейство. Семейства обозначаются арабской цифрой, а подсемейства – прописной буквой, которые добавляются к корневому символу СYP (от cytochrome Р-450). Индивидуальные изоформы обозначаются второй арабской цифрой. Таким образом, полное наименование для одних из наиболее важных в клиническом отношении изоформ выглядит как СYP2С9 и СYP2D6. Субстратами для цитохрома Р-450 являются почти все лекарственные вещества, при этом его изоформы отличаются друг от друга субстратной специфичностью и регуляторами активности (ингибиторами и индукторами). При составлении номенклатуры не принималась во внимание каталитическая активность цитохромов, поэтому члены различных подсемейств могут иметь перекрывающуюся субстратную специфичность, а также

перекрестных индукторов и ингибиторов. Примером того факта, что лекарственные соединения могут метаболизироваться более чем одной изоформой, является amitriptilin (CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19). Хорошим примером стереоспецифичности цитохромов Р-450 является метаболизм варфарина, который представляет собой рацемическую смесь R- и S- форм, каждая из которых имеет свой путь биотрансформации. S-варфарин метаболизируется CYP2C9, тогда как менее активная форма – R-варфарин – с участием изоформ CYP3A4, CYP1A2 и CYP2C19. Значение этого факта заключается в том, что ингибирование либо индукция CYP2C9 будет иметь больший эффект на метаболизм варфарина, чем таковые, влияющие на уровень CYP3A4, CYP1A2 или CYP2C19 (Падалко В.И., с соавт., 2005). В свою очередь, ингибиторами одновременно нескольких изоферментов является ряд ЛС: циметидин, амиодарон, эритромицин, флувоксамин, метронидазол, омепразол, сертралин, противогрибковые препараты (флуконазол, кетоконазол).

Содержание различных изоферментов цитохрома Р-450 в печени человека, а также их вклад в окисление лекарств неодинаково. Около 75% ЛС метаболизируются, в основном, изоферментами 3A4, 2C9, 2C19, 2D6 и 1A2 (Williams J. et al., 2004). Каждый изофермент цитохрома Р-450 кодируется определенным геном. Гены изоферментов цитохрома Р-450 находятся в разных хромосомах и занимают в них разные локусы. К настоящему времени идентифицированы около 500 разных генов, кодирующих Р450 (Падалко В.И., с соавт., 2005). Информация об исследованиях структуры изофермента, субстратной специфичности, тканевой и клеточной локализации, строения гена и многих других свойствах приведена в базе данных «Cytochrome P-450, Database» (CPD), созданной в Институте биомедицинской химии РАН под руководством А.И.Арчакова (Арчаков А.И., с соавт., 2004). Наиболее обстоятельно изучены полиморфные варианты цитохромов, обеспечивающих I фазу метаболизма более 50% используемых в клинической практике лекарств. В списках лекарств, имеющих побочные эффекты – 59% препаратов, которые метаболизируются

полиморфными ферментами I фазы, из них 86% приходится на цитохромы. Известно более 200 вариантов аллелей цитохромов, участвующих в метаболизме лекарств. Наибольшее количество установлено для CYP2D6 – 141, для CYP2C9 – 64 - (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>), для CYP2C19 – 16. Разные фенотипы окисления определяют различия в фармакокинетических параметрах, а значит и эффектах ЛС (Вальдман Е.А., 2008).

Межвидовые, внутривидовые и индивидуальные различия в скорости метаболизма ксенобиотиков позволяют выделить популяционные группы в зависимости от активности ферментов метаболизма (Середенин С.Б., 2004; Vogni A., et al., 2005; Кукес В.Г., с соавт., 2008):

- EMs-метаболизаторы (от англ. «extensive metabolizers» - «экстенсивные» или «активные» метаболизаторы) - животные и люди со среднестатистической скоростью метаболизма ксенобиотиков. Как правило, они гомозиготны по «дикому» аллелю гена соответствующего фермента. К EMs-метаболизаторам относится большинство населения, а также видов и популяций животных;
- PMs-метаболизаторы (от англ. «poor metabolizers» - «медленные» метаболизаторы) – лица со сниженной скоростью метаболизма ксенобиотиков, как правило, гомозиготы (при аутосомно-рецессивном типе наследования) или гетерозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по полиморфному «медленному» аллелю гена соответствующего фермента. У PM-метаболизаторов либо отсутствует синтез фермента метаболизма, либо происходит синтез «дефектного» фермента, и как следствие - снижение ферментативной активности или ее отсутствие. У PM-метаболизаторов ксенобиотики накапливаются в организме в высоких концентрациях, что приводит к появлению выраженных нежелательных эффектов.
- IMs-метаболизаторы (от «intermediate metabolizers» - замедленные, промежуточные метаболизаторы). Лица с IMs-фенотипом имеют низкий уровень активности цитохрома.

- UMs-метаболизаторы (от «ultraextensive metabolizers» - «сверхактивные» или «быстрые» метаболизаторы) - лица с повышенной скоростью метаболизма, как правило, гомозиготы (при аутосомно-доминантном типе наследования) по полиморфному «быстрому» аллелю гена соответствующего фермента. Для «сверхактивных» метаболизаторов доза должна быть выше, чем для активных метаболизаторов.

Распространенность генотипов «медленных» и «быстрых» метаболизаторов по отдельным ферментам метаболизма ЛС в различных популяциях представлена в таблице 1. Для Российской Федерации, имеющий многонациональный состав, актуальность исследований в этом направлении очевидна, что определяет рациональность внедрения методов фармакогенетического тестирования (генотипирование пациентов по ферментам метаболизма) в регионах компактного проживания определенных этнических групп.

**Таблица 1. Распространенность генотипов «медленных» и «быстрых» метаболизаторов по отдельным ферментам метаболизма ЛС в популяциях (Rosemary J., 2007; Derek V. B., 2010; Кукеc В.Г., с соавт., 2007).**

Фермент	ЛС-субстраты ферментов метаболизма	Фенотип	Популяция (этническая группа)	Частота, %
СУР2С9	Варфарин, фенитоин, пероральные гипогликемические средства (производные сульфонилмочевины)	«Медленные» метаболизаторы	Белое население США	25,2
			Афроамериканцы	0,08
			Испанцы	27,5
			Французы	23
			Русские	17,2
			Египтяне	18
			Бенинцы	0
			Канадские индейцы	9
			Инуиты	0
			Жители США мексиканского	14

			происхождения	
			Жители юга Индии	12
			Китайцы	4,1
СУР2С19	Антиконвульсанты (вальпроевая кислота, барбитураты), ингибиторы протонного насоса (омепразол, лагоопразол)	«Медленные» метаболитаторы	Белое население США	13,6
			Коренное население Северной Америки	19,1
			Европейцы	12
			Русские	11,7
			Арабы	15
			Афроамериканцы	25
			Японцы	39,7
			Вануату	80
			Китайцы	36,3
			СУР2D6	в-адреноблокаторы, антидепрессанты, нейролептики, транквилизаторы
Афроамериканцы	2			
Коренное население Северной Америки	1-4			
Арабы	1			
Китайцы	0,7-1			
Европейцы	5-10			
Словаки	4			
Японцы	0			
Ганийцы	0-7,1			
Нигерийцы	0-8,1			
Египтяне	1,4			
Гренландцы	3,2			
			Жители	20

			Гонконга	
		«Быстрые» метаболизаторы	Европейцы	5-7
			Испанцы	7
			Скандинавы	1,5
N-ацетилтрансфераза	Изониазид, гидралазин, прокаинамид, сульфаниламиды	«Медленные» метаболизаторы (ацетиляторы)	Белое население США	60
			Афро американцы	60
			Коренное население Северной Америки	20
			Европейцы	50-58,6
			Монголоиды	10-15
			Эскимосы	10,5
			Японцы	12
			Китайцы	22
			Индийцы	59
			Московская популяция	46
			Египтяне	90

### 1.3. Этнические аспекты результативности лекарственного воздействия

Исследования взаимосвязи этнических особенностей и здоровья человека в последнее десятилетие вызывают большой интерес. Результаты многолетних исследований позволили определить распространенность болезней среди народов разных стран и регионов. Изучено влияние полиморфизмов генов, кодирующих ферменты биотрансформации, на эффективность фармакотерапии (Баранов В.С., с соавт., 2001; Ляхович В.В., с соавт., 2004; Носиков В.В., с соавт., 2005). Установлены этнические особенности течения метаболических процессов

(Сулейманов С.Ш., с соавт., 2003; Сычев Д.А., с соавт., 2005). Соответственно выявлены и различия в эффектах лекарственных препаратов в разнообразных этнических группах (Вартанян Ф.Е., 2004; Батулин В.А., Яковлева Н.В., 2006; Кукес В.Г., с соавт., 2007; Коман И.Э., с соавт., 2005).

Каждый этнос имеет свою историю формирования, определяемую множеством причин и условий как внешнего, так и внутреннего характера. Прошел очень длительный исторический период времени прежде, чем сформировалась современная география сложной этнической мозаики и национального состава населения Северного Кавказа. Южная окраина России - Северокавказская в корне отличается от других ареалов страны. На территории Северного Кавказа проживает около 50 народов, имеющих самостоятельные языки и более 100 диалектов (Шаповалов В.А., 2006).

Человек, как вид, характеризуется выраженной изменчивостью морфофизиологических особенностей. Человеческие популяции проявляют определенную изменчивость под влиянием факторов окружающей их среды. Экологические факторы, накладываясь на биологическую основу человека, оказывают разнообразное влияние на группы людей, различающихся по генетической структуре, которая и определяет реакцию конкретного организма в ответ на воздействие факторов окружающей среды и обуславливает присущие ему морфологические и функциональные характеристики. Судя по природе морфофункциональных особенностей популяций, проживающих в определенных географических условиях, эта реакция носит адаптивный характер. В течение многих тысяч лет человек сумел адаптироваться к окружающей среде, экологическим условиям и местному климату. Такая долгосрочная адаптация не могла не оставить оригинальный отпечаток на генетическом аппарате представителя любой расы или этнической группы (Пашутин С. Б., 2005).

Становление этноса определяется также и влиянием факторов, способствующих формированию национального темперамента и характера: наследственность, определяющая расовые признаки, приспособление к моральной

и социальной среде. Под этнической природой особей определенной популяции следует рассматривать генетически детерминированный метаболический статус, представляющий собой совокупность ферментативных процессов метаболизма веществ различного происхождения (продуктов питания, лекарственных средств). При этом реакция индивидуумов различных этнических групп будет иметь разную степень выраженности в зависимости от частоты содержания носителей того или иного фенотипа метаболизма веществ и исходной активности ферментных систем в соответствующих популяциях (Пирузян Л.А., 2004; Кукес В.Г., с соавт., 2008).

Важно отметить, что спектр и частоты различных мутаций и генетического полиморфизма обладают выраженной популяционной специфичностью. В популяциях, ограниченных и географически и социально, обмен генами происходит преимущественно внутри популяции, что приводит к накоплению определенного гена. Поэтому мутации, характерные для населения одного региона или этноса, существенно отличаются от таковых в других географических ареалах или в других этнических группах. Такого рода генетическая вариабельность, ограниченная одним видом, получила название **генетического полиморфизма**. Экологическая адаптация, различия в продуктах питания, тяжелые инфекции (оспа, чума, холера, СПИД), селективное преимущество гетерозигот (эффект гетерозиса), дрейф генов (случайные колебания в популяции числа аллелей) - вот основные популяционные факторы и механизмы, определяющие естественные колебания числа ГП и мутаций в различных популяциях и в регионах мира (Рычков Ю. Г., с соавт., 1996).

Генетический полиморфизм может быть качественным, когда происходят замены или потери отдельных нуклеотидов, и количественным, когда в ДНК варьирует число нуклеотидных повторов различной протяженности.

Качественный генетический полиморфизм представляет собой преимущественно однонуклеотидные замены - Single Nucleotide Polymorphism (SNP) (Wang. Z., et al., 2001). Это наиболее частый генетический полиморфизм.

Генетическое родство всех людей (сходство геномов - 99,9 %) продемонстрировало первое сравнительное изучение геномов у представителей разных рас и этнических групп, что позволило кроме того получить ценную информацию о происхождении человека, маршрутах его расселения по планете и о путях этногенеза.

**Количественный ГП** - представлен вариациями числа тандемных повторов (STR - Short Tandem Repeats) в виде 1-2 нуклеотидов (микросателлитная ДНК) либо 3 - 4 и более нуклеотидов на коровую (повторяющуюся) единицу. Это так называемая минисателлитная ДНК. Повторы ДНК могут иметь большую протяженность и вариабельную по нуклеотидному составу внутреннюю структуру - так называемые VNTR (Variable Number Tandem Repeats).

Как правило, количественный ГП касается внесмысловых некодирующих (кодовых) участков генома. Исключение составляют только тринуклеотидные повторы. Чаще это CAG (citosine-adenine-guanine) - триплет, кодирующий глютаминовую кислоту. Они могут встречаться и в кодирующих последовательностях ряда структурных генов. В частности, такие ГП характерны для генов «болезней экспансии». В этих случаях по достижении определенной копийности тринуклеотидного (полинуклеотидного) повтора ГП перестают быть функционально нейтральными и проявляют себя как особый тип так называемых «динамических мутаций» (Горбунова В. Н., с соавт., 1997; Пузырев В. П., с соавт., 1997; Иллариошкин С. Н., с соавт., 2002). Последние особенно характерны для большой группы нейродегенеративных заболеваний (хорея Гентингтона, болезнь Кеннеди, спиноцеребеллярная атаксия и др.).

На сегодняшний день хорошо известно, что полиморфизм характерен практически для всех генов человека. Более того, установлено, что он имеет выраженную этническую и популяционную специфику, и эта особенность позволяет широко использовать полиморфные генные маркеры в этнических и популяционных исследованиях (Лимборская С. А., с соавт., 2002).

Отличительной особенностью генетических факторов, является их постоянство в течение всей жизни (Evans W.E., et al., 2003). Выявление генетических особенностей у больных позволяют прогнозировать фармакологический ответ на ЛС, а значит повысить эффективность и безопасность применения ЛС, так как идентификация соответствующего аллельного варианта, приводящего к изменениям фармакокинетики и (или) фармакодинамики у больного, требует коррекции терапии (доза, кратность введения, путь введения, замена ЛС и т.д.) (Evans W.E., et al., 2003; Середенин С.Б., 2004; Кукес В.Г., с соавт., 2004; Kalow W., et al., 2005). Поэтому, применение подобного подхода в клинической практике позволяет индивидуализировать фармакотерапию. Все этапы фармакокинетики ЛС, такие как всасывание, распределение, метаболизм (биотрансформация), выведение находятся под контролем соответствующих генов (Кукес В.Г., с соавт., 2000, 2004; Пирузян Л.А., 2004). Поэтому, теоретически, полиморфизм различных генов может влиять на все из выше названных фармакокинетических процессов. Однако, как показали исследования, проведенные в последнем десятилетии, наибольшее клиническое значение имеет полиморфизм генов, контролирующих синтез и работу ферментов биотрансформации ЛС, а также транспортных белков-переносчиков ЛС, то есть транспортеров, участвующих в их всасывании, распределении и выведении (Schwab M., et al., 2003; Marzolini C., et al., 2004).

#### **1.4. Генетический полиморфизм *CYP2C9*: этническая вариабельность и клиническое значение**

Генетически детерминированное изменение активности *CYP450* подтверждено многочисленными исследованиями в различных популяциях и этнических группах, как за рубежом, так и в РФ. Имеющиеся данные о клинически значимых аллелях генов позволяют с учетом этнических

особенностей, оптимизировать фармакотерапию, а также на молекулярном уровне устанавливать причины разной восприимчивости к ЛС у представителей различных этнических групп (Linder M.W., et al., 1999; Ingelman-Sundberg M., et al., 2005). Изучение этнических аспектов полиморфизма генов имеет перспективы для разработки и внедрения фармакогенетических тестов, а также позволяет оценить эффективность и экономическую целесообразность их применения.

### **Общая характеристика изофермента цитохрома P-450 2C9 (CYP2C9)**

Подсемейство ферментов CYP2C состоит из 4-х изоферментов: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 и CYP2C19 (Lee C.R., et al., 2002). Из них CYP2C9 и CYP2C19 имеют наибольшее значение в метаболизме ксенобиотиков (Daly A.K., 2003). Изоферменты подсемейства ПС составляют около 18% от всех изоферментов цитохрома P-450 печени (Woolf T.F., 1999).

CYP2C9 представляет собой белок, состоящий из 490 аминокислотных остатков с молекулярной массой 55 кДальтон. Ген цитохрома 2C9 находится в 10 хромосоме, локусе 10q24.1-24.3. CYP2C9 находится, в основном, в печени. CYP2C9 начинает обнаруживаться в печени через 1 месяц после рождения и его активность не меняется в течение всей жизни (Woolf T.F., 1999).

### **Субстраты**

Считается, что CYP2C9 ответственен за метаболизм 15 - 20% всех препаратов, подвергшихся I фазе) (Ali Z.K. et al., 2009; Lee C.R., et al., 2002). CYP2C9 – основной фермент биотрансформации НПВП, блокаторов рецепторов ангиотензина II, пероральных гипогликемических средств (производные сульфонилмочевины), флувастатина, антикоагулянтов непрямого действия (варфарин, аценокумарол) и некоторых других ЛС (таблица 2).

**Таблица 2. Субстраты CYP2C9.**

<b>Наименование препарата</b>	
Ирбесартан	Лорноксикам
Лозартан	Мелоксикам
Кандесартан	Напроксен

Фенитоин	Торасемид
Циклофосфамид	Глибенкламид
Тамоксифен	Глимепирид
Флувастатин	Глипизид
Целекоксиб	Толбутамид
Диклофенак	Варфарин
Ибупрофен	Аценокумарол

### **Индукторы и ингибиторы**

Индуктором CYP2C9 является рифампицин (Vormfelde S., et al., 2009), совместный прием с которым приводил к увеличению клиренса ЛС, являющихся субстратами CYP2C9. Клиренс лозартана, фенитоина, толбутамида и S-варфарина у здоровых добровольцев и пациентов, получавших рифампицин, увеличивался двукратно (Miners J.O., et al., 1998; Kanebratt K.P., et al., 2008).

Ингибиторами CYP2C9 являются амиодарон, флуконазол, сульфафеназол и ряд других ЛС (Miners J.O., et al., 1998). Опасные взаимодействия ЛС могут возникнуть, когда ингибиторы назначаются совместно с препаратами, имеющими низкий терапевтический индекс, например, S-варфарином, толбутамидом, фенитоином (Wells P.S., et al., 1994; Levy R.H., et al., 1995; Scheen A.J., et al., 2005). Например, совместное применение варфарина с амиодароном (ингибитор CYP2C9) приводит к усилению антикоагулянтного эффекта варфарина (Lu Y., et al., 2008; Siddoway L.A. et al., 2003; Heimark L.D., et al., 1992).

### **Полиморфизм гена CYP2C9 – межэтническое распределение**

Ген CYP2C9 обладает выраженным генетическим полиморфизмом. Установлено замедление метаболизма CYP2C9 в трех подсемействах CYP (1, 2 и 3), вовлеченных в I фазу. При этом максимальное количество мутантных «медленных» вариантов зарегистрировано в подсемействе 2 (Solus J.F., et al., 2004).

Наиболее распространенными и хорошо изученными полиморфизмами CYP2C9 являются аллельные варианты CYP2C9\*2 (R144C) и CYP2C9\*3 (I359L),

ассоциированные с замедлением скорости метаболизма ЛС-субстратов. Другие варианты полиморфизмов также изучены. Определена их роль в метаболизме ЛС (Blaisdell J., et al., 2004; Kidd R.S., et al., 2001; Rosemary J., et al., 2007).

Из более 50 различных аллелей *CYP2C9*, которые были описаны, наиболее распространенным является *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*. *CYP2C9\*2* сформирован заменой С430Т на экзоне 3, который приводит к преобразованию Arg144Cys. В результате формируется фермент со сниженной активностью (Crespi C.L., et al., 1997). Аллель *CYP2C9\*3* формируется заменой С1075Т в 7 экзоне гена *CYP2C9*. Это заканчивается изменением синтеза белка с заменой Ile359Leu, который определяет еще более сниженную ферментативную активность, чем вариант *CYP2C9\*2* (Sullivan-Klose T.H., et al., 1996; Niemi M., et al., 2002).

По сравнению с аллелем «дикого» типа, обозначаемым как *CYP2C9\*1*(Arg144-Ile359), варианты *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* обеспечивают синтез фермента со сниженной метаболизирующей активностью. Поэтому носителей вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* как в гомозиготном, так и в гетерозиготном состоянии считают «медленными» метаболизаторами: у них снижен метаболизм лекарственных средств, которые в больших концентрациях накапливаются в организме. Это, в свою очередь, приводит к появлению нежелательных лекарственных реакций, вплоть до интоксикаций. В связи с этим таким лицам следует назначать лекарственные средства в дозе меньше средней терапевтической (Сычев Д. А., 2005; Кукес В.Г., 2007). При этом активность *CYP2C9* у носителей аллельного варианта *CYP2C9\*2* составляет 18% от нормальной, а у носителей аллельного варианта *CYP2C9\*3* – только 5% (Кукес В. Г., 2008).

Полиморфизмы гена *CYP2C9* обуславливают достижение терапевтического эффекта и возникновение нежелательных эффектов большого числа НПВС (Kirchheiner J., et al., 2003; Martin J.H., et al., 2001), противодиабетических препаратов производных сульфонилмочевины (Kirchheiner J., et al., 2002; 2004) и,

что особо важно, пероральных антикоагулянтов (Kirchheiner J., et al., 2005; Rost S., et al., 2005; Siguret V., et al., 2007).

Необходимость определения полиморфных вариантов *CYP2C9* при лечении варфарином демонстрирует большое число исследований (Loebstein R., et al., 2005; 2007). В настоящее время разработаны алгоритмы для их применения в клинической практике (Momyar K.M., et al., 2007; Sconce E.A., et al., 2006; Zhu Y., et al., 2007).

Установлено, что частоты полиморфных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* проявляют существенные межэтнические различия и, вероятно, могут являться «маркерами» предрасположенности к риску развития нежелательных побочных реакций на эти лекарства в каждой отдельной популяции (Середенин С. Б., 2004; Кукес В.Г., с соавт., 2007). Следовательно, выявление генотипов *CYP2C9* важно для достижения оптимальных результатов лекарственной терапии, прогнозирования и предотвращения развития нежелательных побочных реакций.

Исследования групп европеоидов, включая турок (Aynacioglu A.S., et al., 1999), русских (Gaikovitch E.A., et al., 2003), хорватов (Bozina N., et al., 2003; Topic E., et al., 2004), испанцев (Dorado P., et al., 2003), французов (Yang J.Q., et al., 2003) и бельгийцев (Allabi A.C., et al., 2003) показали различия в распределении аллелей *CYP2C9\*2* и *\*3*, частота которых была выше, чем у Восточно-Азиатских и африканских народов (Lee C.R., et al., 2002; Sistonen J., et al., 2009) (таблица 3).

Оба аллеля *CYP2C9\*2* и *\*3* имеют большую распространенность среди американцев европейского происхождения по сравнению с афроамериканцами (Limdi N.A., et al., 2007; 2008; Schelleman H., et al., 2007).

**Таблица 3. Распределение частот аллелей *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в этнических группах.**

Этническая группа	n	*1	*2	*3	Источник
Турки	499	79.4	10.6	10	[Aynacioglu A.S., et al., 1999]
Русские	290	82,8	10,5	6,7	[Gaikovitch E.A., et al., 2003]

Хорваты	200	74	16,5	9,5	[Bozina N., et al., 2003]
Хорваты	177	83,9	12,4	3,7	[Wolf C.R., 1999]
Испанцы	102	74	16	10	[Dorado P., et al., 2003]
Испанцы	152	74	16	10	[LLerena A., 2004]
Испанцы	157	69,5	14,3	16,2	[Garcia-Martin E., et al., 2001]
Французы	151	77	15	8	[Yang J.Q., et al., 2003]
Бельгийцы	121	82,2	10	7,4	[Allabi A.C., et al., 2003]
Боливийцы	778	92,2	4,8	3,0	[Bravo-Villalta H.V., et al., 2005]
Бразильцы	331	84,9	8,6	6,5	[Vianna-Jorge R., et al., 2004]
Бенинцы	111	95,5	0	0	[Allabi A.C., et al., 2003]
Жители США мексиканского происхождения	169	86	8	6	[LLerena A., et al., 2004]
Жители Фарерских островов	312	85,9	8,8	5,3	[Halling J., et al., 2005]
Египтяне	247	82	12	6	[Hamdy S.I., et al., 2002]
Канадские индейцы (100%)	114	91	3	6	[Gaedigk A., et al., 2001]
Инуиты	151	100	0	0	[Gaedigk A., et al., 2001]
Жители юга Индии	346	88	4	8	[Jose R., et al., 2005]
Китайцы	235	96,4	0	3,6	[Hong X., et al., 2005]
Китайцы	265	95,1	0	4,9	[Yu B.N., et al., 2004]
Китайцы	394	96,3	0,1	3,6	[Yang J.Q., et al., 2003]
Японцы	140	98,9	0	1,1	[Kimura M., et al., 1998]
корейцы	574	98,9	0	1,1	[Yoon Y.R., et al., 2001]
Вьетнамцы Kinh	157	97,8	0	2,2	[Lee S.S., et al., 2005]

Испанское население показало частоту 16,2% для *CYP2C9\*3*, самое высокое среди европейцев (Dorado P., et al., 2003; LLerena A., et al., 2004; Garcia-Martin E., et al., 2001). Генотип PMs присутствовал у 10% исследуемых.

У боливийцев (южноамериканское население) оказалась более низкая частота аллелей *CYP2C9\*2* по сравнению с другими белыми (европейцы и

североамериканцы), но она оказалась выше, чем у народов Восточной Азии (Bravo-Villalta H.V., et al., 2005). Частоты были сопоставимы с таковыми у канадских индейцев (Gaedigk A., et al., 2001), афроамериканцев (Sullivan-Klose T.H., et al., 1996) и эфиопов (Scordo M.G., et al., 2001). Фенотип PMs среди боливийцев распространен у 0,4% населения.

У бразильского населения, частоты аллелей *CYP2C9* были сопоставимы с таковыми у европейцев. Однако у темнокожих они встречались до 2,5 - 3 раза реже (Vianna-Jorge R., et al., 2004).

Жители США мексиканского происхождения, включая испаноговорящих лиц, продемонстрировали распространенность *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*, подобную европейцам, которая оказалась выше, чем у африканцев, но ниже, чем у жителей Восточной Азии (LLerena A., et al., 2004).

У арабского населения (египтяне) и жителей Фарерских островов (Halling J., et al., 2005; Hamdy S.I., et al., 2002) также частота аллелей *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* была подобна таковой у европейцев.

Распространенность полиморфизма *CYP2C9* на юге Индии (Jose R., et al., 2005) имеет отличия от европейцев и китайцев. В то время как частота аллеля *CYP2C9\*2* в этой популяции выше, чем у китайцев и ниже, чем у европейского населения, *CYP2C9\*3* присутствует в количестве, сопоставимом с частотой, выявленной у белых.

Среди жителей Восточной Азии *CYP2C9\*2* чрезвычайно редок. Будучи обнаруженным только у 0,1% китайцев (Yang J.Q., et al., 2003; Yu BN, 2004; Hong X., et al., 2005), аллель отсутствовал у японцев (Kimura M., et al., 1998), вьетнамцев Kinh (Lee S.S., et al., 2005), и корейцев (Yoon Y.R., et al., 2001). Исследования Xie H.G. и др. показали, что частота аллеля *CYP2C9\*3* среди китайцев оказалась 3,3% и 4,5% в группе японцев (Xie H.G., et al., 2002).

Интересно, что ни один дефектный аллельный вариант не был обнаружен у инуитского населения Канады (Gaedigk A., et al., 2001).

Помимо двух основных вариантов, описанных выше, большое количество других однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) было открыто в регулирующих и кодирующих областях гена *CYP2C9*. Некоторые полиморфизмы также связаны со сниженной активностью фермента по сравнению с «диким типом». Такой редкий мутантный аллель, как *CYP2C9\*1B*, например, наблюдался в популяции русских Воронежа с частотой 24,8% (Gaikovitch E.A., et al., 2003).

*CYP2C9\*6* (818delA, rs9332131) является редким (1 аллель у 158 афроамериканцев, 0 у европейцев (белого населения) и представляет собой аллель с отсутствием активности в результате нарушения сплайсинга, который вызывает сдвиг рамки считывания, приводящий к синтезу дефектного белка (Kidd R.S., et al., 2001).

Вариант I359T (*CYP2C9\*4*) является также редко встречающимся полиморфизмом (0,5% у афроамериканцев, 6% у европейцев) (Kimura M., et al., 1998; Sullivan-Klose T.H., et al., 1996). *CYP2C9\*4* представляет собой однонуклеотидную замену C1076T в седьмом экзоне гена, который привел к аминокислотной замене изолейцина на треонин в положении 359 (I359T). Оба аллельных варианта были впервые обнаружены у пациентов, с неблагоприятными реакциями на фенитоин (Kidd R.S., et al., 2001; Imai J., et al., 2000).

*CYP2C9\*5* (D360E) присутствует у 0,8% жителей Танзании (Yasar U., et al., 2002) и у 1,8% жителей Бенина (Allabi A.C., et al., 2003).

*CYP2C9\*11* (R335W) был идентифицирован среди бенинцев у 2,7% обследованных (Allabi A.C., et al., 2003).

2% китайцев - носители аллеля *CYP2C9\*13* (L90P) (Guo Y., et al., 2005).

Варианты *CYP2C9\*5* (D360E), *\*6*, *\*8* (R150H), и *\*11* (R335W) были ассоциированы с медленным метаболизмом фенитоина у негроидного населения (Allabi A.C., et al., 2005).

Проспективное исследование азиатских пациентов, постоянно принимавших варфарин, позволило идентифицировать и другие мутации в промоторе, экзоне, интроне и 3'-нетранслируемом участке *CYP2C9* (Zhao F., et

al., 2004). Используя толбутамид, как маркер, было установлено, что каталитическая активность *CYP2C9\*14* и *CYP2C9\*16* была на 80-90% меньшей, а активность *CYP2C9\*17* и *CYP2C9\*19* была на 30-40% меньшей по сравнению с аллелем дикого типа. *CYP2C9\*15* и *CYP2C9\*18* вовсе не имели каталитической активности (Delozier T.C., et al., 2005).

Аллели *CYP2C9\*21* (89C>T → Pro30Leu), *CYP2C9\*22* (121A>G → Asn41Asp), и *CYP2C9\*23* (226G>A → Val76Met) были идентифицированы во время анализа гаплотипов *CYP2C9* среди населения США европейского происхождения (Veenstra D.L., et al., 2005). Аллельные варианты были распределены с частотой 0,5%, 0,3 % и 0,5%, соответственно.

### **Клиническое значение генетического полиморфизма *CYP2C9***

За последнее десятилетие выполнено большое количество исследований, посвященных изучению влияния носительства аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* на фармакокинетику, фармакодинамику, клиническую эффективность и безопасность непрямых антикоагулянтов. В фармакокинетических исследованиях, выполненных на здоровых добровольцах, показано, что носительство «медленных» аллельных вариантов ассоциируется с более высокими концентрациями S-варфарина, S-аценокумарола, а также более низкими значениями их клиренса, из-за замедления метаболизма этих препаратов (Scordo M.G., et al., 2002; Morin S., et al., 2004; Herman D., et al., 2005).

Выбор дозы варфарина демонстрирует широкие межиндивидуальные различия. Более высокие плазменные концентрации приводят к гипокоагуляции и осложнениям в виде кровотечений (Aithal G.P., et al., 1999). При этом многочисленные клинические исследования показали, что при применении непрямых антикоагулянтов у носителей «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* риск кровотечений может возрастать 2 – 3 - кратно. При этом риск гипокоагуляции (МНО более 4) возрастает до 3 - 4 раз (Schalekamp T., et al., 2004; Hummers-Pradier E., et al., 2003; Visser L.E., et al., 2004). У больных, являющихся носителями «медленных» аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и

*CYP2C9\*3*, подобранная доза непрямых антикоагулянтов была меньше, а терапевтические значения МНО достигались быстрее, по сравнению с пациентами, не несущими данных аллельных вариантов. Установлено, что 72% пациентов, которым было подобрана низкая доза варфарина (менее 26,25 мг/неделя) были носителями аллелей *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* (Scordo M.G., et al., 2002).

Сходные результаты были получены Сироткиной О.В. и соавторами. Носители аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* быстрее достигают гипокоагуляции и требуют достоверно меньшей дозы варфарина (Сироткина О.В., с соавт., 2004).

Reuvandi с соавторами (2004) обнаружили, что у 65 - 66% больных, являющихся гомозиготами и гетерозиготами по аллелям *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*, через 4 дня после начала применения варфарина значение МНО приближается к 3. В то же время лишь 33% гомозигот *CYP2C9\*1/\*1* через 4 дня терапии варфарином достигают уровня МНО равное 3.

У афроамериканцев наличие аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *\*3* было ассоциировано со значительным снижением дозы варфарина у 29% пациентов (Freeman B.D., et al., 2000). У американцев европейского происхождения *CYP2C9\*2* и *\*3* варианты были связаны с выбором более низких поддерживающих доз варфарина, с более длительным периодом для стабилизации дозы и увеличенным риском кровотечений (Veenstra D.L., et al., 2005).

В исследовании Voora D. И. соавт., 2005 г., с целью подбора дозы варфарина у 48 пациентов использовали алгоритм дозирования (Voora D., et al., 2005). Несмотря на то, что лица с «медленными» аллельными вариантами быстро достигли терапевтической дозы варфарина, рассчитанной с помощью алгоритма, они были по-прежнему подвержены риску возникновения неблагоприятных событий (МНО > 4) в 3,6 раза чаще ( $p = 0,01$ ).

Herman D. и соавторы изучали влияние генотипа *CYP2C9*, демографические факторы и наличие сопутствующей медикаментозной терапии на метаболизм варфарина и на величину поддерживающей дозы (Herman D., et al., 2005). Величина средней дозы варфарина у носителей «дикого типа», одного и двух мутантных аллелей была 4,88; 2,71 и 1,64 мг/день, соответственно.

В фармакокинетических исследованиях аценокумарола значения плазменного клиренса S-аценокумарола были на 45% ниже, а период полувыведения увеличен вдвое у носителей *CYP2C9\*1/\*3* генотипа. Активность \*3 варианта также уменьшена на 85% при исследовании *in vitro* для гидроксирования S-аценокумарола (Thijssen H.H., et al., 2003). В двух случаях гипокоагуляции после приема 3 - 4 доз аценокумарола 4 мг/сутки в отсутствие кровотечений, значение МНО было больше 9. Поэтому препарат был отменен, чтобы привести МНО к терапевтическому диапазону 2-3. При анализе ДНК, оба пациента, как оказалось, были гомозиготными носителями мутантного аллеля *CYP2C9\*3*. Таким образом, влияние генетического полиморфизма *CYP2C9* на аценокумарол также является клинически значимым (Verstuyft C., et al., 2001).

В настоящее время ответ на терапию антикоагулянтами связывают также с полиморфизмом генов, кодирующих компоненты витамин-К-эпоксидредуктазного комплекса (VKOR) (Caldwell M. D., 2007; Crawford D. C., et al., 2007; D'Andrea G., et al., 2005; Herman D., et al., 2006; Oldenburg J., et al., 2007). Как известно, к возникновению кумаринорезистентности у человека и формированию так называемого «фенотипа кровотечений», может приводить мутация гена, кодирующего субъединицу 1 этого комплекса (VKORC1) (Li T., et al., 2006; Oldenburg J., et al., 2007; Osman A., et al., 2006; Rost S., et al., 2004). VKORC1 - трансмембранный белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, являющийся мишенью действия непрямых антикоагулянтов (Rieder M.J., et al., 2005; Sconce E.A., et al., 2008; Tie J.K., et al., 2005). VKOR переводит витамин – К - 2, 3 - эпоксид в биологически активный гидрохинон витамина К, участвующий в карбоксилировании факторов

свёртывания крови II, VII, IX и X (Goodstadt L., et al., 2004; Oldenburg J., et al., 2006; Schalekamp T., et al., 2006; Stafford D. W., et al., 2005).

В большинстве исследований была показана связь между полиморфизмом гена VKORC1 и снижением эффективной дозы варфарина (Caldwell M.D., et al., 2007; Cho H.J., et al., 2007; D'Andrea G., et al., 2005; Lai S., et al., 2006; Sconce E. A., et al., 2005; Veenstra D. L., et al., 2005; Wadelms M., et al., 2005).

### **1.5. Генетический полиморфизм CYP2D6: этническая вариабельность и клиническое значение**

#### **Общая характеристика изофермента цитохрома P-450 2D6 (CYP2D6)**

Подсемейство цитохрома P-450 CYP1D включает 1 изофермент - CYP2D6 (Woolf T.F., 1999). CYP2D6 представляет собой белок, состоящий из 497 аминокислотных остатков, имеющий молекулярную массу 55 кДальтон. Ген CYP2D6 находится в 22 хромосоме, локусе 22q13.1. В печени взрослых, CYP2D6 составляет около 2-4% от всех изоферментов цитохрома P-450 (Zhou SF., et al., 2009). CYP2D6 метаболизирует около 25% всех известных ЛС, в том числе антидепрессанты, нейролептики, антиаритмические средства, противорвотные,  $\beta$ -адреноблокаторы, опиоиды (таблица 4).

**Таблица 4. Субстраты CYP2D6.**

<b>Наименование препарата</b>		
Амитриптилин	Клозапин	Симвастатин
Бисопролол	Кломипрамин	Спартеин
Венлафаксин	Лидокаин	Тамоксифен
Галоперидол	Лоратадин	Тимолол
Дебризохин	Метоклопрамид	Трамадол
Декстраметорфан	Метопролол	Фенацетин
Дилтиазем	Морфин	Фенформин

Имипрамин	Небиволол	Флуоксетин
Карведилол	Нортриптилин	Хлорпромазин
Кодеин	Пароксетин	Хлорфенирамин

### Индукторы и ингибиторы

Ингибиторами CYP2D6 являются циметидин, тербинафин, амиодарон, флуоксетин и ряд других ЛС. Наиболее мощный ингибитор - антидепрессант пароксетин. Индукторов CYP2D6 не имеет.

### Полиморфизм гена CYP2D6 - межэтническое распределение

CYP2D6 обладает генетическим полиморфизмом. Известно более 100 аллельных вариантов и число их со временем растет (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Среди них выделяют функциональные аллели, аллели со сниженной функцией и нефункциональные аллели, которые отражают широкий спектр активности фермента, от отсутствия активности, до сверхактивных метаболитаторов (таблица 5) (Bertilsson L., et al., 2002; Bjornsson T.D., et al., 2003; Vogni A., et al., 2005). Как следствие, при назначении стандартных доз это влечет за собой либо развитие побочных эффектов, либо отсутствие терапевтического эффекта препарата.

**Таблица 5. Ассоциация между аллельным вариантом и активностью фермента CYP2D6 (Hicks J. K., et al., 2013).**

Функциональный статус	Активность	Аллели
Функциональный - нормальная активность («дикий тип»)	1	*1, *2, *27, *33, *35, *39, *45, *46, *48, *53
Сниженная функция - низкая активность	0,5	*9, *10, *17, *29, *41, *49, *50, *54, *55, *59, *69, *72

Нефункциональный – отсутствие активности	0	*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *13, *14, *15, *16, *18, *19, *20, *21, *31, *36, *38, *40, *42, *44, *47, *51, *56, *57, *62
---	---	--

Аллели \*10, \*17, \*36, \*41 приводят к снижению активности фермента вследствие синтеза дефектного белка. В нулевых аллелях *CYP2D6* отсутствует синтез функционального белка и ферментативная активность *CYP2D6* также отсутствует. Это аллели \*3, \*4, \*5, \*6, \*7, \*8, \*11, \*12, \*13, \*14, \*15, \*16, \*18, \*19, \*20, \*21, \*31, \*38, \*40, \*42, \*44, \*56, \*62. Они несут ответственность за PMs-фенотип («медленные» метаболизаторы) в составе гомо- или гетерозигот. Наиболее важными «медленными» аллельными вариантами являются *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17*, *CYP2D6\*41* (Zhou S.F., et al., 2009).

Существует значительная вариабельность в распределении аллельных вариантов *CYP2D6* среди различных этнических групп (таблица 6), в результате соотношение лиц PMs, IMs, EMs и UMs в каждой популяции различно.

У европейцев более высокая частота фенотипа PMs (7%) *CYP2D6* складывается за счет большей распространенности аллелей *CYP2D6\*4* и *CYP2D6\*5*. Между тем, у азиатов обнаружена более низкая частота *CYP2D6\*4* - 1% (Gaedigk A., et al., 2003; Lin L.Y., et al., 1997; Strange R.C., et al., 1999; Mizutani T. et al., 2003).

**Таблица 6. Распределение частот аллелей гена *CYP2D6* в этнических группах (Hicks J.K., et al., 2013).**

Аллели	Африк анцы	Афроам ерикан цы	Белые (Европе йцы и жители	Средний Восток	Восточ ная Азия	Южная и Централь ная Азия	Аме рика
--------	---------------	------------------------	-------------------------------------	-------------------	-----------------------	---------------------------------	-------------

			Сев.Аме рики)				
*1	0,39	0,41	0,52	0,59	0,34	0,53	0,62
*2	0,20	0,12	0,27	0,24	0,12	0,31	0,24
*3	0,0003	0,0034	0,013	0,0013	0,00	0,00	0,0052
*4	0,033	0,06	0,18	0,076	0,0045	0,065	0,11
*5	0,06	0,058	0,028	0,023	0,058	0,025	0,016
*6	0,00	0,0027	0,0091	0,0096	0,0002	0,00	0,005
*7	0,00	0,00	0,0012	0,00	0,00	-	0,00
*8	0,00	0,00	0,0003	0,00	0,00	-	0,0015
*9	0,0010	0,0054	0,02	0,00	0,0008	0,014	0,013
*10	0,067	0,043	0,028	0,035	0,42	0,19	0,034
*14	0,0013	0,00	0,00	0,00	0,0092	0,00	0,0047
*17	0,19	0,18	0,0027	0,014	0,0002	0,0038	0,023
*36	0,00	0,0056	0,00	0,00	0,017	-	-
*41	0,10	0,10	0,092	0,22	0,022	0,10	0,057
xN	0,075	0,043	0,028	0,067	0,015	0,013	0,033
*1xN	0,014	0,0044	0,0077	0,038	0,0031	0,0050	0,0078
*2xN	0,015	0,016	0,013	0,036	0,0042	0,0050	0,023
*4xN	0,014	0,020	0,0028	0,00	0,00	0,00	0,0036

Как правило, для европейцев функциональная группа аллелей является преобладающей с частотой 71%. Нефункциональные аллели составляют 26% изменчивости, в основном, за счет *CYP2D6\*4*. Но среди всех европейцев, как показало исследование Halling J. и др., 2005 г. частота медленных метаболизаторов *CYP2D6* была в два раза выше среди населения Фарерских островов. Анализ полиморфных аллелей *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*9* выявил, что генотипы *CYP2D6* (\*3/\*4, \*4/\*4, \*4/\*6, \*6/\*6) составили 14,6%. Кроме того, участники исследования были фенотипированы по *CYP2D6* с использованием спартеина. Распределение метаболического отношения (спартеин/дидегидроспартеин) было бимодально, и 14,5% исследуемых были

фенотипированы как «медленные» метаболизаторы, которых также оказалось вдвое больше по сравнению с другими европейскими популяциями (7,4%) (Halling J., et al., 2005).

У монголоидов функциональные аллели составляют лишь около 50% от частоты аллелей *CYP2D6*. У азиатов и жителей островов Тихого океана с высокой частотой (41%) обнаруживается аллель *CYP2D6\*10*, обуславливающий фенотип медленного метаболизма (PMs) (Bradford L.D., et al., 2002). Частота данного аллеля у представителей монголоидной расы значительна. Так, по данным Garcia-Barcelo среди проживающих в Гонконге китайцев генотип *CYP2D6\*10/CYP2D6\*10* самый распространенный - он встречается у 41% жителей (Garcia-Barcelo M., et al., 2000). Еще 47% гетерозиготны по данному варианту. Генотипы *CYP2D6\*1/CYP2D6\*1* и *CYP2D6\*1/CYP2D6\*2* (оба аллеля кодируют фермент с нормальной активностью) были обнаружены лишь у 7,5% китайцев. Частота аллеля *CYP2D6\*10B* (с наличием дополнительной однонуклеотидной замены С1039Т, не изменяющей первичной структуры цитохрома) была в 5,5 раз выше, чем *CYP2D6\*10A*. Частота аллеля *CYP2D6\*10*, определенная в данном исследовании, составила 65%, что согласуется с данными, полученными на китайских выборках другими исследователями (от 48 до 70%). Интересно, что 5% китайцев имеют генотип *CYP2D6\*10/CYP2D6\*5*, ферментативная активность цитохрома Р450 2D6 у которых должна быть чрезвычайно низкой (Wolf C.R., et al., 2000).

Сходные данные были получены Su-Jun Lee с соавторами в группе корейцев. Обнаружено, что аллелем с наибольшей частотой носительства был *CYP2D6\*10* (45,6%), следующими по распространенности были *CYP2D6\*1* (32,3%), \*2 (9,9%), \*5 (5,6%), \*4 (2,2%), \*49 (1,4%) и некоторые другие редкие аллели (<1%). Наблюдаемые частоты *CYP2D6* были аналогичны приведенным для других азиатских популяций, за исключением *CYP2D6\*49*, который был найден у японцев с частотой 0,5% (Lee S.J., et al., 2009).

При обследовании японцев также с максимальной частотой был выявлен *CYP2D6\*10* (38,6%). Частоты *CYP2D6\*2*, *\*5* и *\*14* у японского населения были 12,9; 6,2 и 2,2%, соответственно. При этом аллели *CYP2D6\*3*, *\*4*, *\*8*, *\*11*, *\*12*, *\*17* и *\*18* обнаружены не были (Kubota T., et al., 2000).

Результаты генотипирования в группе коренных народов, принадлежащих к северным монголоидам, показали промежуточное положение частоты аллеля *CYP2D6\*4* у тундровых ненцев, по сравнению с европейцами и азиатами (0,07 против 0,2 у европейцев и 0,07 против 0,003 у азиатов соответственно) (Duzhak T., et al., 2000).

У представителей монголоидной расы с EMs-фенотипом метаболическое отношение окисления дебризохина в среднем выше, чем у европеоидов, а значит, в пределах данного фенотипа у монголоидов активность цитохрома *CYP2D6* более низкая. Причиной этого является повышенная частота однонуклеотидных полиморфизмов, вызывающих аминокислотные замены, снижающие работоспособность фермента (Fuselli S., et al., 2004; Huang J.D., et al., 1999; Ikenaga Y., et al., 2005).

В другой популяции азиатского населения - жителей Ирана определены частоты пяти основных аллелей: *CYP2D6\*2* (кодирует синтез фермента с нормальной активностью), *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*10*, и *CYP2D6\*17*, распределившиеся следующим образом: 32%, 12,5%, 3% и 9%, соответственно. *CYP2D6\*17* полностью отсутствовал в этой группе исследуемых. PMs фенотип был определен с общей частотой 4%. Это первое исследование генетического полиморфизма *CYP2D6* у иранского населения. Частоты изученных аллелей выявили определенные различия между этим населением и европейцами. При этом обнаружилось сходство с результатам, полученным в исследованиях у средиземноморцев и жителей Южной Индии (Kouhi N., et al., 2009).

Информация относительно североамериканских индейцев (Канада), жителей Центральной и Южной Америки демонстрирует сравнительно низкие частоты *CYP2D6\*10* в этих популяциях.

Частота функциональных аллелей у африканцев и афроамериканцев – также составляет приблизительно 50%. И африканцы, и афроамериканцы имеют аллели со сниженной активностью, представляющие 35% разновидностей аллелей, главным образом *CYP2D6\*17* (Bradford L.D., 2002). Такая же тенденция продемонстрирована и в исследовании Gaedigk A. Аллель *CYP2D6\*17* был более распространен (0,395) среди промежуточных (замедленных) метаболизаторов, чем экстенсивных. Аллель *CYP2D6\*29* также был более частым среди промежуточных метаболизаторов (0,114), чем у активных (0,057). Частоты для *CYP2D6\*17* и *CYP2D6\*29* были 0,213 и 0,072, соответственно. Среднее метаболическое отношение (MR) декстрометорфан/дексторфана показало значительно более низкую активность *CYP2D6* в группе афроамериканцев (0,016), чем у белого населения (0,0044) (Gaedigk A., et al., 2002).

Высокая частота аллеля с низкой активностью *CYP2D6\*17* (24,7%) прогнозирует, что население банту (Южная и Восточная Африка) имеют пониженную скорость метаболизма препаратов, являющихся субстратами *CYP2D6* (Dandara C., et al., 2001).

У афроамериканцев, однако, более чем вдвое увеличена средняя частота нефункциональных аллелей по сравнению с африканцами (14,5% против 6,3%). Нефункциональные аллели и аллели со сниженной функцией составляют около 50% их частоты у негроидного населения (Bradford L.D., 2002).

Таким образом, исследования различных рас и этнических групп показывают генетическую разнородность активности метаболических процессов ксенобиотиков, что диктует необходимость определения полиморфных маркеров генов, кодирующих ферменты биотрансформации для оптимизации (индивидуализации) фармакотерапии.

### **Клиническое значение генетического полиморфизма *CYP2D6***

Последствиями полиморфизма гена *CYP2D6* клинически могут проявляться или возникновением побочных действий или изменением терапевтического действия ЛС-субстратов *CYP2D6*. В настоящее время определение

функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* используется для выбора доз с целью оптимизации терапии при назначении трициклических антидепрессантов и нейролептиков, метопролола, кодеина, трамадола, антиаритмических препаратов (флекаинид, пропafenон), тамоксифена [<http://pharmgkb.org/view/dosing-guidelines.do>]. Как правило, препараты, наиболее подверженные влиянию полиморфизма *CYP2D6* – те, для которых *CYP2D6* представляет собой основной фермент метаболического пути, либо он участвует в образовании активных метаболитов. Например, метаболиты энкаинаида являются более мощными, чем сам препарат, и таким образом удлинение комплекса QRS более очевидно у EMs, чем в PMs. Напротив, пропafenон - более мощный, чем его метаболиты и активность препарата при терапии будет более выражена у PMs, чем у EMs, поскольку исходное лекарственное средство у лиц с фенотипом медленного метаболизма (PMs) накапливается (Zhou S.F., et al., 2009). По той же причине вследствие снижения скорости образования морфина у носителей медленных аллельных вариантов гена *CYP2D6* менее выражен анальгезирующий эффект кодеина. У носителей медленных аллельных вариантов гена *CYP2D6* образование O-деметилтрамадола значительно снижено, что приводит к недостаточному анальгезирующему эффекту. Исследуя эффект трамадола у оперированных на брюшной полости больных, было установлено, что гомозиготные носители «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2D6* не отвечают на терапию трамадолом в 2 раза чаще, чем пациенты, не несущие данных аллелей (Stamer U.M., et al., 2003).

Субстратами *CYP2D6* являются многие  $\beta$ -адреноблокаторы, включая бисопролол, пропранолол и карведилол. Однако только в метаболизме метопролола *CYP2D6* принимает наибольшее участие, «перерабатывая» до 70-80% ЛС при прохождении через печень (Fukumoto K., et al., 2006; Goryachkina K.A., et al., 2008; Rau T., et al., 2002). Кроме того, метаболиты метопролола не оказывают существенного влияния на  $\beta$ -адренорецепторы в терапевтическом

диапазоне концентраций (Fukumoto K., et al., 2006). В дальнейшем, они выводятся из организма через почки.

В исследовании Kirchheiner J. et al., 2004 г., выполненном на здоровых добровольцах, показано, что носительство «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2D6* ассоциируется с более высокими значениями максимальной концентрации метопролола в плазме крови, площади под фармакокинетической кривой (AUC), а также более низкими значениями его клиренса, из-за замедления биотрансформации препарата. При применении метопролола в дозе 100 мг/сутки у участников исследования в течение 6 месяцев авторы наблюдали более выраженное снижение ЧСС и АД именно у носителей функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* (Kirchheiner J., et al., 2004). Полученные результаты подтвердились в исследованиях на пациентах с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Rau T. и соавторы изучали равновесную концентрацию метопролола у пациентов сердечно-сосудистыми заболеваниями, принимающих данный препарат в течение 12 месяцев. Оказалось, что у носителей функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* равновесная концентрация метопролола была в 3-6 раз выше по сравнению с пациентами, не несущими данных аллельных вариантов (Rau T., et al., 2002). Очевидно, что подобные изменения фармакокинетики метопролола у носителей функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* должны приводить к нежелательным реакциям при применении данного препарата. Wuttke и соавторы при изучении генотипа *CYP2D6* у 26 пациентов с серьезными нежелательными реакциями метопролола (коллапс, асистолия, выраженная брадикардия, А-V блокады III степени) выявили, что 38% из них были гомозиготами по функционально дефектным аллелям *CYP2D6*, что оказалось в 5 раз выше по сравнению с пациентами, у которых не наблюдалось серьезных НЛР при применении этого препарата (Wuttke H., et al., 2002). С другой стороны, в исследовании Zineh I. et al., 2004г., в которое было включено 50 пациентов артериальной гипертензией, было показано отсутствие различий в частоте

нежелательных реакций метопролола у пациентов, в зависимости от генотипа *CYP2D6*. Кроме того, не было найдено корреляции между возникновением нежелательной реакций и AUC метопролола. Таким образом, данные об ассоциации носительства функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6* и нежелательных реакций метопролола противоречивы.

Японские исследователи - Taguchi и соавторы, продемонстрировали, что у японцев, длительно принимавших метопролол, равновесная концентрация препарата в плазме крови достоверно зависит от носительства аллеля *CYP2D6\*10*. В другой работе Taguchi M. приведены данные генотипирования и фармакокинетических исследований у 34-х пациентов монголоидной расы, принимавших метопролол в дозе 40-120 мг/сут. В группе лиц, носителей аллеля *CYP2D6\*10*, был достоверно ниже клиренс и объем распределения метопролола (Taguchi M., et al., 2003; 2004; 2005). Однако в группе исследуемых не было выявлено нефункциональных аллелей (*CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5* и *CYP2D6\*14*), свойственных фенотипу PMs, а частота аллеля *CYP2D6\*10* составила около 40%.

Эти же авторы не выявили влияния полиморфизма гена *CYP2D6* на фармакокинетику бисопролола у японцев пожилого возраста. Кроме того, в работе было показано, что на фармакокинетику бисопролола не влияет и генетический полиморфизм *CYP2C19* (Taguchi M. et al., 2005). Аналогичные данные были получены и в исследовании Nozawa T. С. и соавторов, свидетельствующие о том, что, в отличие от метопролола, действие бисопролола не зависит от генотипа *CYP2D6*.

В исследованиях влияния генотипа на фармакокинетику трициклических антидепрессантов были выявлены ассоциации более частого развития НЛР у носителей функционально дефектных аллельных вариантов гена *CYP2D6*. В работах Rau T. было продемонстрировано, что частота генотипа «медленного» метаболизма по *CYP2D6* среди пациентов, у которых наблюдались НЛР трициклических антидепрессантов, была почти в 3 раза выше (20%) по сравнению

с пациентами, у которых терапия этими препаратами протекала без осложнений (7%) (Rau T., et al., 2004).

\* \* \*

Таким образом, к настоящему времени имеется большое количество клинических исследований, определяющих значение фактора этнической принадлежности в фармакологическом ответе, а также исследований, подтверждающих влияние генетического полиморфизма системы биотрансформации (*CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP2C19* и других) на фармакокинетику и фармакодинамику ЛС. Все это свидетельствует о генетической неоднородности системы метаболизма лекарственных средств и, как следствие, вариативности опосредующих их эффектов в различных этнических образованиях. Изучение вопросов лекарственной чувствительности в отдельно взятой популяции и проведение фармакогенетического мониторинга в различных этнических группах впоследствии приведет к более достоверным результатам и обоснованным выводам о результативности применения и тактике индивидуализированного подхода в фармакотерапии. В связи с вышеизложенным, с целью расширения представлений об этнической чувствительности к ЛС и генетически детерминированном метаболическом статусе некоторых этносов населения Ставропольского края, важным дополнением в плане генетической паспортизации наряду с изучением активности *CYP2C9* послужит генотипирование и по *CYP2D6*.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы

### Общая схема исследования

Исследование проводилось в два этапа:

I этап – сравнительный анализ антикоагуляционной активности варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий - представителей трех этнических групп: славян, армян и карачаевцев, находившихся на лечении в СКККД – выполнен в дизайне проспективного клинико-лабораторного исследования;

II этап – исследование распространенности «медленных» аллельных вариантов генов *CYP2C9* (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*) и *CYP2D6* (*CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*) среди населения Ставропольского края у здоровых лиц – представителей этнических групп: славян, армян, карачаевцев – выполнен в дизайне одномоментного описательного исследования.

Оба этапа работы предусматривали включение исследуемых из этнических групп славян, армян и карачаевцев, являющихся представителями коренного населения Ставропольского региона.

### 2.1. Этническая и демографическая характеристика исследуемых групп населения Ставропольского края

По данным Всероссийской переписи населения 2010 г. русское население в крае является наиболее многочисленным (2232153 человек) и составляет 80,9% населения края.

Численность лиц, идентифицирующих себя как украинцы, по данным переписи составила 30,4 тыс. человек и за 10 лет в крае снизилась более чем на 30%, что отражает ситуацию в целом по России. Эта тенденция, по-видимому, обусловлена двумя основными фактами: эмиграцией украинцев на свою

этническую родину, и тем, что многие украинцы утратили этническую идентичность и считают себя и своих детей русскими (Итоги ВПН-2010). Учитывая тесные этнокультурные связи, русская и украинская этнические общности изучались нами в одной объединенной группе – «славянской».

Как известно из архивных источников, предки современных славян Северного Кавказа появились на этих территориях в результате массового переселения и колонизации земель степного Предкавказья с конца XVIII в. русскими и украинскими крестьянами, сформировавшими локальное сообщество славянских народов. Кроме того, мощной колонизационной силой на Северном Кавказе выступало казачество - донское, черноморское, екатеринославское, терское. Переселение крестьян происходило из различных губерний Российской империи: Харьковской, Курской, Пензенской, Азовской, Воронежской, Рязанской, Тульской, Калужской, Симбирской, Орловской, и др. (Прозрителев Г.Н., 1912). Начиная с последней четверти XVIII века, в эти земли устремились значительные миграционные потоки «выходцев из исконно украинских территорий: Киевщины, Переяславщины, Черниговщины, Среднего Поднепровья, а позднее Слободско-Украинской губернии и др.» (Касименко, А.К., 1965).

Второе место по численности населения в крае занимают армяне (161,3 тыс. человек) - 5,9% населения. Основная масса ставропольских армян - это потомки выходцев из Нагорного Карабаха, мигрировавших на Северный Кавказ преимущественно в XVIII-XIX веках. Возникновение армянской этнической группы Ставрополя является многоэтапным, многовековым историческим процессом, временная структура проживания армян в Предкавказье условно разделена на четыре периода:

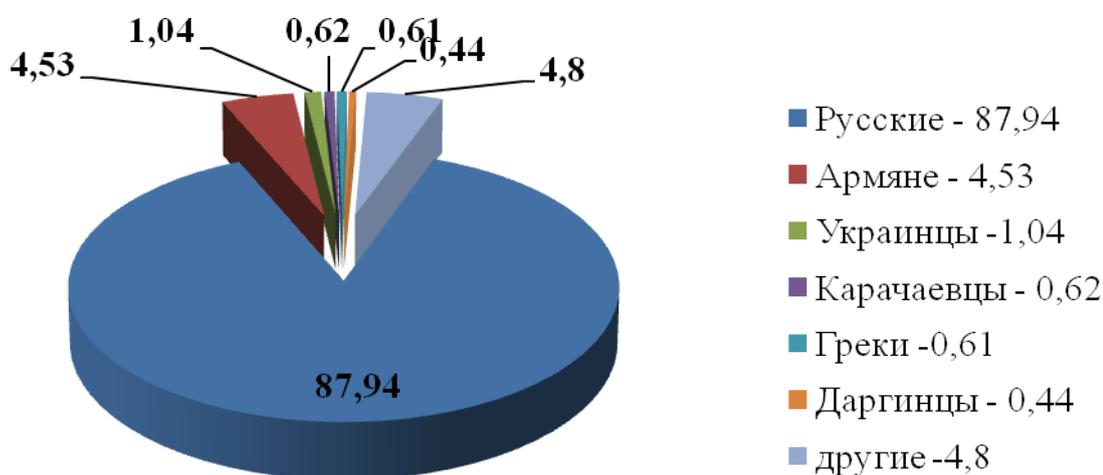
- XI - XIV век - армяне из Крыма и Восточной Армении;
- конец XVIII - начало XIX в. - переселение армян на выделенные им Российской Империей земли, главным образом, с территории Нагорного Карабаха;

- конец XIX - начало XX веков - потомки беженцев из Западной Армении, устремившиеся после геноцида армян в Османской Империи, главным образом после 1915 года.

Эти три периода и сформировали «коренное» население армян Ставропольского края.

- последние 25 – 30 лет - вынужденные мигранты из Армянской ССР, пострадавшие в результате землетрясения в Спитаке (1988 г.), в период конфликта 1987 - 1994 г.г. в Нагорном Карабахе, а также беженцы из Чечни (до войны в Чечне проживало 16 тысяч армян, большинство из них нашли убежище в Ставропольском крае).

Карачаевцы - также значительная по численности национальность края (15,6 тыс. человек). Большая часть из них проживает в краевом центре (рисунок 1). В формировании карачаевского этноса, по всей видимости, принимали участие аланы и местные горские племена кобанской культуры (III тысячелетие до н. э.)



**Рисунок 1. Этнический состав населения г.Ставрополя, % (ВПН, 2010)**

## 2.2. Сравнительный проспективный анализ клинической эффективности варфарина у больных с фибрилляцией предсердий

### Характеристика больных, включенных в исследование клинической эффективности варфарина.

В исследование вошли 122 пациента с постоянной формой фибрилляции предсердий в возрасте от 43 до 70 лет с сопутствующими заболеваниями: ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертоническая болезнь (ГБ) 1 и 2 степени, хроническая сердечная недостаточность I и II функционального класса (ФК). Всем пациентам назначался Варфарин (Nucomed) по стандартной схеме в начальной дозе 5 мг в сутки (Диагностика и лечение фибрилляции предсердий Рекомендации РКО, ВНОА и АССХ, 2012). Оптимальным показателем соотношения эффективности и безопасности варфарина является уровень целевых значений МНО, который для больных с фибрилляцией предсердий находится в диапазоне 2,0-3,0 (Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Рекомендации РКО, ВНОА и АССХ, 2012). МНО определялось на 5-й день терапии. Эпизодами чрезмерной гипокоагуляции считались все случаи превышения терапевтического диапазона. Из препаратов, применение которых способно изменять активность CYP2C9, в нашем исследовании был только амиодарон, используемый у больных из всех трех этнических групп (группы были уравнены по частоте применения амиодарона) (таблица 7). Пациентов представителей славян было – 60 (49,2%), из них женщин - 28 (46,7%), мужчин - 32 (53,3%). Представителей армянского этноса оказалось 35 (28,7%), среди них пациентов женского пола было 15 (42,9%) и 20 (57,1%) - мужского пола. Пациентов представителей карачаевцев, включенных в исследование, было 27 человек (22,1%), среди них пациентов женского пола 14 (51,9%) и 13 (48,1%) - мужского. Диагноз ИБС устанавливался на основании клинических и анамнестических данных (перенесенный инфаркт миокарда, госпитализации по

поводу других острых коронарных синдромов, стенокардия). Диагноз гипертонической болезни устанавливался на основании рекомендаций Российского медицинского общества по артериальной гипертензии и ВНОК (четвертый пересмотр, 2010). Диагноз ХСН ставился на основании классификации, предложенной обществом специалистов по сердечной недостаточности (ОССН), утвержденной Российским съездом кардиологов в 2003 г.

Критерии включения:

- ишемическая болезнь сердца (ИБС);
- гипертоническая болезнь (ГБ) 1 и 2 степени;
- хроническая сердечная недостаточность I и II ФК (NYHA);
- постоянная форма фибрилляции предсердий;
- наличие информированного согласия пациента на участие в исследовании;
- отсутствие смешанных межэтнических браков до третьего поколения предков.

Критерии исключения:

- ХСН, ФК III и IV (NYHA);
- ГБ 3 степени;
- пороки сердца (кроме относительной митральной и/или трикуспидальной недостаточности, но не более 2-й степени);
- острые нарушения мозгового кровообращения в анамнезе;
- тяжелое поражение печени и почек;
- системные и онкологические заболевания;
- сахарный диабет 1 и 2 типов;
- заболевания щитовидной железы;
- заболевания желудочно-кишечного тракта в стадии обострения (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, холецистит, панкреатит, гастрит);

- сопутствующий прием препаратов, изменяющих активность CYP2C9, за исключением амиодарона.

Демографическая, антропометрическая и клиническая характеристика включенных в исследование пациентов представлена в таблице 7.

**Таблица 7. Характеристика больных с постоянной формой фибрилляции предсердий, включенных в исследование эффективности непрямого антикоагулянта варфарина.**

Показатель	Значение		
	Славяне	Армяне	Карачаевцы
Количество больных	60	35	27
• мужчины	32	20	13
• женщины	28	15	14
Рост, м. (M±m)	169±8,1	167±8,9	168±7,3
Вес, кг. (M±m)	89±9,3	93±15,0	88±9,1
Возраст, годы (M±m)	58±9	57±10	61±9
Мерцательная аритмия постоянная форма	60	35	27
ИБС	60	35	27
• стенокардия напряжения	60	35	27
• острый инфаркт миокарда в анамнезе	10	7	4
Артериальная гипертензия	60	35	27
• 1 степень	34	14	17
• 2 степень	26	21	10
Хроническая сердечная	60	35	27

недостаточность			
• I функционального класса по NYHA	47	28	24
• II функционального класса по NYHA	13	7	3
Сопутствующий прием амиодарона	51 (85%)	30 (85,7%)	24 (88,9%)

### 2.3. Определение показателя МНО

МНО определяли на коагулометре «CGL-2110» производства ЗАО «SOLAR» (Беларусь) с использованием набора реагентов «Ренампластин» (НПО «РЕНАМ», Россия) для определения протромбинового времени, аттестованного по международному индексу чувствительности (МИЧ).

### 2.4. Исследование распространенности «медленных» аллельных вариантов генов *CYP2C9* (*CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*) и *CYP2D6* (*CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*) среди населения Ставропольского края

Было проведено изучение частот двух основных полиморфных маркеров гена *CYP2C9*, характерных для европеоидов: нуклеотидной замены в третьем экзоне цитозинового нуклеотида на тимидиновый в положении 416 (C416T), соответствующий аминокислотному полиморфизму (аргинин или цистеин) в положении 144 (Arg144Cys), и нуклеотидной замены в седьмом экзоне цитозинового нуклеотида на адениновый в положении 1061 (C1061A), соответствующий аминокислотному полиморфизму (изолейцин или лейцин) в положении 359 (Ile359Leu). Из четырех возможных комбинаций аллельных

вариантов гена *CYP2C9* у европейцев обнаружены три. Они получили обозначения *CYP2C9\*1* (Arg144-Ile359) - так называемый «дикий тип»; *CYP2C9\*2* (Cys144-Ile359) и *CYP2C9\*3* (Arg144-Leu359) [Кукес В. Г., 2008].

Из известных в настоящее время «медленных» аллельных вариантов *CYP2D6* наиболее важными у европейцев являются, по данным разных авторов, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5* [Gaedigk A., et al., 2003; Strange R.C., et al., 1999; Mizutani T., et al., 2003].

С технической точки зрения было сочтено возможным исследовать аллели: *CYP2D6\*3* (делеция нуклеотида 2549A, что приводит к сдвигу рамки считывания и отсутствию ферментативной активности *CYP2D6*) и *CYP2D6\*4* (нуклеотидная замена G1846A) - ключевой полиморфный маркер, ответственный за синтез нефункционального цитохрома.

#### **2.4.1. Характеристика здоровых лиц, включенных в исследование межэтнической распространенности аллельных вариантов гена *CYP2C9* в Ставропольском крае**

С целью выявления возможных этнических различий в частотах аллелей и генотипов по *CYP2C9* в исследование были включены жители Ставропольского края (всего 136 человек), давшие согласие на участие в обследовании. При выборе участников исследования по этническому признаку было выделено 3 группы:

- 63 человека, являющиеся представителями этнической группы славян (этнические русские и украинцы);
- 38 человек, являющиеся представителями этнической группы армян;
- 35 человек, являющиеся представителями этнической группы карачаевцев.

Все участники исследования являются представителями коренного населения Ставропольского края. Принадлежность к этническим группам верифицировалась анамнестически, путем собеседования с пациентом,

подтвердившим принадлежность членов его семьи к данной национальности при условии отсутствия смешанных межэтнических браков до третьего поколения предков. Лица, включенные в исследование, не состояли между собой в кровном родстве.

Для проведения генотипирования, у всех добровольцев был осуществлен забор крови из кубитальной вены в количестве 2,5 мл в вакуумные пробирки с K<sub>2</sub>-ЭДТА (1,8 мг/мл).

С целью исключения ассоциации органической патологии с носительством полиморфных аллельных вариантов *CYP2C9* в исследование не вошли лица с органическими заболеваниями. Для этого все предполагаемые участники исследования были осмотрены терапевтом, а также прошли рутинное клиническое обследование: общий анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, электрокардиографическое исследование (ЭКГ), эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной полости и почек.

**Таблица 8. Демографическая и антропометрическая характеристика лиц изучаемых этнических групп Ставропольского края, включенных в исследование распространенности аллельных вариантов гена *CYP2C9***

Показатель	Славяне n=63	Армяне n=38	Карачаевцы n=35
Пол, М/Ж	24/39	20/18	20/15
Возраст, годы (M±m)	24±7	27±10	22±7,5
Рост, см (M±m)	171±8,3	168±8,1	172±7,3
Вес, кг (M±m)	75±8,3	79±10,1	67±8,1

Характеристика лиц, включенных в исследование распространенности аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в изучаемых группах населения Ставропольского края, представлена в таблице 8. Различные этнические группы,

представители которых вошли в исследование (славяне (русские и украинцы), армяне, карачаевцы), были уравнены по половому, возрастному и антропометрическому критериям.

#### **2.4.2. Характеристика здоровых лиц, включенных в исследование межэтнической распространенности аллельных вариантов гена *CYP2D6* в Ставропольском крае**

В исследование частот аллельных вариантов гена *CYP2D6* были включены жители Ставропольского края (всего 105 человек), давшие согласие на участие в обследовании. При выборе участников исследования по этническому признаку было выделено 3 группы с равным составом участников исследования – по 35 человек в каждой: группа славянского этноса (русские и украинцы); этническая группа армян и этническая группа карачаевцев.

Все участники исследования являются представителями коренного населения Ставропольского края. Принадлежность к этническим группам верифицировалась со слов исследуемых при условии отсутствия смешанных межэтнических браков до третьего поколения предков.

Для проведения генотипирования, у всех добровольцев был осуществлен забор крови из кубитальной вены в количестве 2,5 мл в вакуумные пробирки с  $K_2$ -ЭДТА (1,8 мг/мл).

Из исследования исключались лица с органическими заболеваниями, для чего все предполагаемые участники исследования были осмотрены терапевтом, а также прошли рутинное клиническое обследование: общий анализ крови, биохимический анализ крови, клинический анализ мочи, электрокардиографическое исследование (ЭКГ), эхокардиографическое исследование (ЭХО-КГ), ультразвуковое исследование (УЗИ) органов брюшной

полости и почек. У всех лиц, включенных в исследование, проводили антропометрическое исследование.

Демографическая и антропометрическая характеристика лиц, включенных в исследование распространенности аллельных вариантов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5* в изучаемых группах населения Ставропольского края, представлена в таблице 9. Различные этнические группы, представители которых были включены в исследование (славяне (русские и украинцы), армяне, карачаевцы), были уравнены по половому, возрастному и антропометрическому критериям.

**Таблица 9. Характеристика лиц изучаемых этнических групп Ставропольского края, включенных в исследование распространенности аллельных вариантов гена *CYP2D6*.**

Показатель	Славяне n=35	Армяне n=35	Карачаевцы n=35
Пол, М/Ж	15/20	17/18	20/15
Возраст, годы (M±m)	22±5,3	23±7,1	22±7,5
Рост, см (M±m)	172±10,1	170±5,7	172±7,3
Вес, кг (M±m)	67±7,7	73±8,4	67±8,1

#### **2.4.3. Реактивы и препараты для выделения ДНК, проведения ПЦР и анализа продуктов амплификации**

Генотипирование лиц, включенных в исследование проводилось в Лаборатории фармакогенетических исследований Центра научно-инновационного развития ГБОУ ВПО «СтГМУ» Минздрава РФ и Лаборатории сибирской язвы ФКУЗ «СНИПЧИ» Роспотребнадзора.

Все праймеры для определения генотипа по полиморфизму генов

*CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* были синтезированы научно-производственной фирмой «Литех» в соответствии с нуклеотидными последовательностями, описанными M. Hersberger et al. (2000 г.)

Амплификационные смеси готовили на основе универсального набора реактивов и препаратов для ПЦР «АмплиСенс-200-1» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «ИнтерЛабСервис» (Москва), содержащего все компоненты, необходимые для приготовления амплификационных смесей, за исключением праймеров.

Для проведения электрофоретического разделения продуктов амплификации готовили 2,5 % гель из агарозы для электрофореза (ИнтерЛабСервис, Россия). Использовали ТБЕ-буфер 20-кратной концентрации производства (ИнтерЛабСервис, Россия) после соответствующего разбавления.

Для определения величин амплифицированных фрагментов ДНК использовали ДНК-маркер молекулярных размеров 100 bp + 1,5 Kb (СибЭнзим, Россия).

### **Лабораторное оборудование**

На различных этапах молекулярно-генетических исследований с применением ПЦР использовали вертикальный ламинарно-поточный шкаф II класса защиты «Cat R3-1300» (KOJAIR, Финляндия), морозильные камеры «ARDO» (Италия) и «Stinol» (Россия), микроволновую печь «MS-255T» (LG, Южная Корея), отсасыватель хирургический «OX-10» (Россия), микрокомпрессор «АЭН-4» (Литех, Россия), микроцентрифуги «Minispin» (Eppendorf, Германия), «CM 70M» (ELMI, Латвия) и «Cyclo Temp 202» (Россия), твердотельный термостат для микропробирок «Гном» (ДНК-Технология, Россия), вортекс «CV-150» (Хеликон), автоматические пипетки «Ленпипет-колор» (Россия) с различными интервалами дозируемых объемов, амплификаторы ДНК Mastercycler 22331 (Eppendorf, Германия) и MC-2 «Герцик» (ДНК-технология, Россия).

Электрофорез проводили в камерах для горизонтального электрофореза Sunrise<sup>TM</sup> Gibco BRL Horizontal Gel Electroforesis Apparatus<sup>TM</sup> (Life Technologies,

США) с размером геля 20x25 см, Gel Electrophoresis Apparatus GNA-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция) с размером геля 20x20 см, и производства фирмы «Литех» (Россия) с размером геля 12,5x8,5 см. Гели просматривали и регистрировали изображение с использованием ультрафиолетового трансиллюминатора TFX-20M Gibco BRL UV Transilluminator (Life Technologies, США). Регистрацию и анализ изображений осуществляли с помощью системы Kodak Digital Science EDAS 120 System.

### Методы

Выделение ДНК осуществляли сорбционным методом при помощи набора «ДНКсорб Б» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора «ИнтерЛабСервис» (Москва) в соответствии с инструкцией.

#### 2.4.4. Определение аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*

Аллельные варианты гена *CYP2C9* выявляли методом ПЦР с использованием диагностических наборов для выявления полиморфизмов в геноме человека «SNP – экспресс» производства НПФ «ЛИТЕХ», г. Москва (таблица 10). Материалом для выделения ДНК была цельная венозная кровь.

**Таблица 10. Состав набора реагентов «SNP-экспресс».**

	Комплект на 100 исследований + 20 контрольных образцов
Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ1*	300 мкл
Реакционная смесь АЛЛЕЛЬ2*	300мкл
Разбавитель	4мкл
Тaq-полимераза	50мкл
Минеральное масло	4мкл

\*-название 10х реакционных смесей

АЛЛЕЛЬ 1 - аллель, указанная до позиции замены/делеции/инсерции.

АЛЛЕЛЬ 2 - аллель, указанная после позиции замены/делеции/инсерции

### **I. Выделение ДНК из лейкоцитов цельной крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь».**

1000 мкл цельной крови в пробирке типа «Эппендорф» центрифугировали со скоростью 3000 об/мин. в течение 5 мин. После центрифугирования удаляли плазму, и выдерживали пробирку в морозильной камере при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч до полного замораживания форменных элементов. Содержимое пробирки размораживали при комнатной температуре. В пробирку вносили реактив «ДНК-экспресс-кровь» в соотношении к объему форменных элементов и плазмы 1:1. Содержимое пробирки в течение 10 с тщательно перемешивали на микроцентрифуге-вортекс FV-2400 «Micro-spin». Пробирку помещали в термостат, прогретый до  $99^{\circ}\text{C}$  и выдерживали в течение 25 минут при  $99^{\circ}\text{C}$ . Пробирку центрифугировали на центрифуге «MiniSpin» со скоростью 13 400 об/мин. при комнатной температуре в течение 1 минуты. Супернатант использовался в качестве исследуемого образца ДНК. Для сохранения образцы переносили в отдельную пробирку типа «Эппендорф» и хранили в морозилке при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Для ПЦР использовали 10 мкл полученного образца.

### **II. Проведение ПЦР с использованием комплекта реагентов для амплификации «SNP-экспресс».**

Из компонентов комплекта готовились 2 рабочие смеси реагентов (с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 1 и с реакционной смесью АЛЛЕЛЬ 2) для амплификации из расчета на 1 пробу: 17,5 мкл разбавителя, 2,5 мкл реакционной смеси (эти 2 компонента перемешивали), вносили 0,2 мкл Taq-полимеразы. Рабочую смесь тщательно перемешивали пипетированием.

Для амплификации использовали по 20 мкл соответствующей рабочей амплификационной смеси в каждую из подготовленных пробирок. Во все пробирки добавляли по 25 мкл минерального масла.

Вносили по 5 мкл образца из обработанной анализируемой пробы (с выделенной ДНК) в пробирку с рабочей амплификационной смесью АЛЛЕЛЬ 1 и

в пробирку с рабочей амплификационной смесью АЛЛЕЛЬ 2 под слой масла. В качестве отрицательного контрольного образца вносили разбавитель в объеме 5 мкл в оба типа реакционной смеси.

8. Пробирки центрифугировали в течение 3-5 секунд при 2400 об/мин при комнатной температуре на микроцентрифуге-вортекс FV-2400 «Micro-spin». Пробирки помещали в прогретый до температуры +94°C термостат (амплификатор) «Терцик», амплификацию проводили по программе, указанной в инструкции к набору.

### **III. Детекция продуктов амплификации.**

Разделение продуктов амплификации методом горизонтального электрофореза. В аппарат для электрофореза заливали ТАЕ буфер, приготовленный на дистиллированной воде разбавлением 50хТАЕ в 50 раз (рН=8,3). Приготовляли 3% агарозу из расчета на 1 гель: к 1,5 г агарозы, добавляли 1 мл 50х ТАЕ буфера и 55 мл дистиллированной воды. Приготовленную смесь расплавляли в СВЧ-печи на небольшой мощности. Добавляли к 50 мл расплавленной агарозы 5 мкл 1% раствора бромистого этидия, перемешивали. Расплавленную агарозу сразу заливали в планшет для заливки геля. После застывания агарозы переносили планшет с гелем в камеру для проведения электрофореза. В карманы геля наносили по 15 мкл амплификата в последовательности, соответствующей нумерации проб.

Напряжение источника питания 10-15 В/см геля (для камеры с расстоянием между электродами 27 см максимальное напряжение 150 В). Проводили электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (-) к аноду (+).

Контроль за электрофоретическим разделением осуществляли визуально по движению полосы красителя. Полоса красителя проходила от старта 1,5 - 2 см (оптимальное время разгонки - 17 минут).

### **IV. Визуализация результатов электрофореза.**

Из формы гель переносили на стекло УФ-трансиллюминатора.

Фрагменты анализируемой ДНК проявляются под УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

#### 2.4.5. Определение аллельных вариантов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*

Источником для выделения ДНК для изучения генотипа по полиморфизмам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* служили пробы цельной крови, отобранной из вены пациентов в пробирки с 6 % раствором ЭДТА (1:20).

**Выявление полиморфизма генов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* с применением ПЦР.**

Для выявления полиморфизма генов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* использовали праймеры, нуклеотидная последовательность которых представлена в таблице 11.

**Таблица 11. Перечень и нуклеотидная последовательность праймеров, использованных в работе.**

№ п/п	Праймеры	Нуклеотидные последовательности
1	1new	5' - TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCG - 3'
2	2new	5' - GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT - 3'
3	Bmut	5' - TCTCCCACCCCAA - 3'
4	7	5' - CGAAAGGGGCGTCC - 3'
5	3	5' - GCGGAGCGAGAGACCGAGGA - 3'
6	6	5' - GCTAACTGAGCACG - 3'
7	4new	5' - GGTCCGGCCCTGACACTCCTTCT - 3'
8	Awt	5' - TCCCAGGTCATCCT - 3'

Пересчет концентрации праймеров из оптических единиц на миллилитр в мкМ производили следующим образом: в нуклеотидной последовательности просчитывали количество каждого вида оснований, полученные величины

умножали для каждого вида на следующий коэффициент:

A – 15200

C – 7050

G – 12010

T – 8400

Все полученные величины в сумме составляют величину «а», которая используется в дальнейших вычислениях по формуле:

$$c = \frac{b \times 1000000}{a}, \quad (1)$$

где

**c** – концентрация праймеров в мкМ,

**b** – концентрация праймеров в опт.ед./мл,

**a** – коэффициент, зависящий от нуклеотидной последовательности праймеров.

Объем препарата праймеров конкретной концентрации, необходимый для внесения в амплификационную смесь, рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{v \times c_1}{c}, \quad (2)$$

где

**x** – необходимый объем раствора праймеров в микролитрах,

**v** – общий объем амплификационной смеси, включая пробу ДНК,

**c** – концентрация праймеров в мкМ в конкретном препарате

**c<sub>1</sub>** – конечная концентрация праймеров в амплификационной смеси.

Амплификационные смеси, состав которых приведен в таблице 12, готовили на основе универсального набора реактивов и препаратов для ПЦР «Ампли Сенс-200-1» производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

**Таблица 12. Состав амплификационных смесей, использованных в работе.**

№ п/п	Исследуемый локус	Праймеры		Содержание компонентов амплификационной смеси			
		наименование	концентрация μМ	dNTP μМ	ПЦР-буфер	MgCl <sub>2</sub> mM	Taq-полимераза, ед
1.	<i>CYP2D6</i> *4	1new, 2new,	0,50 0,50	200	x1	1,5	2,5

		Bmut, 7	0,75 0,50				
2.	<i>CYP2D6</i> *3	3, 6, Awt, 4new	0,30 0,75 0,75 0,30	200	x1	1,5	2,5

В соответствии с инструкцией по применению набора, готовили две смеси. «Нижняя» в объеме 5 мкл на одну пробу содержала dNTP и праймеры, «верхняя» – в объеме 10 мкл включала ПЦР-буфер, MgCl<sub>2</sub> и Taq-полимеразу.

После внесения на дно амплификационной пробирки 5 мкл «нижней» смеси сверху наносили 10 мкл расплавленного воска, после застывания которого пробирки хранили при температуре –20<sup>0</sup>С и использовали по мере необходимости. Поверх застывшего воска наносили 10 мкл «верхней» смеси, а также каплю минерального масла, если амплификацию осуществляли в термоциклере с крышкой без подогрева. Пробу ДНК объемом 10 мкл вносили в «верхнюю» смесь, после чего пробирки помещали в амплификатор, прогретый до температуры денатурации. Параметры программ амплификации, соответствующих праймерам фрагментов ДНК, основанные на литературных данных (Hersberger et al., 2000 г.) приведены в таблице 13.

**Таблица 13. Режимы амплификации фрагментов локусов генома *CYP2D6*\*3 и *CYP2D6*\*4, использованные в работе.**

№ п/п	Анализи руемый локус	Режим амплификации										
		Предвари тельная денатурация		Денатурация		Отжиг		Элонга ция		Кол - во цик лов	Завершающ ая элонгация	
		t (°C)	продол жительность (с)	t (°C)	продол жительность (с)	t (°C)	про должи тель ность (с)	t (°C)	дли тель ность (с)		t (°C)	продол жительность (с)
1.	<i>CYP2D6</i> * 3	94	600	94 94	30 30	63 53	30 30	72 72	60 60	20 27	72	420

2.	<i>CYP2D6</i> <i>*4</i>	94	600	94 94	30 30	63 53	30 30	72 72	60 60	15 27	72	420
----	----------------------------	----	-----	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------	----	-----

Анализ продуктов амплификации проводили методом электрофоретического разделения в 2,5 % агарозном геле размером 8,5x12,5 см при напряжении 120-140 В в течение 30-60 мин в зависимости от размеров и электрофоретической подвижности специфических ампликонов. Идентификацию амплифицированных фрагментов ДНК проводили, сравнивая их размеры с эталонами в виде коммерческих маркеров молекулярных размеров фрагментов ДНК. Размеры ампликонов при выявлении полиморфизма локусов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4* определяли с применением компьютерной программы Kodak 1D Image Analytic Software (Eastman Kodak Company, 2000). Аллели генотипов определяли в соответствии с наборами ампифицированных фрагментов ДНК описанных М. Hersberger et al. (2000 г.)

## 2.5. Статистическая обработка результатов исследования

Полученные данные обрабатывались с помощью пакета статистических программ SPSS 21.0 for Windows с применением методов параметрической и непараметрической статистики. В работе проводился описательный анализ всех пациентов, включенных в исследование. Качественные переменные описывались абсолютными и относительными (%) частотами, для количественных переменных определялись среднее значение, стандартное отклонение, стандартная ошибка среднего значения. При сравнении двух групп с нормальным характером распределения данных использовали t-тест для независимых группировок, а при характере распределения, отличном от нормального, применяли критерий  $\chi^2$ . Оценку достоверности различий по частотам аллелей между исследуемыми группами проводили по критерию Н Краскала-Уоллиса и ANOVA. Для сравнения фактических и ожидаемых частот в малых группах применяли критерий точной

вероятности Фишера. Корреляционный анализ осуществляли с помощью коэффициента корреляции Пирсона или коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при  $p < 0,05$ .

### **ГЛАВА 3. Этнические особенности антикоагуляционной активности варфарина в Ставропольском крае**

Изучение результатов применения лекарственных средств в группах различных этносов могут характеризовать эффективность и безопасность их потребления у лиц различной этнической принадлежности, в связи с чем представлялось интересным оценить клиническую эффективность и безопасность применения варфарина у больных славянской, армянской и карачаевской этнических групп, а также провести исследование распространенности полиморфных маркеров генов системы биотрансформации ЛС *CYP2C9* и *CYP2D6* в этих группах.

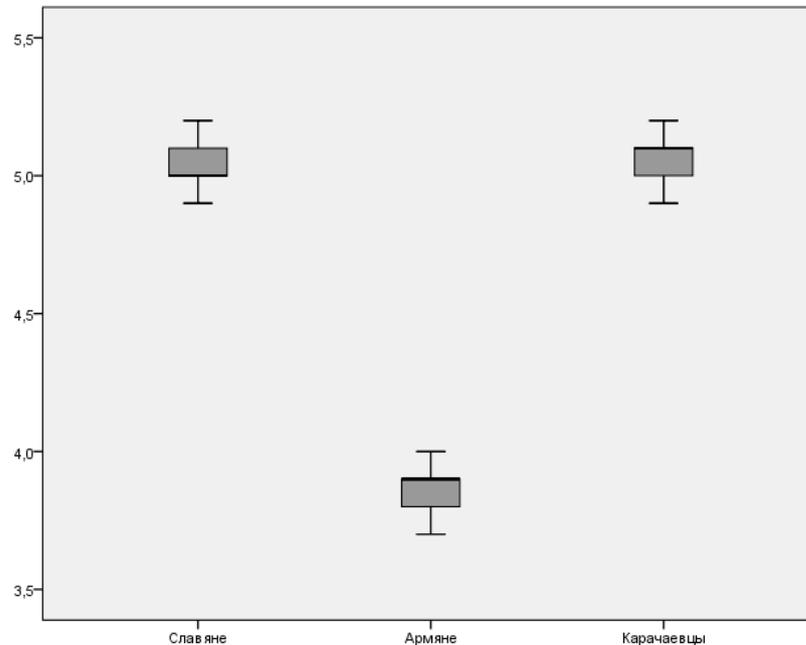
#### **3.1. Сравнительный анализ антикоагуляционной активности варфарина у пациентов с фибрилляцией предсердий представителей трех этнических групп: славян, армян и карачаевцев**

В исследование вошли 122 пациента с постоянной формой фибрилляции предсердий, являющихся представителями этнических групп Ставропольского края: славянской, армянской, карачаевской. Средний возраст больных в исследуемых этнических группах был практически одинаков:  $57,7 \pm 9,3$  лет у славян,  $56,7 \pm 10,5$  лет у армян,  $61,1 \pm 9,3$  лет у карачаевцев, т.е. большинство пациентов были представлены лицами около 60 лет. Достоверной возрастной разницы между представителями славян, армян и карачаевцев, а также между представителями обоих полов внутри каждой группы не выявлено.

Пациентам, включенные в исследование, варфарин назначался по стандартной схеме, начиная с дозы 5 мг в сутки, в соответствии с рекомендациями РКО, ВНОА и АССХ по диагностике и лечению фибрилляции

предсердий (2012 г.) Доза корректировалась в соответствии со значениями МНО. Дозу варфарина расценивали как подобранную, если она обеспечивала терапевтический уровень гипокоагуляции (диапазон значений МНО 2-3) в течение 2–3 последовательных определений.

Дозы варфарина у пациентов армянского этноса находилась в пределах от 1,25 мг в сутки до 6,875 мг в сутки, и в среднем оказалась на уровне  $3,9 \pm 1,5$  мг/сутки (рисунок 2). У представителей славян подобранная доза варфарина колебалась от 1,875 до 11,875 мг в сутки, и в среднем составила  $5,2 \pm 2,1$  мг/сутки. У пациентов карачаевского этноса подобранная доза варфарина колебалась от 2,5 до 10 мг, и в среднем составила  $5,1 \pm 1,4$  мг в сутки (рисунок 2).



**Рисунок 2. Среднее значение подобранной дозы варфарина у пациентов, мг.**

Из 60 пациентов славянской этнической группы только у 13 (21,7%) подобранная доза варфарина была менее 5 мг в сутки, у 47 пациентов подобранная доза варфарина была 5 мг в сутки и выше. При этом из 35 пациентов армян у 19 (54,3%) подобранная доза варфарина была менее 5 мг в сутки, и у 16 - 5 мг в сутки и выше. Аналогичным образом, из 27 представителей карачаевцев 7

(25,9%) пациентов принимали варфарин в подобранной дозе менее 5 мг в сутки, и 20 пациентов - 5 мг/сутки и выше.

При этом представители армянского этноса, по сравнению с пациентами славянами и карачаевцами, статистически значимо чаще имели подобранную дозу варфарина менее 5 мг/сутки (таблица 14.)

**Таблица 14. Распределение пациентов этнических групп в зависимости от величины подобранной дозы варфарина.**

Подобранная доза варфарина	Славяне n=60	Армяне n=35	Карачаевцы n=27
< 5 мг	13 (21,7%)*	19 (54,3%)*(**)	7 (25,9%)**
> 5 мг	47 (78,3%)*	16 (45,7%)*(**)	20 (74,1%)**

\*-  $p < 0,05$  при сравнении доз варфарина у армян и славян (критерий  $\chi^2$ )

\*\* -  $p < 0,05$  при сравнении доз варфарина у армян и карачаевцев (критерий  $\chi^2$ )

Одним из основных параметров, отражающих клиническую эффективность терапии непрямыми антикоагулянтами, является показатель МНО (Loriot M.A., et al., 2006; Venusiglio P. R., et al., 2007). При оценке риска развития осложнений в результате приема варфарина оказалось, что из 60 пациентов группы славян эпизоды увеличения МНО более 3 отмечались у 11 человек (18,3%). Среди карачаевцев у 3 пациентов (11,1%) были эпизоды увеличения МНО более 3. В группе представителей армянского этноса из 35 пациентов у 9 (25,7%) определены эпизоды увеличения МНО выше 3. При этом, у пациентов из группы армян по сравнению с пациентами карачаевцами эпизоды увеличения МНО более 3 развивались статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ) (таблица 15).

Среди пациентов, МНО которых достигло целевого значения (2 - 3), армян оказалось достоверно больше ( $p < 0,05$ ) - 20 человек (57%) по сравнению с группой славян – 19 пациентов (31,7%) и группой карачаевцев - 9 человек (33,3%) (рисунок 3). Значительная часть больных, принимавших варфарин, не достигала терапевтических значений МНО. В группе армян таких пациентов было

достоверно меньше ( $p < 0,05$ ) - 6 человек (17,3%), по сравнению с представителями славян - 30 (50%) и карачаевцев – 15 человек (55,6%) (таблица 12).

**Таблица 15. Распределение пациентов исследуемых этнических групп в зависимости от уровня МНО.**

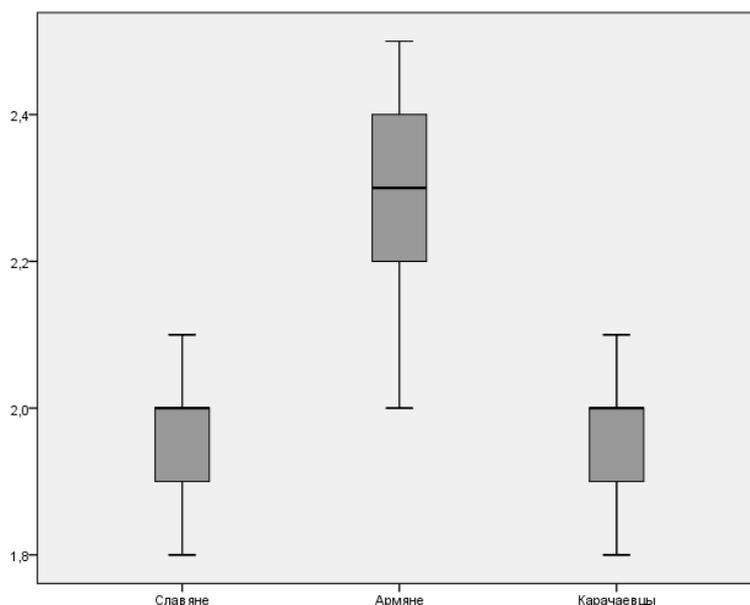
Этническая группа	МНО		
	<2	2-3	>3
Славяне	30 (50%)*	19 (31,7%)**	11 (18,3%)
Армяне	6 (17,3%)*(**)	20 (57%)*(**)	9 (25,7%)**
Карачаевцы	15 (55,6%)**	9 (33,3%)**	3 (11,1%)**

\*-  $p < 0,05$  при сравнении значений МНО у армян и славян (критерий  $\chi^2$ )

\*\* -  $p < 0,05$  при сравнении значений МНО у армян и карачаевцев (критерий  $\chi^2$ )

Таким образом, у армян среднее значение МНО было  $2,3 \pm 0,7$ , у представителей славян и карачаевцев показатели МНО не отличались и оказались равны 2,0 в обеих группах (у славян -  $2,0 \pm 0,9$ , у карачаевцев -  $2,0 \pm 0,64$ ) (рисунок 3).

Для характеристики эффективности варфарина в исследуемых группах представлялось важным провести расчет средних доз антикоагулянта, обеспечивающих диапазон целевых значений МНО (2 – 3). С этой целью были исследованы только те пациенты, показатель МНО у которых был в пределах целевых значений: из представителей славян таких лиц было 19 (31,7%), армян – 20 (57%) и карачаевцев – 9 (33,3%). Было определено, что для достижения целевого уровня МНО у армян требовалась более низкая суточная доза варфарина -  $3,8 \pm 1,5$  мг, в то время, как у карачаевцев и славян она составила  $5,1 \pm 1,5$  мг и  $5,2 \pm 2,0$  мг, соответственно.



**Рисунок 3. Средние значения МНО пациентов исследуемых этнических групп.**

Таким образом, можно констатировать большую эффективность варфарина в армянской этнической группе. Полученные результаты дают основание для индивидуализированного подхода к выбору начальной дозы варфарина в зависимости от этнической принадлежности.

### **3.2. Этнические особенности генетического полиморфизма *CYP2C9* в Ставропольском крае**

Генетически детерминированное изменение активности *CYP450* - это одна из главных причин межиндивидуальной вариабельности окислительного метаболизма ЛС (Кукес В. Г., с соавт., 2008; Середенин С.Б., 2004). Ген *CYP2C9*, контролирующей функцию изофермента системы биотрансформации ЛС *CYP2C9*, имеет выраженный полиморфизм с более чем 60 различными аллельными вариантами (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>). Некоторые из этих дефектных вариантов (наиболее распространены \*2 и \*3) связаны со сниженным метаболизмом соответствующих ЛС-субстратов (непрямые

антикоагулянты, НПВС, блокаторы рецепторов ангиотензина II, производные сульфонилмочевины), что и определяет увеличение их фармакологических эффектов (Nebert D.W., et al., 2004). Частоты полиморфных аллелей показали выраженную межэтническую вариативность в популяциях различных регионов мира. С этих позиций исследование распространенности медленных аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у населения Ставропольского края представляет большой клинический и научный интерес.

### 3.2.1. Проверка соответствия соотношения генотипов *CYP2C9* в изученных выборках закону Харди-Вайнберга

Наиболее значимыми, в клиническом отношении полиморфными маркерами гена *CYP2C9* являются аминокислотные замены: Arg144Cys, приводящая к замещению в 144 положении полипептидной цепи аминокислоты аргинина на цистеин, и Ile359Leu, приводящая к замещению в 359 положении полипептидной цепи изолейцина на лейцин. Результатом таких аминокислотных замен являются полиморфные изоформы *CYP2C9*: *CYP2C9\*2* (Arg144Cys), и *CYP2C9\*3* (Ile359Leu). Для изучения частот аллелей и генотипов вышеуказанных полиморфных маркеров были сформированы три этнические группы из здоровых добровольцев. Группа славян включала в себя 63 человека, группа армян - 38 человек, карачаевцев 35 человек. Полученные результаты частот аллелей и генотипов в изученных подгруппах представлены в таблице 16.

**Таблица 16. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg144Cys гена *CYP2C9* в исследуемых этнических группах Ставропольского края.**

Аллель	Славяне n=126	Армяне n=76	Карачаевцы n=70
--------	------------------	----------------	--------------------

144Arg	107 (0,8492)	67 (0,8816)	68 (0,9714)
144Cys	19 (0,1508)	9 (0,1184)	2 (0,0286)
<b>Генотип</b>	<b>Славяне</b> n=63	<b>Армяне</b> n=38	<b>Карачаевцы</b> n=35
144ArgArg	47 (0,746)	29 (0,7632)	33 (0,9429)
144ArgCys	13 (0,2064)	9 (0,2368)	2 (0,0571)
144CysCys	3 (0,0476)	0	0

В группе славян было выявлено 107 аллелей 144Arg и 19 аллелей 144Cys, то есть носителями генотипа 144ArgArg являлись 47 человек, 144ArgCys - 13 человек и 3 человека - носители генотипа 144CysCys.

В группе армян обнаружено 67 аллелей 144Arg и 9 аллелей 144Cys. Носителями генотипа 144ArgArg оказались 29 человек, носителями генотипа 144ArgCys - 9.

Соответственно, в группе карачаевцев из обнаруженных носителей 68 аллелей 144Arg и 2 аллелей 144Cys 33 человека были носители генотипа 144ArgArg и 2 носителя генотипа 144ArgCys.

В группах армян и карачаевцев генотипа 144CysCys выявлено не было.

Прежде чем сравнивать выборки по частотам аллелей и генотипов, необходимо было проверить, насколько исследуемые выборки отражают состояние частот в генеральной совокупности. Это соответствие можно подтвердить, проверив выполнение закона Харди-Вайнберга в исследуемых группах. Если выборки реально отражают свойства популяции, то наблюдаемые в действительности частоты генотипов не должны статистически значимо отличаться от ожидаемых частот, рассчитанных через частоты аллелей (соотношение Харди-Вайнберга). Тогда эти частоты генотипов будут поддерживаться постоянными из поколения в поколение и соответствовать уравнению:

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1, \quad (3)$$

при условии, что  $p + q = 1$ ,

где  $p^2$  - доля гомозигот по одному из аллелей;  $p$  - частота этого аллеля;  $q^2$  - доля гомозигот по альтернативному аллелю;  $q$  - частота соответствующего аллеля;  $2pq$  - доля гетерозигот.

Отсутствие достоверных различий при сравнении лиц с установленными генотипами и с ожидаемым количеством лиц с этими генотипами, определяли с помощью точного критерия Фишера.

В таблицах 17, 18 и 19 представлены результаты вышеописанной проверки, проведенной с помощью точного критерия Фишера. Во всех случаях показатель «р», характеризующий вероятность принадлежности двух рассматриваемых выборок к одной генеральной совокупности, превышал 0,05, что означает отсутствие статистически значимого отклонения от соотношения Харди-Вайнберга во всех трех изученных выборках, следовательно, все наши подгруппы являются релевантными для изучения частот аллелей и генотипов полиморфного маркера Arg144Cys гена *CYP2C9*.

**Таблица 17. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера Arg144Cys гена *CYP2C9* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе славян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=126		р
	наблюдаемое	ожидаемое	
144ArgArg	47	45	>0,05
144ArgCys	13	16	>0,05
144CysCys	3	2	>0,05

**Таблица 18. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера Arg144Cys гена *CYP2C9* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе армян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=38		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
144ArgArg	29	29,5	>0,05
144ArgCys	9	8	>0,05
144CysCys	0	0,5	>0,05

**Таблица 19. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера Arg144Cys гена CYP2C9 с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе карачаевцев.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
144ArgArg	33	33	>0,05
144ArgCys	2	2	>0,05
144CysCys	0	0	>0,05

Изучение распространенности полиморфного маркера Ile359Leu гена *CYP2C9* в исследуемых этнических группах показало, что в группе славян 55 человек являлись носителями генотипа 359IleIle и 8 человек - 359IleLeu. Таким образом, было обнаружено 118 аллелей 359Ile и 8 аллелей 359Leu.

В группе армян обнаружено 27 носителей генотипа 359IleIle, 10 носителей генотипа 359IleLeu и 1 носитель 359LeuLeu, то есть было выявлено 64 аллеля 359Ile и 12 аллелей 359Leu.

В группе карачаевцев, соответственно - 28 носителей генотипа 359IleIle и 7 носителей - 359IleLeu, следовательно - 63 аллеля 359Ile и 7 аллелей 359Leu (таблица 20). Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера 359IleLeu гена *CYP2C9* в изученных выборках представлены в таблице 17.

**Таблица 20. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера  $\text{Pe}359\text{Leu}$  гена  $\text{CYP2C9}$  в исследуемых этнических группах Ставропольского края.**

<b>Аллель</b>	<b>Славяне</b> n=126	<b>Армяне</b> n=76	<b>Карачаевцы</b> n=70
359Ile	118 (0,9365)	64 (0,8421)	63 (0,900)
359Leu	8 (0,0635)	12 (0,1579)	7 (0,100)
<b>Генотип</b>	<b>Славяне</b> n=63	<b>Армяне</b> n=38	<b>Карачаевцы</b> n=35
359IleIle	55 (0,873)	27 (0,7105)	28 (0,80)
359IleLeu	8 (0,127)	10 (0,2632)	7 (0,20)
359LeuLeu	0	1 (0,0263)	0

Для полиморфного маркера 359IleLeu также была проведена проверка выполнимости закона Харди-Вайнберга в изученных выборках. Результаты проверки представлены в таблицах 21, 22 и 23. При сравнении наблюдаемых лиц с установленными генотипами и с ожидаемым количеством лиц с этими генотипами различия являются статистически не достоверными.

**Таблица 21. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера  $\text{Pe}359\text{Leu}$  гена  $\text{CYP2C9}$  с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе славян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=126		<i>p</i>
	наблюдаемое	ожидаемое	
359IleIle	55	55	>0,05
359IleLeu	8	8	>0,05
359LeuLeu	0	0	>0,05

**Таблица 22. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера *Pe359Leu* гена *CYP2C9* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе армян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=38		<i>p</i>
	наблюдаемое	ожидаемое	
359IleIle	27	27	>0,05
359IleLeu	10	10	>0,05
359LeuLeu	1	1	>0,05

**Таблица 23. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера *Pe359Leu* гена *CYP2C9* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе карачаевцев.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		<i>p</i>
	наблюдаемое	ожидаемое	
359IleIle	28	28	>0,05
359IleLeu	7	6	>0,05
359LeuLeu	0	1	>0,05

Таким образом, в исследуемых выборках различия между наблюдаемым и ожидаемым числом генотипов, рассчитанным по количеству выявленных аллелей на основании уравнения Харди-Вайнберга, оказались статистически недостоверными. Это позволяет сделать вывод о том, что размер выборок вполне соответствует задачам исследования и позволит проводить сравнительные расчеты между группами.

### 3.2.2. Изучение распространенности аллелей *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3* и генотипов *CYP2C9* у представителей славянской, армянской и карачаевской этнических групп населения Ставропольского края

С целью выявления возможных этнических различий было проведено генотипирование (определение генотипа по *CYP2C9* у каждого индивидуума) здоровых лиц славянской, армянской и карачаевской этнических групп населения Ставропольского края (всего 136 человек): 63 человека, являющихся представителями этнической группы славян (этнические русские и украинцы); 38 человек из этнической группы армян; 35 человек, являющихся представителями карачаевской этнической группы.

Были выявлены генотипы *CYP2C9\*1/\*1*, *CYP2C9\*1/\*2*, *CYP2C9\*1/\*3*, *CYP2C9\*2/\*2*, *CYP2C9\*3/\*3*. Генотип *CYP2C9\*1/\*1* был выявлен у 83 человек (61%), из них 39 человек являлись славянами, 18 - армянами, 26 - карачаевцами. Генотип *CYP2C9\*1/\*2* был выявлен у 24 человек (17,6%), из них 13 человек относились к этнической группе славян, 9 - были армянам, 2 - карачаевцами. Генотип *CYP2C9\*1/\*3* был выявлен у 25 человек (18,4%), из которых 8 человек являлись славянами, 10 - армянами, 7 - карачаевцами. Генотип *CYP2C9\*2/\*2* был выявлен только у славян - 3 человека (2,2%). Генотип *CYP2C9\*3/\*3* был определен у 1 человека (0,7%), относившегося к армянской этнической группе.

Выявленные генотипы *CYP2C9* и их численность в изученных группах представлены в таблице 24.

**Таблица 24. Распределение генотипов *CYP2C9* в исследуемых популяциях.**

Генотип	Славяне (n =63)	Армяне (n =38)	Карачаевцы (n =35)
<i>CYP2C9*1/*1</i>	39	18	26
<i>CYP2C9*1/*2</i>	13	9	2

<i>CYP2C9*1/*3</i>	8	10	7
<i>CYP2C9*2/*2</i>	3	0	0
<i>CYP2C9*2/*3</i>	0	0	0
<i>CYP2C9*3/*3</i>	0	1	0

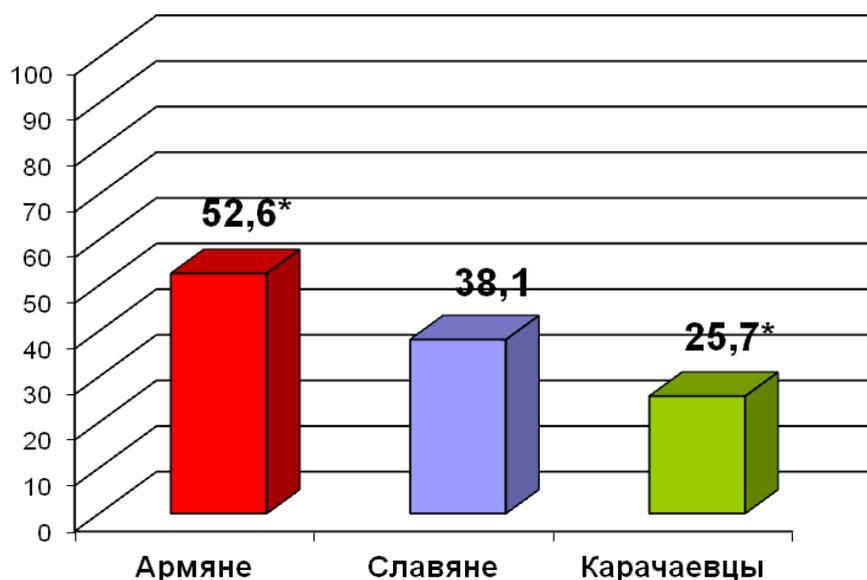
Генотип *CYP2C9\*1/\*1* встречается у 61,9% русских, 47,4% армян и 74,3% карачаевцев. Генотип *CYP2C9\*1/\*2* встречается у 20,6% славян, 23,7% армян и 5,7% карачаевцев. Генотип *CYP2C9\*1/\*3* встречается у 12,7% славян, 26,3% армян и 20% карачаевцев. Генотип *CYP2C9\*2/\*2* встречается у 4,8% славян и не был обнаружен у армян и карачаевцев. Генотип *CYP2C9\*2/\*3* не обнаружен ни в одной этнической группе. Генотип *CYP2C9\*3/\*3* встречается у 2,6% армян и не был обнаружен у славян и карачаевцев.

Частоты генотипов *CYP2C9* в исследуемых этнических группах Ставропольского края представлена в таблице 25. Суммарная частоты носителей генотипов «медленного» метаболизма *CYP2C9* (*CYP2C9\*1/\*2*, *CYP2C9\*1/\*3*, *CYP2C9\*2/\*2*, *CYP2C9\*2/\*3*, *CYP2C9\*3/\*3*) в каждой этнической группе представлены на рисунке 4.

**Таблица 25. Частоты генотипов *CYP2C9* в трех этнических группах населения Ставропольского края, %**

Генотип	Славяне, % (n =63)	Армяне, % (n =38)	Карачаевцы, % (n =35)
<i>CYP2C9*1/*1</i>	61,9	47,4	74,3
<i>CYP2C9*1/*2</i>	20,6	23,7	5,7
<i>CYP2C9*1/*3</i>	12,7	26,3	20
<i>CYP2C9*2/*2</i>	4,8	0	0
<i>CYP2C9*2/*3</i>	0	0	0
<i>CYP2C9*3/*3</i>	0	1	0

\*-  $p < 0,05$  при сравнении частот генотипов в группе армян и карачаевцев



**Рисунок 4. Соотношение частот генотипов «медленных» окислителей CYP2C9 в трех этнических группах населения Ставропольского края, %**

При сравнении распределения генотипов *CYP2C9* у славян и армян с помощью теста Краскала-Уоллиса, оказалось, что у армян по сравнению со славянами нет достоверных различий в распространенности генотипа *CYP2C9\*1/\*2* ( $p=0,763$ ), (таблица 23). Однако, генотипы *CYP2C9\*1/\*1* ( $p=0,032$ ) и *CYP2C9\*2/\*2* ( $p=0,036$ ) достоверно чаще встречались у славян по сравнению с армянами. В свою очередь, генотипы *CYP2C9\*1/\*3* ( $p=0,041$ ) и *CYP2C9\*3/\*3* ( $p=0,035$ ) достоверно чаще встречались у армян по сравнению со славянами (таблица 26).

**Таблица 26. Сравнение распределения генотипов по CYP2C9 у славян и армян.**

Генотип	Славяне, % (n =63)	Армяне, % (n =38)	p
<i>CYP2C9*1/*1</i>	61,9 (39)	47,4 (18)*	0,032
<i>CYP2C9*1/*2</i>	20,6 (13)	23,7 (9)	0,763
<i>CYP2C9*1/*3</i>	12,7 (8)*	26,3 (10)	0,041

<i>CYP2C9*2/*2</i>	4,8 (3)*	(0)	0,036
<i>CYP2C9*2/*3</i>	(0)	(0)	-
<i>CYP2C9*3/*3</i>	(0)	2,6 (1)*	0,035

При сравнении распределения генотипов *CYP2C9* у славян и карачаевцев с помощью теста Краскала-Уоллиса было установлено, что у славян по сравнению с карачаевцами достоверно чаще встречались генотипы *CYP2C9\*1/\*2* ( $p=0,002$ ) и *CYP2C9\*2/\*2* ( $p=0,039$ ) (таблица 27). При этом генотипы *CYP2C9\*1/\*1* ( $p=0,036$ ) и *CYP2C9\*1/\*3* ( $p=0,038$ ) достоверно чаще встречались у карачаевцев по сравнению со славянами.

**Таблица 27. Сравнение распределения генотипов по *CYP2C9* у славян и карачаевцев.**

Генотип	Славяне, % (n =63)	Карачаевцы, % (n =35)	p
<i>CYP2C9*1/*1</i>	61,9 (39)*	74,3 (26)*	0,036
<i>CYP2C9*1/*2</i>	20,6 (13)**	5,7 (2)**	0,002
<i>CYP2C9*1/*3</i>	12,7 (8)*	20 (7)*	0,038
<i>CYP2C9*2/*2</i>	4,8 (3)*	(0)	0,039
<i>CYP2C9*2/*3</i>	(0)	(0)	-
<i>CYP2C9*3/*3</i>	(0)	(0)	-

Было проведено сравнение распределения генотипов *CYP2C9* у армян и карачаевцев с помощью теста Краскала-Уоллиса. У армян по сравнению с карачаевцами нет достоверных различий в распространенности генотипа *CYP2C9\*1/\*3* ( $p=0,821$ ), (таблица 28). Однако, генотип *CYP2C9\*1/\*1* ( $p=0,029$ ) достоверно чаще встречался у карачаевцев по сравнению с армянами (таблица 25). В свою очередь, генотипы *CYP2C9\*1/\*2* ( $p=0,003$ ) и *CYP2C9\*3/\*3* ( $p=0,042$ ) достоверно чаще встречались у армян по сравнению с карачаевцами (таблица 28).

**Таблица 28. Сравнение распределения генотипов по *CYP2C9* у армян и карачаевцев.**

Генотип	Армяне, % (n =38)	Карачаевцы, % (n =35)	p
<i>CYP2C9*1/*1</i>	47,4(18)*	74,3 (26)	0,029
<i>CYP2C9*1/*2</i>	23,7 (9)	5,7 (2)**	0,003
<i>CYP2C9*1/*3</i>	26,3 (10)	20 (7)	0,821
<i>CYP2C9*2/*2</i>	(0)	(0)	-
<i>CYP2C9*2/*3</i>	(0)	(0)	-
<i>CYP2C9*3/*3</i>	2,6 (1)*	(0)	0,042

Было выявлено и проанализировано 272 аллеля гена *CYP2C9*. Обнаружено 215 аллелей *CYP2C9\*1* (79%), 30 аллелей *CYP2C9\*2* (11%) и 27 аллелей *CYP2C9\*3* (10%). Из 215 аллелей *CYP2C9\*1* 99 были обнаружены у славян, 55 - у армян, 61 - у карачаевцев. Из 30 аллелей *CYP2C9\*2* 19 были обнаружены у славян, 9 - у армян, 2 - у карачаевцев. Из 27 аллелей *CYP2C9\*3* 8 были обнаружены у славян, 12 - у армян, 7 - у карачаевцев. Распределение аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в трех этнических группах Ставрополя представлено в таблице 29.

**Таблица 29. Распределение аллелей *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в изученных группах.**

Этнос	<i>CYP2C9*1</i>	<i>CYP2C9*2</i>	<i>CYP2C9*3</i>	Число аллелей в популяциях
Славяне	99	19	8	126
Армяне	55	9	12	76
Карачаевцы	61	2	7	70
Всего аллельных вариантов	215	30	27	<b>272</b>

У славян из 126 аллелей выявлено 99 аллелей *CYP2C9\*1* (78,6%), 19 аллелей *CYP2C9\*2* (15,1%), 8 аллелей *CYP2C9\*3* (6,3%). У армян из 76 аллелей выявлено 55 аллелей *CYP2C9\*1* (72,4%), 9 аллелей *CYP2C9\*2* (11,8%), 12 аллелей *CYP2C9\*3* (15,8%). У карачаевцев из 70 аллелей выявлен 61 аллель *CYP2C9\*1* (87,1%), 2 аллеля *CYP2C9\*2* (2,9%), 7 аллелей *CYP2C9\*3* (10%). Частота аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* в трех этнических группах Ставропольского края представлена в таблице 30.

**Таблица 30. Частота аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у славян, армян и карачаевцев, %.**

Этнос	<i>CYP2C9*1</i>	<i>CYP2C9*2</i>	<i>CYP2C9*3</i>
Славяне	78,6	15,1	6,3
Армяне	72,4	11,8	15,8
Карачаевцы	87,1	2,9	10

При сравнении распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у славян и армян с помощью теста Краскала-Уоллиса, обнаружено, что у армян по сравнению со славянами нет достоверных различий в распространенности аллельных вариантов *CYP2C9\*1* ( $p=0,752$ ) и *CYP2C9\*2* ( $p=0,873$ ) (таблица 28). Однако, аллельный вариант *CYP2C9\*3* достоверно чаще встречался у армян по сравнению со славянами ( $p=0,038$ ) (таблица 31).

**Таблица 31. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у славян и армян.**

Аллельный вариант	Славяне	Армяне	p
<i>CYP2C9*1</i>	78,6	72,4	0,752
<i>CYP2C9*2</i>	15,1	11,8	0,873
<i>CYP2C9*3</i>	6,3*	15,8*	0,038

\*-  $p<0,05$

При сравнении распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у славян и карачаевцев с помощью теста Краскала-Уоллиса, оказалось, что у карачаевцев, по сравнению со славянами, нет достоверных различий в распространенности аллельных вариантов *CYP2C9\*1* ( $p=0,698$ ) и *CYP2C9\*3* ( $p=0,598$ ) (таблица 29). Однако, аллельный вариант *CYP2C9\*2* ( $p=0,003$ ) у карачаевцев встречался достоверно реже по сравнению со славянами (таблица 32).

**Таблица 32. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у славян и карачаевцев.**

Аллельный вариант	Славяне	Карачаевцы	p
<i>CYP2C9*1</i>	78,6	87,1	0,698
<i>CYP2C9*2</i>	15,1**	2,9**	0,003
<i>CYP2C9*3</i>	6,3	10	0,598

\*\* -  $p < 0,01$

Было проведено сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у армян и карачаевцев с помощью теста Краскала-Уоллиса. У армян по сравнению с карачаевцами нет достоверных различий в распространенности аллельных вариантов *CYP2C9\*1* ( $p=0,482$ ) и *CYP2C9\*3* ( $p=0,693$ ) (таблица 33). Однако, аллельный вариант *CYP2C9\*2* достоверно чаще встречался у армян по сравнению с карачаевцами ( $p=0,006$ ) (таблица 33).

**Таблица 33. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2C9\*1*, *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у армян и карачаевцев.**

Аллельный вариант	Армяне	Карачаевцы	p
<i>CYP2C9*1</i>	72,4	87,1	0,482
<i>CYP2C9*2</i>	11,8**	2,9**	0,006
<i>CYP2C9*3</i>	15,8	10	0,693

\*\* -  $p < 0,01$

Таким образом, были выявлены различия в частотах аллелей и генотипов по аллельным вариантам *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* у представителей этнических групп славян, армян и карачаевцев населения Ставропольского края. Результаты большого числа исследований позволили установить, что носителям аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* присуща сниженная активность фермента *CYP2C9*. Это является следствием аминокислотных замен в нуклеотидной последовательности ДНК, в результате которых и происходит синтез фермента с дефектом метаболической активности, а носительство наиболее распространенных функционально дефектных аллелей *CYP2C9\*2* (R144C) и *CYP2C9\*3* (I359L) сопряжено с высокими концентрациями непрямых антикоагулянтов и более частым развитием кровотечений или эпизодов чрезмерной гипокоагуляции (Wadelius M., Nebert D.W., 2004; Shahin M.H., Nebert D.W., 2013). Следовательно, носителям таких «медленных» аллельных вариантов требуются меньшие дозы варфарина. Причем активность функционально дефектного варианта *CYP2C9\*3* снижена в значительно большей степени и составляет всего 5% от нормальной (Кукес В.Г., 2008). Исходя из данных, полученных в нашей работе, генетическую предрасположенность к повышенной чувствительности на ЛС, которые подвергаются метаболизму под действием *CYP2C9*, имеют представители армянской этнической группы Ставропольского региона, и, прежде всего, это относится к непрямые антикоагулянтам. В связи с этим можно ожидать, что в армянской этнической группе при использовании варфарина риск кровотечений может быть выше, чем у славян и карачаевцев.

### 3.3. Этнические особенности генетического полиморфизма *CYP2D6* в Ставропольском крае

Информация о генетически полиморфных маркерах метаболизма ЛС, полученная в популяционных исследованиях невозможна без учета этнических аспектов полиморфизма исследуемого гена, изучение которых позволяет определить степень распространения полиморфизма, его масштабность и значимость в исследуемой популяции и связанные с этим особенности применения ЛС-субстратов в той или иной этнической группе. Среди всех изоформ *CYP*-450 *CYP2D6* обладает наибольшей фенотипической изменчивостью. С полиморфизмом этого гена связаны наиболее ранние наблюдения вариаций в метаболизме лекарственных средств. Для оценки распространенности дефектных аллельных вариантов и генотипов *CYP2D6* в группах коренных этносов населения Ставропольского края с целью расширения представлений об этнических особенностях метаболизма и в качестве сравнения с таковыми по *CYP2C9* было проведено генотипирование исследуемых лиц по *CYP2D6*.

#### 3.3.1. Проверка соответствия соотношения генотипов *CYP2D6* в изученных выборках закону Харди-Вайнберга

В настоящее время число описанных гаплотипов *CYP2D6* превысило 100. Из всех известных «медленных» аллельных вариантов *CYP2D6* наиболее важными являются *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17* и *CYP2D6\*41* (Zhou S.F., et al., 2009), но у европейцев более высокая частота фенотипа PMs (7%) *CYP2D6* складывается именно за счет большей распространенности аллелей *CYP2D6\*4* и *CYP2D6\*5* (Gaedigk A., et al., 2003;

Mizutani T., et al., 2003), а Saxena (1994) отмечает, что 95% всех «медленных» метаболизаторов по CYP2D6 являются носителями вариантов *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5* (Кукес В. Г., 2008).

Аллель *CYP2D6\*3* характеризуется делецией нуклеотида 2549A, что приводит к сдвигу рамки считывания и к отсутствию ферментативной активности кодируемого цитохрома CYP2D6. Ключевым полиморфным маркером *CYP2D6\*4*, ответственным за синтез нефункционального цитохрома является замена G1846A. Дефектному аллелю *CYP2D6\*4* соответствует нуклеотид 1846A, то есть при обнаружении аденина в положении 1846 устанавливают, что это соответствует *CYP2D6\*4*. Согласно данным литературы, у европеоидов, в том числе у населения российской популяции, наиболее распространенный полиморфизм гена *CYP2D6*, имеющий фенотипическое проявление, - 1846G>A (Сычев Д.А., 2011).

Для изучения частот аллелей и генотипов вышеуказанных полиморфных маркеров были сформированы три этнические группы из здоровых добровольцев. Группа славян включала в себя 35 человек, группа армян - 35 человек, карачаевцев - 35 человек. Полученные результаты частот аллелей и генотипов в изученных группах представлены в таблице 34.

**Таблица 34. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера 1846GA гена *CYP2D6* в исследуемых этнических группах Ставропольского края.**

<b>Аллель</b>	<b>Славяне</b> n=70	<b>Армяне</b> n=70	<b>Карачаевцы</b> n=70
1846G	62 (0,8857)	62 (0,8857)	56 (0,80)
1846A	8 (0,1143)	8 (0,1143)	14 (0,20)
<b>Генотип</b>	<b>Славяне</b> n=35	<b>Армяне</b> n=35	<b>Карачаевцы</b> n=35
1846GG	27	27	21
1846GA	8	8	14
1846AA	0	0	0

В группе славян было выявлено 62 аллеля 1846G и 8 аллелей 1846A, т.е. носителями генотипа 1846GG являлись 27 человек, генотипа 1846GA - 8 человек.

Аналогичным образом было выявлено число генотипов и аллелей в армянской этнической группе: 62 аллеля 1846G, 8 аллелей 1846A. Носителями генотипа 1846GG являлись 27 человек, генотипа 1846GA - 8 человек.

Соответственно, в группе карачаевцев из обнаруженных носителей 56 аллелей 1846G и 14 аллелей 1846A 21 человек был носителем генотипа 1846GG и 14 носителями генотипа 1846GA. При этом ни в одной из исследуемых групп гомозигот 1846AA обнаружено не было.

Для подтверждения соответствия частот аллелей и генотипов наших выборок реальной популяции, проведена проверка выполнения закона Харди-Вайнберга. В таблицах 35, 36 и 37 представлены результаты такой проверки, как описано в разделе 3.2.1. Было установлено, что во всех изученных выборках не наблюдается достоверных различий между количествами лиц с установленными генотипами и с ожидаемыми генотипами.

**Таблица 35. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера 1846GA гена *CYP2D6* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе славян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
1846GG	27	27,46	>0,05
1846GA	8	7,09	>0,05
1846AA	0	0,45	>0,05

Таким образом, распределение частот генотипов полиморфного маркера 1846GA в наших выборках находится в соответствии с уравнением Харди-Вайнберга. Это означает, что в изучаемых группах по этому полиморфизму отражено соответствие частот генотипов 1846GA генеральной совокупности.

**Таблица 36. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера 1846GA гена *CYP2D6* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе армян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
1846GG	27	27,46	>0,05
1846GA	8	7,09	>0,05
1846AA	0	0,45	>0,05

**Таблица 37. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера 1846GA гена *CYP2D6* с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе карачаевцев.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
1846GG	21	22,4	>0,05
1846GA	14	11,2	>0,05
1846AA	0	1,4	>0,05

Аналогичным образом проведены расчеты и с другим полиморфным маркером гена *CYP2D6* - *del2549A*(\*3). Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *del2549A*(\*3) в изученных выборках представлены в таблице 38.

**Таблица 38. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *del2549A(\*3)* гена *CYP2D6* в исследуемых этнических группах Ставропольского края.**

<b>Аллель</b>	<b>Славяне</b> n=70	<b>Армяне</b> n=70	<b>Карачаевцы</b> n=70
<i>*1</i>	68 (0,9714)	70	70
<i>del2549A(*3)</i>	2 (0,0286)	0	0
<b>Генотип</b>	<b>Славяне</b> n=35	<b>Армяне</b> n=35	<b>Карачаевцы</b> n=35
<i>*1/*1</i>	33	35	35
<i>*1/*3</i>	2	0	0
<i>*3/*3</i>	0	0	0

Из всех трех выборок только в группе славян было выявлено 2 носителей генотипа *CYP2D6\*1/\*3*. Мутантных гетерозигот и гомозигот по *CYP2D6\*3* в группе армян и карачаевцев выявлено не было. Носителей генотипа *CYP2D6\*1/\*1* среди славян выявлено 33 человека. Следовательно, число носителей аллельного варианта *\*3* в этой группе было 2, аллельного варианта *\*1* – 68 человек.

В таблицах 39, 40 и 41 отображены результаты проверки выполнения закона Харди-Вайнберга по соответствию частот аллелей и генотипов изученных выборок реальной популяции (раздел 3.2.1.) Установлено, что во всех изученных выборках не наблюдается достоверных различий между количествами лиц с установленными генотипами и с ожидаемыми генотипами.

Таким образом, распределение частот генотипов полиморфного маркера *del2549A* в наших выборках подчиняется закону Харди - Вайнберга, и наши выборки по этому полиморфизму отражают соответствие частот генотипов *del2549A* в генеральной совокупности.

**Таблица 39. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера del2549A(\*3) гена CYP2D6 с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе славян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
*1/*1	33	33	>0,05
*1/*3	2	2	>0,05
*3/*3	0	0	>0,05

**Таблица 40. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера del2549A(\*3) гена CYP2D6 с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе армян.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
*1/*1	35	35	>0,05
*1/*3	0	0	>0,05
*3/*3	0	0	>0,05

**Таблица 41. Сопоставление наблюдаемых частот генотипов полиморфного маркера del2549A(\*3) гена CYP2D6 с частотами, рассчитанными по частотам соответствующих аллелей, исходя из соотношения Харди-Вайнберга, в группе карачаевцев.**

Генотип	Распределение генотипов, n=35		p
	наблюдаемое	ожидаемое	
*1/*1	35	35	>0,05
*1/*3	0	0	>0,05
*3/*3	0	0	>0,05

### 3.3.2. Изучение частот аллелей и генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у представителей славянской, армянской и карачаевской этнических групп Ставропольского края

С целью выявления возможных этнических различий было проведено определение аллелей и генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* в трех этнических группах коренного населения Ставропольского края: славянской (этнические русские и украинцы), армянской и карачаевской. Всего обследовано 105 здоровых добровольцев – по 35 представителей каждой этнической группы. Выявленные генотипы по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* и их численность в изученных группах представлены в таблице 42.

**Таблица 42. Распределение генотипов *CYP2D6* в исследуемых популяциях.**

Генотип	Славяне (n =35)	Армяне (n =35)	Карачаевцы (n =35)
<i>CYP2D6*1/*1</i>	25	27	21
<i>CYP2D6*1/*3</i>	2	-	-
<i>CYP2D6 *1/*4</i>	8	8	14

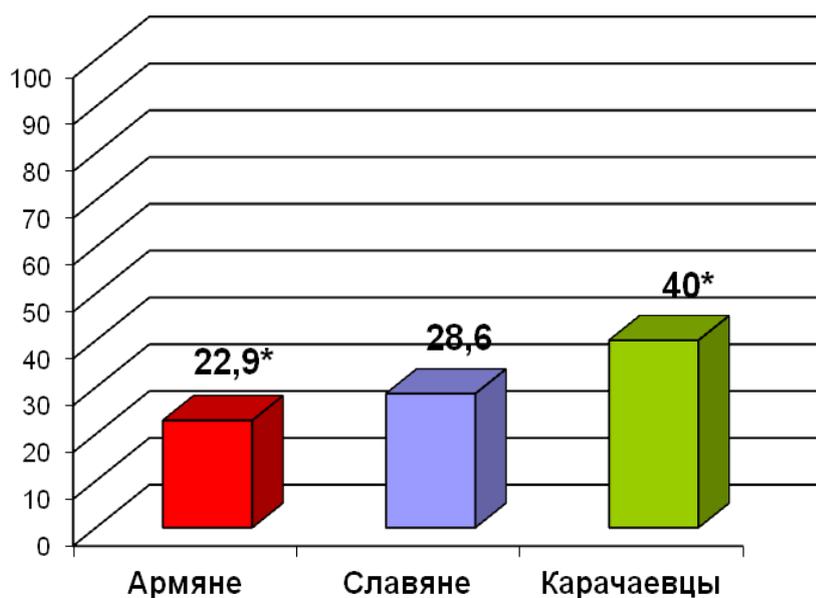
Генотип *CYP2D6\*1/\*1* был выявлен у 73 человек, из них 25 человек являлись славянами, 27 - армянами, 21- карачаевцами. Генотип *CYP2D6\*1/\*3* был выявлен только у 2 человек, являющихся представителями славянской этнической

группы. Генотип *CYP2D6\*1/\*4* был выявлен у 30 человек, из них 8 человек являлись славянами, 8 - армянами, 14 - карачаевцами.

Генотип *CYP2D6\*1/\*1* встречается у 71,4% славян, 77,1% армян и 60% карачаевцев. Генотип *CYP2D6\*1/\*3* был выявлен только у славян с частотой 5,7%. Генотип *CYP2D6\*1/\*4* встречается у 22,9% славян, 22,9% армян и у 40% карачаевцев. Частоты генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* и их численность в изученных группах представлены в таблице 43. Суммарно частоты носителей генотипов «медленного» метаболизма (*CYP2D6\*1/\*3* и *CYP2D6\*1/\*4*) в каждой этнической группе представлены на рисунке 5.

**Таблица 43. Частоты генотипов *CYP2D6* в исследуемых этнических группах, %.**

Генотип	Славяне (n =35)	Армяне (n =35)	Карачаевцы (n =35)
<i>CYP2D6*1/*1</i>	71,4	77,1	60
<i>CYP2D6*1/*3</i>	5,7	-	-
<i>CYP2D6*1/*4</i>	22,9	22,9	40



\*-  $p < 0,05$  при сравнении частот генотипов в группе армян и карачаевцев

**Рисунок 5. Соотношение частот генотипов «медленных» окислителей *CYP2D6* в исследуемых этнических группах, %.**

При сравнении распределения генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и армян с помощью теста Краскалла-Уоллиса, достоверных различий в распространенности генотипов *CYP2D6\*1/\*1* ( $p=0,853$ ) и *CYP2D6\*1/\*4* ( $p=0,796$ ) не обнаружено.

Генотип *CYP2D6\*1/\*3* был выявлен только у 2 славян (5,7%) и не встречался у армян и карачаевцев, поэтому сравнение распределения этого генотипа в трех этнических группах не проводилось.

При сравнении распределения генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и карачаевцев с помощью теста Краскалла-Уоллиса, у славян, по сравнению с карачаевцами, чаще встречался генотип *CYP2D6\*1/\*1* (71,4% против 60%,  $p=0,041$ ). Генотип *CYP2D6\*1/\*4* достоверно чаще встречался у карачаевцев по сравнению со славянами (40% против 22,9%,  $p=0,003$ ).

Мы провели сравнение распределения генотипов по аллельным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у армян и карачаевцев с помощью теста Краскалла-Уоллиса. У армян, по сравнению с карачаевцами, чаще встречался генотип *CYP2D6\*1/\*1* (77,1% против 60%,  $p=0,037$ ). Генотип *CYP2D6\*1/\*4* достоверно чаще встречался у карачаевцев по сравнению с армянами (40% против 22,9%,  $p=0,003$ ).

Было выявлено и проанализировано 210 аллелей гена *CYP2D6*. Обнаружено: 178 аллелей *CYP2D6\*1* (84,8%), 2 аллеля *CYP2D6\*3* (0,9%), 30 аллелей *CYP2D6\*4* (14,3%). Из 178 аллелей *CYP2D6\*1* 60 были выявлены у славян, 62 - у армян, 56 - у карачаевцев. 2 аллеля *CYP2D6\*3* обнаружены только у славян. Из 30 аллелей *CYP2D6\*4* у славян и армян было обнаружено по 8 в каждой группе и 14 аллелей – у карачаевцев. Распределение аллелей по полиморфным вариантам *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* в этнических группах Ставрополя представлено в таблице 44.

**Таблица 44. Распределение аллелей *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* в изученных группах.**

Этнос	<i>CYP2D6*1</i>	<i>CYP2D6*3</i>	<i>CYP2D6*4</i>	Число аллелей в популяциях
Славяне	60	2	8	70
Армяне	62	-	8	70
Карачаевцы	56	-	14	70
Всего аллельных вариантов	178	2	30	<b>210</b>

У славян из 70 аллелей выявлено 60 аллелей *CYP2D6\*1* (85,7%), 2 аллеля *CYP2D6\*3* (2,9%), 8 аллелей *CYP2D6\*4* (11,4%). У армян из 70 аллелей выявлено 62 аллеля *CYP2D6\*1* (88,6%) и 8 аллелей *CYP2D6\*4* (11,4%). У карачаевцев из 70 аллелей выявлено 56 аллелей *CYP2D6\*1* (80%) и 14 аллелей *CYP2D6\*4* (20%). Частоты аллельных вариантов *CYP2D6* в этнических группах Ставропольского края представлены в таблице 45.

**Таблица 45. Частоты аллельных вариантов *CYP2D6* в исследуемых этнических группах, %.**

Аллельный вариант	Славяне (n =70)	Армяне (n =70)	Карачаевцы (n =70)
<i>CYP2D6*1</i>	85,7	88,6	80
<i>CYP2D6*3</i>	2,9	-	-
<i>CYP2D6*4</i>	11,4	11,4	20

При сравнении распределения аллелей *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и армян с помощью теста Краскала-Уоллиса, оказалось, что у славян, по сравнению с армянами, не было достоверных различий по частоте аллельного варианта *CYP2D6\*1* (85,7% против 88,6%,  $p=0,865$ ), а по частоте аллеля

*CYP2D6\*4* армяне и славяне оказались идентичны (11,4% в обеих группах). При этом, аллель *CYP2D6\*3* из трех групп встречался только у славян (2,9%), поэтому сравнение его частот в исследуемых группах не проводилось (таблица 46.)

**Таблица 46. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и армян.**

Аллельный вариант	Славяне	Армяне	р
<i>CYP2D6*1</i>	85,7%	88,6%,	0,865
<i>CYP2D6*3</i>	2,9%	0	-
<i>CYP2D6*4</i>	11,4%	11,4%	-

Сравнение распределения аллелей *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и карачаевцев с помощью теста Краскалла-Уоллиса не выявило достоверных отличий по частоте аллеля *CYP2D6\*1* у славян, по сравнению с карачаевцами (85,7 % против 80%,  $p=0,792$ ). Аллель *CYP2D6\*4* достоверно чаще встречается у карачаевцев по сравнению со славянами (20% против 11,4%,  $p=0,043$ ) (таблица 47).

**Таблица 47. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у славян и карачаевцев.**

Аллельный вариант	Славяне	Карачаевцы	р
<i>CYP2D6*1</i>	85,7%	80%,	0,792
<i>CYP2D6*3</i>	2,9%	0	-
<i>CYP2D6*4</i>	11,4%	20%	0,043

Было проведено сравнение распределения аллелей *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у армян и карачаевцев с помощью теста Краскалла-Уоллиса. У армян, по сравнению с карачаевцами, нет достоверных различий в распространенности

аллеля *CYP2D6\*1* ( $p=0,801$ ). Аллель *CYP2D6\*4* также достоверно чаще встречается у карачаевцев по сравнению с армянами (20% против 11,4%,  $p=0,043$ ) (таблица 48).

**Таблица 48. Сравнение распределения аллельных вариантов *CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* у армян и карачаевцев.**

Аллельный вариант	Армяне	Карачаевцы	p
<i>CYP2D6*1</i>	88,6%,	80%,	0,801
<i>CYP2D6*3</i>	0	0	-
<i>CYP2D6*4</i>	11,4%	20%	0,043

Таким образом, аллель *CYP2D6\*4* и генотип *CYP2D6\*1/\*4*, ассоциирующийся с низкой активностью *CYP2D6*, а, следовательно, и со сниженной скоростью биотрансформации ЛС-субстратов *CYP2D6*, чаще встречается в этнической группе карачаевцев по сравнению с армянами и славянами. Эти данные позволяют предположить более высокую чувствительность карачаевцев к ЛС, которые метаболизируются *CYP2D6*.

## ГЛАВА 4. Обсуждение результатов

Таким образом, сравнительный проспективный анализ клинической эффективности варфарина показал, что представители армянского этноса нуждаются в более низкой подобранной дозе варфарина. По результатам исследования у них преобладала доза варфарина менее 5 мг и составила в среднем  $3,9 \pm 1,5$  мг/сутки. Удалось также выявить, что пациенты армяне быстрее достигали целевых значений МНО. При оценке риска развития осложнений в результате приема варфарина оказалось, что большинство эпизодов увеличения МНО выше 3 было зарегистрировано также у армян.

При проведении генотипирования пациентов в изучаемых популяциях были выявлены различия в частотах аллелей и генотипов по аллельным вариантам *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*. Исходя из полученных данных, армяне имеют генетическую предрасположенность к повышенной чувствительности на ЛС, которые подвергаются метаболизму под действием *CYP2C9*, что, прежде всего, относится к непрямые антикоагулянтам. Следовательно, были выявлены этнические различия чувствительности к непрямые антикоагулянтам у пациентов армянской, славянской и карачаевской национальности.

Этнические различия результатов применения ЛС были выявлены во многих исследованиях. Среди пациентов европеоидной расы ингибиторы АПФ являются более эффективными в плане снижения АД, чем у афроамериканцев, вероятно, вследствие того, что у афроамериканцев АГ протекает на фоне низкого уровня ренина. В свою очередь, эта группа пациентов хорошо отвечает на терапию диуретиками и БКК (Беркоу Р., 1997; Чазова И.Е., 2000).

Определенные особенности в реагировании пациентов из различных популяций получены в отношении психофармакологических соединений (антидепрессанты) (Vartanian F.E., et al., 1986). Выявлена лучшая эффективность применения высоких доз amitриптилина, имипрамина и мапротилина для

европейских популяций (жители Швейцарии). Напротив, выраженные побочные явления, отмеченные у пациентов азиатов (жители Японии) и населения Индии, свидетельствовали о высокой чувствительности этих популяций к психотропным препаратам. Причины такой чувствительности в данном случае можно частично объяснить наличием статистически достоверно более низкими показателями массы тела и роста, особенностями диеты с низким содержанием белка и генетическими особенностями ферментов метаболизма (Вартанян Ф.Е., 2004). Результаты подобных исследований демонстрируют определенные закономерности в ответ на применение ЛС у пациентов различных этнических групп, что нельзя не учитывать при выборе фармакотерапии.

Одним из основных факторов, определяющих реакцию организма на воздействие большинства ЛС, являются генетические особенности конкретного пациента, и, в первую очередь, это генетический полиморфизм белков, контролирующих синтез ответственных за биотрансформацию ЛС молекул-мишеней, а также осуществляющих регуляцию этих структур (Середенин С.Б., 2004; Кукес В.Г., с соавт., 2008).

В Ставропольском крае ранее уже были установлены этнические, а также половые различия использования и эффективности антигипертензивной терапии у славян и армян региона Кавказских Минеральных Вод (Батурич В.А., Яковлева Н.В., 2006). Фармакоэпидемиологическое исследование продемонстрировало, что пациенты армянской этнической группы нуждаются в более интенсивной антигипертензивной терапии. Именно у них чаще использовалась многокомпонентная терапия, и применялись большие дозы некоторых препаратов (ИАПФ, БАБ, гидрохлортиазид). Была установлена слабая эффективность ИАПФ лизиноприла у армян по сравнению со славянами, и более кратковременный эффект каптоприла, а также определена тенденция к более низкой эффективности  $\beta$ -адреноблокатора атенолола. Наиболее слабый эффект лизиноприла был отмечен у представительниц армянского этноса, как с сопутствующим сахарным диабетом, так и без него.

В то же время, исследование показало, что пролонгированный БКК - амлодипин был в равной степени эффективен у представителей славянского и армянского этносов. Для достижения полного антигипертензивного эффекта армянам, особенно женщинам, приходилось назначать большее количество гипотензивных препаратов. При этом, несмотря на проведение пациентам армянской этнической группы более агрессивной терапии, цифры АД у них оставались выше, чем у славян. Обратил на себя внимание и тот факт, что менее выраженная динамика САД, на фоне терапии лизиноприлом и атенололом, была отмечена у женщин – армянок. Важно, что у армянок с сопутствующим сахарным диабетом, на фоне приема ИАПФ – лизиноприла, отмечалась худшая динамика не только САД, но и ДАД. Лучший антигипертензивный эффект достигался у женщин – славянок.

Реакция больных на фармакотерапию индивидуальна и зависит от целого комплекса различных факторов, ведущими из которых являются генетические. Среди генетических факторов, оказывающих влияние на режим дозирования, эффективность и риск развития осложнений при назначении варфарина, ведущее место принадлежит изоферменту цитохрома Р-450 *CYP2C9* (Nebert D.W., et al., 2004; Сычев Д.А., с соавт., 2008). Многочисленные фармакокинетические исследования последних лет показали, что носительство так называемых «медленных» аллелей *CYP2C9\*2*, *CYP2C9\*3*, гена *CYP2C9* приводит к замедлению метаболизма непрямых антикоагулянтов, в том числе варфарина, и развитию его побочных эффектов.

Согласно многочисленным исследованиям, распространенность полиморфизмов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* существенно различается в разных этнических группах. В европеоидных популяциях наиболее часто встречаются варианты аллели полиморфизмов *CYP2C9\*2* (8–20%) и *CYP2C9\*3* (6–10%) по сравнению с азиатами (0 и 2–5%, соответственно) (Stehle S., et al., 2008). Аллели гена *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*, связанные с уменьшением его каталитической активности, были определены среди населения европейского, африканского или

азиатского происхождения. При этом оба дефектных аллеля встречаются с большей частотой среди американцев европейского происхождения, чем у афроамериканцев (Limdi N.A., et al., 2007, 2008; Gage B.F., et al., 2005; Schelleman H., et al., 2007).

Наибольшее распространение «медленного аллеля» *CYP2C9\*3* среди европейцев оказалось у испанского населения - 16,2% (Dorado P., et al., 2003; L.Lerena A., et al., 2004; Garcia-Martin E., et al., 2001).

Среди населения Южной Америки, у испаноязычных боливийцев обнаружена более низкая частота аллелей *CYP2C9\*2* по сравнению с другими белыми (европейцы и североамериканцы), но и она оказалась выше, чем у народов Восточной Азии (Bravo-Villalta H.V. et al., 2005).

Исследования генетических особенностей полиморфизма *CYP-450* у народов Сибири (Makeeva O., et al., 2008) показали различия в частотах дефектных аллельных вариантов *CYP2C9*. У русских Сибири *CYP2C9\*2* обнаруживался с частотой 12% и занимал промежуточное положение между бельгийцами (10%) и хорватами (17%); а *CYP2C9\*3* составил 7%, что сопоставимо с большинством результатов, полученным у европейцев.

В этом же исследовании были выявлены существенные различия в частотах аллелей между русскими и коренными народами Сибири: мутантный аллель *CYP2C9\*2* у русских (12%) выявлялся почти в 12 раз чаще, чем у тувинцев (1,1%) и якутов (1,1%), в 6 раз чаще, чем у бурятов (2,3%), и почти в 2 раза чаще, чем у алтайцев (5,7%). Частота *CYP2C9\*3* была самой высокой в группе алтайцев, у которых она составила 9% против 1,7% у бурятов ( $p = 0,002$ ) и 0,6% у якутов ( $p = 0,0001$ ). У русских полиморфизм *CYP2C9\*3* был выявлен у 6,8% исследуемых.

При исследовании полиморфизма гена *CYP2C9* у коренных жителей Северной Сибири (2011 г.) также была выявлена определенная доля носителей «медленных» аллельных вариантов, как среди русских, так и коренных жителей (самодийские популяции): *CYP2C9\*2* встречался с максимальной частотой 13,77% именно у русского населения, что отличало их от лесных ненцев (6,77%),

селькупов (4,85%), нганасанов (3,49%) и тундровых ненцев (2,56%), у которых этот аллель был выявлен с достоверно меньшей частотой (Корчагина Р.П., с соавт., 2011).

В аналогичном изучении населения Чукотки (2005 г.) частоты *CYP2C9\*2* у чукчей и эвенов были сходны с таковыми в исследованных этносах Северной Сибири. Оба исследования примечательны тем, что аллель *CYP2C9\*2* во всех самодийских популяциях, а также у чукчей и эвенов, встречается значительно реже, чем в популяциях русских Северной Сибири и Воронежской области (Gaikovitch E.A., et al., 2003), а также у европейского населения, например, у немцев и словенцев ( $p < 0,05$ ). У азиатских этносов аллель *CYP2C9\*2* встречается крайне редко: у китайцев (0 – 0,1%) (Yang J.Q., et al., 2003; Yu B.N., et al., 2004; Hong X., et al., 2005). У японцев (Kimura M., et al., 1998), вьетнамцев (Lee S.S., et al., 2005), и корейцев аллель отсутствовал (Yoon Y.R., et al., 2001), исходя из чего можно выдвинуть предположение, что мутантный аллель *CYP2C9\*2* имеет европеоидное происхождение (Корчагина Р.П., с соавт., 2011).

В нашей работе полученные частоты *CYP2C9\*2* у славян - 15,1% согласуются с таковыми, полученными при исследовании европейского населения: французов -15% (Yang J.Q., et al., 2003), испанцев - 14,3 – 16% (Dorado P, 2003), хорватов - 12,4 – 16,5% (Bozina N., et al., 2003; Topic E., 2004) и русского населения Воронежа – 10,5% (Gaikovitch E.A., et al., 2003).

При сравнении частот аллелей *CYP2C9\*2* у русских Ставрополя с русскими Сибири результаты также не отличались ( $p > 0,05$ ), но по сравнению с изучаемым *CYP2C9\*2* аллелем у русских Чукотки, южные славяне имели достоверно большую его распространенность (7,4% против 15,1%) ( $p < 0,05$ ).

В группе армян частота *CYP2C9\*2* по сравнению, как со славянами (Ставропольского края, русскими Сибири и Воронежа), так и с европейскими популяциями, не имела достоверных различий (таблица 49). Но у карачаевцев, по нашим данным, распространенность *CYP2C9\*2* (2,9%) оказалась почти в 5 раз

меньше, чем у славян и в 4 раза меньше, чем у армян и была сопоставима с таковой у тундровых ненцев (2,56%), нганасанов (3,49%) и эвенов (3,0%).

**Таблица 49. Частоты аллелей гена *CYP2C9* в изученных популяциях и других этнических группах, %**

Этническая группа	n	*1	*2	*3
Турки <sup>1</sup>	499	79,4	10,6	10
Хорваты <sup>1</sup>	200	74	16,5	9,5
Хорваты <sup>1</sup>	177	83,9	12,4	3,7
Испанцы <sup>1</sup>	102	74	16	10
Испанцы <sup>1</sup>	152	74	16	10
Испанцы <sup>1</sup>	157	69,5	14,3	16,2
Французы <sup>1</sup>	151	77	15	8
Бельгийцы <sup>1</sup>	121	82,2	10	7,4
Китайцы <sup>1</sup>	235	96,4	0	3,6
Китайцы <sup>1</sup>	265	95,1	0	4,9
Китайцы <sup>1</sup>	394	96,3	0,1	3,6
Японцы <sup>1</sup>	140	98,9	0	1,1
Корейцы <sup>1</sup>	574	98,9	0	1,1
Вьетнамцы Kinh <sup>1</sup>	157	97,8	0	2,2
Русские Северной Сибири <sup>2</sup>	690	76,52	13,77	9,71
Русские Сибири <sup>3</sup> (макеева)	174	81,1	12,1	6,8
Русские Чукотки <sup>4</sup>	404	83,6	7,4	9,0
Русские Воронежа <sup>5</sup>	290	72,6	10,5	6,7
Славяне (русские и украинцы) Ставрополя <sup>5</sup>	126	78,6	15,1	6,3
Армяне <sup>5</sup>	76	72,4	11,8	15,8
Карачаевцы <sup>5</sup>	70	87,1	2,9	10,0
Карачаевцы <sup>6</sup>	250	-	-	24,8

<sup>1</sup> - Rosemary, J. The Pharmacogenetics of CYP2C9 and CYP2C19: Ethnic Variation and Clinical Significance / J. Rosemary, C. Adithan // Current Clinical Pharmacology. – 2007. – Vol. 2 . – P. 93–109.]

<sup>2</sup> - Р.П.Корчагина, Л. П. Осипова, Н. А. Вавилова, Е. Н. Воронина, М. Л. Филипенко Генетический полиморфизм цитохрома P450 2C9, участвующего в метаболизме лекарственных препаратов, в популяциях коренных жителей Северной Сибири // Бюллетень СО РАМН – 2011. - № 6. - Т. 31. - С. 39 - 46]

<sup>3</sup> - Makeeva O, Stepanov V, Puzyrev V, Goldstein DB, Grossman I 2008 ; Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes. Pharmacogenomics. 9:847-868

<sup>4</sup> - Koman I.E., Sychev D.A., Pavliut E.V. et al. Ethnic features of CYP2C9 gene polymorphism in Chukotka children // Availably: <http://www.mediasphera.ru/journals/pediatr/207/eng/3000/>

<sup>5</sup> - Царукян, А. А. Значение генетических факторов для терапии непрямыми антикоагулянтами в этнических группах Ставрополя / А. А. Царукян, В. А. Батулин // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2013. – Т. 6, № 56. – С. 279–283.

<sup>6</sup> - Ромодановский Д. П., Хапаев Б. А., Игнатъев И. В., Кукес В. Г., Каркищенко В. Н. Частоты «медленных» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 у карачаевцев и черкесов // Биомедицина - 2010. - № 2. – С. 33-37

По частотам аллеля *CYP2C9\*3* максимальная распространенность полиморфизма была получена нами в этнической группе армян (15,8%), что оказалось достоверно больше, чем у славян Ставропольского края, а при сравнении с показателями частоты данного аллеля в европейских популяциях значения находились в промежутке между турками (10%) и испанцами (16,2%). У карачаевцев частота аллельного варианта *CYP2C9\*3* - 10,0% не отличалась от большинства европейцев (бельгийцев - 7,4%, турок - 10%), русских Воронежа (6,7%), Северной Сибири (9,71%) и Чукотки (9,0%), и славян Ставропольского края (6,3%) ( $p=0,598$ ).

По частотам аллеля *CYP2C9\*3* в группах коренных этносов Северной Сибири наблюдается существенная этническая вариабельность. Так, нганасаны и тундровые ненцы показывают сходные частоты, близкие к таковым в монголоидных популяциях китайцев, чукчей ( $p>0,05$ ). В популяции селькупов, напротив, выявлена максимальная частота *CYP2C9\*3*, сходная с таковой у русских Северной Сибири, у русских из других регионов, а также у европейцев (немцы, словенцы) ( $p > 0,05$ ).

Существенным в нашем исследовании является то, что среди всех популяций, как исследованных, так и взятых для сравнения, у славян

Ставропольского края наблюдается минимальная частота встречаемости *CYP2C9\*3*, а также максимальная частота *CYP2C9\*2* среди популяций этнических русских Северной Сибири, Чукотки и Воронежа. У армян, проживающих на территории Ставропольского края, среди исследуемых этносов частота аллеля *CYP2C9\*3* оказалась максимальной (15,8%).

Этнические особенности полиморфизма гена *CYP2D6*, имеющие существенные различия, были продемонстрированы во многих исследованиях, в основном, для трех основных совокупностей популяций - европеоидной, негроидной и монголоидной. У африканцев и афроамериканцев 35% всех аллелей представляет, главным образом, вариант со сниженной активностью *CYP2D6\*17*; среди азиатов с высокой частотой (41%) обнаруживается аллель *CYP2D6\*10*, также обуславливающий медленный метаболизм, а для европейцев нефункциональные аллели составляют 26% изменчивости, и в основном это реализуется за счет преобладания *CYP2D6\*4* (Bradford L.D., 2002). Аллели, кодирующие *CYP2D6* с нормальной активностью (*CYP2D6\*1*, *CYP2D6\*2*), у европеоидов преобладают с частотой 71%. У африканцев функциональные аллели составляют около 50% от общего числа аллелей *CYP2D6*. Частота функциональных аллелей у монголоидов (азиаты) - также приблизительно 50% (Bradford LD., 2002).

В исследовании распределения частот полиморфных генотипов *CYP2D6* в группах коренных жителей Западной Сибири (европеоидов) и малочисленной группе тундровых ненцев, принадлежащих к северным монголоидам, было выявлено промежуточное по частоте положение аллеля *CYP2D6\*4* у тундровых ненцев, составившее 7%, по сравнению с европейцами (20%) и азиатами (0,3%) (Duzhak T., et al., 2000). Эти данные могут свидетельствовать о том, что интермедиальное положение частоты *CYP2D6\*4* в популяции тундровых ненцев между азиатами и европейцами, скорее всего, демонстрирует европеоидное происхождение аллеля.

По результатам, полученным в нашем исследовании, аллель *CYP2D6\*4*, ассоциирующийся с низкой активностью *CYP2D6*, достоверно чаще ( $p=0,043$ ) распространен в этнической группе карачаевцев (20,0%) по сравнению с группами армян (11,4%) и славян (11,4%). Частота аллеля *CYP2D6\*4*, обнаруженного нами у карачаевцев, соответствовала полученной в исследовании, проведенном ранее у коренного населения Карачаево-Черкесской Республики (Ромодановский Д.П. с соавт., 2010) и была сопоставима с таковой в популяции русских других регионов и некоторых европейских популяциях.

Причины этнических различий в эффективности лекарственных средств могут быть обусловлены вариативностью не только фармакокинетики, но и фармакодинамики препаратов. В основе кумаринорезистентности, например, помимо генетически детерминированных различий генов метаболизма, могут находиться генетически обусловленные особенности активности витамин – К – эпоксидредуктазного комплекса (*VKOR*). Варфарин реализует свой фармакологический эффект, препятствуя синтезу витамина К-зависимых факторов свертывания путем ингибирования *VKORC1* (Wallin R., et al., 2004; Li T., et al., 2004). Различные научные исследования показали участие и других генов в изменчивости дозирования варфарина в различных популяциях. К ним относятся *GGCX* (Herman D., et al., 2006; Vecsler M., et al., 2006; Wadelius M., et al., 2005; Kimura R., et al., 2006), факторы свертывания II, VII и белок С, (Aquilante C.L., et al., 2006) гены транспортеров витамина К, включая аполипопротеин Е (*APO-E*) (Sconce E.A., 2006; Kohnke H., 2005; Kimmel S.E., 2008) и гликопротеин-Р (Wadelius M., 2004). Играют определенную роль и дополнительные гены, участвующие в метаболизме эпоксида витамина К (Vecsler M., et al., 2006; Loebstein R., et al., 2005).

Полиморфизм в промоторной области *VKORC1* - G3673A или G1639A, как его обычно называют в литературе, является важным свойством для проявления фенотипа низкой дозы варфарина. Активность аллеля G была увеличена на 44%

по сравнению с аллелем А [статья: [15888487](#) ]. Изменения в экспрессии гена, по-видимому, приводят к меньшему количеству функциональных копий зрелого белка VKORC1, который является ферментом, ограничивающим скорость цикла витамин К. В изученных к настоящему времени группах населения (таблица 50) G3673A полиморфизм также имеет выраженные этнические различия его частоты: аллель А преобладает у лиц азиатского происхождения (приблизительно 90% носителей) и это носительство объясняет потребность в более низкой дозе варфарина. Среди европейцев этот вариант также весьма распространен, но с частотой, почти вдвое уступающей азиатам, около 40%.

**Таблица 50. Частоты аллеля А гена VKORC1 в различных этнических группах.**

Население	N	Частота аллеля А (%)	Источник
Японцы	93	93	Kimura R., et al., 2006, 2007
Шведы	181	39	Wadelius M <sup>1</sup> , et al., 2007
Японцы (приним. антикоагулянты)	260	89	Obayashi K, et al., 2006
Японцы(здоровые добровольцы)	228	94	Obayashi K, et al., 2006
Испанцы (приним. антикоагулянты)	105	52	Montes R, et al., 2006
Немцы	200	42	Geisen C, et al., 2005
Англичане	297	47	Sconce EA, et al., 2005
Европейцы	92	37	Yuan HY, et al., 2005
Китайцы	95	91	Yuan HY, et al., 2005
Китайцы (приним. варфарин)	104	88	Yuan HY, et al., 2005
Шведы	201	39	Wadelius M <sup>1</sup> , et al., 2005
Французы	263	42	Bodin L, et al., 2005
Японцы	828	91	Mushiroda T, et al., 2006

В заключение хочется отметить следующее. Хотя различия в поддерживающей дозе варфарина у пациентов изучаемых этносов не были статистически достоверны, прослеживается тенденция к потребности в более низкой дозе варфарина у армян по сравнению со славянами и карачаевцами. Кроме того, армяне гораздо быстрее достигают целевых значений МНО и по сравнению с карачаевцами статистически значимо чаще имеют случаи увеличения МНО выше 3. В клиническом аспекте этот феномен является крайне важным, поскольку несет в себе потребность в индивидуализации антикоагулянтной терапии, как в плане повышения ее эффективности, так и безопасности, и требует внесения определенных поправок в региональные стандарты лечения.

Что же касается сравнения частот и генотипов полиморфных маркеров гена *CYP2C9* с таковыми в других этнических группах, то можно сделать вывод, что по частоте носительства «медленного» мутантного аллеля *CYP2C9\*3* статистически значимо среди других обследованных европеоидов преобладают представители армянского этноса Ставрополя ( $p < 0,05$ ), это может означать некорректность использования существующих клинических рекомендаций для населения этой группы. Кроме того, в нашем исследовании количество представителей армянской этнической группы, являющихся носителями генотипов «медленного» окислительного метаболизма, преобладало над таковыми в группе славян и карачаевцев, что должно найти отражение в региональных особенностях применения варфарина.

Результаты генотипирования пациентов по *CYP2D6* в трех популяциях позволяют предположить, что представители карачаевского этноса не отличаются от других европеоидов по исследуемым частотам аллелей, но славяне и армяне, среди которых выявлена меньшая частота носительства «медленного» аллельного варианта *CYP2D6\*4*, по данным параметрам будут менее чувствительны к ЛС, которые метаболизируются *CYP2D6*. При сравнении частот выявленных генотипов *CYP2D6* принадлежность «медленному» метаболизму преобладала у

карачаевцев по сравнению с армянами ( $p < 0,05$ ) и славянами, что также должно найти место в региональных стандартах диагностики и лечения в Ставропольском крае.

При сравнении частот генотипов *CYP2C9* и *CYP2D6* в исследуемых группах этносов Ставропольского края, отмечается, что носительство генотипов «медленного» метаболизма *CYP2C9* более распространено среди представителей армянской национальности (52,6%). Карачаевцы обладают наименьшей суммарной частотой носителей полиморфных генотипов (25,7%), славяне занимают промежуточное положение (38,1%). Обратная ситуация наблюдается при анализе генотипов *CYP2D6*: с максимальной частотой генотипы *CYP2D6\*1/\*3* и *CYP2D6\*1/\*4* выявлены у карачаевцев (40%), а в группе армян их количество наименьшее (22,9%). Славяне относительно этих явлений находятся интермедиадно (28,6%) (таблица 51).

**Таблица 51. Соотношение носителей полиморфных «медленных» аллелей генов *CYP2C9* и *CYP2D6* в этнических группах, %**

Носители полиморфных «медленных» аллелей гена	Армяне	Славяне	Карачаевцы
<i>CYP2C9</i>	52,6*	38,1	25,7*
<i>CYP2D6</i>	22,9**	28,6	40**

\*-  $p < 0,05$  при сравнении «медленных» окислителей по *CYP2C9*

\*\* -  $p < 0,05$  при сравнении «медленных» окислителей по *CYP2D6*

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармакогенетические тесты в настоящее время еще не нашли широкого распространения в практике лечебно-профилактических учреждений России. Однако полученные в ходе исследований данные послужат фундаментом для получения картины распространенности полиморфных аллельных вариантов в той или иной популяции жителей Ставропольского края. Они также необходимы для построения алгоритмов персонализированной фармакотерапии.

В ходе исследования были установлены этнические различия в чувствительности к непрямые антикоагулянтам среди пациентов армянской, славянской и карачаевской национальностей. Представители армянского этноса нуждались в более низкой подобранной дозе варфарина, они же быстрее достигали целевых значений МНО. Кроме того, большинство эпизодов увеличения МНО выше 3 было зарегистрировано у армян.

По результатам генотипирования по аллельным вариантам *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* здоровых добровольцев - представителей изучаемых этносов, можно утверждать, что армяне, проживающие в Ставропольском крае, имеют генетическую предрасположенность к повышенной чувствительности на ЛС, метаболизм которых осуществляется *CYP2C9*. Прежде всего, это касается непрямого антикоагулянта - варфарина.

Сравнение частот генотипов *CYP2C9* и *CYP2D6* в исследуемых группах позволило выявить преобладание носителей генотипов «медленного» метаболизма *CYP2C9* в группе армян, но наименьшую их частоту в группе карачаевцев. Анализ генотипов *CYP2D6* показал максимальную частоту *CYP2D6\*1/\*3* и *CYP2D6\*1/\*4* у карачаевцев, и минимальную - в группе армян. Славяне относительно этих явлений занимают промежуточное положение.

Следовательно, для обеспечения эффективной и безопасной терапии непрямыми антикоагулянтами в Ставропольском крае необходимо внедрение обязательного фармакогенетического тестирования при назначении варфарина, в

первую очередь, при лечении представителей армянской этнической группы, а также включение генотипирования по *CYP2C9* в перечень тарифов на оплату медицинской помощи в сфере ОМС.

**ВЫВОДЫ**

1. Сравнительный клинический анализ обнаружил этнические различия антикоагуляционной активности варфарина у больных с фибрилляцией предсердий из групп славян, армян и карачаевцев: представителям армянского этноса для достижения целевых уровней МНО (2 – 3) требовалась меньшая доза варфарина по сравнению со славянами и карачаевцами (в 1,3 и в 1,4 раза соответственно).
2. Среди всех пациентов, достигших целевых значений МНО, представителей армян оказалось достоверно больше ( $p < 0,05$ ) - 57% по сравнению с группой славян - 31,7% и группой карачаевцев - 33,3%. Кроме того, в группе пациентов армянского этноса чаще, чем у славян и карачаевцев определялись эпизоды увеличения МНО выше 3. При этом, у пациентов из группы армян по сравнению с пациентами карачаевцами эпизоды увеличения МНО более 3 развивались статистически значимо чаще ( $p < 0,05$ ).
3. По результатам исследования частоты встречаемости «медленных» аллельных вариантов гена *CYP2C9* (*CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*) установлена большая распространенность *CYP2C9\*2* у славян (15,1%) и армян (11,8%) по сравнению с карачаевцами (2,9%) ( $p < 0,05$ ). В то же время, частота *CYP2C9\*3* в армянской этнической группе оказалась выше по сравнению с представителями двух других исследуемых этносов (15,8% против 10% у карачаевцев и 6,3% у славян ( $p < 0,05$ )).
4. При оценке распространенности носительства генотипов *CYP2C9*, ассоциированных с высокой чувствительностью к варфарину, суммарная частота «медленных метаболизаторов» *CYP2C9* в исследуемых группах оказалась наибольшей в группе армян (52,6%) и наименьшей в группе карачаевцев (25,7%).
5. При дополнительном исследовании скорости окисления с участием *CYP2D6* путем изучения распространенности «медленных» аллельных

вариантов *CYP2D6\*3* и *CYP2D6\*4* была определена большая частота *CYP2D6\*4* в группе карачаевцев – 20% (у славян и армян 11,4%). При анализе распространенности генотипов «медленных» окислителей *CYP2D6* выявлена максимальную частоту *CYP2D6\*1/\*3* и *CYP2D6\*1/\*4* у карачаевцев (40%), и минимальная - в группе армян (22,9%).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

При назначении варфарина представителям армянской этнической группы, проживающим в Ставропольском крае, необходимо проводить фармакогенетическое тестирование для выявления полиморфных аллельных вариантов *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3*, определяющих замедленный метаболизм антикоагулянта, и включить генотипирование по *CYP2C9* в перечень тарифов на оплату медицинской помощи в сфере ОМС. Целесообразность внесения данной медицинской технологии в арсенал специализированных отделений лечебно-профилактических учреждений г. Ставрополя и Ставропольского края определяется тем, что пациенты из этнической группы армян имеют высокий риск гипокоагуляции при приеме варфарина. Больные - армяне достигают целевых значений МНО при дозах антикоагулянта меньших, чем у славян и карачаевцев. У армян чаще возникают эпизоды увеличения МНО выше 3.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- АГ - артериальная гипертензия
- АД - артериальное давление
- АПФ – ангиотензинпревращающий фермент
- АССХ - ассоциация сердечно-сосудистых хирургов
- БАБ -  $\beta$  - адреноблокаторы
- БКК - блокаторы кальциевых каналов
- ВНОК - Всероссийское научное общество кардиологов
- ВНОА - Всероссийское научное общество специалистов по аритмологии
- ВПН - Всероссийская перепись населения
- ГБ - гипертоническая болезнь
- ГП - генетический полиморфизм
- ДАД - диастолическое артериальное давление
- ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИАПФ - ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента
- ИБС - ишемическая болезнь сердца
- ИМ - инфаркт миокарда
- ЛС - лекарственное средство
- МНО - международное нормализованное отношение
- НПВС - нестероидные противовоспалительные средства
- НЛР - нежелательные лекарственные реакции
- ОНМК - острое нарушение мозгового кровообращения
- ПЦР - полимеразная цепная реакция
- РКО - Российское кардиологическое общество
- САД - систолическое артериальное давление
- УЗИ – ультразвуковое исследование
- ФК - функциональный класс
- ХСН - хроническая сердечная недостаточность

ЧСС - частота сердечных сокращений

ЭДТА - этилендиаминтетраацетат

ЭКГ - электрокардиография

ЭХО-КГ - эхокардиография

CPD - Cytochrome P-450 Database

CYP – цитохром P450

EMs - «extensive metabolizers» - «активные» метаболитаторы

GGCX – гамма-глутамилкарбоксилаза

IMs - «intermediate metabolizers» - «замедленные» метаболитаторы

PMs - «poor metabolizers» - «медленные» метаболитаторы

UMs - «ultraextensive metabolizers» - «сверхактивные» метаболитаторы

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Арчаков А.И., Гусев С.А., Лисица А.В. База данных по цитохромам P450. // Свидетельство об официальной регистрации базы данных №2004620199. – 2004.
2. Баранов, В. С. Определение генетической предрасположенности к некоторым мультифакториальным заболеваниям. Генетический паспорт / В. С. Баранов, В. Х. Хавинсон; ред. Хавинсон В. Х. - СПб.: Фолиант, 2001. - 48 с.
3. Батулин, В. А., Яковлева Н. В., Фармакоэпидемиология антигипертензивных средств в регионе Кавказских Минеральных Вод - этнические аспекты / В. А. Батулин, Н. В. Яковлева // Проблемы стандартизации в здравоохранении. - 2006. - №9. - С. 15 - 18.
4. Вальдман, Е.А. Проблемы внедрения достижений фармакогеномики / Е.А. Вальдман // Ремедиум. - 2008. - №3. – С. 6 – 9.
5. Вартамян, Ф. Е. Популяционная нейробиология и индивидуальная чувствительность. / Ф. Е. Вартамян // Психиатрия и психофармакотерапия. - 2004. - Т. 6. № 4. – С. 153-155.
6. Вилкинсон, Я. Б., Уоринг С.В., Кокрофт Д. Р. Артериальная гипертензия. Ответы на Ваши вопросы //Лондон: ЭлсевиерСайн, 2005. – 232 с.
7. Генофонд, геногеография и заболеваемость населения / Рычков Ю. Г., Балановская Е. В., Жукова О. В. [и др.] // Успехи современной генетики. - М.: Наука, 1996. - 205 с.
8. Горбунова, В. Н. Введение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / В. Н. Горбунова, В. С. Баранов - СПб.: Специальная Литература, 1997. - 284 с.
9. Диагностика и лечение фибрилляции предсердий. Рекомендации РКО, ВНОА и АССХ, 2012

10. Дьяченко, В. Г. Метаболический статус больных и перспективы реализации индивидуального подхода в проведении фармакотерапии / В. Г. Дьяченко, С. Ш. Сулейманов // Дальневосточный медицинский журнал. - 1997. - № 4. с. 32.
11. Иллариошкин, С. Н. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии / С. Н. Иллариошкин, И. А. Иванова-Смоленская, Е. Д. Маркова - М.: МИА, 2002. - 590 с.
12. Каркищенко, Н.Н. Альтернативы биомедицины : классика и альтернативы фармакотоксикологии / Н.Н. Каркищенко. - М.:ВПК, 2007. –Т.2. – 448 с.
13. Карпов, Р. С. Молекулярно–генетический анализ гипертрофии миокарда левого желудочка / Р. С. Карпов, К. В. Пузырев // Кардиология. – 2001. – № 6. – С. 25–30.
14. Касименко, А.К. История Украинской ССР/ А.К. Касименко, - Киев: Наукова думка, 1965. - 490 с. - С. 44.
15. Коман, И. Э. Этнические особенности полиморфизма гена *CYP2C9* у детского населения Чукотки / И. Э. Коман, Д. А. Сычев, Е. В. Павлють // Российский вестник перинатологии и педиатрии. - 2005. - № 6. - С. 23.
16. Кукес, В. Г., Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей // В. Г.Кукес, С. В. Грачев, Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, - М.: ГЭОТАР - Медиа, 2008. – 304с.
17. Курбанов, Р. Д. Влияние полиморфизма гена *CYP2C9* на эффективность варфарина у больных узбекской национальности с длительно существующей фибрилляцией предсердий / Р. Д. Курбанов, Н.У. Закиров, Д. Б. Ирисов [и др.] // Медицинские новости. - 2012. - №9. - С. 35-38.
18. Левченко, В. И. Распределение фенотипа ацетилирования изониазида в этнических группах, населяющих Ставропольский край / В. И. Левченко // Материалы VII Российского съезда фтизиатров. – М.: 2003 г.

19. Лимборская, С. А. Этногеномика и геногеография народов Восточной Европы / С. А. Лимборская, Э. К. Хуснутдинова, Е. В. Балановская - М.: Наука, 2002. - 281 с.
20. Ляхович, В. В. Фармакогенетика и современная медицина / В. В. Ляхович, В. А. Вавилин, А. Ю. Гришанова [и др.] // Вестник РАМН. – 2004. - №10. - С.40-45.
21. Носиков, В. В. Генетическая предрасположенность к артериальной гипертонии / В.В. Носиков, Л.О. Минушкина, И. В. Игнатъев [и др.] // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. - 2005. - Т.4. - №4 (приложение). - С.241.
22. Падалко, В. И. Клинические аспекты функционирования системы цитохрома Р-450 микросом печени / В.И. Падалко, Т.В. Севастьянова // Вісник Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна. – 2005. – № 705. Сер.: Медицина. – Вип. 11. – С. 110 – 121.
23. Пашутин, С. Б. Этнические лекарства. / С. Б. Пашутин // Consilium provisorum. - 2005. - Т. 4, № 3.- С. 43-45.
24. Пирузян, Л.А. Метаболический паспорт человека – основа новой стратегии в фармакологии / Л.А. Пирузян // Вестник Российской Академии Наук. – 2004. - Т. 74, № 7. - С. 610-618.
25. Прозрителев, Г. Н. Первые русские поселения на Северном Кавказе и в нынешней Ставропольской губернии // Г. Н. Прозрителев / Сборник сведений о Северном Кавказе. - Ставрополь, 1912, - Т.7. - С. 7.
26. Пузырев, В. П. Патологическая анатомия генома человека / Пузырев В. П., Степанов В. А. - Новосибирск: Наука, 1997. - 223 с.
27. Корчагина, Р. П. Генетический полиморфизм цитохрома Р450 2С9, участвующего в метаболизме лекарственных препаратов, в популяциях коренных жителей Северной Сибири / Р. П. Корчагина, Л. П. Осипова, Н. А. Вавилова, Е. Н. Воронина [и др.] // Бюллетень СО РАМН. - 2011. - Т. 31, № 6. - С. 39 - 46.

28. Ромодановский, Д. П. Частоты «медленных» аллельных вариантов генов, кодирующих изоферменты цитохрома P450 CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 у карачаевцев и черкесов / Д. П. Ромодановский, Б. А. Хапаев, И. В. Игнатъев [и др.] // Биомедицина - 2010. - № 2. - С. 33- 37.
29. Руководство по медицине. Диагностика и терапия: Пер. с англ. В 2 т. / Под ред. Р. Беркоу, Э. Флетчера. - М.: Мир, 1997. - Т.1. - 1045 с.
30. Середенин, С. Б. Лекции по фармакогенетике / С. Б. Середенин. - М.: МИА, 2004. - 303 с.
31. Сироткина, О. В. Аллельные варианты *CYP2C9\*2* и *CYP2C9\*3* гена цитохрома CYP2C9 в популяции Санкт-Петербурга и их клиническое значение при антикоагулянтной терапии варфарином. / О. В. Сироткина, А. С. Улитина, А. Е. Тараскина [и др.] // Российский кардиологический журнал. – 2004. - №6. – С. 24-31.
32. Сулейманов, С. Ш. Анализ особенностей фенотипа ацетилирования у больных артериальной гипертонией / С. Ш. Сулейманов, С. М. Маркова, Е. Н. Шепелева // Здоровоохранение Дальнего Востока. - 2003. - № 2. - С. 11.
33. Сычев, Д. А. Клиническая фармакогенетика непрямых антикоагулянтов / Д. А. Сычев, Г. В. Раменская, И. В. Игнатъев, В. Г. Кукес // Клиническая фармакогенетика: учебное пособие / под ред. В. Г. Кукеса, Н. П. Бочкова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 118 – 130.
34. Сычев, Д. А. Клиническая фармакогенетика изофермента цитохрома P-450 2C9 / Д. А. Сычев, Е. В. Стасяк, И. В. Игнатъев // Клиническая фармакология и терапия. - 2005. - №4. – С. 60–63.
35. Сычев, Д. А. Фармакогенетическое тестирование: клиническая интерпретация результатов (рекомендации для практикующих врачей) / Д. А. Сычев. - М.: 2011. – 88 с.
36. Царукян, А.А. Значение генетических факторов для терапии непрямыми антикоагулянтами в этнических группах Ставрополя / А. А.

Царукян, В. А. Батурич // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2013. – Т. 6, № 56. – С. 279–283.

37. Чазова, И. Е. Применение ингибиторов АПФ в лечении артериальной гипертензии // И. Е. Чазова // Русский медицинский журнал. – 2000. – № 15 -16 (610) [http://www.rmj.ru/articles\\_1668.htm](http://www.rmj.ru/articles_1668.htm)

38. Чиждова, Г. В. Роль реакции ацетилирования в формировании патологических нарушений в постменопаузальном периоде // Г. В. Чиждова, С. Ш. Сулейманов, Л.Б. Виноградова // Вестник Российской ассоциации акушеров и гинекологов. - 2001. - № 2. - С. 26.

39. Шаповалов, В. А. Энциклопедический словарь Ставропольского края / В. А. Шаповалов, В. А. Авксеньтьев, И. В. Акинин [и др.] - Ставрополь: Изд-во СГУ. - 2006. – 458 с.

40. Aithal, G. P. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. G. P. Aithal, C. P. Day, P. J. Kesteven, A. K. Daly // Lancet. – 1999. - Vol. 27 (353(9154)). - P. 717-719.

41. Ali, Z. K. CYP2C9 polymorphisms: considerations in NSAID therapy / Z. K. Ali, R. J. Kim, F.M. Ysla // Curr. Opin. Drug Discov. Devel. - 2009. - Vol.12. – P.108–114.

42. Allabi, A. C., Genetic polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 in the Beninese and Belgian populations / A.C. Allabi, J. L. Gala, J. P. Desager, M. Heusterspreute, Y. Horsmans // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2003. - Vol.56(6). - P.653-657.

43. Allabi, A. C. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoin metabolism in a Black Beninese population / A.C.Allabi, J.L.Gala, Horsmans Y. // Pharmacogenet. Genomics. – 2005. - Vol.15. – P. 779–786.

44. Aquilante, C. L., Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on

warfarin dose requirements / C. L. Aquilante, T. Y. Langaee, L. M. Lopez [et al.] - Clin. Pharmacol. Ther. – 2006. - Vol.79. – P.291–302.

45. Aynacioglu, A. S., Frequency of cytochrome P450 *CYP2C9* variants in a Turkish population and functional relevance for phenytoin / A. S. Aynacioglu, J. Brockmoller, S. Bauer [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1999. -Vol.48(3). – P. 409-415.

46. Benusiglio, P. R. Oral anticoagulation and pharmacogenetics: importance in the clinical setting / P. R. Benusiglio, J. Desmeules, P. de Moerloose, P. Dayer // Rev. Med. Suisse. – 2007. - Vol.3(124). – P. 2030, 2033-2034, 2036.

47. Bertilsson, L., Molecular genetics of *CYP2D6*: clinical relevance with focus on psychotropic drugs / L. Bertilsson, M. L. Dahl, P. Dalen, A. Al-Shurbaji // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2002. - Vol. 53. - P. 111-122.

48. Bjornsson, T. D. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A pharmaceutical research and manufacturers of America (PhRMA) perspective. T. D. Bjornsson, J. T. Callaghan, H. J. Einolf [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. - 2003. - Vol. 31. - N. 7. - P. 815-832.

49. Blaisdell, J. Discovery of new potentially defective alleles of human *CYP2C9* / J. Blaisdell, L. F. Jorge-Nebert, S. Coulter [et al.] // Pharmacogenetics. – 2004. - Vol.14(8). – P.527-53.

50. Bodin, L. Cytochrome P450 2C9 (*CYP2C9*) and vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity / Bodin L., Verstuyft C., Tregouet D.A. [et al.] // Blood. – 2005. - Vol.106(1). – P.135-140.

51. Bogni, A. Substrate specific metabolism by polymorphic cytochrome P450 2D6 alleles / A. Bogni, M. Monshouwer, A. Moscone // Toxicology in Vitro.- 2005. - Vol. 19. - P. 621-629.

52. Bozina, N. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: *CYP2C9*, *CYP2C19*, and *CYP2D6* in Croatian population / N. Bozina, P. Granic, Z. Lalic, [et al.] // Croat. Med. J. - 2003. - Vol.44(4). – P. 425-428.

53. Bradford, L.D. *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants / L.D. Bradford // *Pharmacogenomics*. – 2002. - Vol. 3(2). - P. 229-243.
54. Bravo-Villalta, H.V. Genetic polymorphism of *CYP2C9* and *CYP2C19* in a Bolivian population: an investigative and comparative study / H. V. Bravo-Villalta, K. Yamamoto, K. Nakamura [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2005. - Vol. 61(3). – P. 179-84.
55. Caldwell, M. D. Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction / M. D. Caldwell, R. L. Berg, K. Q. Zhang, [et al.] // *Clinical medicine & research*. – 2007. - Vol. 5(1). – P.816.
56. Cho, H. J. Factors affecting the interindividual variability of warfarin dose requirement in adult Korean patients / H. J. Cho, K. H. Sohn, H. M. Park, [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2007. - Vol. 8(4). – P.329-337.
57. Hicks, J. K. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for *CYP2D6* and *CYP2C19* Genotypes and Dosing of Tricyclic Antidepressants / J. K. Hicks, J. J. Swen, C. F.Thorn [et al.] // *Clinical pharmacology and therapeutics*. – 2013. - Vol. 93(5). – P. 402-408.
58. Crawford, D. C. Identifying the genotype behind the phenotype: a role model found in *VKORC1* and its association with warfarin dosing / D. C. Crawford, M. D. Ritchie, M. J. Rieder // *Pharmacogenomics*. – 2007. - Vol. 8(5). – P. 487-496.
59. Crespi, C.L., The R144C change in the *CYP2C9\*2* allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome P450 oxidoreductase / C. L. Crespi, V. P. Miller // *Pharmacogenetics*. – 1997. - Vol.7(3). – P.203-210.
60. Daly, A. K. Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes / A. K. Daly // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2003. - Vol.17(1). - P. 27-41.
61. Dandara, C., Genetic polymorphism of *CYP2D6* and *CYP2C19* in east-and southern African populations including psychiatric patients / Dandara C., C. M. Masimirembwa, A. Magimba [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2001. - Vol.57(1). – P.11-17.

62. D'Andrea, G. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose anticoagulant effect of warfarin / G. D'Andrea, R. L. D'Ambrosio, P. Di Perna, [et al.] // *Blood*. – 2005. - Vol.105(2). – P.645-649.
63. Delozier, T.C. Functional characterization of novel allelic variants of CYP2C9 recently discovered in Southeast Asians. / T.C. Delozier, S.C. Lee, S. J. Coulter [et al.] // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2005; Vol.11. – P.29-33.
64. Derek, V. B. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9 / V. B. Derek, M. Sharon, McL. Howard [et al.] // *Pharmacogenet. Genomics*. - 2010. - Vol.20(4). - P. 277-281.
65. Dorado, P. *CYP2C9* genotypes and diclofenac metabolism in Spanish healthy volunteers / P. Dorado, R.Berecz, M. J. Norberto [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. - Vol.59(3). – P. 221-225.
66. Duzhak, T. Genetic polymorphisms of *CYP2D6*, *CYP1A1*, *GSTM1* and *p53* genes in a unique Siberian population of Tundra Nentsi / T. Duzhak, D. Mitrofanov, V. Ostashevskii [et al.] // *Pharmacogenetics*. – 2000. - Vol.10(6). – P.531-537.
67. Evans, W. E. Pharmacogenomics - drug disposition, drug targets, and side effects / W. E. Evans, H. L. McLeod // *N. Engl. J. Med.* – 2003. - Vol.348(6). – P. 538–549.
68. Freeman, B. D. Cytochrome P450 polymorphisms are associated with reduced warfarin dose / B. D. Freeman, B.A. Zehnbauser, S. McGrath [et al.] // *Surgery*. - 2000. - Vol.128(2). – P. 281-285.
69. Fukumoto, K. Effect of amiodarone on the serum concentration / dose ratio of metoprolol in patients with cardiac arrhythmia. // K. Fukumoto, T. Kobayashi, K. Tachibana [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* - 2006. - Vol. 21(6). - P. 501-505.
70. Fuselli, S. Molecular diversity at the *CYP2D6* locus in the Mediterranean region. // S. Fuselli, I. Dupanloup, E. Frigato [et al.] // *European Journal of Human Genetics*. - 2004. - Vol. 12. - P. 916-924.

71. Gaedigk, A. Unique CYP2D6 activity distribution and genotype-phenotype discordance in black Americans. / A. Gaedigk, L.D. Bradford, K. A. Marcucci [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2002. - Vol. 72(1). – P.76-89.
72. Gaedigk, A. Cytochrome P450C9 (CYP2C9) allele frequencies in Canadian Native Indian and Inuit populations. / A. Gaedigk, W. L. Casley, R.F. Tyndale // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2001. - Vol. 79(10). –P. 841-847.
73. Gaedigk, A. CYP2D6 poor metabolizer status can be ruled out by a single genotyping assay for the 1584G promoter polymorphism. / A. Gaedigk, D. L. Ryder, L.D. Bradford, J. S. Leeder // *Clinical Chemistry*.- 2003. - Vol. 49(6). - P. 1008-1011.
74. Gaikovitch, E. A. Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP1A1*, *NAT2* and of P-glycoprotein in a Russian population. / E. A. Gaikovitch, I. Cascorbi, P. M. Mrozikiewicz [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 2003. - Vol. 59. – P.303–312.
75. Garcia-Barcelo, M. Genetic analysis of the CYP2D6 locus in a Hong Kong Chinese population. // M. Garcia-Barcelo, L.Y. Chow, H.F.K. Chiu [et al.] // *Clinical Chemistry*. - 2000. - Vol.46(1).- P.18-23.
76. Garcia-Martin, E. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. / E. Garcia-Martin, C. Martinez, J.M. Ladero [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 2001. - Vol.57(1). – P.47-49.
77. Geisen, C. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. / C. Geisen, M. Watzka, K. Sittlinger [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2005. - Vol. 94(4). – P.773-779.
78. Goodstadt, L. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. / L. Goodstadt, C. P. Ponting // *Trends Biochem Sci.* – 2004. - Vol. 29(6). – P.289-292.
79. Goryachkina, K. A. Inhibition of metoprolol metabolism and potentiation of its effects by paroxetine in routinely treated patients with acute myocardial infarction (AMI) / K. A. Goryachkina, A.T. Burbello, S. A. Boldueva [et al.] // *European Journal of Clinical Pharmacology*. - 2008. - Vol. 64(3). - P. 275-282.

80. Guo, Y. Role of CYP2C9 and its variants (CYP2C9\*3 and CYP2C9\*13) in the metabolism of lornoxicam in humans. / Y. Guo, Y. Zhang, Y. Wang, [et al.] // Drug. Metab. Dispos. - 2005. - Vol. 33(6). – P. 749-753.
81. Halling, J. Polymorphism of *CYP2D6*, *CYP2C19*, *CYP2C9* and *CYP2C8* in the Faroese population. / J. Halling, M. S. Petersen, P. Damkier [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2005. - Vol.61(7). – P. 491-497.
82. Hamdy, S.I. Allele and genotype frequencies of polymorphic cytochromes P450 (*CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2E1*) and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) in the Egyptian population. / S. I. Hamdy, M. Hiratsuka, K. Narahara [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2002. - Vol.53(6). – P.596-603.
83. Heimark, L. D. The mechanism of the interaction between amiodarone and warfarin in humans. / L. D. Heimark, L. Wienkers, K. Kunze [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 1992. - Vol.51. – P.398–407.
84. Herman, D. The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. / D. Herman, P. Peternel, M. Stegnar [et al.] // Thrombosis & Haemostasis. - 2006. - Vol.95. – P.782-787.
85. Herman, D. Influence of CYP2C9 polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintenance dose. / D. Herman, I. Locatelli, I. Grabnar, [et al.] // Pharmacogenomics J. - 2005. - Vol.5(3). – P.193-202.
86. Hong, X. *CYP2C9\*3* allelic variant is associated with metabolism of irbesartan in Chinese population. / X. Hong, S. Zhang, G. Mao, [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2005. - Vol.11. – P.345-350
87. Huang, J. D. Pharmacokinetics of metoprolol enantiomers in Chinese subjects of major CYP2D6 genotypes. / J. D. Huang, S. K. Chuang, C. L. Cheng, M. L. Lai // Clinical Pharmacology and Therapeutics. - 1999. - Vol.65(4). - P. 402-407.
88. Hummers-Pradier, E. Determination of bleeding risk using genetic markers in patients taking phenprocoumon / E. Hummers-Pradier, S. Hess, I.M. Adham, T.

Papke, B. Pieske, M. M Kochen // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 2003. - Vol.59. – P. 213-219.

89. Ikenaga, Y. The frequency of candidate alleles for CYP2D6 genotyping in the Japanese population with an additional respect to the -1584C to G substitution / Y.Ikenaga, T.Fukuda, K. Fukuda [et al.] // *Drug Metab. Pharmacokinet.* - 2005. - Vol. 20(2). - P. 113-116.

90. Imai, J. Polymorphism of the cytochrome P450 (CYP) 2C9 gene in Japanese epileptic patients: genetic analysis of the CYP2C9 locus. / J. Imai, I. Ieiri, K. Mamiya, S. Miyahara, [et al.] // *Pharmacogenetics.* – 2000. - Vol.10. – P. 85-89.

91. Ingelman-Sundberg, M. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. / M. Ingelman-Sundberg, C. Rodriguez-Antona, // *Phil. Trans. R. Soc. B.* – 2005. - Vol.360. – P.1563-1570

92. Ingelman-Sundberg, M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. / M. Ingelman-Sundberg // *The Pharmacogenomics Journal.* - 2005. - Vol. 5. - P. 6-13.

93. Jose, R. CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms: frequencies in the south Indian population. / R. Jose, A. Chandrasekaran, S. S. Sam, [et al.] // *Fundam. Clin. Pharmacol.* – 2005. - Vol.19(1). – P. 101-105.

94. Kanebratt, K. P. Cytochrome P450 induction by rifampicin in healthy subjects: determination using the Karolinska cocktail and the endogenous CYP3A4 marker 4beta-hydroxycholesterol. / K. P. Kanebratt, U. Diczfalusy, T. Backstrom [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2008. - Vol.84. – P. 589– 594.

95. Kidd, R. S. Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. / R. S. Kidd, T. B. Curry, S. Gallagher, T. Edeki, J. Blaisdell, J. A. Goldstein // *Pharmacogenetics.* – 2001. - Vol.11(9) – P.803-808.

96. Kimmel, S. E. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. / S. E. Kimmel, J. Christie, C. Kealey [et al.] // *Pharmacogenomics J.* – 2008. – Vol.8. –P.53–60.

97. Kimura, M. Genetic polymorphism of cytochrome P450, CYP2C19, and CYP2C9 in a Japanese population. / M. Kimura, I. Ieiri, K. Mamiya, A. Urae, S.Higuchi // *Ther Drug Monit.* - 1998. - Vol.20. – P.243–247.
98. Kimura, R. Polymorphisms in vitamin K-dependent gammacarboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. / R. Kimura, Y. Kokubo, K .Miyashita [et al.] // *Int J Hematol.* - 2006. - Vol.84. – P. 387–397.
99. Kimura, R. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. / R .Kimura , K. Miyashita , Y. Kokubo [et al.] // *Thromb Res.* – 2007. - Vol.120(2). – P.181-186.
100. Kirchheiner, J. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. / J.Kirchheiner, C.Heesch, S.Bauer [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2004. - Vol.76(4). – P.302-312.
101. Kirchheiner, J. Impact of *CYP2C9* and *CYP2C19* polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. / J.Kirchheiner, S.Bauer, I.Meineke [et al.] // *Pharmacogenetics.* - 2002. - Vol. 12(2). – P.101-109.
102. Kirchheiner, J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. / J.Kirchheiner, J.Brockmoller // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2005. - Vol.77(1). – P.1-16.
103. Kirchheiner, J. Impact of CYP2C9 amino acid polymorphisms on glyburide kinetics and on the insulin and glucose response in healthy volunteers. / J.Kirchheiner, J.Brockmoller, I. Meineke [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2002 - Vol.71(4). – P.286-296.
104. Kirchheiner, J. Influence of *CYP2C9* and *CYP2D6* polymorphisms on the pharmacokinetics of nateglinide in genotyped healthy volunteers. / J.Kirchheiner,

I.Meineke, G.Muller [et al.] // Clinical pharmacokinetics. – 2004. - Vol.43(4). – P.267-278.

105. Kirchheiner, J. Influence of *CYP2C9* genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. / J.Kirchheiner, E.Stormer, C. Meisel [et al.] // Pharmacogenetics. – 2003. - Vol.13(8). – P.473-480.

106. Kohnke, H. Apolipoprotein E (APOE) and warfarin dosing in an Italian population. / H. Kohnke, M.G. Scordo, V. Pengo [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. - 2005. - Vol.61. – P.781–783.

107. Kouhi, H. Frequency of five important *CYP2D6* alleles within an Iranian population (Eastern Azerbaijan) / H.Kouhi, H. Hamzeiy, J. Barar [et al.] // Genet. Test. Mol. Biomarkers. – 2009. - Vol. 13(5). – P.665-670.

108. Kubota, T. Frequencies of *CYP2D6* mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different *CYP2D6* genotypes. / T.Kubota, Y.Yamaura, N. Ohkawa [et al.] //Br. J. Clin. Pharmacol. - 2000. - Vol. 50(1). – P.31-34.

109. Lai, S. Pharmacogenetics of target genes across the warfarin pharmacological pathway. / S.Lai, S.R.Jada, X.Xiang [et al.] // Clinical pharmacokinetics. – 2006. - Vol. 45(12). – P.1189-1200.

110. Lee, C. R. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. / C. R. Lee, J.A. Goldstein, J.A. Pieper [et al.] // Pharmacogenetics. – 2002. - Vol.12. – P.251–263.

111. Lee, S. J. Discovery of Novel Functional Variants and Extensive Evaluation of *CYP2D6* Genetic Polymorphisms in Koreans / S. J. Lee, S. S. Lee, Jung H. J. et al. // Drug metabolism and disposition. – 2009. - Vol.37. – P.1464–1470.

112. Lee, S. S. Genetic polymorphism of *CYP2C9* in a Vietnamese Kinh population. / S. S. Lee, K. M. Kim, H. Thi-Le [et al.] // Ther Drug Monit. - 2005. - Vol.27(2). – P. 208-210.

113. Levy, R. H. Cytochrome P450 isozymes and antiepileptic drug interactions. / R.H. Levy // *Epilepsia*. – 1995. - Vol.36 (5). - P.8-13.

114. Lewis, D. F. V. Cytochrome P450 Substrate Specificities, Substrate structural Templates and Enzyme Active Site Geometries. / D.F.V. Lewis, M. Dickins, P.J. Eddershaw [et al.] // *Drug metabolism and drug interactions*. - 1999. - Vol.15(1). – P. 1-51.

115. Li, T. Polymorphisms in the VKORC1 gene are strongly associated with warfarin dosage requirements in patients receiving anticoagulation. / T. Li, L. A. Lange, X. Li et al. // *J. Med. Genet.* – 2006. - Vol. 43(9). – P.740-744.

116. Limdi, N. A. Warfarin Pharmacogenetics. / N.A. Limdi, D.L. Veenstra // *Pharmacotherapy*. – 2008. - Vol.28. – P.1084-1097.

117. Limdi, N. A. Influence of *CYP2C9* Genotype on warfarin dose among African American and European Americans. / N. A. Limdi, J. A. Goldstein, J. A. Blaisdell, et al. // *Personalized Medicine*. – 2007. - Vol.4. – P.157–169.

118. Lin, L.Y. Oxidation of methamphetamine and methylenedioxymethamphetamine by CYP2D6 / L.Y.Lin, E.W.Di Stefano, D.A.Schmitz [et al.] // *Drug Metabolism and Disposition*. - 1997. - Vol. 25(9). - P. 1059-1064.

119. Linder, M.W. Pharmacogenetics in the practice of laboratory medicine. / M.W. Linder, J. R. Valdes // *Molecular. Diagnosis*. - 1999. - Vol. 4(4). - P. 365-379.

120. LLerena, A. Lower frequency of *CYP2C9*\*2 in Mexican-Americans compared to Spaniards. / A. LLerena, P. Dorado, F. O'Kirwan [et al.] // *Pharmacogenomics J*. - 2004. - Vol.4(6). – P. 403-406.

121. Loebstein, R. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. / R. Loebstein, M. Vecsler, D. Kurnik [et al.] // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2005. - Vol.77. – P.365–372.

122. Loebstein, R. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. / R. Loebstein, I. Dvoskin, H. Halkin [et al.] // *Blood*. – 2007. - Vol.109(6). – P.2477-2480.

123. Lorient, M. A. Vitamin K epoxide reductase: Fresh blood for oral anticoagulant therapies. / M. A. Lorient, P. Beaune // *Rev Med Interne*. – 2006. - Vol. 27(12). – P.979-982.

124. Lu, Y. Characteristics of the amiodarone-warfarin interaction during long-term follow-up. / Y. Lu, K. A. Won, B. J. Nelson [et al.] // *Am. J. Health Syst. Pharm.* – 2008. - Vol.65. – P.947–952.

125. Makeeva, O. Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes./ O. Makeeva, V. Stepanov, V. Puzyrev [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2008. - Vol.9(7). – P.847-868.

126. Martin, J. H. Is cytochrome P450 2C9 genotype associated with NSAID gastric ulceration? / J. H. Martin, E. J. Begg, M. A. Kennedy et al. // *British journal of clinical pharmacology*. – 2001. - Vol.51(6). – P.627-630.

127. Marzolini, C. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance / C.Marzolini, E.Paus, T.Buclin, R.B. Kim. // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2004. - Vol.75. – P. 10-17.

128. Mellen, P.B. Pharmacogenomics of blood pressure response to antihypertensive treatment. / P.B. Mellen, D.M. Herrington // *Journal of Hypertension*. – 2005 - Vol.23. – P.1311-1325.

129. Miners, J. O. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. / J. O. Miners, D. J. Birkett // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 1998. - Vol. 45. – P.525–538.

130. Mizutani, T. PM frequencies of major CYPs in Asians and Caucasians. *Drug Metab Rev.* – 2003. - Vol. 35(2-3). – P. 99-106.

131. Momary, K. M. Factors influencing warfarin dose requirements in African Americans / K. M. Momary, N. L. Shapiro, M. A. Viana [et al.] // *Pharmacogenomics*. – 2007. - Vol.8(11). – P.1535-1544.

132. Montes, R. The c.-1639G > A polymorphism of the *VKORC1* gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients / R. Montes, E. Ruiz de Gaona, M.A. Martínez-González [et al.] // *Br. J. Haematol.* - 2006. - Vol.133(2). – P. 183-187.

133. Morin, S. Pharmacogenetics of acenocoumarol pharmacodynamics / S. Morin, L. Bodin, M.A. Lorient [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2004. - Vol.75. – P.403-414.

134. Mushiroda, T. Association of *VKORC1* and *CYP2C9* polymorphisms with warfarin dose requirements in Japanese patients. / T. Mushiroda, Y. Ohnishi, S. Saito [et al.] // *J. Hum. Genet.* – 2006. - Vol.51(3). - P.249-253.

135. Nebert, D.W. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the *CYP1* enzymes in environmental toxicity and cancer // D.W. Nebert, T.P. Dalton, A.B. Okey [et al.] // *J. Biol. Chem.* - 2004. - Vol.279. - P.23847-23850.

136. Niemi, M. Glyburide and glimepiride pharmacokinetics in subjects with different *CYP2C9* genotypes / M.Niemi, I. Cascorbi, R. Timm [et al.] // *Clin Pharmacol. Ther.* – 2002. - Vol.72(3). - P.326-32.

137. Nozawa, T. Influence of *CYP2D6* genotype on metoprolol plasma concentration and P-adrenergic inhibition during long-term treatment. / T.Nozawa, M.Taguchi, K.Tahara [et al.] // *J. Cardivasc. Pharmacol.* - 2005. - Vol. 46(5). - P. 713-720.

138. Obayashi, K. *VKORC1* gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. / K. Obayashi, K.Nakamura, J. Kawana [et al.] // *Clin Pharmacol Ther.* – 2006. - Vol.80(2). - P.169-178.

139. Oldenburg, J. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant *VKORC1* and *CYP2C9* alleles. /

J.Oldenburger, C. G.Bevans [et al.] // *Fregin. Thromb. Haemost.* - 2007. - Vol. 98(3). - P.70-578.

140. Oldenburg, J. Vitamin K epoxide - reductase complex subunit 1 (VKORC1): the key protein of the vitamin K cycle. / J. Oldenburg, C. G. Bevans, C. R. Muller [et al.] // *Antioxid. Redox Signal.* - 2006. - Vol.8(3-4). - P.347-353.

141. Oldenburg, J. VKORC1: molecular target of coumarins. / J. Oldenburg, M. Watzka, S.Rost, C. R. Muller // *J Thromb Haemost.* - 2007. - Vol.5(1). - P.1-6.

142. Osman, A. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. / A.Osman, C. Enstrom, K.Arbring [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* - 2006. - Vol.4(8). - P.1723-1729.

143. Peyvandi, F. *CYP2C9* genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. / F. Peyvandi, M. Spreafico, S.M. Siboni [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2004. - Vol. 75(3). - P.198-203.

144. Rau, T. Effect of the *CYP2D6* genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. / T. Rau, R. Heide, K. Bergmann [et al.] // *Pharmacogenetics.* - 2002. - Vol. 12(6). - P.465-72.

145. Rau, T. *CYP2D6* genotype: impact on adverse effects and nonresponse during treatment with antidepressants - a pilot study. / T. Rau, G. Wohleben, H. Wuttke [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2004. - Vol.75. - P.386-93.

146. Rieder, M. J. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. / M.J.Rieder, A.P.Reiner, B.F.Gage [et al.] // *N. Engl. J. Med.* - 2005. - Vol.352(22). - P.2285-2293.

147. Rosemary, J. The Pharmacogenetics of *CYP2C9* and *CYP2C19*: Ethnic Variation and Clinical Significance. / J.Rosemary, C.Adithan // *Current Clinical Pharmacology.* - 2007. - Vol.2. - P. 93-109.

148. Rost, S. Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant-sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids define structural

requirements for enzymatic activity and inhibition by warfarin. / S.Rost, A.Fregin, M.Flunerberg [et al.] // *Thromb. Haemost.* – 2005. - Vol. 94(4). – P.780-786.

149. Rost, S. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. / S.Rost, A.Fregin, V.Ivaskevicius [et al.] // *Nature*. - 2004. - Vol.427(6974). – P.537-541.

150. Schalekamp, T. Acenocoumarol stabilization is delayed in CYP2C9\*3 carriers. / T.Schalekamp, J.H.van Geest-Daalderop, H. de Vries-Goldschmeding [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 75. – P.394-402.

151. Schalekamp, T. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. / T.Schalekamp, B.P.Brasse, J.F.Roijers [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2006. - Vol.80(1). – P. 13-22.

152. Stafford, D. W. The vitamin K cycle. / D.W.Stafford. // *J. Thromb. Haemost.* – 2005. - Vol. 3(8). – P.1873-1878.

153. Scheen, A.J. Drug interactions of clinical importance with antihyperglycaemic agents: an update. / A. J. Scheen. // *Drug. Saf.* – 2005. - Vol. 28. – P.601–631.

154. Schelleman, H. Warfarin Response and Vitamin K Epoxide Reductase Complex 1 in African Americans and Caucasians. / H. Schelleman, Z. Chen, C. Kealey [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2007. - Vol.81. – P.742-747.

155. Schwab, M. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. / M. Schwab, M. Eichelbaum, M. F. Fromm // *Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2003. - Vol.43. - P.285-307.

156. Sconce, E. A. Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) polymorphism influences the anticoagulation response subsequent to vitamin K intake: a pilot study / E. A. Sconce, P. J. Avery, H. A. Wynne [et al.] // *J. Thromb. Haemost.* – 2008. - Vol.6(7). – P.1226-1228.

157. Sconce, E. A. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements / E. A. Sconce, A. K. Daly, T. I. Khan [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics*. - 2006. - Vol.16. - №8. – P.609-611.

158. Sconce, E. A. The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen / E. A. Sconce, T. L. Khan, H. A. Wynne [et al.] // *Blood*. – 2005. - Vol.106. - №7. – P. 2329-2333.

159. Scordo, M. G. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in a Caucasian and a black African population / M. G. Scordo, E. Aklillu, U. Yasar [et al.] // *M. Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2001. - Vol.52(4). – P.447-450.

160. Scordo, M. G. Influence of *CYP2C9* and *CYP2C19* genetic polymorphisms on warfarin maintenance dose and metabolic clearance / M. G. Scordo, V. Pengo, E. Spina et al. // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2002. - Vol.72. – P.702-710.

161. Shahin, M. H. Genetic variants associated with warfarin dose in African-American individuals: a genome-wide association study. / M. H. Shahin, M. A. Perera, L. H. Cavallari et al. // *Lancet*. – 2013. – Vol. 382. - 9894. – P.790-796.

162. Siddoway, L. A. Amiodarone: guidelines for use and monitoring. / L. A. Siddoway. // *Am. Fam. Physician*. – 2003. - Vol.68. – P.2189–2196.

163. Siguret, V. Impact of pharmacogenetics on interindividual variability in the response to vitamin K antagonist therapy. / V.Siguret. // *Pathol Biol (Paris)*. – 2007. - Vol.55(6). – P.295-298.

164. Sistonen, J. Pharmacogenetic variation at *CYP2C9*, *CYP2C19*, and *CYP2D6* at global and microgeographic scales. / J. Sistonen, S. Fuselli, J.U. Palo [et al.] // *Pharmacogenet Genomics*. – 2009. - Vol.19. – P.170–179.

165. Solus, J.F. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. / J.F.Solus, B.J.Arietta, J.R.Harris [et al.] // *Pharmacogenomics*. - 2004. - Vol.5(7). – P. 895-931.

166. Stamer, U. M. Impact of *CYP2D6* genotype on postoperative tramadol analgesia. / U. M. Stamer, K. Lehnen, F. Hothker [et al.] // *Pain*. – 2003. - Vol.105(1-2). – P.231-238.

167. Stehle, S. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. / S. Stehle, J. Kirchheiner, A. Lazar [et al.] // *Clin. Pharmacokinet.* - 2008. - Vol. 47(9). - P. 565-594.

168. Strange, R.C. Cytochrome P450 *CYP2D6* genotypes: association with hair colour, Breslow thickness and melanocyte stimulating hormone receptor alleles in patients with malignant melanoma. / R.C. Strange, T. Ellison, F. Ichii-Jones [et al.] // *Pharmacogenetics*. - 1999. - Vol. 9(3). - P. 269-276.

169. Sullivan-Klose, T. H. The role of the *CYP2C9*-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. / T. H Sullivan-Klose, B. I. Ghanayem, D. A. Bell [et al.] // *Pharmacogenetics*. - 1996. - Vol.6. – P.341–349.

170. Taguchi, M. Pharmacokinetic variability of routinely administered bisoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients / M. Taguchi, T. Nozawa, A. Igawa [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* - 2005. - Vol. 28. - N. 5. - P. 876-881.

171. Taguchi, M. Effect of *CYP2D6\*10* on pharmacokinetic variability of routinely administered metoprolol in middle-aged and elderly Japanese patients / M. Taguchi, T. Nozawa, T. Kameyama [et al.] // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* - 2003. - Vol.59. - P. 385-388.

172. Taguchi, M. Nonlinear mixed effects model analysis of the pharmacokinetics of metoprolol in routinely treated Japanese patients / M. Taguchi, T. Nozawa, K. Mizumaki [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* - 2004. - Vol. 27(10). - P. 1642-1648.

173. Thijssen, H. H. Acenocoumarol pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 *2C9* genotype / H. H. Thijssen, B. Ritzen // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2003. - Vol.74(1). – P.61- 68.

174. Tie, J. K. Membrane topology mapping of vitamin K epoxide reductase by in vitro translation/cotranslocation / J. K. Tie, C. Nicchitta, G. von Heijne [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2005. - Vol.280. - №16. – P.16410-16416.

175. Topic, E. Association between the *CYP2C9* polymorphism and the drug metabolism phenotype / E. Topic, M. Stefanovic, M. Samardzija // *Clin. Chem. Lab. Med.* - 2004. - Vol.42(1). – P.72-78.

176. Vartanian, F. E. Dose effect of antidepressant medication in different populations / F. E. Vartanian, N. Sartorius, T. Ngo Khac [et al.] // *J. Affective Disorders.* – 1986. - Vol.(2). – P.1–7.

177. Vecsler, M. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin / M. Vecsler, R. Loebstein, S. Almog [et al.] // *Thrombosis & Haemostasis.* - 2006. - Vol.95. – P.205–211.

178. Veenstra, D. L. Association of Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. / D. L.Veenstra, J.H.You, M.J.Rieder [et al.] // *Pharmacogenetics and genomics.* – 2005. - Vol.15(10). – P.687-691.

179. Veenstra, D. L. *CYP2C9* haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes / D. L. Veenstra, D. K. Blough, M. K. Higashi [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* – 2005. - Vol.77(5). – P.353-364.

180. Verstuyft, C. Early acenocoumarol overanticoagulation among cytochrome P450 2C9 poor metabolizers / C. Verstuyft, S. Morin, A. Robert [et al.] // *Pharmacogenetics.* – 2001. - Vol.11(8). – P.735-737.

181. Vianna-Jorge, R. *CYP2C9* genotypes and the pharmacokinetics of tenoxicam in Brazilians. / R. Vianna-Jorge, J. A. Perini, E. Rondinelli [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2004. - Vol.76(1). – P.18-26.

182. Visser, L. E. The risk of bleeding complications in patients with cytochrome P450 *CYP2C9*\*2 or *CYP2C9*\*3 alleles on acenocoumarol or phenprocoumon / L. E.

Visser, R. H. Schaik, Mv. M. Vliet [et al.] // *Thromb. Haemost.* - 2004. - Vol.92. - P.61-66.

183. Voora, D. Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2C9 genotype. / D. Voora, C. Eby, M. W. Linder [et al.] // *Thromb Haemost.* - 2005. - Vol.93(4). - P.700-705.

184. Vormfelde, S. Relative impact of genotype and enzyme induction on the metabolic capacity of CYP2C9 in healthy volunteers. / S. Vormfelde, J. Brockmoller, S. Bauer [et al.] // *Clin. Pharmacol. Ther.* - 2009. - Vol.1. - P.54-61.

185. Wadelius, M. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. / M. Wadelius, L.Y. Chen, K. Downes [et al.] // *Pharmacogenomics J.* - 2005. - Vol.5. - P.262-270.

186. Wadelius, M. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. / M. Wadelius, L.Y. Chen, N. Eriksson [et al.] // *Hum Genet.* - 2007. - Vol.121(1). - P.23-34.

187. Wadelius, M., Warfarin sensitivity related to *CYP2C9*, *CYP3A5*, *ABCB1* (*MDR1*) and other factors. / M. Wadelius, K. Sorlin, O. Wallerman [et al.] // *Pharmacogenomics Journal.* - 2004. - Vol.4. - P.40-48.

188. Wadelius, M. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. / M. Wadelius, L. Y. Chen, K. Downes [et al.] // *The pharmacogenomics journal.* - 2005. - Vol.5(4). - P.262-270.

189. Wallin, R. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. / R. Wallin, S.M.Hutson. // *Trends. Mol. Med.* - 2004. -Vol.10. - P.299-302.

190. Li, T. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. / T. Li, C.Y. Chang, D.Y. Jin [et al.] // *Nature.* - 2004. - Vol. 427. - P.541-544.

191. Wang, Z. SNP's, protein structure and disease / Wang Z., Moulton J. // *Hum. Mutat.* -2001. - Vol. 17. - P. 263-270.

192. Wells, P. S. Interactions of warfarin with drugs and food. / P.S.Wells, A.M.Holbrook, N.R. Crowther [et al.] // Ann. Intern. Med. -1994. - Vol. 121. – P.676–683.
193. Wolf, C.R. Science, medicine, and the future pharmacogenetics. / C.R.Wolf, G. Smith, R. L. Smith // BMJ. - 2000. - Vol. 320. - P. 987-990.
194. Wolf, C. R. Pharmacogenetics. / C. R. Wolf, G. Smith // Br. Med. Bull. - 1999. - Vol.55. – P. 366-86.
195. Woolf, T.F. Handbook of drug metabolism. / T.F. Woolf // 1999. - P. 153-169.
196. Wuttke, H. Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol - associated adverse effects. / H.Wuttke, T. Rau, R. Heide [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. - 2002. - Vol.72 (4). – P.429-437.
197. Xie, H. G. *CYP2C9* allelic variants: ethnic distribution and functional significance. / H. G. Xie, H. C. Prasad, R. B. Kim [et al.] // Adv. Drug. Deliv. Rev. - 2002. - Vol. 54(10). – P.1257-1270.
198. Yang, J. Q. Frequency of cytochrome P450 2C9 allelic variants in the Chinese and French populations. / J. Q. Yang, S. Morin, C. Verstuyft [et al.] // Fundam. Clin. Pharmacol. – 2003. - Vol.17(3). – P. 373-376.
199. Yasar, U. Analysis of *CYP2C9*\*5 in Caucasian, Oriental and black-African populations. / U. Yasar, E. Aklillu, R. Canaparo [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. - 2002. - Vol.58(8). – P.555-558.
200. Yoon, Y. R. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population. / Y.R. Yoon, J. H. Shon, M. K. Kim [et al.] // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2001. - Vol.51(3). – P.277-280.
201. Yu, B.N. *CYP2C9* allele variants in Chinese hypertension patients and healthy controls. / B. N. Yu, C. H. Luo, D. Wang [et al.] //Clin. Chim. Acta. – 2004. - Vol.348(1-2). – P.57-61.
202. Yuan, H. Y. A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity /

H. Y. Yuan, J. J. Chen, M. T. Lee [et al.] // Hum. Mol. Genet. - 2005. - Vol.14(13). – P.1745-1751.

203. Zhao, F. Novel CYP2C9 genetic variants in Asian subjects and their influence on maintenance warfarin dose. / F. Zhao, C. Loke, S.C. Rankin [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2004. - Vol.76(3). – P. 210-219.

204. Zhou, S. F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. / S. F. Zhou // Clin Pharmacokinet. - 2009. –Vol.48(11). – P.689-723.

205. Zhu, Y. Estimation of warfarin maintenance dose based on VKORC1 (-1639 G>A) and CYP2C9 genotypes. / Y. Zhu, M. Shennan, K. K. Reynolds [et al.] // Clin. Chem. - 2007. - Vol.53(7). – P.1199-1205.

206. <http://pharmgkb.org/view/dosing-guidelines.do>

207. <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9.htm>