

УДК 616.125-008.313-085.-273.0165-06:616-005.1:575.174.015.3]-07“32”

Взаємозв'язок поліморфізму генів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 з розвитком геморагічних ускладнень при терапії варфарином у хворих з фібриляцією передсердь: результати одноцентрового річного спостереження

М.Ю. Колесник, О.М. Камишний, Я.М. Михайловський

Запорізький державний медичний університет

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фібриляція передсердь, варфарин, поліморфізм генів, геморагічні ускладнення

Важливий аспект терапії фібриляції передсердь (ФП) – запобігання виникненню тромбоемболічних подій [1, 2]. Незважаючи на появу нових оральних антикоагулянтів, основним препаратом, що застосовується з цією метою, залишається варфарин [12, 13]. Призначаючи варфарин, необхідно враховувати, що препарат характеризується вузьким терапевтичним діапазоном, а його доза, стабільність антикоагулянтного ефекту і ризик виникнення кровотеч залежать від багатьох чинників, серед яких важливе значення мають генетичні особливості [1, 4, 5]. Головна фармакодинамічна мішень для варфарину – субодинамія 1-го комплексу епоксидредуктази вітаміну К (VKORC1). За даними літератури, поліморфний варіант гена, що кодує VKORC1, асоційований зі зниженням концентрації цього ферменту, що призводить до підвищеної чутливості до варфарину та ризику виникнення геморагічних ускладнень [7, 9].

Основним каталізатором метаболізму варфарину є цитохром CYP2C9. Зміна в його активності може значно впливати на чутливість пацієнта до лікування варфарином [4, 6]. На сьогодні ідентифіковано 58 поліморфних варіантів генів, що кодують CYP2C9, серед них 6 мають найбільше поширення та клінічне значення [9, 15].

Найбільш поширений у популяції дикий тип – CYP2C9 *1/*1, при якому швидкість метаболізму варфарину стандартна. Носіїв цього алельного варіанта прийнято називати «екстенсивними метаболізаторами». Поліморфні варіанти гена знижують каталітичну активність ферменту порівняно з його найбільш частою формою [4, 16]. Носії цих алельних варіантів є «повільними метаболізаторами». При цьому швидкість елімінації варфарину з організму знижена, що призводить до збільшення його концентрації в плазмі крові та підвищення ризику геморагічних ускладнень [4, 15, 16].

Існує ще один ген, поліморфізм в якому пов'язаний з чутливістю до варфарину, – CYP4F2. Фермент CYP4F2 бере участь в інактивації вітаміну К. Мутація в гені призводить до зниження функції ферменту. Це потребує призначення вищих доз варфарину [14].

Слід зазначити, що в Сполучених Штатах Америки генетичний метод підбору дози варфарину внесено до офіційної інструкції препарату. В Україні підбір дози варфарину здійснюється, як правило, емпірично. Поширеність мутацій генів, що впливають на метаболізм варфарину, може відрізнятися навіть у різних регіонах однієї країни. В Запорізькій області дослідження поліморфізмів цих генів не проводили.

Згідно з рекомендаціями Європейського товариства кардіологів (2016) найбільшої ефективності та безпечності терапії варфарином можна досягти лише за умови постійного динамічного спостереження за хворими у спеціалізованих клініках та антикоагулянтних кабінетах [10].

Мета роботи – дослідити ефективність та безпечність терапії варфарином у хворих з фібриляцією передсердь протягом року в умовах антикоагулянтного кабінету, виявити частоту поліморфізму генів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 та встановити їх потенційний взаємозв'язок з розвитком геморагічних ускладнень у мешканців Запорізької області.

Матеріал і методи

Спостереження в антикоагулянтному кабінеті, створеному на базі ННМЦ «Університетська клініка» ЗДМУ, було рекомендовано 150 хворим з ФП, які не мали фінансової можливості отримувати нові пероральні антикоагулянти. З них 70 пацієнтів не розпочали прийом варфарину через небажання або неможливість щомісячно контролювати міжнародне нормалізоване відношення (МНВ) та побоювання побічних ефектів. На участь у дослідженні погодилися 80 пацієнтів, серед яких 41 (середній вік – $(68,2 \pm 1,2)$ року, чоловіків – 19, жінок – 22) залишився на постійному контролі в антикоагулянтному кабінеті протягом року.

Відомості про кожного хворого заносили в електронну базу даних (реєстр). Пацієнти мали можливість консультуватися з лікарем не лише при відвідуванні кабінету, а й за допомогою електронної пошти та мобільного зв'язку.

З метою підвищення інформованості та прихильності пацієнтів до лікування організована регулярно діюча школа. Кожному хворому надавалися роздруковані на паперових носіях та в електронному вигляді рекомендації щодо дієти та способу життя, а також індивідуальні карти контролю дози варфарину.

Клінічний діагноз ФП встановлювали згідно з рекомендаціями Європейського товариства кардіологів 2016 р. [10]. Критерії вилучення з дослідження: протезовані клапани серця, тяжкі порушення функції нирок та печінки, гострий коронарний синдром, гострі порушення мозкового кровообігу, онкологічні захворювання.

Обстеження хворих проводили відповідно до загальноприйнятих стандартів. Показники коагулограми з розрахунком МНВ визначали на апараті Coag Chrome 3003 щомісяця, оцінювали ризик тромбоемболічних подій за шкалою CHA₂DS₂-VASc та ризик кровотеч за шкалою HAS-BLED. Підбір та контроль дози варфарину здійснювали за стандартною методикою. За умови, що МНВ було в межах 2,0–3,0 менше ніж у 60 % вимірювань, його вважали лабільним. Геморагічні ускладнення при прийомі варфарину розподіляли на малі та великі кровотечі за класифікацією S.D. Fihn та співавторів [8].

Поліморфізм генів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 у хворих з ФП визначали у відділі молекулярно-генетичних досліджень навчального медико-лабораторного центру ЗДМУ. Зразки ДНК виділяли з лейкоцитів цільної крові за допомогою набору реагентів ПРОБА-РАПІД-ГЕНЕТИКА (ООО «НПО ДНК-Технологія»). Ампліфікацію фрагментів ДНК, що містять поліморфні ділянки, проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу наборами «Фармакогенетика Варфарин» (ООО «НПО ДНК-Технологія») в термоциклері CFX-96 (BioRad) з флуоресцентною схемою детекції. У пробірки вносили по 20 мкл попередньо відцентрифугованої відповідної суміші для ампліфікації. Окремо готували суміш ПЦР-буферу з Taq-АТ-полімеразою у співвідношенні 20 : 1 і центрифугували її протягом 1–3 с. У пробірки із сумішшю для ампліфікації додавали по 10 мкл суміші ПЦР-буферу з Taq-АТ-полімеразою. У кожну пробірку вносили по 1 краплі (20 мкл) мінерального масла. У відповідні пробірки додавали по 5 мкл виділеного зі зразків препарату ДНК наконечниками з аерозольним бар'єром. Ті ж самі маніпуляції проводили з контрольним зразком. Після центрифугування протягом 1–3 с здійснювали ампліфікацію. Результати ПЦР реєстрували автоматично програмним забезпеченням.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакета програм Statistica 6.0 (StatSoft Inc, № AXXR712D833214FAN5) за загальноприйнятою методикою. Порівняння якісних показників та оцінку відповідності розподілу генотипів очікуваним значенням за рівновагою Харді – Вайнберга проводили за допомогою критерію χ^2 з поправкою Йейтса. З метою оцінки впливу поліморфізму генів на ймовірність розвитку кровотеч розраховували відносний ризик з визначенням 95 % довірчого інтервалу (ДІ).

Таблиця 1

Частота реєстрації поліморфізму генів, пов'язаних з метаболізмом варфарину, у хворих з ФП

| Поліморфізм генів | Гомозиготи за диким алелем | Гетерозиготи | Гомозиготи за мутантним алелем |
|-------------------|----------------------------|--------------|--------------------------------|
| CYP2C9*2 | 29 (70,72 %) | 11 (26,83 %) | 1 (2,45 %) |
| CYP2C9*3 | 35 (85,37 %) | 6 (14,63 %) | – |
| CYP4F2 | 28 (68,3 %) | 12 (29,25 %) | 1 (2,45 %) |
| VKORC1 | 18 (43,9 %) | 17 (41,46 %) | 6 (14,63 %) |

Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Серед хворих, що перебували під динамічним спостереженням, постійну форму ФП виявлено у 25 (61,39 %), персистентну – у 16 (39 %), пароксизмальну – не виявлено в жодного пацієнта. Найбільш частим етіологічним фактором ФП була ішемічна хвороба серця в поєднанні з гіпертонічною хворобою – 36 (87,83 %) хворих (рис. 1).

Середній бал за шкалою CHA₂DS₂-VASc становив $3,6 \pm 0,2$, а за шкалою HAS-BLED – $2,15 \pm 0,17$. Середня доза варфарину – $(5,30 \pm 0,27)$ мг. Лабільність МНВ спостерігали у 27 (65,85 %) хворих. Із препаратів, що впливають на метаболізм варфарину, 7 (17,07 %) хворих приймали аміодарон, 36 (87,8 %) – статини.

Протягом року геморагічні ускладнення (малі кровотечі) виникли у 22 (53,66 %) хворих (рис. 2), серед яких підшкірні гематоми – у 9 (40,9 %), гемофтальм – у 5 (22,73 %), кров у випорожненнях – у 1 (4,55 %), носові кровотечі та кровотечі з ясен – у 6 (27,27 %) пацієнтів, гематурія – у 1 (4,55 %).

Великих кровотеч не спостерігали. Тромбоемболічні ускладнення не зафіксовані, хоча ризик виникнення інсульту протягом року для наших пацієнтів становив 4 % (середній бал за шкалою CHA₂DS₂-VASc більше 3).

Результати генетичного аналізу наведено в табл. 1.

За результатами генотипування поліморфізму гена CYP2C9*2 гомозиготи за диким алелем (генотип C/C) виявлені у 29 (70,72 %) випадках, гетерозиготи (C/T) – у 11 (26,83 %), гомозиготи за мутантним алелем (T/T) – у 1 (2,45 %) випадку. При дослідженні поліморфізму гена CYP2C9*3 гомозиготи за диким алелем (A/A) виявлені у 35 (85,37 %) випадках, гетерозиготи (A/C) – у 6 (14,63 %), гомозигот за мутантним алелем (C/C) не зареєстровано. Поліморфізм гена CYP4F2 виявлено у 13 (31,70 %) хворих, при цьому гетерозиготами (C/T) були 12 (29,25 %) хворих, а гомозиготами за мутантним алелем (T/T) – 1 (2,45 %), 28 (68,3 %) мали дикий тип гена (C/C). Мутація гена VKORC1 виявлена у 23 (56,1 %) хворих: 17 (41,46 %) гетерозигот (G/A) і 6 (14,63 %) гомозигот (A/A) відповідно. У 18 (43,9 %) мутацій не виявлено (G/G).

Розподіл частот генотипів поліморфних маркерів CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 відповідав рівновазі Харді – Вайнберга, що свідчить про відсут-

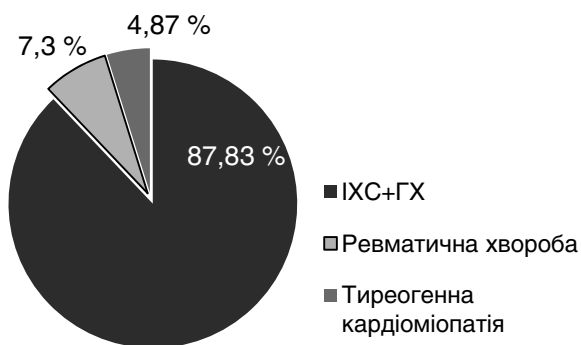


Рис. 1. Розподіл хворих за етіологічним фактором ФП.

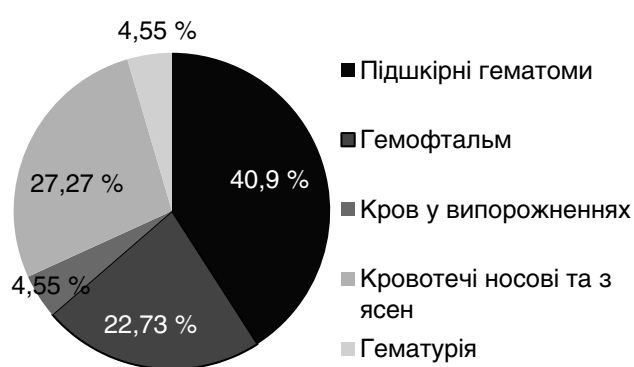


Рис. 2. Структура кровотеч у хворих з ФП, які приймають варфарин.

Таблиця 2

Порівняння частот генотипів різних поліморфних маркерів з розрахованими частотами за рівновагою Харді – Вайнберга

| Генотипи | Випадки (n=41) | Рівновага Харді – Вайнберга (n=41) | χ^2 | P |
|-----------------------|----------------|------------------------------------|----------|------|
| CYP2C9*2 (C/T) | | | | |
| C/C | 29 / 0,707 | 29 / 0,708 | 0,001 | 0,99 |
| C/T | 11 / 0,268 | 11 / 0,267 | | |
| T/T | 1 / 0,024 | 1 / 0,025 | | |
| CYP2C9*3 (A/C) | | | | |
| A/A | 35 / 0,854 | 35 / 0,859 | 0,26 | 0,88 |
| A/C | 6 / 0,146 | 6 / 0,136 | | |
| C/C | 0 / 0 | 0 / 0,05 | | |
| CYP4F2 (C/T) | | | | |
| C/C | 28 / 0,683 | 28 / 0,688 | 0,05 | 0,98 |
| C/T | 12 / 0,293 | 12 / 0,283 | | |
| T/T | 1 / 0,024 | 1 / 0,029 | | |
| VKORC1 (G/A) | | | | |
| G/G | 18 / 0,439 | 17 / 0,418 | 0,35 | 0,84 |
| G/A | 17 / 0,415 | 19 / 0,457 | | |
| A/A | 6 / 0,146 | 5 / 0,125 | | |

ність помилок при формуванні вибірок та генотипуванні (табл. 2).

При цьому встановлена нами поширеність вищезазначених генотипів у мешканців Запорізької області була зіставною з результатами досліджень, проведених серед європейського населення [6, 16].

У літературі є дані, що поліморфізм генів, пов'язаних з метаболізмом варфарину, впливає на частоту геморагічних ускладнень [11]. Так, у дослідженні ВАРФАГЕН встановлено взаємозв'язок між частотою кровотеч та генетично зумовленою підвищеною чутливістю до варфарину.

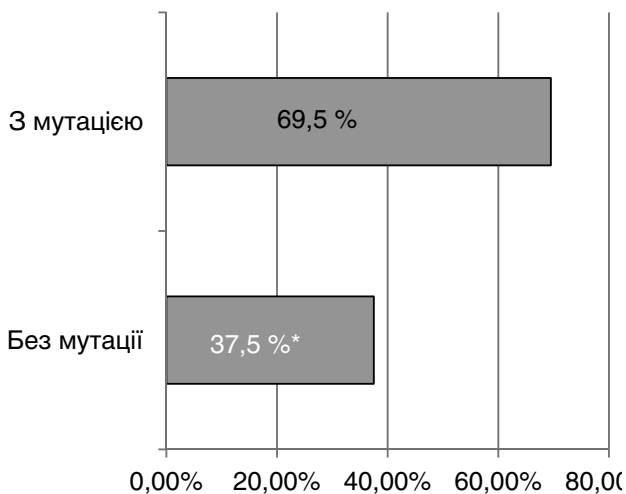


Рис. 3. Частота виникнення кровотеч залежно від мутації гена VKORC1. * – різниця між групами статистично значуща за критерієм χ^2 .

У нашому дослідженні кровотечі виникали статистично значуще частіше в групі хворих з мутацією гена VKORC1 (рис. 3): 69,5 проти 37,5 % без мутації ($\chi^2=5,331$; $P<0,05$). У зв'язку з цим ми провели визначення відносного ризику виникнення геморагічних ускладнень у хворих з мутацією гена VKORC1. Встановлено, що відносний ризик виникнення кровотеч становить 1,97 (ДІ 1,039; 3,751; $P<0,05$), що підтверджує статистично значущий вплив генетичного фактора на ймовірність розвитку цього ускладнення терапії варфарином.

Взаємозв'язку частоти розвитку кровотеч з поліморфізмом інших генів не виявлено.

Отримані результати збігаються з даними інших авторів, які вивчали вплив поліморфізму гена VKORC1 на фармакодинаміку варфарину. Встановлено, що його алель А асоціюється з високою чутливістю до варфарину й обумовлює розвиток надмірної гіпокоагуляції в перший місяць лікування, що сприяє розвитку геморагічних ускладнень, водночас алель G пов'язаний з низькою чутливістю до препарату і не викликає передозування [7, 9].

Висновки

1. Тривала терапія варфарином в умовах антикоагулянтного кабінету є ефективною щодо профілактики тромбоемболічних ускладнень у хворих з фібриляцією передсердь, що підтвер-

джується відсутністю їх розвитку протягом року спостереження.

2. За умови постійного динамічного спостереження в антикоагулянтному кабінеті терапія варфарином безпечна щодо виникнення великих кровотеч. З іншого боку, малі кровотечі є частим ускладненням тривалої терапії варфарином (понад 50 % пацієнтів), проте вони не потребують відміни препарату. Найчастіший вид малих кровотеч – підшкірні гематоми.

3. У мешканців Запорізької області поліморфізм гена VKORC1 пов'язаний з підвищеною частотою геморагічних ускладнень з відносним ризиком 1,97. Перспективним є застосування персоналізованого підходу до підбору дози варфарину з використанням фармакогенетичного тестування.

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: концепція і проект дослідження, узагальнення матеріалу, редагування тексту – М.К.; проведення молекулярно-генетичних досліджень, редагування тексту – О.К.; збір матеріалу, статистичне опрацювання даних, написання тексту – Я.М.

Література

1. Гаврисюк Е.В., Сычев Д.А., Казаков Р.Е. и др. Опыт использования фармакогенетического тестирования для персонализации дозирования варфарина в поликлинических условиях // Тихоокеанский мед. журн. – 2015. – № 1. – С. 60–62.
2. Дзяк Г.В., Жарінов О.Й. Фібриляція передсердь. – К.: Четверта хвиля, 2011. – 192 с.
3. Сичов О.С., Бородай А.О., Бородай Е.С. Предиктори виникнення серцево-судинних подій у пацієнтів з фібриляцією та тріпотінням передсердь неклапанного походження // Укр. кардіол. журн. – 2016. – № 6. – С. 64–75.
4. Сычев Д.А. Рекомендации по применению фармакогенетического тестирования в клинической практике // Качественная клиническая практика. – 2011. – № 1. – С. 4–10.
5. Целуйко В.И., Ополонская Н.А. Распространенность факторов риска тромбоэмболических и геморрагических осложнений среди больных с фибрилляцией предсердий // Медицина неотложных состояний. – 2013. – № 7. – С. 65–69.
6. Buzoianu A.D., Trifa A.P., Muresanu D.F. et al. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 1639 G > A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe // J. Cell. Mol. Med. – 2012. – Vol. 16 (12). – P. 2919–2924.
7. Daly A.K. Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms // Arch. Toxicol. – 2013. – Vol. 87 (3). – P. 407–420.
8. Fihn S.D., McDonnell M., Martin D. et al. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group // Ann. Intern. Med. – 1993. – Vol. 118 (7). – P. 511–520.
9. Johnson J.A., Gong L., Whirl-Carrillo M. et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 Genotypes and Warfarin Dosing // Clin. Pharmacol. Therap. – 2011. – Vol. 90 (4). – P. 625–629.
10. Kirchhof P., Benussi S., Kotecha D. et al. ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS (2016) // Eur. Heart J. – 2016. – Vol. 37. – P. 2893–2962.
11. Mazur-Bialy A.L., Zdebska K., Wypasek E. et al. Repeated bleeding complications during therapy with vitamin K antagonists in a patient with the VKORC1*2A and the CYP2C9*3/*3 alleles: genetic testing to support switching to new oral anticoagulants // Tromb. Res. – 2013. – Vol. 131 (3). – P. 279–280.
12. Okumura Y., Yokoyama K., Matsumoto N. et al. Current use of direct oral anticoagulants for atrial fibrillation in Japan: Findings from the SAKURA AF Registry // J. Arrhythm. – 2017. – Vol. 33 (4). – P. 289–296.
13. Potpara T.S., Larsen T.B., Deharo J.C. et al. Oral anticoagulant therapy for stroke prevention in patients with atrial fibrillation undergoing ablation: results from the First European Snapshot Survey on Procedural Routines for Atrial Fibrillation Ablation (ESS-PRAFA) // Europace. – 2015. – Vol. 17 (6). – P. 986–993.
14. Rusdiana T., Araki T., Nakamura T. et al. Responsiveness to low-dose warfarin associated with genetic variants of VKORC1, CYP2C9, CYP2C19, and CYP4F2 in an Indonesian population // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2012. – Vol. 69 (3). – P. 395–405.
15. Teh L.K., Langmia I.M., Fazleen Haslinda M.H. et al. Clinical relevance of VKORC1 (G-1639A and C1173T) and CYP2C9*3 among patients on warfarin // J. Clin. Pharm. Ther. – 2012. – Vol. 37 (2). – P. 232–236.
16. Zhu Y., Shennan M., Reynolds K.K. et al. Estimation of Warfarin Maintenance Dose Based on VKORC1 (1639 G_A) and CYP2C9 Genotypes // Clin. Chemistry. – 2007. – Vol. 53 (7). – P. 1199–1205.

Надійшла 7.11.2017 р.

Взаимосвязь полиморфизма генов CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 с развитием геморрагических осложнений при терапии варфарином у больных с фибрилляцией предсердий: результаты одноцентрового годичного наблюдения

М.Ю. Колесник, А.М. Камышный, Я.М. Михайловский

Запорожский государственный медицинский университет

Цель работы – исследовать эффективность и безопасность терапии варфарином у больных с фибрилляцией предсердий (ФП) в течение года в условиях антикоагулянтного кабинета, определить частоту выявления полиморфизма генов CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 и установить их взаимосвязь с развитием геморрагических осложнений у жителей Запорожской области.

Материалы и методы. Обследован 41 больной с ФП (средний возраст – (68,2±1,2) года, мужчин – 19, женщин – 22), находившийся после назначения варфарина под амбулаторным наблюдением в течение года в антикоагулянтном кабинете на базе ННМЦ «Университетская клиника ЗГМУ». Методом полимеразной цепной реакции исследован полиморфизм генов CYP2C9, CYP4F2, VKORC1.

Результаты. В течение года геморрагические осложнения (малые кровотечения) возникли у 22 (53,66 %) больных с ФП, получавших терапию варфарином. Кровотечения наблюдали статистически значимо чаще в группе больных с мутацией гена VKORC1: 69,5 % по сравнению с 37,5 % без мутации ($\chi^2=5,331$; $P<0,05$). Установлено, что относительный риск возникновения кровотечений при терапии варфарином у больных с мутацией гена VKORC1 составляет 1,97 (95 % доверительный интервал – 1,039; 3,751; $P<0,05$).

Выводы. Полиморфизм гена VKORC1 связан с повышенной частотой геморрагических осложнений у больных с ФП при терапии варфарином, что свидетельствует об актуальности персонализированного подхода к подбору дозы варфарина с использованием фармакогенетического тестирования.

Ключевые слова: фибрилляция предсердий, варфарин, полиморфизм генов, геморрагические осложнения.

The interrelation of CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphism and hemorrhagic complications of warfarin therapy in patients with atrial fibrillation: a single-center one-year study

М. Yu. Kolesnyk, O. M. Kamyshnyi, Ya. M. Mykhailovskyi

Zaporizhzhia State Medical University

The aim – to evaluate the effectiveness and safety of warfarin therapy in patients with atrial fibrillation (AF) in the anticoagulation practice, the rate of CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphism and their interrelation with hemorrhagic complications among Zaporizhzhia region residents.

Material and methods. We studied 41 patients with AF (mean age – 68.2±1.2 years, men – 19, women – 22) enrolled in a 1-year out-patient observation in the anticoagulation practice of Zaporizhzhia State Medical University clinics. All patients were treated with warfarin. CYP2C9, CYP4F2, VKORC1 genes polymorphism was determined using polymerase chain reaction method.

Results. During one year hemorrhagic complications (small bleedings) arose in 22 (53.66 %) patients with AF, receiving warfarin therapy. Bleedings were significantly more frequent in the group of patients with VKORC1 gene mutation: 69.5 % vs. 37.5 %, respectively ($\chi^2=5.331$; $P<0.05$). It was found that the relative risk of bleeding under warfarin treatment in patients with VKORC1 gene mutation is 1.97 (95 % CI 1.039; 3.751; $P<0.05$).

Conclusions. VKORC1 polymorphism is associated with increased frequency of hemorrhagic complications in patients with AF taking warfarin, indicating the relevance of a personalized approach to the warfarin dose titration using pharmacogenetic testing.

Key words: atrial fibrillation, warfarin, genes polymorphism, hemorrhagic complications.