

Клінічне значення поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1 в індивідуалізації терапії варфарином

І.В. Малярчук^{1,2}, Н.Г. Горовенко², О.А. Крикунов³, А.Р. Бабочкіна³

¹ ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ

² Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л. Шупика МОЗ України, Київ

³ ДУ «Національний інститут серцево-судинної хірургії ім. М.М. Амосова НАМН України», Київ

КЛЮЧОВІ СЛОВА: варфарин, генотип, доза, епізоди надмірної гіпокоагуляції

Операції протезування серцевих клапанів для корекції гемодинамічних порушень при вадах серця сьогодні є звичайними для кардіохірургічних відділень, а кількість хворих зі штучними клапанами серця збільшується з кожним роком. Віддалені результати операцій, виживання, реабілітація та збереження працездатності пацієнтів з механічними клапанами серця визначаються в основному розвитком клапанозалежних ускладнень – тромбозів штучних клапанів серця та тромбоемболічних ускладнень (ТЕУ). Доведено, що всім хворим з механічними клапанами серця показаний постійний пожиттєвий прийом непрямих антикоагулянтів, зокрема варфарину [8].

Варфарин характеризується вузьким терапевтичним діапазоном, при перевищенні якого зростає ризик кровотеч. Спостерігають різну чутливість пацієнтів до дії варфарину та виникнення серйозних геморагічних ускладнень при його передозуванні [1, 12]. Безперечно, вивчення факторів, що визначають індивідуальну чутливість до варфарину, зокрема генетичних, є актуальним.

Головна фармакодинамічна мішень для варфарину – субодинаця 1-го комплексу епоксидредуктази вітаміну К (VKORC1). VKORC1 – мембранний протеїн, що складається із 163 амінокислотних залишків та локалізований в ендоплазматичному ретикулумі гепатоцитів. При інгібуванні VKORC1 не утворюється активна форма вітаміну К, у результаті чого зменшується

синтез вітаміну К-залежних факторів зсідання крові, а саме II, VII, IX, X, а також антикоагулянтних протеїнів С та S.

Ген VKORC1 (OMIM*608547) локалізований на хромосомі 16 (16p11.2), складається з 3 екзонів та кодує білок VKORC1 [9]. За даними літератури, найбільш вивченим та клінічно значущим для пацієнта в режимі дозування варфарину вважають поліморфізм G1639A (rs9923231) [4]. Поліморфний варіант G1639A характеризується заміною гуаніну (G) на аденін (A) у положенні 1639 у промоторній зоні VKORC1. За даними [5, 10], алель 1639A асоційований зі зниженням концентрації VKORC1, що призводить до підвищеної чутливості до варфарину та підвищеного ризику виникнення геморагічних ускладнень при проведенні терапії. Це означає, що носії алеля 1639A гена VKORC1 потребують редуції вже перших доз варфарину для безпечного досягнення та підтримання цільового рівня міжнародного нормалізованого відношення (MHB). На сьогоднішній день проведені дослідження, присвячені виявленню асоціації поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1 з рівнем безпечної та ефективної дози варфарину в пацієнтів з високим ризиком виникнення ТЕУ [7, 13, 15]. В Україні таких досліджень не було.

Мета роботи – проаналізувати залежність величини підбраної дози варфарину та ступеня гіпокоагуляції від генотипу поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1 у пацієнтів, які перенесли операцію протезування клапанів серця.

Матеріал і методи

У дослідження залучено 155 пацієнтів, які перенесли операцію протезування клапанів серця та отримували терапію варфарином, з них 105 (67,74 %) чоловіків, 50 (32,26 %) жінок віком у середньому (51,7±1,1) року. На проведення роботи одержано дозвіл комітету з біоетики НМАПО імені П.Л. Шупика, кожний пацієнт давав інформовану згоду на участь у дослідженні.

У 155 осіб цієї групи було проведено аналіз залежності підбраної дози варфарину та ступеня гіпокоагуляції від генотипу поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1. Враховували такі характеристики: підбрану дозу варфарину в мг/добу та проміжні значення МНВ. Згідно з інструкцією, стартова доза варфарину становила 5 мг/добу. Підбір дози варфарину в пацієнтів з протезованими серцевими клапанами здійснювали до досягнення рекомендованих цільових значень МНВ 2,5–3,5. Підбраною вважали дозу, при якій цільові значення рівня МНВ підтримувалися у двох послідовних аналізах. Пацієнти, в яких на етапі підбору дози варфарину значення МНВ підвищувалися більше 3,5, що є маркером надмірної гіпокоагуляції крові та може призвести до виникнення кровотеч, увійшли до підгрупи А (n=35). Пацієнти, в яких показник МНВ не виходив за межі цільових значень, увійшли до підгрупи Б (n=120).

Для молекулярно-генетичного дослідження використовували ДНК, виділену з лейкоцитів периферійної крові. Виділення ДНК здійснювали з використанням комерційного набору «ДНК-сорб-В» (ЦНДІ Епідеміології Міністерства охорони здоров'я РФ). Генотипування поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1 проводили з використанням методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) згідно з методикою, описаною [13] та оптимізованою до наших умов.

Фрагмент довжиною 290 пар нуклеотидів (п. н.) піддавали рестрикції рестриктазою Msp1 (HpaII) (Fermentas, Литва). Наявність фрагментів з молекулярною масою 169 п. н. та 121 п. н. вказувала на генотип 1639GG, фрагментів з молекулярною масою 290 п. н., 169 п. н. та 121 п. н. – на генотип 1639GA, та фрагмента з молекулярною масою 290 п. н. – на генотип 1639AA.

Детекцію продуктів ПЛР – ПДРФ проводили в 2 % агарозному гелі. Візуалізацію результатів здійснювали в ультрафіолетовому світлі після

фарбування розчином етидію броміду. Довжини фрагментів аналізували шляхом порівняння з маркерною ДНК (рис. 1).

Статистичну обробку даних проводили на персональному комп'ютері з використанням програмних пакетів Statistica 10.0 та MS Excel. Для оцінки відповідності розподілу генотипів очікуваним значенням при рівновазі Харді – Вайнберга, порівняння розподілу частот генотипів між підгрупами дослідження та порівняння середніх величин доз, використовували критерій χ^2 Пірсона, критерій χ^2 Пірсона з поправкою Йетса на безперервність (при кількості досліджень менше 10). Для порівняння величин доз у підгрупах дослідження використовували критерій Стюдента. Вплив генотипів на ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції крові оцінювали за величиною відношення шансів (ВШ) у межах 95 % довірчого інтервалу (ДІ) [2]. Статистично достовірними вважали відмінності при $P < 0,05$.

Результати та обговорення

У результаті проведеного молекулярно-генетичного дослідження 155 пацієнтів визначено частоти генотипів за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1: 1639GG – 37,42 %, 1639GA – 46,45 % та 1639AA – 16,13 %. Частота алелів p та q становила 0,61 та 0,39 відповідно. Виходячи з отриманих частот алелів, підраховано теоретично очікувані частоти генотипів і показано, що частоти генотипів за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1 відповідали розподілу за законом Харді – Вайнберга та статистично значущо не відрізнялися від теоретично очікуваних. При проведенні порівняльної оцінки отриманих частот генотипів гена VKORC1 у нашому дослідженні з частотами, визначеними в

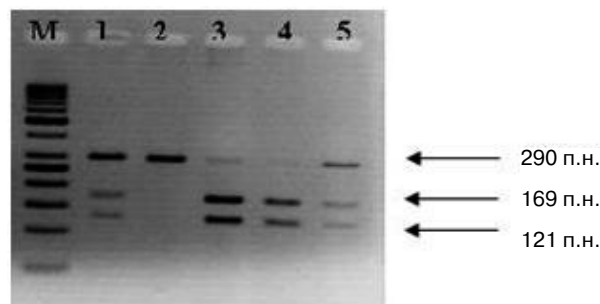


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційних фрагментів гена VKORC1. Зразки 3, 4 – генотип 1639GG; зразки 1, 5 – генотип 1639GA; зразок 2 – генотип 1639AA; М – ДНК маркер.

європейських популяціях [3, 14], достовірної різниці не виявлено.

Проведено аналіз залежності величини дози варфарину від генотипу гена *VKORC1* у 155 пацієнтів. Підібрана доза варфарину становила від 0,625 до 10,0 мг на добу (рис. 2).

У пацієнтів з генотипом 1639GG найменша підібрана доза варфарину становила 2,5 мг/добу, а найбільша – 10 мг/добу. Середня доза варфарину в пацієнтів з генотипом 1639GG становила $(4,4 \pm 0,2)$ мг/добу, що достовірно більше середніх величин дози в пацієнтів з генотипами 1639GA та 1639AA. У хворих з генотипом 1639GA найменша доза варфарину для досягнення та підтримання цільового рівня МНВ була 0,625 мг/добу, а найбільша – 6,25 мг/добу. Середня доза варфарину в пацієнтів з генотипом 1639GA становила $(3,05 \pm 0,14)$ мг/добу та була достовірно більшою, ніж у пацієнтів з генотипами 1639AA. Мінімальна доза варфарину в пацієнтів з генотипом 1639AA становила 0,625 мг/добу, а максимальна – 3,75 мг/добу, середня доза – $(2,05 \pm 0,19)$ мг/добу, що в 2,5 разу нижче від стартової дози. Таким чином, пацієнти з генотипами 1639GA та 1639AA потребували менших доз варфарину для досягнення та підтримання значень цільового рівня МНВ, на відміну від пацієнтів з генотипом 1639GG, що підтверджується даними інших дослідників [6, 7, 13].

На наступному етапі аналізували залежність ступеня гіпокоагуляції крові від генотипу гена *VKORC1* у 155 пацієнтів при терапії варфарином. У пацієнтів з генотипами 1639GA та 1639AA на

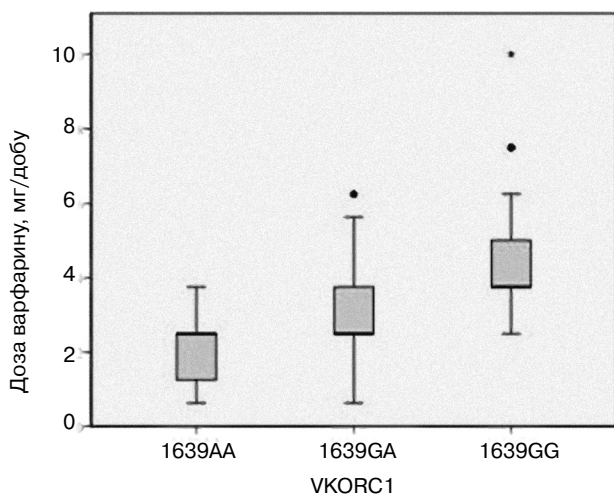


Рис. 2. Величина підібраної дози варфарину залежно від генотипу гена *VKORC1*.

етапі підбору дози підвищення рівня МНВ більше 3,5 реєстрували частіше, ніж у пацієнтів з генотипом 1639GG. Тільки в одного пацієнта з генотипом 1639GG зафіксовано зростання МНВ до 5,54. У 15 пацієнтів з генотипом 1639AA спостерігали зростання МНВ понад 3,5, у 8 з яких епізоди надмірної гіпокоагуляції реєстрували більше одного разу. Зростання МНВ більше 3,5 відзначено у 19 пацієнтів з генотипом 1639GA, у 4 з яких МНВ неодноразово перевищувало межі терапевтичного діапазону на етапі підбору дози (максимальні зафіксовані значення МНВ – 4,1; 4,79; 6,12 та 6,49). В однієї пацієнтки рівень МНВ виходив за межі терапевтичного діапазону 8 разів. Наводимо детальний опис цього випадку.

Клінічний випадок. Пацієнтка С., 63 роки. Після проведеної операції протезування серцевого клапана призначено варфарин у стандартній дозі 5 мг на добу. Вихідний рівень МНВ – 1,15. На третю добу прийому препарату зафіксовано МНВ 6,12, надмірна гіпокоагуляція крові утримувалася протягом 3 діб, що потребувало відміни препарату. За весь період підбору дози значення МНВ виходили за межі терапевтичного діапазону 8 разів. Підібрана доза варфарину при МНВ 3,2 становила 0,625 мг на добу (рис. 3).

Оскільки в цієї пацієнтки з гетерозиготним генотипом 1639GA за поліморфним варіантом G1639A гена *VKORC1* виявився неочікувано складний підбір дози, нами додатково проведено дослідження поліморфізму гена *CYP2C9*, що кодує фермент біотрансформації варфарину. За результатами молекулярно-генетичного дослідження встановлено генотип компаундна гете-

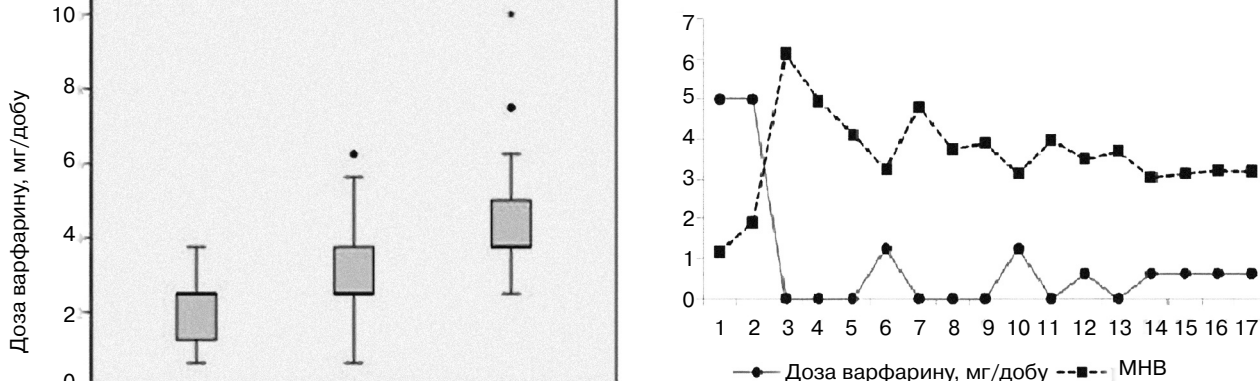


Рис. 3. Підбір дози варфарину в пацієнтки С. з генотипом *2*3 за алельними варіантами *2 та *3 гена *CYP2C9* та генотипом 1639GA за поліморфним варіантом G1639A гена *VKORC1*.

Таблиця 1

Рекомендовані діапазони терапевтичних доз варфарину залежно від генотипів генів CYP2C9 і VKORC1

Генотип гена VKORC1	Доза варфарину в пацієнтів з генотипом гена CYP2C9, мг					
	*1*1	*1*2	*1*3	*2*2	*3*3	*2*3
1639GG	5–7	5–7	3–4	3–4	3–4	0,5–2
1639GA	5–7	3–4	3–4	3–4	0,5–2	0,5–2 ¹
1639AA	3–4	3–4	0,5–2	0,5–2	0,5–2	0,5–2

Примітка. ¹ Рекомендований діапазон дози варфарину для пацієнтки С.

розигота *2*3 за алельними варіантами *2 та *3 гена CYP2C9.

У 2007 р. Управління з контролю лікарських засобів і продуктів харчування США (U.S. Food and Drug Administration – FDA) внесло зміни до інструкції варфарину із зазначенням рекомендованих діапазонів терапевтичних доз варфарину залежно від поліморфізму генів CYP2C9 і VKORC1 у пацієнта.

Результати нашого молекулярно-генетичного дослідження показали, що величина емпірично підбраної добової дози варфарину 0,625 мг для пацієнтки С. перебуває в рекомендованому FDA діапазоні для осіб з гетерозиготним генотипом 1639GA за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1 та з генотипом *2*3 за алельними варіантами *2 та *3 гена CYP2C9 (табл. 1).

На наступному етапі проаналізували вплив генотипів гена VKORC1 на ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції крові при терапії варфарином у пацієнтів підгруп А та Б (табл. 2).

Частота генотипу 1639GG гена VKORC1 у підгрупі Б порівняно з підгрупою А була достовірною більшою ($\chi^2=21,19$; $P<0,05$; ВШ=0,03 (95 % ДІ 0,00–0,25), що свідчить про достовірне зниження ризику виникнення епізодів надмірної гіпокоагуляції. У пацієнтів з генотипом 1639AA гена VKORC1 ризик виникнення надмірної гіпокоагуляції був підвищений у 8 разів порівняно з пацієнтами з генотипом «дикий тип», що під-

тверджується результатами досліджень інших авторів [11, 15].

Висновки

1. Частота генотипів за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1 у пацієнтів з протезованими клапанами серця становить: 1639GG – 37,42 %, 1639GA – 46,45 %, 1639AA – 16,13 %.

2. Пацієнтам після протезування клапанів серця з генотипом 1639AA за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1 можна рекомендувати розпочинати терапію варфарином у дозі 2,5 мг на добу, а пацієнтам з генотипом 1639GA – у дозі 3,75 мг на добу.

3. У пацієнтів з генотипом 1639AA за поліморфним варіантом G1639A гена VKORC1 при проведенні терапії варфарином у стандартній дозі 5 мг на добу ризик епізодів надмірної гіпокоагуляції збільшений у 8 разів порівняно з пацієнтами з генотипом 1639GG.

4. Для оптимізації підбору дози варфарину пацієнтам необхідно проводити молекулярно-генетичне дослідження не лише поліморфізму гена VKORC1, а і поліморфізму гена CYP2C9.

5. Враховуючи чималу кількість осіб з генотипами 1639GA та 1639AA гена VKORC1 серед пацієнтів, яким проводять операції на серці, слід впровадити у клінічну практику лікувальних закладів України фармакогенетичне тестування до призначення варфарину для персоналізованого підходу до режиму дозування та зменшення ризику геморагічних ускладнень при проведенні терапії.

Література

1. Алгоритмы дозирования варфарина, основанные на результатах фармакогенетического тестирования: реальная возможность оптимизации фармакотерапии / Д.А. Сычев, И.М. Антонов, С.В. Загребин [и др.] // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2007. – № 2. – С. 59–66.
2. Бабич П.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятие, вычисление и интерп-

Таблиця 2

Розподіл генотипів поліморфного варіанта G1639A гена VKORC1 у пацієнтів залежно від значення МНВ на етапі підбору дози варфарину

Генотипи гена VKORC1	Частота виявлення у підгрупах		Результати статистичного аналізу
	А (МНВ > 3,5; n=35)	Б (МНВ 2,5–3,5; n=120)	
1639GG	1 (2,86 %)	57 (47,5 %)	$\chi^2=21,19$; $P<0,05$; ВШ=0,03 (95 % ДІ 0,00–0,25)
1639GA	19 (54,28 %)	53 (44,17 %)	$P>0,05$
1639AA	15 (42,86 %)	10 (8,33 %)	$\chi^2=23,87$; $P<0,05$; ВШ=8,25 (95 % ДІ 3,25–20,94)

- ретація / П.Н. Бабич, А.В. Чубенко, С.Н. Лапач // Укр. медичний часопис. – 2005. – № 2. – С. 138–144.
3. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 1639 G>A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe / A.D. Buzoianu, A.P. Trifa, D.F. Muresanu [et al.] // J. Cell. Mol. Med. – 2012. – Vol. 16 (12). – P. 2919–2924.
4. 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 Peima [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 105 (2). – P. 645–649.
5. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing / J.A. Johnson, L. Gong, M. Whirl-Carrillo [et al.] // Clinical pharmacol. Therap. – 2011. – Vol. 90 (4). – P. 625–629.
6. Clinical relevance of VKORC1 (G-1639A and C1173T) and CYP2C9*3 among patients on warfarin / L.K. Teh, I.M. Langmia, M.H. Fazleen Haslinda [et al.] // J. Clin. Pharm. Ther. – 2012. – Vol. 37 (2). – P. 232–236.
7. Estimation of Warfarin Maintenance Dose Based on VKORC1 (1639 G_A) and CYP2C9 Genotypes / Y. Zhu, M. Shennan, K.K. Reynolds [et al.] // Clinical Chemistry. – 2007. – Vol. 53 (7). – P. 1199–1205.
8. Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) / A. Vahanian, O. Alfieri, F. Andreotti [et al.] // Eur. Heart J. – 2012. – Vol. 33. – P. 2451–2496.
9. 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.
10. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) affects gene expression and warfarin dose requirement / D. Wang, H. Chen, K.M. Momary [et al.] // Blood. – 2008. – Vol. 112(4). – P. 1013–1021.
11. Responsiveness to low-dose warfarin associated with genetic variants of VKORC1, CYP2C9, CYP2C19, and CYP4F2 in an Indonesian population / T. Rusdiana, T. Araki, T. Nakamura [et al.] // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2013. – Vol. 69 (3). – P. 395–405.
12. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin optimized outpatient follow-up study group / S.D. Fihn, M. McDommel, D. Matin [et al.] // Ann. Intern. Med. – 1993. – Vol. 118 (7). – P. 511–520.
13. 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.I. Khan, H.A. Wynne [et al.] // Blood. – 2005. – Vol. 106 (7). – P. 2329–2333
14. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting / M. Wadelius, L.Y. Chen, J.D. Lindh [et al.] // Blood. – 2009. – Vol. 113 (4). – P. 784–792.
15. Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction / K.B. Haug, M.N. Sharikabad, M.K. Kringen [et al.] // Thrombosis J. – 2008. – Vol. 6. – P. 1–7.

Надійшла 20.12.2013 р.

Клиническое значение полиморфного варианта G1639A гена VKORC1 в индивидуализации терапии варфарином

И.В. Малаярчук^{1,2}, Н.Г. Горовенко², А.А. Крикунов³, А.Р. Бабочкина³

¹ ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев

² Национальная медицинская академия последипломного образования им. П.Л. Шупика МЗ Украины, Киев

³ ГУ «Национальный институт сердечно-сосудистой хирургии им. Н.М. Амосова НАМН Украины», Киев

Цель работы – проанализировать зависимость величины подобранной дозы варфарина и степени гипокоагуляции от генотипа гена VKORC1 у пациентов, перенесших операцию протезирования клапанов сердца.

Материал и методы. В исследование включено 155 пациентов, которые перенесли операцию протезирования клапанов сердца и получали терапию варфарином. Подбор дозы варфарина осуществляли до достижения целевых значений международного нормализованного отношения (МНО) от 2,5 до 3,5. Выделены две подгруппы пациентов: у которых на этапе подбора дозы варфарина наблюдали повышение МНО больше 3,5 (n=35), и пациенты, у которых уровень МНО не выходил за границы целевых значений (n=120).

Результаты. Нами определены частоты генотипов по полиморфному варианту G1639A гена VKORC1: 1639GG – 37,42 %, 1639GA – 46,45 %, 1639AA – 16,13 %. Пациентам с генотипами 1639AA и 1639GA необходимы достоверно более низкие дозы варфарина по сравнению с пациентами с генотипом 1639GG (P<0,05). У пациентов с генотипом 1639AA достоверно увеличен риск возникновения эпизодов чрезмерной гипокоагуляции, по сравнению с пациентами с генотипом 1639GG (P<0,05).

Выводы. В связи с высокой частотой выявления пациентов с генотипами 1639AA и 1639GA по полиморфному варианту G1639A гена VKORC1 необходим персонализированный подход к дозированию варфарина.

Ключевые слова: варфарин, генотип, доза, чрезмерный антикоагулянтный эффект.

The clinical significance of G1639A polymorphic variants of VKORC1 gene for individualized therapy with warfarin

I.V. Maliarchuk^{1,2}, N.G. Gorovenko², A.O. Krykunov³, A.R. Babochkina³

¹ *SI «Institute of Genetic and Regenerative Medicine of NAMS», Kyiv, Ukraine*

² *Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine*

³ *SI «National Institute of Cardiovascular Surgery Amosov NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine*

The aim – to investigate the impact of VKORC1 polymorphism on dosage of warfarin and international normalized ratio (INR).

Material and methods. The study included 155 patients after heart valve replacement. Patients received warfarin treatment from initial dose of 5 mg daily. Subgroup A (n=35) included patients with INR values out of therapeutic range and subgroup B (n=120) – patients with INR values in the range 2.5–3.5. For determination of polymorphic variant G1639A of VKORC1 gene the method of PCR-RFLP has been used.

Results. The frequencies of 1639GG, 1639GA and 1639AA genotypes among the patients group were 37.42 %, 46.45 %, 16.13 %, respectively. The mean warfarin daily dose requirement was the lowest in patients with genotypes VKORC1 1639AA and 1639GA compared to patients with genotype 1639GG ($P<0.05$). Patients with genotype VKORC1 1639AA had higher risk of over-anticoagulation (INR > 3.5) during warfarin therapy, compared to patients with wild-type genotype ($P<0.05$).

Conclusions. Genotypes 1639GA and 1639AA are frequent enough to provide background for personalized warfarin dosing.

Key words: warfarin, genotype, dose, therapy, over-anticoagulation.