

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ТЕРАПИИ

АЛЛЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ CYP2C9*2 И CYP2C9*3 ГЕНА ЦИТОХРОМА CYP2C9 В ПОПУЛЯЦИИ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА И ИХ КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ПРИ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ ТЕРАПИИ ВАРФАРИНОМ

Сироткина О.В.¹, Улитина А.С.², Тараскина А.Е.¹, Кадинская М.И.², Вавилова Т.В.²,
Пчелина С.Н.^{1,2}, Шварц Е.И.^{1,2}

Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова РАН¹, Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова²

Резюме

Одним из основных препаратов выбора для проведения терапии непрямыми антикоагулянтами, вышедшим в настоящее время на отечественный фармацевтический рынок, является варфарин. Фармакокинетические свойства данного препарата зависят от структурных полиморфизмов гена цитохрома CYP2C9, метаболизирующего варфарин. В настоящем исследовании мы проанализировали: 1) частоты встречаемости двух аллельных вариантов данного гена; 2) зависимость индивидуальной реакции пациентов на прием варфарина от генотипа CYP2C9. В результате было показано следующее: 1) частоты аллельных вариантов гена CYP2C9 в популяции г. Санкт-Петербурга составляют 82,66% (CYP2C9*1), 11,11% (CYP2C9*2) и 6,32% (CYP2C9*3); 2) носители CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей быстрее достигают терапевтического уровня гипокоагуляции и требуют достоверно меньшей недельной дозы препарата. На основании полученных результатов мы рекомендуем ввести в клиническую практику определение аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 у больных, которым назначается варфарин.

Ключевые слова: антикоагулянтная терапия, варфарин, генетические аспекты.

Тромбозы и тромбоэмболии различной этиологии являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения, что заставляет врачей прибегать к их фармакологической профилактике, в том числе — с помощью антикоагулянтов непрямого действия, в частности, варфарина. Отмечается различная чувствительность пациентов к варфарину и серьезные геморрагические осложнения при его передозировке. Индивидуальная чувствительность к варфарину обусловлена, в первую очередь, полиморфизмом цитохрома P450 CYP2C9, являющегося ключевым ферментом в окислении, и клиренсе варфарина [2, 8, 9]. Варфарин представляет собой рацемическую смесь двух активных (S)- и (R)-энантиомеров. Фармакологическая активность S-варфарина в пять раз выше, чем у R-варфарина. Было показано, что S-варфарин преимущественно конвертируется в печени с помощью цитохрома CYP2C9 в 7-гидрокси-S-варфарин, который и элиминируется из организма [7]. Таким образом, каталитическая активность CYP2C9 является решающим фактором в определении концентрации варфарина в плазме крови.

К настоящему времени в кодирующей части гена CYP2C9 идентифицировано шесть структурных полиморфизмов [11], два из них характерны для белой расы: нуклеотидная замена С/Т в позиции 416 в третьем экзоне гена, что приводит к замене аргинина на цистеин в белковом продукте в позиции 144

(Arg144Cys), и нуклеотидная замена С/А в позиции 1061 в седьмом экзоне гена, что приводит к замене изолейцина на лейцин в 359 позиции белкового продукта (Ile359Leu). Данные аллельные варианты гена получили названия CYP2C9*1 («дикий» аллель), CYP2C9*2 (Arg144Cys) и CYP2C9*3 (Ile359Leu). Каталитические активности фермента, кодируемого аллелями CYP2C9*2 и CYP2C9*3, снижены относительно CYP2C9*1 и составляют 12% и 5%, соответственно [10]. Было показано, что необходимая ежедневная доза варфарина у носителей мутантных аллелей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 существенно ниже, чем у лиц с «диким» генотипом [1, 6, 10]. Таким образом, генетические полиморфизмы CYP2C9 детерминируют концентрацию варфарина в плазме и, соответственно, степень гипокоагуляции [7].

Появление на отечественном фармацевтическом рынке варфарина и отсутствие сведений о распределении структурных полиморфизмов гена CYP2C9 и их клиническом значении для российской популяции послужило основанием для настоящего исследования, целью которого явилось определение частот встречаемости наиболее значимых полиморфных вариантов гена CYP2C9 — CYP2C9*2 и CYP2C9*3 в популяции г. Санкт-Петербурга и выявление зависимости индивидуальной чувствительности к варфарину от наличия вышеуказанных структурных полиморфизмов гена CYP2C9.

Таблица 1
Распределение генотипов CYP2C9 в популяции
г. Санкт-Петербурга

Генотип CYP2C9	Число носителей (n=297)	Частота генотипа, %	
		фактическая*	расчетная
CYP2C9*1/*1	202	68,0	68,3
CYP2C9*1/*2	54	18,2	18,4
CYP2C9*1/*3	33	11,1	10,3
CYP2C9*2/*3	4	1,35	1,4
CYP2C9*2/*2	4	1,35	1,2
CYP2C9*3/*3	0	0	0,4

Примечание: * $\chi^2=1,5$, $df=5$, $p>0,75$ – различия между фактическими и расчетными частотами генотипов статистически незначимы.

Материалы и методы

В исследование были включены 297 человек в возрасте от 15 до 75 лет (средний возраст – 44 ± 2 года), являющиеся жителями г. Санкт-Петербурга, не связанные узлами родства. Из них 186 мужчин были здоровы, 57 мужчин и 54 женщины наблюдались в клиниках СПбГМУ им. И.П.Павлова по поводу тромбозов различной локализации или повышенного риска тромбообразования.

Геномную ДНК выделяли из лейкоцитов периферической крови стандартным фенол-хлороформным методом.

Определения аллельных вариантов гена CYP2C9 проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего рестрикционного анализа, с использованием эндонуклеаз Kpn I, Ava II и Mph I 103 I («Fermentas», Литва) и олигонуклеотидов («Литех», Москва), как было описано ранее [11].

Из обследованных лиц 62 пациента получали варфарин для первичной или вторичной профилактики тромбозов или тромбоэмболических осложнений (ТЭО). Степень гипокоагуляции оценивали по уровню Международного Нормализованного Отношения (МНО). Использовали тромбопластин с индексами чувствительности 1,1 – 1,2 (Ренам, Москва и Технология-Стандарт, Барнаул). Для оценки фармакокинетики варфарина и индивидуальной чувствительности к препарату использовали два количественных показателя: длительность фазы индукции – сроки достижения терапевтического уровня МНО (количество дней) и недельную дозу варфарина (мг), которая требовалась для поддержания полученного эффекта.

Статистическая обработка полученных результатов проводилась с использованием стандартного пакета программ Statistica 5.0, для оценки соответствия полученного распределения генотипов равновесию Харди-Вайнберга применяли метод χ^2 , для сравнения средних значений числовых показателей в раз-

личных группах использовали непараметрический метод – U-тест Манн-Уитни. Значение $p<0,05$ принимали за значимый уровень достоверности.

Результаты исследования

Полученное в результате исследования распределение генотипов представлено в табл. 1. Данное распределение генотипов находится в соответствии с равновесием Харди-Вайнберга: $\chi^2=1,5$, $df=5$, $p>0,75$. Частоты аллелей составили: CYP2C9*1 – 82,66%, CYP2C9*2 – 11,11%, CYP2C9*3 – 6,32%, соответственно. Частота носительства CYP2C9*2 или CYP2C9*3 аллеля достигала 32%. Полученные нами частоты аллельных вариантов гена CYP2C9 в популяции г. Санкт-Петербурга соответствуют таковым в европейских популяциях [12]. Необходимо отметить, что нами не было выявлено ни одного носителя CYP2C9*3 аллеля в гомозиготном состоянии.

Анализ индивидуальной чувствительности к варфарину показал, что носители CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей быстрее достигают терапевтического уровня гипокоагуляции в период индукции и требуют достоверно меньшей недельной дозы препарата для поддержания терапевтического уровня. Причем, среди обследованных нами больных наибольший вклад в эти различия вносил аллель CYP2C9*3 (табл. 2).

Превышение МНО более 4,5 в период индукции на начальном этапе лечения варфарином было отмечено у семи больных. Еще четверо пациентов очень быстро достигли чрезмерной гипокоагуляции: значения МНО составили 4,65, 4,75, 5,28 и 6,08, соответственно, на первые и вторые сутки терапии. Генетическое исследование этих пациентов выявило носительство CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей в гетерозиготном состоянии. Кроме того, мы отмечали резкие колебания МНО при малейшем изменении дозы варфарина у большинства носителей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей.

Обсуждение

Функционально-значимые полиморфизмы CYP2C9, обуславливающие снижение его ферментативной активности, являются причиной развития побочных реакций для тех лекарств, которые метаболизируются данным ферментом. Это наглядно проиллюстрировано на примере варфарина: передозировка препарата приводит к серьезным геморагическим осложнениям, причем риск кровотечения при долгосрочной терапии варфарином выше именно у носителей мутантных аллелей [2]. Таким образом, лечение непрямыми антикоагулянтами требует решения двух задач: во-первых, подбор терапевтической дозы препарата при максимально коротком времени индукции без эпизодов чрезмерной гипокоагуляции и, тем более, кровотечения и,

Таблица 2

Зависимость индивидуальной реакции больных к варфарину от наличия аллельных вариантов гена CYP2C9

Генотип CYP2C9	Число носителей (n=62)	Длительность фазы индукции, дни	Недельная доза варфарина, мг
CYP2C9*1/*1	46	5,40±0,45*	43,65±2,17**
CYP2C9*1/*2	10	4,22±0,64	31,87±2,27
CYP2C9*1/*3	5	2,75±1,03	22,75±3,50
CYP2C9*2/*3	1	2	17,5

Примечание: * - $p=0,038$ – CYP2C9*1/*1 против остальных генотипов; $p=0,32$ – CYP2C9*1/*1 против CYP2C9*1/*2; $p=0,057$ – CYP2C9*1/*1 против CYP2C9*1/*3; ** - $p<0,0001$ – CYP2C9*1/*1 против остальных генотипов.

во-вторых, поддержание постоянного оптимального уровня гипокоагуляции. Это обуславливает необходимость постоянного мониторинга МНО. Результаты нашего исследования показывают, что внедрение в клиническую практику генетического типирования аллельных вариантов гена CYP2C9 может служить важным дополнением к рутинным коагулометрическим измерениям при терапии варфарином. Выявленная в настоящей работе зависимость индивидуальной реакции больных на прием варфарина от генотипов CYP2C9 согласуется с литературными данными. Так, начальная доза варфарина для индивидуумов с аллельными вариантами *2 и *3 должна быть в пределах 1-1,5 мг по сравнению с обычно используемой 5-10 мг [5]. Аналогичные выводы были сделаны и в другом исследовании [8], где под наблюдением находились 153 человека, получавших варфарин в течение 11 месяцев. Данная исследуемая группа включала представителей черной и белой расы (22% и 78%, соответственно). Прежде всего, были выявлены существенные различия в частотах встречаемости полиморфных аллелей гена CYP2C9 между двумя этническими группами – 15,2% и 39,2%, соответственно. Средняя недельная доза варфарина для лиц с аллельными вариантами CYP2C9*2 и CYP2C9*3 была существенно ниже, чем для остальной группы – $30,6 \pm 2,5$ мг, по сравнению с $40,1 \pm 1,7$ мг ($p=0,002$). Нестабильность МНО у пациентов – носителей CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей – показана не только в нашем исследовании, но и у других авторов [2], которые проводили мониторинг МНО в группе 185 больных, получавших варфарин в течение 10 лет. Из них 58 человек (31,4%) были носителями как минимум одного из полиморфных аллелей CYP2C9. У них статистически достоверно чаще встречались случаи повышения величин МНО, им требовалось больше времени для стабилизации величин МНО с момента старта терапии варфарином, и достоверно чаще случались кро-

вотечения. Все авторы приходят к выводу о высокой значимости типирования аллельных вариантов гена CYP2C9 перед началом терапии варфарином, что согласуется с нашим заключением. При обсуждении результатов нашей работы нельзя не остановиться на следующей проблеме. Цитохром CYP2C9, помимо варфарина, метаболизирует целый ряд лекарственных препаратов самого различного спектра действия – от нестероидных противовоспалительных средств (ибупрофен, диклофенак, пироксикам) – до противоэпилептических (фенитоин) [7, 3]. Уже существуют данные о потенцировании действия одного лекарственного препарата при одновременном приеме другого, также являющегося субстратом для CYP2C9 [4]. Следовательно, определение аллельных вариантов гена CYP2C9 становится особенно актуальным при полимедикации, когда больной вынужден принимать несколько лекарственных препаратов.

Выводы

1. Частоты аллельных вариантов гена CYP2C9 в популяции г. Санкт-Петербурга составляют 82,66% (CYP2C9*1), 11,11% (CYP2C9*2) и 6,32% (CYP2C9*3) и соответствуют таковым в европейских популяциях.
2. Носители CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей быстрее достигают терапевтического уровня гипокоагуляции при терапии варфарином и требуют достоверно меньшей недельной дозы варфарина.
3. Учитывая высокую частоту носительства CYP2C9*2 и CYP2C9*3 аллелей в популяции – 32%, а также зависимость индивидуальной чувствительности пациентов к варфарину от генотипа CYP2C9, необходимо рекомендовать внедрение в широкую клиническую практику генотипирование пациентов на аллельные варианты CYP2C9*2 и CYP2C9*3 до начала терапии варфарином для оптимизации сроков подбора требуемой дозы препарата и избежания геморрагических осложнений.

Авторы выражают глубокую благодарность коллективу лаборатории генной инженерии и иммуногенетики Научно-исследовательского института физико-химической медицины (Москва) за помощь в проведении настоящего исследования.

Литература

1. Aithal G.P., Day C.P., Kesteven P.J.L., Daly A.K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications // Lancet. - 1999. - V. 353. P. 717-719.
2. Higashi M.K., Veenstra D.L., Kondo L.M. et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy// JAMA. - 2002. - V. 287. P. 1690-1698.
3. Lee C.R., Goldstein J.A., Pieper J.A. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data // Pharmacogenetics. - 2002. - V. 12. P. 251-263.
4. Lim V., Pande I. Leflunomide can potentiate the anticoagulant effect of warfarine. // BMJ. - 2002. - V. 325. - P. 1333-1334.
5. Mannucci P.M. Genetic control of anticoagulation // Lancet. - 1999. - V. 353. - P. 688-689.
6. Margaglione M., Colazzo D., D'Andrea G. et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin // Thromb. Haemost. - 2000. - V. 84. - P. 775-778.
7. Miners J.O., Birkett D.J. Cytochrome P450 2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism // Br. J. Clin. Pharmacol. - 1998. - V. 45. - P. 525-536.
8. Tabrizi A.R., Zehnbaue B.A., Borecki I.B. et al. The frequency and effects of cytochrome P450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin // J. Am. Coll. Surg. - 2002. - V. 194. - P. 267-273.
9. Tassies D., Freire C., Puaon J., Maragall S. Et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms influence dose requirements and stability of anticoagulation // Haematologica. - 2002. - V. 87. - P. 1185-1191.
10. Taube J., Halsell D., Baglin T. Influence of cytochrom P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment // Blood. - 2000. - V. 96. - P. 1816-1819.
11. Yasar U., Eliasson E., Dahl M.-L. et al. Validation of methods for CYP2C9 genotyping: frequencies of mutant alleles in a Swedish population // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1999. - V. 254. - P. 628-631.
12. Young-Ran Yoon, Ji-Hong Shon, Moon-Kyung Kim et al. Frequency of cytochrome P450 2C9 mutant alleles in a Korean population // Br. J. Clin. Pharmacol. - 2001. - V. 51. - P. 277-280.

Abstract

*One of the leading anticoagulants in Russia is warfarin. Its pharmacokinetics is determined by structural polymorphisms of CYP2C9 cytochrome gene, metabolizing warfarin. In the present study, the authors analyzed: 1) prevalence of two allele variants of this gene; 2) patients' individual reaction to warfarin, according to their CYP2C9 genotype. It was demonstrated that: 1) prevalence of CYP2C9 gene allele variants in St. Petersburg population was 82,66% (CYP2C9*1), 11,11% (CYP2C9*2), and 6,32% (CYP2C9*3); 2) individuals with CYP2C9*2 and CYP2C9*3 alleles reached therapeutic hypocoagulation faster, and required significantly lower weekly doses of the medication. Routine identification of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 alleles is recommended to all patients administered warfarin.*

Keywords: Anticoagulant therapy, warfarin, genetic aspects.

Поступила 20/12-2003