

**А.А. Абрамов¹, В.В. Шахтарин¹, С.О. Айвазян²,
С.С. Жилина¹, К.В. Осипова¹, М.М. Яворская²,
М.С. Бачманова¹, Г.Р. Мутовин¹, А.Г. Притыко¹**

¹ Научно-практический центр медицинской помощи детям с пороками развития черепно-лицевой области и врожденными пороками развития нервной системы Департамента здравоохранения г. Москвы

² НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва

Полиморфизм гена MDR1 и фармакорезистентность к противосудорожным препаратам при эпилепсии

Выполнено исследование полиморфных маркеров С3435Т и С1236Т гена MDR1 у 122 больных эпилепсией (73 мальчика и 49 девочек) в возрасте от 1 года до 18 лет. Исследовали группы детей, ответивших на лечение антиконвульсантами, со стойкой клинической ремиссией более 1 года, и детей, резистентных к проводимой противосудорожной терапии. В качестве биологического материала использовали клетки крови исследуемых больных. Выявлено, что доля больных, чувствительных к терапии, в группе детей с гаплотипом ТТ/СС почти в шесть раз меньше, чем в группе больных с гаплотипом СС/ТТ по маркерам С1236Т и С3435Т. Показано, что наличие аллеля С полиморфизма С3435Т гена MDR1 увеличивает риск развития фармакорезистентности у больных с эпилепсией, а наличие аллеля Т полиморфизма С1236Т гена MDR1 само по себе оказывает незначительное влияние на развитие у них фармакорезистентности.

Ключевые слова: эпилепсия, дети, фармакорезистентность, полиморфизм, ген MDR1.

Контактная информация: Жилина Светлана Сергеевна. E-mail: szhylina@mail.ru

© Коллектив авторов, 2011

Распространенность эпилепсии в популяции достигает 0,5–0,75%, а среди детского населения – до 1% [1]. У 30% пациентов с эпилепсией разного генеза не удается купировать приступы противосудорожными

препаратами в адекватных терапевтических дозах, такую эпилепсию называют фармакорезистентной.

Существуют различные гипотезы фармакорезистентности, одна из них – гипотеза «транспортеров».

A.A. ABRAMOV, V.V. SHAKHTARIN, S.O. AIVAZYAN, S.S. ZHILINA, K.V. OSIPOVA, M.M. YAVORSKAYA, M.S. BACHMANOVA, G.R. MUTOVIN, A.G. PRITYKO

Polymorphism of MDR1 gene and pharmacoresistance to anticonvulsant agents in epilepsy

An investigation was carried out of polymorphic markers С3435Т and С1236Т in the MDR1 gene in 122 epileptic patients comprising 73 boys and 49 girls between the ages of one year and 18 years. Under investigation were groups of children who responded to anticonvulsant therapy showing a sustained clinical remission of over one year and children resistant to anticonvulsant therapy. As biological material use was made of blood cells of investigated children. It was found that the proportion of patients responsive to treatment in the group of children who harbored haplotype ТТ/СС was nearly six times less than in patient group with haplotype СС/ТТ for markers С1236Т and С3435Т. It is indicated that the presence of allele С of the С3435Т MDR1 gene polymorphism tends to enhance the risk of development of pharmacoresistance in epileptic patients whereas the presence of allele Т of the С1236Т MDR1 gene polymorphism per se impacts negligibly on the development of pharmacoresistance in this patient group.

Key words: epilepsy, children, pharmacoresistance, polymorphism, MDR1 gene.

Известно, что в выведении препаратов из клетки участвуют так называемые транспортные белки (органические переносчики, которые могут переносить лекарственные вещества, связанные с глутатионом, глюкуронатом или сульфатом), в частности, белки группы *P-glycoprotein*, который кодируется геном MDR1 (*multidrug resistance gene 1*) [2]. Изучены многие полиморфные маркеры в гене MDR1, но предпочтение при исследовании ассоциаций с множественной лекарственной резистентностью отдают двум из них – С1236Т и С3435Т [3, 4]. Предполагают, что полиморфные маркеры С3435Т и С1236Т приводят к изменению экспрессии гена MDR1. В работах *Asra Siddiqui et al.* (2003) [5] показано, что наличие определенных полиморфизмов в гене MDR1 ассоциировано с повышением экспрессии белков-транспортеров, а значит, и с более быстрой элиминацией препаратов из клеток, и, как следствие, – с развитием фармакорезистентной эпилепсии (пациенты с фармакорезистентной эпилепсией чаще имели СС-генотип в MDR1 3435, чем ТТ-генотип).

Цель работы: изучение частоты полиморфизмов С1236Т и С3435Т в гене MDR1 и эффективности антиконвульсантов в зависимости от характера полиморфизмов и их гаплотипа в группе детей, страдающих эпилепсией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование полиморфных маркеров С3435Т и С1236Т гена MDR1 было выполнено у 122 больных эпилепсией (73 мальчика и 49 девочек), получавших лечение в НПЦ медицинской помощи детям в

2008–2010 годах. Возраст обследованных – от 1 года до 18 лет (медиана – 8 лет).

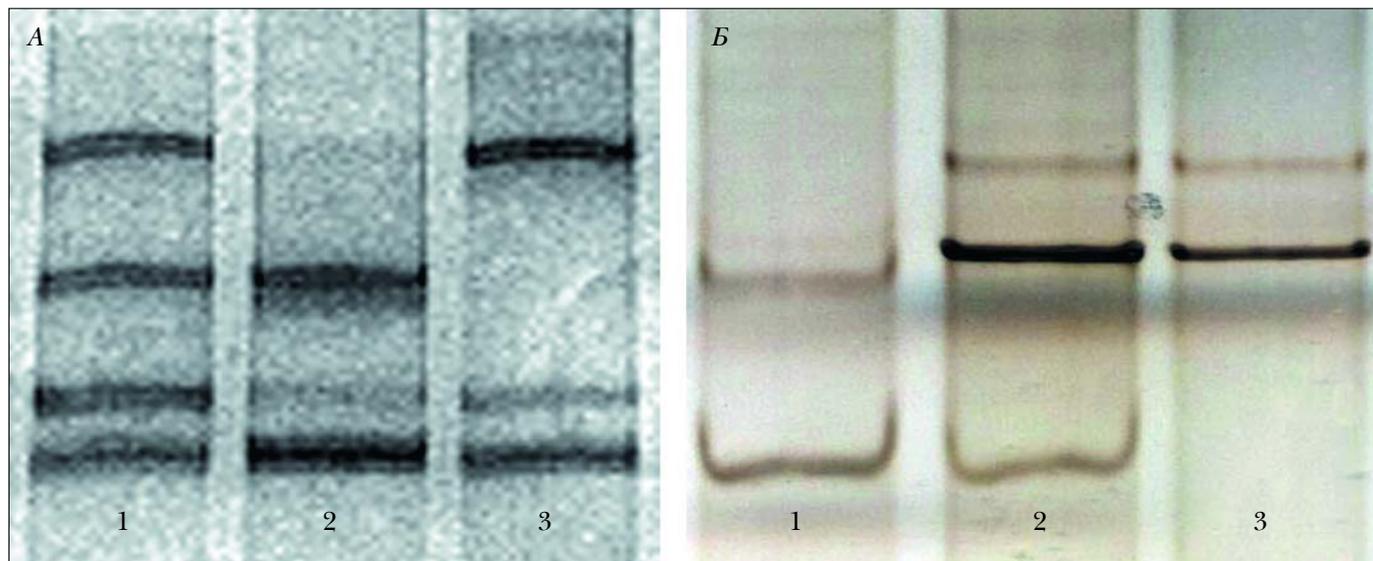
У исследуемых больных были диагностированы: идиопатическая генерализованная эпилепсия (n=5), идиопатическая фокальная эпилепсия (n=5), криптогенная генерализованная эпилепсия (n=3), криптогенная фокальная эпилепсия (n=28), симптоматическая генерализованная эпилепсия (n=1), симптоматическая фокальная эпилепсия (n=80). В процессе лечения использовали широкий спектр препаратов (Депакин, Ламиктал, карбамазепин, фенобарбитал, Кеппра, Топамакс, Клоназепам).

По результатам лечения пациентов разделили на две группы: резистентные – 67 человек, чувствительные – 55. Критериями резистентности служили: длительность заболевания более двух лет, применение более трех антиконвульсантов в терапевтических дозах без достижения ремиссии. При ранних детских формах заболевания сроки не принимали во внимание, а критерием была неэффективность более трех антиконвульсантов в терапевтических дозах.

В качестве биологического материала использовали лейкоциты периферической крови исследуемых больных. ДНК выделяли стандартным фенольным методом с протеиназой К. Для анализа выбранных полиморфизмов в гене MDR1 (С3435Т и С1236Т) при помощи программы *Oligos* с использованием базы *Blast* были сконструированы следующие праймеры.

На точку С1236Т – праймер А: 5'-TTCGAA-GAGTGGGCACAAACC, Tm=55,9 °С, Tm (10)=32,0 °С; праймер В: 5'-CAGCCACTGTTTCCAACCAGG, Tm=55,7 °С, Tm (10)=32,0°С. Размер ПЦР продукта – 330 п.н. Оптимальная температура отжига – 53,3 °С.

Фото 1. А – SSCP-электрофорез в ПААГе гена MDR1, полиморфизм С1236Т: 1 – СТ-вариант; 2 – СС-вариант; 3 – ТТ-вариант.
Б – SSCP-электрофорез в ПААГе гена MDR1, полиморфизм С3435Т: 1 – СС-вариант; 2 – СТ-вариант; 3 – ТТ-вариант



На точку С3435Т – праймер А: 5'-CTGAAT-GTTCAGTGGCTCCGAG, Tm=55,3 °С, Tm (10)=34,7 °С; праймер В: 5'-AAGGTAACAАСТААСССAAACAGG, Tm=55,9 °С, Tm (10)=32,4 °С. Размер продукта ПЦР – 353 п.н. Оптимальная температура отжига – 56,5 °С.

ПЦР для амплификации анализируемых последовательностей проводили в аппарате *GeneAmp PCR System 9700 (AppliedBioSystems)* при следующих условиях: в реакцию брали 200 мкМ каждого dNTP, 200 нМ каждого праймера, 2,5 единицы активности. Таq полимеразы, буфер для ПЦР – до 1-кратного. В смесь добавляли 0,5 мкг исследуемой ДНК.

На следующем этапе проводили SSCP-электрофорез при следующих условиях: 12%-ный полиакриламидный гель; 260 В; длительность – 6 ч. Данные условия SSCP-электрофореза позволили четко дифференцировать варианты СС, ТТ и СТ выбранных то-

чек. Результаты SSCP-электрофореза полиморфизма С3435Т и С1236Т представлены на *фото 1*. Результаты SSCP-исследования подтверждали двусторонним секвенированием на аппарате *ABI Prism 3130xl, AppliedBioSystems*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований по полиморфному маркеру С3435Т наблюдались следующие аллельные варианты: СС встречался в 26,98%, СТ – в 50,79%, ТТ – в 22,22% случаев. По полиморфному маркеру С1236Т: СС – в 30,47%, СТ – в 44,53%, ТТ – в 25% случаев.

Проведен анализ встречаемости аллельных вариантов маркера С1236Т в зависимости от эффективности антиконвульсантов. В группе больных с хоро-

График 1

А – влияние полиморфизма С1236Т на чувствительность к лечению эпилепсии: по оси х – полиморфизм С1236Т, по оси у – процент пациентов с хорошей чувствительностью к лечению эпилепсии. Б – влияние полиморфизма С3435Т на чувствительность к лечению эпилепсии: по оси х – полиморфизм С3435Т, по оси у – процент пациентов с хорошей чувствительностью к лечению эпилепсии

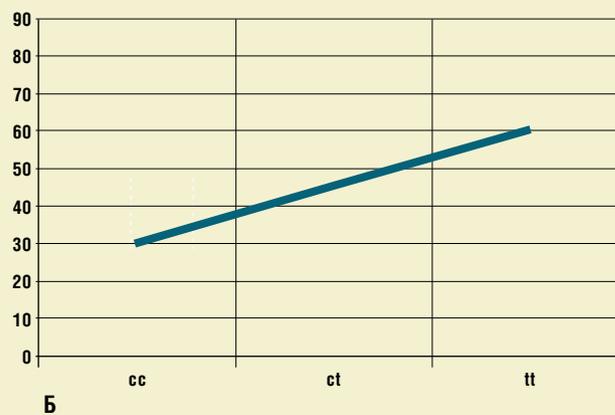
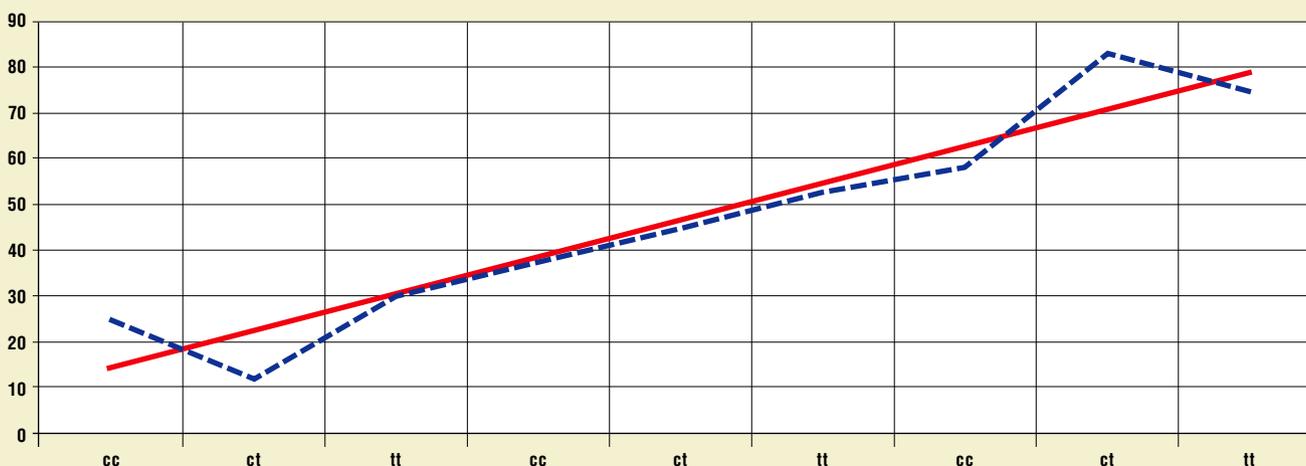


График 2

Ассоциация гаплотипов полиморфизмов гена MDR1 с фармакорезистентностью у детей с эпилепсией: по оси х – сочетание полиморфизмов (с1236т/с3435т); по оси у – процент пациентов, чувствительных к фармакотерапии эпилепсии



шей чувствительностью к лечению эпилепсии наблюдалась следующая встречаемость аллельных вариантов маркера: СС – в 48,6% (18 из 37), СТ – в 44,4% (20 из 54), ТТ – в 54,1% (13 из 24) случаев. В группе больных с фармакорезистентностью: СС – в 51,4% (19 из 37), СТ – в 55,6% (30 из 54), ТТ – в 45,9% (11 из 24) случаев.

Таким образом, встречаемость разных аллельных вариантов маркера С1236Т при чувствительной и резистентной формах заболевания была примерно одинаковой (график 1), а значит, можно сделать вывод о незначительном влиянии данного полиморфного маркера на общую чувствительность к противоэпилептическим препаратам.

Проведен аналогичный анализ для маркера С3435Т. В группе больных с хорошей чувствительностью к лечению эпилепсии наблюдалась следующая встречаемость аллельных вариантов маркера: СС – в 30,30% (10 из 33), СТ – в 45,2% (28 из 62), ТТ – в 62,9% (17 из 27) случаев. В группе больных с фармакорезистентностью: СС – в 69,70% (23 из 33), СТ – в 54,8% (34 из 62), ТТ – в 37,1% (10 из 27) случаев. Полученные результаты свидетельствуют о значительном влиянии аллельных вариантов маркера С3435Т на эффективность противоэпилептического лечения. Так, при аллельном варианте СС процент больных, положительно отвечающих на проводимое лечение, был более чем в два раза выше в группе больных с аллельным вариантом ТТ (график 1).

Установлена следующая частота встречаемости гаплотипов по анализируемым полиморфизмам в обследованной группе больных: СС/СС – 17,21%, СС/СТ – 9,84%, СС/ТТ – 3,28%, СТ/СС – 6,56%, СТ/СТ – 32,79%, СТ/ТТ – 4,92%, ТТ/СС – 3,28%, ТТ/СТ – 8,20%, ТТ/ТТ – 13,93% случаев.

В таблице представлены сочетание полиморфизмов С3435Т и С1236Т гена MDR1 и чувствительность к противоэпилептическим препаратам (в % от числа больных с данным гаплотипом). Таблица построена по аналогии с решеткой Пеннета и, на наш взгляд, позволяет наглядно проследить гаплотип

маркеров и изменение чувствительности к противоэпилептическому лечению. Прослеживается закономерность увеличения количества пациентов, чувствительных к фармакотерапии эпилепсии, от СС к ТТ по полиморфизму С3435Т и от ТТ к СС по полиморфизму С1236Т. На основании полученных данных построен график 2, демонстрирующий ассоциацию сочетания полиморфизмов С1236Т и С3435Т и чувствительности к лечению эпилепсии у детей. Доля пациентов, чувствительных к терапии, в группе больных с гаплотипом ТТ/СС почти в шесть раз меньше, чем в группе больных с гаплотипом СС/ТТ по маркерам С1236Т и С3435Т.

ВЫВОДЫ

Наличие аллеля С полиморфизма С3435Т гена MDR1 увеличивает риск развития фармакорезистентности у больных с эпилепсией, при этом у лиц с наличием двух аллелей С наблюдается наиболее высокий процент фармакорезистентности.

Наличие аллеля Т полиморфизма С1236Т гена MDR1 само по себе оказывает незначительное влияние на развитие фармакорезистентности у больных эпилепсией.

Характер гаплотипа по полиморфным маркерам С1236Т и С3435Т гена MDR1 с высокой степенью достоверности ассоциируется с чувствительностью больных эпилепсией к антиконвульсантам.

Литература

1. Aicardi J. Epilepsy in children. Lippincott – Raven Publishers, 1996; 555 p.
2. Lazarowski A., Czornyj L., Lubienieki F., Girardi E., Vazquez S., D'Giano C. ABC Transporters during Epilepsy and Mechanisms Underlying Multidrug Resistance in Refractory Epilepsy – Epilepsia 2007, Vol. 48, pp. 140–9 (10).
3. Woodahl E.L., Yang Z., Bui T., Shen D.D., Ho R.J. Multidrug resistance gene G1199A polymorphism alters efflux transport activity of P-glycoprotein. J Pharmacol Exp Ther 2004; 310: 1199–207.
4. Zimprich, F., Sunder-Plassmann, R., Stogmann, E., Gleiss, A., Dal-Bianco, A., Zimprich, A., Plumer, S., Baumgartner, C., Mannhalter, C. (2004). Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmacoresistance in temporal lobe epilepsy. Neurology 63: 1087–9.
5. Siddiqui A., Kerb R., Weale M.E., Brinkmann U., Smith A.B.Sc., Goldstein D.B., Wood N.W., Sisodiya S.M., Association of Multidrug Resistance in Epilepsy with a Polymorphism in the Drug-Transporter Gene ABCB1. The New Engl J Medicine 2003; 348 (15): 1442–8.

Таблица
Сочетание полиморфизмов С3435Т и С1236Т гена MDR1 и чувствительность к противоэпилептическим препаратам, % от числа больных с данным гаплотипом

Полиморфизм	С3435Т		
	СС	СТ	ТТ
С1236Т			
СС	38%	58%	75%
СТ	13%	45%	83%
ТТ	25%	30%	53%