

Łukasz Skalski
Ekspresja enzymów metabolizujących leki w przebiegu HCV
The expression of drugs metabolising enzymes in patients with HCV

STRESZCZENIE

Wstęp: Farmakokinetyka leków jest w dużej mierze determinowana przez enzymy metabolizujące leki, na które mogą wpływać choroby wątroby. Aktywność tych enzymów jest kluczowym czynnikiem w metabolizmie leków.

Celem badań była: (1) ocena profilu ekspresji mRNA wybranych genów kodujących enzymy związane z metabolizmem leków, (2) ilościowe określenie zawartości białek wybranych enzymów CYP450 i UGT, (3) określenie korelacji pomiędzy ekspresją mRNA badanych genów a zawartością białka, (4) analiza związku pomiędzy wybranymi wariantami genetycznymi, a ekspresją genów związanych z metabolizmem leków na poziomie mRNA i białka w bioptatach wątroby pobranych od pacjentów z niewydolnością tego organu w przebiegu HCV oraz w grupie kontrolnej.

Materiały i metody: W badaniu wykorzystano próby tkanek wątroby pobrane od pacjentów z HCV w różnych stanach funkcjonalnych, zgodnie z klasyfikacją Childa-Pugha, w tym klasy A (30 próbek), klasy B (21 próbek) i klasy C (7 próbek). Próby kontrolne stanowiły bioptaty wątroby pochodzące od pacjentów z rakiem okrężnicy z przerzutami do wątroby, pobrane z miejsca oddalonego o co najmniej 5 cm od guza, bez cech patologicznych (n=20). W pracy przeanalizowano zawartość białka (LC-MS/MS) i mRNA (qRT-PCR) 9 enzymów CYP450 (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) i czterech UGT (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 i UGT2B15). Dodatkowo, w przypadku CYP2D6, CYP2C19 i CYP3A5, przeprowadzono badania genetyczne pod kątem występowania najbardziej rozpowszechnionych wariantów funkcjonalnych, wykorzystując sondy typu TaqMan.

Wyniki: W badaniu stwierdzono, że stężenia białka CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 i CYP2D6 nie był istotnie zmieniony przez chorobę. W wątrobach pacjentów zakwalifikowanych do klasy A wg Childa-Pugha stwierdzono istotnie zwiększoną zawartość białka UGT1A1 (średnio 163% wartości dla grupy kontrolnej). W wątrobach od pacjentów z klasy B Childa-Pugha zawartość niektórych białek była istotnie mniejsza: CYP2C19 (38% kontroli), CYP2E1 (54%), CYP3A4 (33%), UGT1A3 (69%) i UGT2B7 (56%). W wątrobach

klasy C wg Child-Pugh stwierdzono mniejsze stężenie białka CYP1A2 (52% wartości w grupie kontrolnej). Średnia zawartość większości pozostałych białek także była niższa w grupie HCV, jednak różnice nie osiągnęły progu istotności statystycznej. Stężenia badanych białek u pacjentów z HCV wykazywały korelację z ekspresją kodujących je genów mierzoną na poziomie mRNA, jednak korelacja ta nie była pełna i różniła się, w zależności od badanego enzymu. Wyniki wskazują, że zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C może znacząco wpływać na ekspresję genów i stężenie białek enzymów metabolizujących leki w wątrobie, a obserwowane różnice zależą w znacznym stopniu od stanu zaawansowania choroby. Czynniki genetyczne mogą mieć wpływ na zawartość mRNA i białka enzymów CYP2D6, CYP3A5 i CYP2C19, przy czym w przypadku pierwszych dwóch genów obserwowane różnice zależne od genotypu były istotne statystycznie.

Podsumowanie: Badanie wykazało, że zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C może prowadzić do istotnych zmian w ekspresji genów i stężeniu białek biorących udział w metabolizmie leków w wątrobie, a zakres tych zmian jest związany ze stopniem zaawansowania choroby oraz genotypem pacjenta. Wyniki niniejszej pracy mogą dostarczyć ważnych danych na temat zmienionego metabolizmu leków w przebiegu HCV i mogą zostać w przyszłości wykorzystane do optymalizacji strategii terapeutycznych, dostosowanych do indywidualnych potrzeb pacjentów, zarówno w farmakoterapii HCV, jak i chorób współistniejących.

SUMMARY

Introduction: Drug pharmacokinetics is largely determined by drug-metabolising enzymes, which can be affected by liver disease. The activity of these enzymes is a key factor in drug metabolism.

The aim of this study was to (1) assess the mRNA expression profile of selected genes encoding enzymes associated with drug metabolism, (2) quantify the protein content of selected CYP450 and UGT enzymes, (3) determine the correlation between mRNA expression of the genes studied and protein content, (4) analyse the relationship between selected genetic variants and the expression of genes associated with drug metabolism at the mRNA and protein level in liver biopsy specimens taken from patients with failure of this organ in the course of HCV and in a control group.

Materials and methods: Liver tissue samples from HCV patients in different functional states, according to the Child-Pugh classification, including class A (30 samples), class B (21 samples) and class C (7 samples), were used in this study. Control samples were liver biopsy specimens from patients with colon cancer with liver metastases, taken from a site at least 5 cm away from the tumour, without pathological features (n=20). In this study, protein (LC-MS/MS) and mRNA (qRT-PCR) of nine CYP450 enzymes (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4, CYP3A5) and four UGTs (UGT1A1, UGT1A3, UGT2B7 and UGT2B15) were analysed. In addition, for CYP2D6, CYP2C19 and CYP3A5, genetic screening for the most prevalent functional variants was performed using TaqMan assay.

Results: The study found that protein levels of CYP1A1, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 and CYP2D6 were not significantly altered by the disease. Livers from patients classified as Child-Pugh class A showed significantly increased UGT1A1 protein (on average 163% of the value for the control group). In livers from Child-Pugh class B patients, the content of some proteins was significantly lower: CYP2C19 (38% of controls), CYP2E1 (54%), CYP3A4 (33%), UGT1A3 (69%) and UGT2B7 (56%). Child-Pugh class C livers had lower CYP1A2 protein levels (52% of control values). The average content of most other proteins was also lower in the HCV group, but the differences did not reach the threshold of statistical significance. The concentrations of the proteins studied in HCV patients showed a correlation with the expression

of the genes encoding them measured at the mRNA level, but this correlation was not complete and varied, depending on the enzyme tested. The results indicate that hepatitis C virus infection can significantly affect gene expression and protein levels of drug-metabolising enzymes in the liver, and the observed differences are highly dependent on disease status. Genetic factors can affect the mRNA and protein levels of CYP2D6, CYP3A5 and CYP2C19 enzymes, and for the first two genes the observed genotype-dependent differences were statistically significant.

Summary: This study showed that hepatitis C virus infection can lead to significant changes in gene expression and protein levels involved in drug metabolism in the liver, and that the extent of these changes is related to the severity of the disease and the patient's genotype. The results of the present study may provide important data on altered drug metabolism in the course of HCV and may be used in the future to optimise therapeutic strategies tailored to individual patients, both in HCV pharmacotherapy and in comorbidity