

Корнева Е.В., Рачина С.А., Романов А.В.,
Эдельштейн М.В., Милягин В.А., Кожухова Л.Л.

Исследование фармакогенетических особенностей пациентов с фибрилляцией предсердий, нуждающихся в приеме оральных антикоагулянтов

ГОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Минздравсоцразвития Российской Федерации, г. Смоленск

Korneva E.V., Rachina S.A., Romanov A.V., Eidelshstein M.V., Miliagin V.A., Kozhuhova L.L.

Pharmacogenetic testing of patients with atrial fibrillation who required warfarin therapy

Резюме

Обследовано 66 пациентов с фибрилляцией предсердий, проживающих на территории Смоленской области и нуждающихся в назначении варфарина. У пациентов определялось наличие клинически значимых вариантов генов CYP2C9 и VKORC1: CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1*2 методом ПЦР в режиме реального времени. Среди обследованной популяции выявлено широкое распространение полиморфизмов, определяющих повышенную индивидуальную чувствительность к варфарину.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, варфарин, индивидуальная чувствительность, распространенность полиморфизмов генов CYP2C9 и VKORC1

Summary

66 patients with atrial fibrillation from Smolensk region who needed warfarin therapy were recruited into the study. The significant variants of CYP2C9 and VKORC1 genes (CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1*2) were detected by real-time PCR. Among the study population the prevalence of warfarin sensitivity genotypes were widespread.

Key words: atrial fibrillation, warfarin, individual sensitivity, prevalence of polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1

Введение

Заболевания сердечно-сосудистой системы являются серьезным "бременем" для современного общества, так как вносят основной вклад в заболеваемость и смертность населения. Среди них немаловажную роль играют аритмии, в том числе фибрилляция предсердий (ФП), как наиболее часто встречающееся нарушение ритма, требующее лечения. Распространенность ФП в популяции составляет 1-2% [1,2]. По прогнозам специалистов, число пациентов с ФП в ближайшие годы будет неуклонно расти, и достигнет к 2050 г. в такой стране, как США 5,6-12,1 млн. человек [2,3].

ФП, нарушая внутри- и внесердечную гемодинамику, создает риск артериальных тромбоэмболических осложнений (ТЭО) [4,5]. В настоящее время основными препаратами для профилактики ТЭО при ФП остаются аспирин и оральные антикоагулянты (ОАК). По данным клинических исследований, у пациентов с ревматической ФП ОАК по эффективности профилактики ТЭО значительно превосходят плацебо и аспирин [6-11]. Наиболее изученным с точки зрения эффективности и безопасности препаратом из группы ОАК является варфарин [12]. Однако, несмотря на мно-

голетний опыт использования, подбор дозы варфарина для практического врача до сих пор представляет существенную проблему в связи с такими особенностями ОАК, как узкий терапевтический диапазон и многочисленные лекарственные взаимодействия, создающие угрозу развития избыточной гипokoагуляции и серьезных кровотечений [13].

Не менее актуальной проблемой является индивидуальная чувствительность к варфарину, обусловленная главным образом полиморфизмом гена CYP2C9, кодирующего цитохром P450 CYP2C9, и гена VKORC1, кодирующим витамин К-эпоксид редуктазу [14-17].

Аллельные комбинации гена CYP2C9 определяют разную активность цитохрома P450 CYP2C9. Так, комбинация CYP2C9*1 (Arg144 и Ile359), которую обозначают в литературе как «дикий» аллель, кодирует более активно метаболизирующий варфарин фермент. Аллельные варианты CYP2C9*2 (Cys 144 и Ile359) и CYP2C9*3 (Arg144 и Leu 359) кодируют фермент с меньшей метаболической активностью относительно «дикого» варианта, что может определять потребность в более низкой дозе варфарина у пациентов с данными генотипами [18].

При исследовании различных мутаций в VKORC1 также была выявлена зависимость между дозой варфарина, необходимой пациенту и полиморфизмом данного гена. Так, при наличии замены цитозина на тимин в 1173-м положении в интроне 1 (генотипы СТ и ТТ) выявлена потребность в более высокой дозе варфарина, чем у пациентов с генотипом СС [19-21]. Носительство генотипов СТ и ТТ, которые определяют низкую экспрессию VKORC1, часто обозначают как *1/*2 и 2*/2*.

Ряд исследователей полагают, что использование данных о генетических особенностях пациента при подборе дозы варфарина позволяет минимизировать риск его передозировки и развития кровотечений, а также сократить расходы на визиты к врачу и лабораторный контроль уровня гипоксагуляции [22,23]. Однако для оценки клинических и экономических перспектив использования фармакогенетических исследований в конкретном регионе требуется изучение локальной эпидемиологии значимых полиморфизмов гена CYP2C9 и гена VKORC1.

Цель исследования - изучить распространенность значимых полиморфизмов генов CYP2C9 и VKORC1 у пациентов с ФП в Смоленской области.

Материалы и методы

В исследование включались пациенты европеоидной расы в возрасте 18 лет и старше с ФП, а также наличием хотя бы одного из дополнительных факторов риска ТЭО:

- предшествующий ишемический инсульт и/или другие артериальные тромбозмболии в анамнезе (в т.ч. транзиторные ишемические атаки),
- возраст более 75 лет,
- артериальная гипертензия, требующая медикаментозной терапии,
- хроническая сердечная недостаточность и/или фракция выброса левого желудочка менее 35%,
- сахарный диабет.

В исследовании определялись полиморфизмы генов CYP2C9 и VKORC1, ассоциированные с гиперчувствительностью к варфарину: CYP2C9*2, CYP2C9*3, VKORC1*2. В качестве биологического материала использовалась цельная кровь из кубитальной вены.

Для детекции перечисленных полиморфизмов был использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени и анализа кривых плавления зондов, основанный на эффекте переноса энергии флуорес-

ценции между 3'-флуоресцентно меченым зондом и праймером, содержащим внутренний гаситель флуоресценции. Мультиплексную ПЦР в режиме реального времени и анализ кривых плавления зондов выполняли с помощью системы Rotor Gene 2000 (Corbett Research, Австралия).

Статистическая обработка данных выполнялась в системе SAS (программный пакет SAS института, США, версия 8.2). Количественные признаки описывались в виде минимального, максимального, среднего значений, стандартного отклонения; качественные признаки представлялись в виде долей (%) и абсолютных чисел.

Результаты и обсуждение

В проспективное эпидемиологическое исследование включено 66 пациентов с ФП в возрасте от 39 до 79 лет, в том числе 36/66 (54%) мужчин. Основные характеристики пациентов представлены в таблице 1. У большинства пациентов выявлена постоянная форма ФП. Несмотря на наличие высокого риска ТЭО, их профилактика на момент включения в исследование вообще не проводилась у 9/66 (14%) пациентов, в остальных случаях она была неадекватной (98,3% пациентов принимали аспирин, 1,7% - клопидогрель при отсутствии противопоказаний к приему ОАК).

При анализе генотипов выявлено, что большинство пациентов - 36/66 (54%) несли мутантные аллели в генах CYP2C9 и/или VKORC1.

Наиболее распространенным генотипом при исследовании полиморфизма гена CYP2C9 являлся CYP2C9*1/1, который обнаружен у 51/66 (77%) пациента, с равной частотой выявлялись CYP2C9*1/2 и CYP2C9*1/3 – рисунок 1. Генотип CYP2C9*2/3 обнаружен только в 1/66 (1,5%) случае.

Следует отметить, что распространенность полиморфизмов CYP2C9*2 и CYP2C9*3, которые повышают чувствительность индивидуума к варфарину и могут обуславливать передозировку препарата при стандартной методике подбора дозы, может существенно варьировать в различных регионах. Так, частота встречаемости вышеуказанных аллелей в Европе составляет примерно 35%, в США в зависимости от этнической группы может колебаться от 15 до 39%, в Японии, Корее, Китае их распространенность значительно меньше (около 3%) [24,25].

Полученные нами результаты в целом согласуются с распространенностью полиморфизмов гена CYP2C9 в других регионах России [26,27]. По данным Сироткиной

Таблица 1. Основные характеристики пациентов с ФП, включенных в фармакогенетическое исследование (n=66)

Возраст, среднее ± CO*, лет	60,4±8,3
Пол	
- доля мужчин, n%	36/54
Формы ФП	
- постоянная, n%	41/62
- пароксизмальная, n%	24/36,5
- персистирующая, n%	1/1,5
Доля пациентов, которым проводилась профилактика ТЭО до включения в исследование n%	57/86

* CO – стандартное отклонение

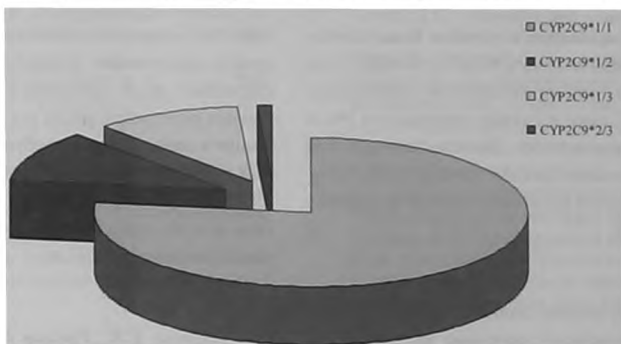


Рис.1. Структура генотипов CYP2C9 у пациентов с ФП в Смоленской области (n=66, %)

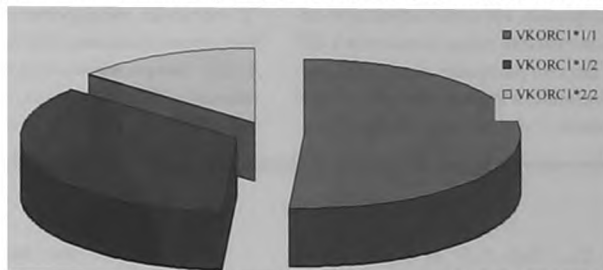


Рис.2. Структура генотипов VKORC1 у пациентов с ФП в Смоленской области (n=66, %).

О.В., и соавт., в Северо-Западном регионе частота встречаемости генотипа CYP2C9 *1/*1 в популяции составляет 68%, CYP2C9 *1/*2 – 18%, CYP2C9 *1/*3 – 11%, CYP2C9 *2/*3 – 1,4%, CYP2C9 *2/*2 – 1,4% [26]. В Москве и Московской области генотип CYP2C9 *1/*1 выявлялся у 64% обследованных лиц, CYP2C9 *1/*2 – у 14%, CYP2C9 *1/*3 – у 17%, CYP2C9 *2/*3 – у 2%, CYP2C9 *2/*2 – у 1%, CYP2C9 *3/*3 – у 1,5% [27].

Генотип VKORC1 *1/1 в нашем исследовании был выявлен у 34/66 (51%) пациентов, тогда как, генотипы, наличие которых у пациента может привести к избыточной гипокоагуляции, обнаружены в 32/66 (49%) случаях – рисунок 2.

Необходимо отметить, что частота встречаемости полиморфизмов гена VKORC1 имеет также весьма существенные географические и этнические различия. Известно, что мутантные аллели редко выявляются среди африканского населения, тогда как среди представителей европеоидной и азиатской расы распространенность их очень высока и варьирует от 42% у белых европейцев до 95% у китайцев (гетерозиготный вариант) [23,28].

Согласно данным отдельных российских исследований, в Северо-Западном регионе РФ распространенность генотипа VKORC1*1/2 составляет 38%, VKORC1*2/2 – 19%, в Москве и Московской области – 48 и 18%, соответственно [21,29].

Как показало наше исследование, среди 36/66 (54%) пациентов, имеющих мутантные аллели генов CYP2C9 и/или VKORC1, в 13/66 (19,5%) случаях были выявлены генотипы, которые можно отнести к опасным, так как они могут требовать значительного снижения дозы варфарина (таблица 2). К ним, в частности, можно отнести следующие комбинации: CYP2C9*1/1 и VKORC1*2/2, CYP2C9*1/3 и VKORC1*2/2, CYP2C9*1/2 и VKORC1*2/2, CYP2C9*1/3 и VKORC1*1/2, CYP2C9*2/3 и VKORC1*1/2. Остальные комбинации, которые встречались у 33/66 (34,5%) пациентов (CYP2C9*1/1 и VKORC1*1/2, CYP2C9*1/2 и VKORC1*1/1, CYP2C9*1/2 и VKORC1*1/2), можно отнести к клинически значимым.

Несмотря на то, что целью нашего исследования не являлся детальный анализ предшествующей антиротботической терапии, необходимо отметить, что в 100% случаев она была неадекватной. Отказ от применения ОАК при ФП может быть связан с различными причинами – трудоемкость лечения, связанная с необходимостью индивидуального подбора дозы препарата и регулярного лабораторного контроля уровня гипокоагуляции, негативный предшествующий опыт применения, недостаточный уровень знаний фармакодинамики и фармакокинетики данной группы ЛС.

Таблица 2. Комбинации полиморфизмов генов CYP2C9 и VKORC1 у пациентов с ФП в Смоленской области (n=66)

Генетические варианты	VKORC1 *1/*1	VKORC1 *1/*2	VKORC1 *2/*2
CYP2C9 *1/*1	30/66 (46%)	18/66 (27%)	3/66 (4,5%)
CYP2C9 *1/*2	4/66 (6%)	1/66 (1,5%)	2/66 (3%)
CYP2C9 *1/*3	-	3/66 (4,5%)	4/66 (6%)
CYP2C9 *2/*3	-	1/66 (1,5%)	-

Известно, что у пациентов с одной и более клинически значимых мутаций в генах CYP2C9 и VKORC1 сохраняется риск возникновения избыточной гипокоагуляции при приеме ОАК даже в случае тщательного учета индивидуальных факторов риска. Поэтому поиск путей оптимизации использования данной группы лекарственных средств в клинической практике остается чрезвычайно актуальной задачей.

Выводы

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о том, что клинически значимые мутации в генах CYP2C9 и VKORC1, определяющие повышенную чувствительность к варфарину, его более вероятную передозировку и риск кровотечений среди пациентов с ФП в Смоленской области широко распространены. Это свидетельствует об обоснованности фармакогенетического скрининга среди пациентов с ФП, нуждающихся в при-

еме ОАК, который может способствовать сокращению сроков достижения терапевтической гипокоагуляции и снижению риска потенциальных осложнений терапии. Однако целесообразность его рутинного использования в клинической практике требует дальнейших проспективных клинических исследований, предполагающих изучения благоприятного влияния данного метода на клинические исходы и/или затраты на оказание медицинской помощи пациентам с ФП. ■

Корнева Е.В., Рачина С.А., Раманов А.В., Эдельштейн М.В., Милягин В.А., Кожухова Л.Л. ГОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Минздрава России, г. Смоленск; Автор, ответственный за переписку - Корнева Е.В., Челябинск г. Островского ул., д. 81. Городская больница Челябинска № 4 ГКБ МУЗ. Телефон: +7(351) 742-76-91.

Литература:

1. Stewart S, Hart C.L., Hole D.J., et al. Population prevalence, incidence and predictors of atrial fibrillation in the Renfrew/Paisley study. *Heart* 2001; 86:516-21.
2. Go A.S., Hylek E.M., Phillips K.A., et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implication for rhythm and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in atrial Fibrillation (ATRIA) study. *JAMA* 2001; 285:2370-5.
3. Miyasaka Y., Barnes M.E., Gersh B.J., et al. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation*, 2006, 114:119-25.
4. Benjamin E.J., Wolf P.A., D'Agostino R.B., et al. Impact of atrial fibrillation on the risk of death: the Framingham Heart study. *Circulation* 1998; 98:946-52.
5. Wolf P.A., Dawber T.R., Thomas H.E., et al. Epidemiologic assessment of chronic atrial fibrillation and risk of stroke: the Framingham Study. *Neurology* 1978; 28:073-7.
6. Petersen P., Boysen G., Godtfredsen J., et al. Placebo-controlled, randomized trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. The Copenhagen AFASK study. *Lancet* 1989; 1:175-9.
7. Conolly S.J., Laupacis A., Gent M., et al. Canadian Atrial Fibrillation Anticoagulation (CAFA) Study. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18:349-55.
8. Ezekowitz M.D., Bridgers S.L., James K.E., et al. Warfarin in the prevention of stroke associated with nonrheumatic atrial fibrillation. Veterans Affairs Stroke Prevention in Nonrheumatic Atrial Fibrillation Investigators (published erratum of appears in *N Engl J Med* 1993;328:148). *N Engl J Med* 1992; 327:1406-12.
9. The effect of low-dose warfarin on the risk of stroke in patients with nonrheumatic atrial fibrillation. The Boston Area Anticoagulation Trial for Atrial Fibrillation Investigators. *N Engl J Med* 1990; 323:1505-11.
10. Stroke prevention in Atrial Fibrillation Study. Final results. *Circulation* 1991; 84:527-39.
11. Secondary prevention in non-rheumatic atrial fibrillation after transient ischemic attack or minor stroke. EAFT (European Atrial Fibrillation Trial) Study Group. *Lancet* 1993; 342:1255-62.
12. Pirmohamed M. Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62:509-11.
13. Linkins I.A., Choi P.T., Douketis J.D. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2003; 139 (11):839-900.
14. Cooper G.M., Johnson J.A., Langae T.Y., et al. A genom-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood* 2008; 112:1022-27.
15. Сычев Д.А., Раменская Г.В., Игнатьев И.В., и др. Клиническая фармакогенетика. М.:ГЭОТАР-Медиа, 2007, стр.118-130.
16. Wadelius M., Chen L.Y., Lindh J.D., et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009; 113:784-92.
17. Schwartz U.I., Ritche M.D., Bradford Y. et al. Genetic determinations of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 358:999-1008.
18. Taube J., Halsell D., Baglin T. Influence of cytochrome P-450 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; 96:1816-19.
19. D'Andrea G., D'Ambrosio R., Di Perna P., et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105(2):645-49.
20. Сироткина О., Вавилова Т. Фармакогенетика антитромботических препаратов. *Тромбоз, гемостаз и реология* 2007; 2:3-9.
21. Байдак Д.В. Влияние полиморфизма гена, кодирующего витамин К эпоксид редуктазу (VKORC1) на эффективность и безопасность не прямых антикоагулянтов варфарина и аценокумарола. Автореф. дисс. канд. мед. наук М., 2007: 24 с.
22. Yin T., Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenetics of CYP2C9 and VKORC1 - rationale and perspectives. *Thrombosis Research* 2007; 120:1-10.
23. Becquemont L. Evidence for pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008; 64 (10):953-60.
24. Lee C.R., Goldstein J.A., Pieper J.A. Cytochrome P450

- CYP2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002; 12:251-63.
25. Tabrizi A., Zehnabeur B., Borecki I., et al. The frequency and effects of cytochrome P450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin. *J Am Coll Surg.* 2002; 194:267-73.
 26. Сироткина О.В., Улитина А.С., Тараскина А.Е., Вавилова Т.В., Пчелина С.Н., Шварц Е.И. Аллельные варианты CYP2C9 *2 и CYP2C9 *3 гена цитохрома CYP2C9 в популяции Санкт-Петербурга и их клиническое значение при антикоагулянтной терапии варфарином. *Российский кардиологический журнал.* 2004; 6 (50):47-50.
 27. Сычев Д.А. Значение фармакогенетических исследований системы биотрансформации и транспортеров для оптимизации фармакотерапии сердечно-сосудистыми лекарственными средствами (фармакокинетические, клинические и этнические аспекты). Автореф. дисс. доктора мед. наук. М., 2006: 50 с.
 28. Geisen C., Watzka M., Sittlinger K., et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thrombosis and Haemostasis.* 2005; 94:773-79.
 29. Улитина А.С. Молекулярный анализ генов цитохрома P450 2C9 и витамин К-эпоксид редуктазы VKORC1 в лабораторном контроле терапии варфарином. Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2006: 16 с.