

Optymalizacja leczenia antagonistami witaminy K — rola polimorfizmów genowych

Optimalisation of treatment with vitamin K antagonists — the role of gene polymorphisms

Ewa Stępień^{1, 2}, Ewa Wypasek^{1, 2}, Agnieszka Branicka¹, Anetta Undas^{1, 2}

¹Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków

²Zakład Kardiologii Anestezjologii i Kardiologii Doświadczalnej, Instytut Kardiologii, *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie

Na wielkość stabilnej dawki antagonistów witaminy K (VKA) w leczeniu przeciwzakrzepowym, oprócz znanych czynników klinicznych, środowiskowych i demograficznych, duży wpływ mają również czynniki genetyczne. Ich udział w przewidywaniu dawki VKA ocenia się na 40–50%. Kluczowe znaczenie mają polimorfizmy genetyczne 2 enzymów uczestniczących w metabolizmie witaminy K i/lub VKA — podjednostka 1 reduktazy epoksydu witaminy K (VKORC1) i izoformy 2C9 cytochromu P450 (CYP2C9). Mniejsze lub niewielkie znaczenie mają genetyczne polimorfizmy innej izoformy P450 (CYP4F2), apolipoproteiny E (APOE) oraz γ -karboksylazy (GGCX). W populacji europejskiej wyróżnia się 3 haplotypy VKORC1: VKORC1*2, VKORC1*3 i VKORC1*4, determinujące 99% zmienności genetycznej tego enzymu. Obecność polimorfizmu VKORC1 –1639G>A wiąże się z większym zapotrzebowaniem na VKA. Warianty alleliczne CYP2C9*2 i CYP2C9*3 (występujące odpowiednio u 8–12% i 3–8% chorych) warunkują wolniejszy metabolizm VKA i tym samym zwiększają ryzyko krwawień, zwłaszcza na początku terapii. Dostępne algorytmy farmakogenetyczne uwzględniające polimorfizmy genów VKORC1 i CYP2C9 ułatwiają przewidzenie dawki VKA, szczególnie gdy zapotrzebowanie na lek jest małe lub umiarkowane. Wciąż jednak brak przekonujących danych o zmniejszeniu ważnych klinicznie powikłań leczenia VKA dzięki znajomości profilu farmakogenetycznego pacjenta.

Słowa kluczowe: antagoniści witaminy K, polimorfizm genetyczny, reduktaza epoksydu witaminy K, cytochrom P450, oporność, farmakogenetyka, stabilna antykoagulacja

Abstract

The magnitude of a maintenance vitamin K antagonist (VKA) dose during anticoagulant therapy depends not only on clinical, environmental, and demographic factors, but also on genetic factors. Known genetic polymorphisms explain 40–50% of the variance in VKA dosing. Polymorphisms of two genes encoding enzymes involved in vitamin K and/or VKA metabolism such as vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) and cytochrome P450 2C9 isoform (CYP2C9) play a key role in this variance. Polymorphisms of cytochrome P450 4F2 isoform (CYP4F2), apolipoprotein E (APOE) and gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) are of minor or negligible importance. In European populations, 3 haplotypes of VKORC1, VKORC1*2, VKORC1*3 and VKORC1*4 — have been identified and they determined 99% of genetic variability of this enzyme. The presence of –1639G>A VKORC1 polymorphism is associated with increased VKA dose requirements. Allelic variants of CYP2C9*2 and CYP2C9*3 (found in 8–12% and 3–8% of individuals, respectively) increase the risk of haemorrhage due to slow VKA metabolism, especially at the therapy initiation. Pharmacogenetic algorithms incorporating VKORC1 and CYP2C9 genotypes help to predict the VKA dosage, particularly if the dose requirements are low or moderate. However, there is no compelling evidence showing reduced risk for clinical adverse events during VKA therapy following the identification of the patient's genetic profile.

Key words: vitamin K antagonists, genetic polymorphism, vitamin K epoxide reductase, cytochrome P450, resistance, pharmacogenetics, stable anticoagulation

Kardiol Pol 2010; 68, supl. V: 428–435

Adres do korespondencji:

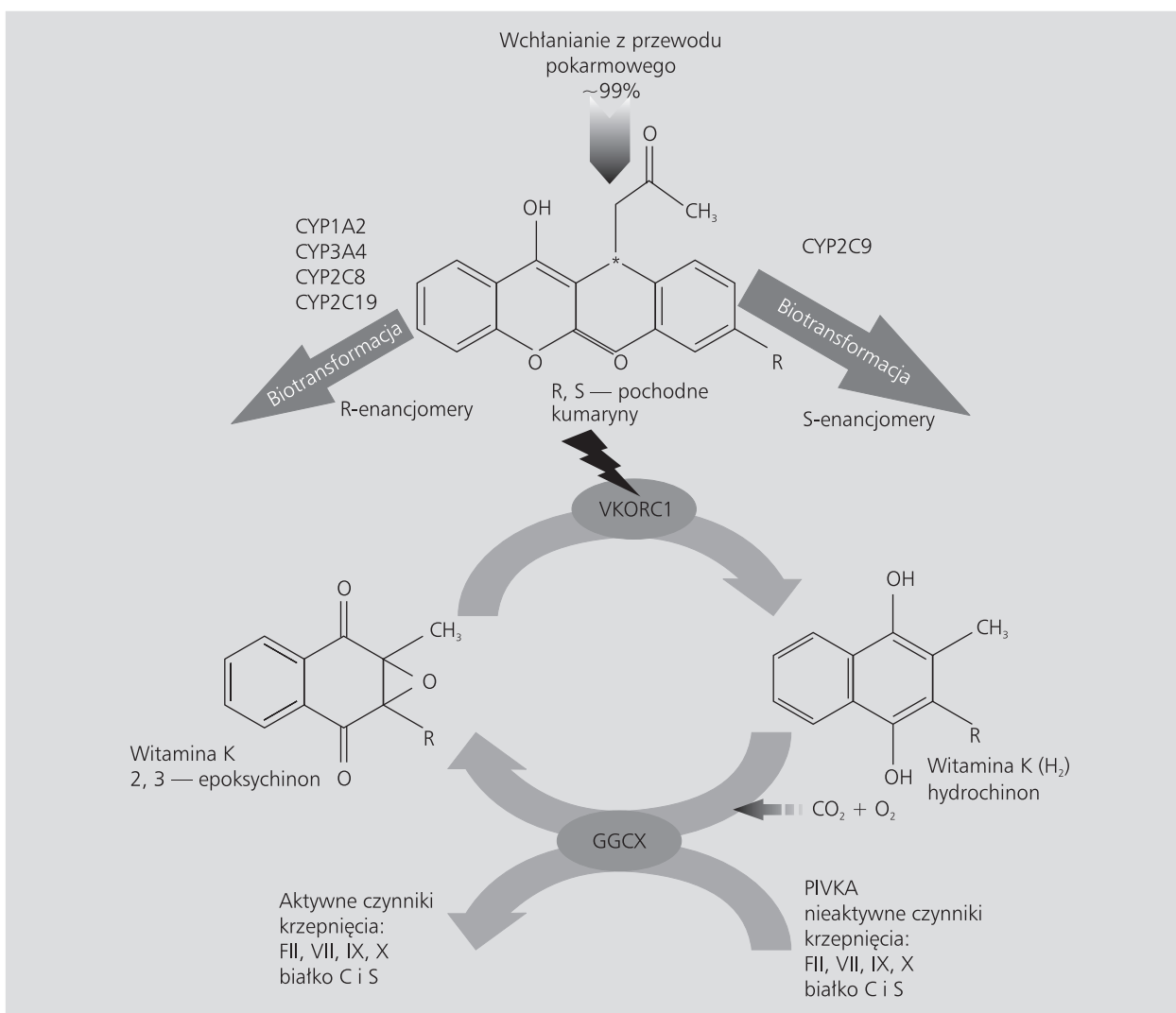
prof. dr hab. n. med. Anetta Undas, Zakład Kardiologii Anestezjologii i Kardiologii Doświadczalnej, Instytut Kardiologii, *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego, ul. Prądnicka 80, 31–202 Kraków, tel: +48 12 614 30 04, faks: +48 12 614 31 45, e-mail: mmundas@cyf-kr.edu.pl

WSTĘP

Znane od ponad 60 lat pochodne 4-hydroksykumaryny, czyli warfaryna, acenokumarol i fenoprokumon, są związkami o działaniu antagonistycznym do witaminy K (VKA, *vitamin K antagonists*). Pochodne te stosuje się jako leki pierwszego wyboru w przewlekłej profilaktyce powikłań zakrzepowo-zatorowych u osób z migotaniem przedsionków, sztucznymi zastawkami serca oraz żylną chorobą zakrzepowo-zatorową.

Przeciwwkrzepliwy efekt działania VKA polega na zahamowaniu aktywności enzymatycznej kompleksu reduktazy epoksydu witaminy K (VKORC, *vitamin K epoxide reductase complex*) (ryc. 1). Konsekwencją jest niedobór zredukowanej

postaci witaminy K (hydroksychinonu), która jest niezbędna do γ -karboksylacji zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia syntetyzowanych w wątrobie. Gamma-karboksylacja, będąca potranslacyjną modyfikacją prekursorowych białek układu krzepnięcia (czynników krzepnięcia II, VII, IX, X oraz inhibitorów krzepnięcia — białka C, S i Z), umożliwia wiązanie przez te białka jonów wapniowych i w konsekwencji, tworzenie kompleksów z fosfolipidami błon komórkowych — tenazy zewnątrz- i wewnątrzpodrodnej oraz protrombiny — zapewniających ostatecznie sprawną generację trombiny [1]. Niekarboksylowane pochodne tych białek, zwane PIVKA (*protein induced by vitamin K absence*), upośledzają



Rycina 1. Przemiany witaminy K w wątrobie i ich modyfikacja przez antagonistów witaminy K (VKA). Zredukowana postać witaminy K (H₂) jest niezbędna do γ -karboksylacji zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia (F) przy udziale enzymu gamma-karboksylazy (GGX). W wyniku tego procesu witamina K utlenia się do postaci zredukowanej (H₂) i tym samym przywraca dostępność witaminy K w procesie γ -karboksylacji prekursorów czynników krzepnięcia. Pochodne 4-hydroksykumaryny (VKA) blokują aktywność VKORC, ograniczają dostępność witaminy K oraz sprzyjają nagromadzeniu niekarboksylowanych pochodnych białek krzepnięcia (PIVKA). R, S-enancjomery VKA są wchłaniane w ok. 99% z przewodu pokarmowego. Część z nich ulega biotransformacji, głównie przy udziale izoformy cytochromu CYP2C9, który hydroksyluje S-enancjomery warfaryny i acenokumarolu [3]; zmodyfikowane

aktywność kompleksów tenazy i protrombinazy na zaktywowanych płytkach, a w konsekwencji przyczyniają się do powstawania zakrzepu w miejscu uszkodzenia ściany naczynia.

FARMAKOKINETYKA I BIOTRANSFORMACJA POCHODNYCH KUMARYNY

Farmakokinetyka i farmakodynamika pochodnych kumaryny jest różna [2]. Każdy z leków z klasy VKA ma 1 centrum chiralne, co powoduje, że związki te występują w postaci 2 izomerów optycznych (forma S — lewoskrętna i R — prawoskrętna). S-enancjomer ma średnio 2–5-krotnie silniejsze działanie antagonistyczne na VKORC niż forma R [3]. S-formy charakteryzują się większym klirensiem, a w związku z tym, krótszym czasem trwania w porównaniu z R-enancjomerami [4]. Jednak szacuje się, że S-enancjomer odpowiada za 70% działania przeciwzakrzepowego warfaryny i acenokumarolu. Antagoniści witaminy K są produkowani w postaci mieszaniny racemicznej obu izomerów w stosunku 1:1. Wszystkie VKA wchłaniają się niemal całkowicie z przewodu pokarmowego i w ok. 99% wiążą się z białkami osocza, głównie z albuminą. Maksymalne stężenie w osoczu VKA osiągają po kilku godzinach, przy czym dla warfaryny czas ten wynosi 0,3–4 godzin, a dla acenokumarolu około 2 godzin. Czas półtrwania warfaryny wynosi 32–43 godzin, a acenokumarolu przeciętnie 8–11 godzin. Pełne działanie antykoagulacyjne obu leków pojawia się po 2–5 dniach.

Acenokumarol, podobnie jak warfaryna, jest prawie całkowicie metabolizowany w wątrobie poprzez hydroksylację, a w mniejszym stopniu redukcję. Za metabolizm VKA są odpowiedzialne głównie cytochromy P450 [5], spośród których najważniejszą rolę odgrywa izoforma CYP2C9. Ze względu na stereo- i izoselektywność CYP2C9 hydroksyluje głównie S-enancjomery warfaryny (> 90%) i acenokumarolu (100%) oraz jest częściowo odpowiedzialny za biotransformację R-acenokumarolu (ok. 60%) [2]. Ponadto w biotransformacji VKA biorą udział inne izoformy: CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8 i CYP2C19 [2] (ryc. 1).

MONITOROWANIE LECZENIA ANTAGONISTAMI WITAMINY K

Międzynarodowy współczynnik znormalizowany (INR) w trakcie leczenia VKA powinien się mieścić w przedziale 2,0–3,0 (z wyjątkiem części chorych z mechanicznymi zastawkami serca, u których zaleca się INR 2,5–3,5). W czasie stosowania VKA jest wymagane regularne monitorowanie wskaźnika INR, nie rzadziej niż raz na 4 tygodnie [6]. Warto pamiętać, że ze względu na hamowanie reakcji γ -karboksylacji VKA mogą niekiedy wydłużyć czas częściowej tromboplastyny po aktywacji (APTT), zwykle w przypadku stosowania dużych dawek, oraz zmniejszają aktywność koagulacyjną czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K, najczęściej do 30–40% normy. Podstawowym problemem w stosowaniu VKA jest wąski indeks terapeutyczny, z czym wiąże się ryzyko incydentu zakrzepowego lub krwawienia, zwłaszcza na początku leczenia.

Szacuje się, że powikłanie krwotoczne występuje przeciętnie u 10–17% leczonych VKA, a ryzyko zgonu z powodu krwawienia w ciągu roku wynosi 1% [2].

Drugim problemem to duże międzyosobnicze różnice w dawce VKA potrzebnej do osiągnięcia stabilnej antykoagulacji. Dzienna dawka VKA jest bardzo zróżnicowana u poszczególnych chorych i waha się w zakresie 0,5–60 mg (średnio 5 mg) warfaryny [7] i 1–64 mg (średnio 3 mg) acenokumarolu dziennie. Wahania dawki u poszczególnych chorych poddawanych antykoagulacji można ograniczyć tylko częściowo, informując o interakcji z dietą (zielone warzywa jako ważne źródło witaminy K1) i lekami, zalecając kontrole w specjalistycznych przychodniach (*anticoagulation clinics*), stosując aparaty do kontroli INR w domu u wybranych chorych lub zwiększając częstość pomiaru INR nawet do 1 oznaczenia na tydzień [6].

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA DZIAŁANIE ANTAGONISTÓW WITAMINY K

Dawka VKA u pacjenta zależy od czynników demograficznych, środowiskowych oraz genetycznych, a udział tych ostatnich szacuje się najczęściej na 50% [2, 7]. Czynniki demograficzne zwiększające wrażliwość na działanie VKA to podeszły wiek oraz płeć żeńska. Chory o większej masie ciała wymaga także wyższych dawek VKA [8]. U osób w podeszłym wieku często współistnieje kilka chorób, które *per se* wpływają na metabolizm VKA (np. niewydolność serca), oraz wiążą się ze stosowaniem innych leków dodatkowo wpływających na stabilność INR. Czynniki związane z dietą lub lekami, np. antybiotykami, mogą zwiększać lub zmniejszać INR często tylko przejściowo, zwiększając ryzyko krwawienia lub incydentu zakrzepowo-zatorowego.

Ocenia się, że na biotransformację i działanie VKA może wpływać około 30 genów. Na dużą międzyosobniczą zmienność w dawkowaniu VKA koniecznym do osiągnięcia terapeutycznego INR najbardziej wpływają polimorfizmy 2 enzymów — bezpośrednio uczestniczącej w: metabolizmie witaminy K — podjednostki 1 VKORC (VKORC1) oraz w biotransformacji pochodnych 4-hydroksykumaryny — CYP2C9 [1, 2, 9]. Znikomy lub mały wpływ przypisuje się innym polimorfizmom genów, w tym kodujących apolipoproteinę E (apoE) [10], S-transferazę A1 glutationu, mikrosomalną hydrolazę epoksydową oraz γ -karboksylazę (GGCX).

VKORC

VKORC jest małym śródłonkowym białkiem, zlokalizowanym w siateczce wewnątrzplazmatycznej komórek wątroby, w mniejszych ilościach — komórek trzustki i serca. Gen kodujący kompleks reduktazy epoksydu witaminy K znajduje się w chromosomie 16. (p11.2) i zawiera 3 egzony oraz 2 introny. Geisen i wsp. [7] wyróżnili 3 haplotypy w populacji europejskiej: VKORC1*2, VKORC1*3 i VKORC1*4, determinujące 99% zmienności genetycznej tego enzymu; dziki haplotyp VKORC1*1 stwierdza się bardzo rzadko ($u < 0,1\%$

Tabela 1. Częstość alleliczna haplotypów i mutacji białek (enzymów) odpowiedzialnych za metabolizm VKA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref)

Haplotyp lub białko	Marker	NCBI Reference Sequence	Analizowana populacja	Allel dziki	Allel zmutowany
VKORC1*1	rs7200749 [8]	NT_010393.16	Europejska	< 0,1	0,99
			Afroamerykańska	0,205	0,795
			Azjatycka	< 0,1	0,99
VKORC1*2	rs17878363 rs9923231 [8]	NT_010393.16	Europejska	0,653	0,347
			Afroamerykańska	0,857	0,143
			Azjatycka	0,042	0,958
VKORC1*3	rs7294 [8]	NT_010393.16	Europejska	0,674	0,326
			Afroamerykańska	0,568	0,432
			Azjatycka	0,950	0,050
CYP2C9*1	rs1799853** [20]	NG_008385.1	Europejska	0,894	0,104
			Afroamerykańska	0,944	0,056
			Azjatycka	0,99	< 0,1
CYP2C9*3	rs1057910 [20]	NG_008385.1	Europejska	0,942	0,058
			Afroamerykańska	0,960	0,040
			Azjatycka	0,967	0,033
CYP4F2	rs2108622 [1]	NC_000019.8	Europejska	0,826	0,174
			Afroamerykańska	0,913	0,087
			Azjatycka	0,733	0,267
APOE	rs429358 rs7412 [20]	NG_007084.2	Europejska	0,149	0,851
			Azjatycka	< 0,1	0,99

*Na podstawie własnych badań genotypów chorych leczonych acenokumarolem lub warfaryną (n = 123; Stępień, dane niepublikowane); **ten sam marker dla haplotypu CYP2C9*2; APOE — apolipoproteina E; CYP2C9 — cytochrom P450 2C9; CYP4F2 — cytochrom P450 4F2; VKORC1 (*vitamin K epoxide reductase complex subunit 1*) — podjednostka 1 kompleksu reduktazy epoksydu witaminy K

osób rasy białej). Na haplotyp VKORC1*2 składa się kilka polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNPs, *single nucleotide polymorphism*) w obrębie regionów kodujących i niekodujących genu: rs17878363, rs9934438, rs8050894, rs2359612 (odpowiednio: M2, M17, M18 i M19), tworzących klaster genowy VKORC1*2A, który odpowiada za mniejszą o około 50% ekspresję genu VKORC1 (mniejsza transkrypcja mRNA), a w konsekwencji za mniejszą ilość enzymu, co z kolei wpływa na wielkość efektywnej dawki warfaryny [8]. Natomiast haplotypy VKORC1*1, VKORC1*3, VKORC1*4 mogą wywoływać oporność na VKA. Ze względu na to, że co najmniej kilka alleli genu VKORC1 reguluje jego ekspresję: 1173C>T (c.174–136C>T), 1542G>C (c.283+124G>C, rs8050894), 2255T>C (c.283+837T>C, rs2359612), 3730G>A (c.134G>A), ważne jest przyjęcie odpowiedniej nomenklatury w klasyfikacji polimorfizmów VKORC1. Dla populacji europejskiej preferuje się nomenklaturę zaproponowaną przez Geisena i wsp. [7]. W populacji amerykańskiej stosuje się nomenklaturę wprowadzoną przez Riedera i wsp. [11], opierającą się na 5 głównych haplotypach podzielonych na 2 grupy: A — haplotypy warfary-

nowrażliwe (H1 i H2), oraz B — haplotypy warfarynooporne (H7, H8, H9), które wyodrębniono na podstawie 7 SNPs silnie skorelowanych z wielkością dawki warfaryny 381, 3673 (rs17878363), 5808 (rs2884737), 6484 (rs9934438), 6853 (rs8050894), 7566 (rs2359612) i 9041 (rs7294) oraz jednego SNP o mniejszym wpływie na dawkowanie VKA 861 (sekwencja referencyjna AY587020). W przybliżeniu haplotyp A odpowiada VKORC1*2, a haplotyp B odpowiada haplotypowi VKORC1*3 i VKORC1*4 [8]. Klasyfikacja Reidera i wsp. wyjaśnia około 25% zmienności dawki warfaryny dla mieszanej populacji euro-, afro- i azjatycko-amerykańskiej [12].

Częstość występowania haplotypu VKORC1*2, który jest głównym genetycznym modulatorem różnic etnicznych w odpowiedzi na VKA, różni się znacząco w populacjach europejskiej (42%), chińskiej (95%) i afroamerykańskiej (14%) [2]. W obrębie promotora (VKORC1 –1639G>A, rs17878363) SNP sprzężony z 1173C>T w pierwszym intronie genu często występuje w populacji europejskiej, w tym polskiej (tab. 1). Częstość występowania haplotypu VKORC1*3 jest w Europie podobna do częstości VKORC1*2 [8]. W porównaniu z homozygotami VKORC1*4 lub VKORC1*3 homozygoty

VKORC1*2 wymagają mniejszej dawki warfaryny do osiągnięcia tego samego INR, ale także cechują się większymi wahaniami INR na początku terapii i w ciągu następnych 12 miesięcy [12]. Różnica w średniej dawce tygodniowej warfaryny między tymi haplotypami wynosiła ponad 40 mg (odpowiednio, 11,5 mg w porównaniu z 58,1 mg), co wiązało się ze znamienne mniejszym stężeniem S-enancjomeru leku w osoczu u homozygotycznych nosicieli haplotypu VKORC1*2 [13]. Jednak częstości występowania haplotypu VKORC1*2 u osób wymagających przewlekłej antykoagulacji i u osób zdrowych są podobne [2]. Polimorfizmowi 1173C>T przypisuje się 11–25% zmienności dawki warfaryny podczas stabilnej antykoagulacji, a osoby z genotypem VKORC1 1173CC cechują się średnio 2,4-krotnie większym zapotrzebowaniem na ten lek oraz dłuższym czasem potrzebnym do osiągnięcia stabilnego INR niż osoby z genotypem 1173TT (haplotyp VKORC1*2) [2].

W badaniu własnym przeprowadzonym wśród 57 polskich chorych leczonych głównie acenokumarem (n = 50) wykazano, że VKORC1 -1639G>A wyjaśnia z 53-procentowym prawdopodobieństwem większe zapotrzebowanie na acenokumarol, aby osiągnąć terapeutyczny wskaźnik INR: nosiciele allelu -1639G wymagali znamienne większych dawek acenokumarolu ($5,9 \pm 1,9$ mg/d.) niż chorzy mający homozygoty -1639AA ($4,1 \pm 3,3$ mg/d.) [13]. Podobną zależność zaobserwowano u chorych leczonych warfaryną [14].

Zjawisko wrodzonej oporności i słabej odpowiedzi na VKA jest najczęściej uwarunkowane występowaniem mutacji i polimorfizmów genu VKORC1. Całkowita oporność na VKA występuje bardzo rzadko, a zmniejszoną wrażliwość, często utożsamianą z „opornością na VKA”, definiuje się jako zapotrzebowanie na warfarynę w dawce ponad 15 mg dziennie, sięgające nawet 100 mg, lub u pojedynczych chorych całkowity brak odpowiedzi na leczenie VKA [15]. Najczęstszą przyczyną oporności na VKA jest, jak się obecnie uważa, mutacja Asp36Tyr w egzonie 3 VKORC1 (w postaci homozygotycznej powoduje ona niedobór czynników krzepnięcia zależnych od witaminy K typu 2), która wśród Żydów sefardyjskich i aszkenazyjskich występuje z częstością alleliczną wynoszącą odpowiednio 15% i 4%. W populacji białej jest rzadka i wiąże się z opornością na warfarynę [16]. Inne mutacje opisane u osób z opornością na VKA to punktowa mutacja w regionie transbłonowym w domenie katalitycznej — redox VKORC1 (motyw CIVC; pozycja aa 132–135) lub w domenie wiążącej 4-hydroksykumaryny (motyw TYA; pozycja aa 138–140). Kolejnym regionem wrażliwym na mutacje, który odpowiada za zablokowanie funkcji VKORC1 i oporność na VKA, jest zewnątrzbłonowa domena bogata w cysteiny (Cys43, Cys51, Ser67) [17].

CYP2C9

Gen cytochromu CYP2C9 zawierający 9 egzonów znajduje się w chromosomie 10 (q23.33). Opisano do tej pory co najmniej 50 SNPs genu CYP2C9. Jednak tylko 3 polimorfizmy — w pozycjach: 430, 818 i 1075 — mają znaczenie klinicz-

ne w stosowaniu VKA. W 1999 roku Aithal i wsp. [17] po raz pierwszy wykazali, że polimorfizmy w pozycji 430C>T (Arg144Cys) w egzonie 3. i w pozycji 1075A>C (Ile359Leu) w egzonie 7, odpowiedzialne odpowiednio za występowanie allelicznych wariantów cytochromu CYP2C9*2 i CYP2C9*3, wpływają na metabolizm warfaryny. Nosiciele allelu CYP2C9*3 charakteryzują się znacznie wolniejszym metabolizmem S-formy warfaryny (5% w porównaniu z nosicielami CYP2C9*1), podczas gdy allel CYP2C9*2 cechuje się pośrednią aktywnością katalityczną enzymu (70% w porównaniu z nosicielami CYP2C9*1) [2].

W populacji europejskiej nosicielstwo CYP2C9*2 występuje częściej niż obecność CYP2C9*3, odpowiednio: 8–12% (homozygoty 1%) i 3–8% (homozygoty 0,5%) [8, 18]. W populacjach chińskiej lub japońskiej, i u Afroamerykanów, rzadziej występują zmutowane allele CYP2C9*3 (< 1–3%) i CYP2C9*2 (< 1%) [17]. W populacjach pochodzenia afrykańskiego stwierdzono również kilka bardzo rzadkich (< 1%) alleli CYP2C9: *4, *5, *6, wykazujących znikomą aktywność enzymatyczną [17] (tab. 1).

Allele CYP2C9*2 lub *3 wiążą się ze zmniejszonym średnim zapotrzebowaniem na warfarynę, dłuższym czasem potrzebnym do osiągnięcia stabilnego dawkowania VKA, większym odsetkiem osób z wysokimi wartościami INR oraz większym ryzykiem krwawienia w czasie rozpoczynania leczenia i później. Szacuje się, że w porównaniu z homozygotami CYP2C9*1 nosiciele homozygotycznej formy CYP2C9*3 wymagają 3,3-krotnie mniejszej dawki warfaryny, aby osiągnąć taki sam INR [17]. Podobne dane wyliczono dla chorych przyjmujących acenokumarol, wykazując, że homozygoty CYP2C9*3 wymagają 2,5-krotnie mniejszej dawki tego leku w porównaniu z homozygotami CYP2C9*1 [2]. Odsetki chorych, u których INR przekroczy 3 w pierwszym tygodniu podawania warfaryny, wynoszą aż 25% u osób z przynajmniej jednym allelem CYP2C9*3, 17% u chorych z allelem CYP2C9*2, a tylko 5% w przypadku najczęstszych homozygotycznych nosicieli CYP2C9*1 [2]. W metaanalizie 9 badań klinicznych wykazano, że ryzyko wystąpienia krwawienia w czasie stosowania warfaryny jest o 90% większe dla CYP2C9*2 i o 80% dla CYP2C9*3 [19]. W małych badaniach kohortowych stwierdzono, że ryzyko krwawienia u nosicieli CYP2C9*2 lub CYP2C9*3 może być 2–3-krotnie większe niż u homozygot CYP2C9*1 [2]. Ryzyko wystąpienia INR ponad 4 w drugim tygodniu terapii warfaryną jest 10-krotnie większe u nosicieli CYP2C9*3 niż u nosicieli CYP2C9*1 [20]. Dane dla acenokumarolu są mniej jednoznaczne; np. Tassies i wsp. [21] nie wykazali zależności między wariantami CYP2C9 i powikłaniami krwotocznymi u chorych przyjmujących acenokumarol. U leczonych acenokumarem nosicieli alleli CYP2C9*2 lub *3 częstość występowania mniejszych powikłań krwotocznych również była większa niż u nosicieli allelu dzikiego CYP2C9*1 [OR=1,99 (95% CI 1,20–3,33)] [9]. Nie stwierdzono jednak różnic zależnych od tych wariantów allelicznych w częstościach występowania poważnych powi-

kłań, takich jak krwawienia skutkujące znaczącym spadkiem hemoglobiny (> 3 g/dl) [16]. Nosiciele wariantów CYP2C9*2 i CYP2C9*3 są narażeni na większe ryzyko krwawień także w czasie stosowania warfaryny [OR = 3,68 (95%CI, 1,43–9,50)] oraz należy podawać im mniejsze dawki tego leku niż nosicielom wariantu „dzikiego” genu CYP2C9*1 [16]. Podsumowując, zjawisko nadwrażliwości na VKA związane z ryzykiem krwawienia na początku terapii jest głównie uwarunkowane przez częsty polimorfizm genu cytochromu CYP2C9 odpowiedzialnego za metabolizm S-enancjomerów VKA [2, 8].

CYP4F2

Gen CYP4F2 znajduje się na chromosomie 19. (q13.12). Polimorfizm 7253232C>T (rs2108622) wiąże się z koniecznością stosowania większych dawek VKA [1]. Częstość występowania tego polimorfizmu jest stosunkowo duża (ok. 17–23%). Ze względu na dominującą rolę VKORC1 oraz CYP2C9 w farmakokinetyce leku obecnie oznaczanie tego wariantu genetycznego jest prawdopodobnie nieistotne podczas ustalania dawki leku u chorych. Polimorfizmowi CYP4F2 bowiem przypisuje się do 5% zmienności dawki warfaryny [22, 23] (tab. 1).

APOE

Apolipoproteina E (APOE) jest składową cząsteczek powstających w czasie metabolizmu chylomikronów i odgrywa kluczową rolę w wychwycie rozpuszczalnej w tłuszczach witaminy K oraz jej transporcie do wątroby. Wychwyt ten jest największy u nosicieli wariantu allelicznego apoE, $\epsilon 4$, występującego u około 20% Europejczyków, a najmniejszy u nosicieli wariantu $\epsilon 2$ stwierdzanego u 10% mieszkańców Europy (tab. 1). Polimorfizm genu apoE wpływa zatem na biodostępność witaminy K. Obserwowano, że chorzy leczeni warfaryną, którzy mają wariant $\epsilon 4$ lub $\epsilon 2$, wymagają mniejszych dawek niż osoby z wariantem $\epsilon 3$ [20]. Z drugiej strony stwierdzono, że homozygoty i nosiciele wariantu polimorficznego genu apoE ($\epsilon 4$) wymagają mniejszych tygodniowych dawek acenokumarolu niż homozygoty $\epsilon 3$ (odpowiednio: średnio $12,5 \pm 1,6$ mg i $16,1 \pm 0,04$ mg) [11]. W bardzo niejednorodnych wynikach kilkunastu małych badań nad wpływem polimorfizmu apoE na zapotrzebowanie na VKA wskazuje się wyraźnie, że te warianty alleliczne raczej nie mają klinicznego znaczenia.

GGCX

Bardzo rzadkie mutacje genu γ -karboksylazy zlokalizowanego na chromosomie 2. wiążą się z niedoborami zależnych od witaminy K czynników krzepnięcia. Ten enzym siateczki endoplazmatycznej ogranicza oksydację zredukowanej postaci witaminy K. Stwierdzono, że przynajmniej 2 SNPs genu GGCX — 12970C>G (rs11676382) i w pozycji intronu 2. (rs12714145) — w ograniczonym stopniu wpływają na dawkowanie VKA [24]. Uważa się, że oznaczanie tych mutacji

w populacji amerykańskiej nie poprawia stabilności antykoagulacji.

METODY ANALIZY GENETYCZNEJ

Najskuteczniejszą metodą służącą do wykrywania różnego rodzaju mutacji, w tym SNPs, jest metoda sekwencjonowania DNA. Dzięki tej technice wykryto i sklasyfikowano liczne mutacje genu VKORC1, w tym polimorfizmy –1639G>A (rs9923231/17878363) oraz 1173C>T (rs9934438) [8, 14, 15]. Do oznaczania znanych mutacji można zastosować szybsze i tańsze metody diagnostyczne. Jedną z metod genotypowania polimorfizmu typu SNP jest technika analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), w której produkt genu VKORC1 po reakcji PCR jest trawiony z zastosowaniem enzymu *MspI*, a następnie rozdzielany w 10-procentowym żelu polioakrylamidowym [15]. Zdecydowanie szybszą i czulszą analizę uzyskuje się, stosując metodę PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*) z użyciem specyficznych dla amplifikowanego fragmentu DNA sond fluorescencyjnych typu TaqMan [9]. Nowe możliwości przyniosła metoda HRM (*high resolution melts*), w której detekcja polimorfizmów SNP jest oparta na analizie i porównaniu kształtów krzywych denaturacji oraz precyzyjnym wyznaczeniu temperatury topnienia poszczególnych fragmentów DNA [25]. Ze względu na to, że zarówno gen VKORC1, jak i CYP2C9 są silnie polimorficzne, może zaistnieć potrzeba przebadania większej liczby SNP w krótkim czasie. Takie wymagania spełnia metoda analizy mikromacierzowej (*nanofluidic dynamic arrays*), ponieważ podczas jej zastosowania można badać 30–300 SNPs, jest szybka, tańsza i charakteryzuje się niskim odsetkiem błędów. Jedna płytki mikromacierzowa wykorzystywana w tej metodzie ma około 2000 dołków reakcyjnych o objętości kilku nanolitrów. Analiza opiera się na reakcji *real-time PCR* z wykorzystaniem sond TaqMan [26].

W Stanach Zjednoczonych na podstawie danych z 2009 roku stwierdza się, że przy koszcie badań genetycznych wynoszących około 400 dolarów istnieje obecnie tylko 10-procentowa szansa, że dawkowanie warfaryny oparte na ich wynikach będzie optymalne [23].

FARMAKOGENETYCZNE ALGORYTMY STOSOWANIA ANTAGONISTÓW WITAMINY K

W 2007 roku Amerykańska Agencja ds. Żywności i Leków (FDA) dodała do ulotki warfaryny informacje o farmakogenetycznej ocenie wrażliwości na ten lek na początku terapii, nie zalecając określonego sposobu wykorzystania tak pozyskanych danych. Jednak w wytycznych *American College of Chest Physicians* dotyczących profilaktyki i leczenia przeciwzakrzepowego opublikowanych w 2008 roku i zaadaptowanych do warunków polskich [6] nie zaleca się genotypowania VKORC1 i CYP2C9 jako metody optymalizacji leczenia VKA do czasu, gdy dostępne będą wyniki prospektywnych badań z rando-

mizacją wykazujących korzyści wynikające z takiej strategii [6]. Dotychczas nie jest bowiem pewne, czy algorytmy dawkowania VKA uwzględniające polimorfizmy VKORC1 i CYP2C9 poprawiają kontrolę antykoagulacji i, co ważniejsze, zmniejszają ryzyko powikłań takiej terapii. W pierwszym większym prospektywnym badaniu z randomizacją Andersona i wsp. [27] opublikowanym w 2007 roku wykazano podczas 3-miesięcznej obserwacji, że dawki warfaryny dobierane na podstawie danych farmakogenetycznych pozwoliły lepiej przewidzieć wielkość stabilnej dawki leku z rzadszymi i mniejszymi zmianami dawkowania, w porównaniu ze standardowym protokołem. Jednak odsetek INR poza zakresem terapeutycznym nie różnił się istotnie między grupami (odpowiednio: 30,7% i 33,1%) [27]. Międzynarodowe Konsorcjum Farmakogenetyki Warfaryny [28] opracowało algorytm dawkowania tego leku oparty na klinicznych i genetycznych danych oraz sprawdziło jego przydatność wśród ponad 4000 chorych z 9 krajów na 4 kontynentach. Algorytm farmakogenetyczny porównano z algorytmem opartym jedynie na danych demograficznych i klinicznych [wzrost, waga, rasa, stosowanie induktorów cytochromów P450 (zwiększających zapotrzebowanie na VKA nawet o 100% — fenytoiny, karbamazepiny lub rifampicyny) albo amiodaronu (zmniejszającego zapotrzebowanie na VKA średnio o 50%)]. Zaakceptowany algorytm farmakogenetyczny właściwie przewidział niskie dawkowanie warfaryny (maks. 21 mg/tydzień) u 54% chorych, którzy takich dawek wymagali (v. 33% chorych, u których stosowano algorytm tradycyjny), oraz wysokie dawkowanie warfaryny (min. 49 mg/tydzień stwierdzone tylko u 12% leczonych) u 26% (v. 9%) [28]. Najczęstsze dawkowanie wynoszące 21–49 mg tygodniowo, stwierdzone u 54% chorych przyjmujących przewlekle VKA, udało się jednak przewidzieć zarówno za pomocą nowego algorytmu uwzględniającego polimorfizmy genetyczne, jak i za pomocą 2 innych opartych jedynie na danych klinicznych lub „sztywnych” dawkach warfaryny [28]. Oszacowano, że trzeba wykonać badania genetyczne u 13 chorych, aby u 1 uzyskać istotną poprawę dawkowania warfaryny, w porównaniu z algorytmem klinicznym [28]. Jednak ta analiza nie odpowiedziała na ważne klinicznie pytania: 1. czy farmakogenetyczny algorytm dawkowania warfaryny skraca czas potrzebny do osiągnięcia stabilnego terapeutycznego INR, 2. czy wydłuża czas stabilnego INR pacjenta w przedziale terapeutycznym oraz 3. czy zmniejsza ryzyko wystąpienia krwawienia bądź incydentów zakrzepowo-zatorowych? Algorytmu farmakogenetycznego nie sprawdzono również u osób poniżej 40. roku życia leczonych VKA oraz chorych, u których przedział terapeutyczny INR wynosił 2,5–3,5.

Obecnie kilka ośrodków na świecie stosuje różne algorytmy uwzględniające dane genetyczne, czyli VKORC1 –1639G>A oraz CYP2C9*2 i *3, mimo niepełnych danych na temat przydatności takiej strategii. Walidacji tych algorytmów dokonano, opierając się zwykle na niewielkich retrospektywnych i prospektywnych badaniach kohortowych (naj-

większe obejmowało 2000 chorych). Spośród algorytmów największą popularność zdobył opracowany przez Gage'a i wsp. [29] w grupie 203 chorych wymagających antykoagulacji o małej intensywności, który uwzględnił po raz pierwszy docelowy INR (dostępny dla lekarzy pod adresem www.warfarindosing.org). W publikowanych w ostatnich miesiącach analizach porównujących różne algorytmy stwierdza się wiele trudności w interpretacji wyników, między innymi wynikających z odmiennych definicji stabilnej antykoagulacji. Panuje przekonanie, że użycie znanych dotąd algorytmów opartych na badaniu polimorfizmów genetycznych pozwala zadawalająco przewidzieć podtrzymującą dawkę warfaryny w przewlekłej terapii, ale obserwuje się tendencję do zaniżania dawki tygodniowej podczas stosowania tego podejścia farmakogenetycznego [30]. Obecnie są prowadzone duże badania prospektywne mające na celu ocenę algorytmów dawkowania warfaryny opartych na analizie polimorfizmów genów VKORC1 i CYP2C9.

PODSUMOWANIE

Łączna ocena polimorfizmów VKORC1 c. –1639G>A (odpowiada za ok. 30% zmienności dawki warfaryny) oraz CYP2C9*2 i *3 (odpowiada za ok. 15% zmienności dawki warfaryny) u osób rozpoczynających leczenie VKA, u których zapotrzebowanie na lek może się różnić nawet 20-krotnie, jest niewątpliwie jednym z najlepiej obecnie poznanych przykładów zastosowania zdobyczy farmakogenetyki w praktyce klinicznej. Prawdopodobnie w najbliższych latach ocena tych polimorfizmów będzie stosowana w terapii, szczególnie u chorych, u których podejmuje się decyzję o wprowadzeniu wieloletniej farmakoterapii VKA, a u których obserwuje się czynniki zwiększonego ryzyka krwawienia. Populacją, która jako pierwsza zacznie korzystać z algorytmów na podstawie farmakogenetyki VKA, będą chorzy z migotaniem przedsionków niezwiązany z wadą zastawkową serca. Jest to najlicniejsza grupa chorych poddawanych przewlekłej antykoagulacji i najlepiej dotychczas przebadana pod względem przydatności farmakogenetycznej strategii prowadzenia leczenia VKA. Wciąż jednak nie można wyjaśnić około 50-procentowej zmienności międzyosobniczej dawki VKA, opierając się na wynikach badań genetycznych i danych demograficznych oraz klinicznych. Warto zatem wciąż pamiętać o przekazaniu choremu leczoneму VKA często niedocenianych wskazówek dotyczących diety, leków i chorób współistniejących. Nie wiadomo, jak szybko i w jakim zakresie ocena polimorfizmów genetycznych VKORC1 i CYP2C9 znajdzie się w zaleceniach kardiologicznych towarzystw naukowych i będzie stosowana w codziennej praktyce lekarskiej.

Piśmiennictwo

1. Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. *Mayo Clin Proc*, 2009; 84: 1079–1094.
2. Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A et al. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet*, 2008; 47: 565–594.

3. Thijssen HH, Baars LG, Vervoort-Peters HT. Vitamin K 2,3-epoxide reductase: the basis for stereoselectivity of 4-hydroxycoumarin anticoagulant activity. *Br J Pharmacol*, 1988; 95: 675–682.
4. Chan E, McLachlan A, O'Reilly R et al. Stereochemical aspects of warfarin drug interactions: use of a combined pharmacokinetic-pharmacodynamic model. *Clin Pharmacol Ther*, 1994; 56: 286–294.
5. Thijssen HH, Flinois JP, Beaune PH. Cytochrome P4502C9 is the principal catalyst of racemic acenocoumarol hydroxylation reactions in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos*, 2000; 28: 1284–1290.
6. Zawilska K, Jaeschke R, Tomkowski W et al. Polskie wytyczne profilaktyki i leczenia żyłnej choroby zakrzepowo-zatorowej, uaktualnienie 2009. *Pol Arch Med Wewn*, 2009; 119 (suppl. 1): 1–69.
7. Geisen C, Watzka M, Sittinger K et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thromb Haemost*, 2005; 94: 773–779.
8. Kamali F, Khan TI, King BP et al. Contribution of age, body size, and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther*, 2004; 75: 204–212.
9. Mark L, Marki-Zay J, Fodor L, Hajdara I, Paragh G, Katona A. Polimorfizm cytochromu P450 2C9 i leczenie acenokumarolem. *Kardiologia Pol*, 2006; 64: 397–402.
10. Visser LE, Trienekens PH, De Smet PA et al. Patients with an ApoE epsilon4 allele require lower doses of coumarin anticoagulants. *Pharmacogenet Genomics*, 2005; 15: 69–74.
11. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*, 2005; 352: 2285–2293.
12. Osman A, Enstrom C, Arbring K et al. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost*, 2006; 4: 1723–1729.
13. Stepień E, Branicka A, Ciesła-Dul M et al. A vitamin K epoxide reductase-oxidase complex gene polymorphism (–1639G>A) and interindividual variability in the dose-effect of vitamin K antagonists. *J Appl Genet*, 2009; 50: 399–403.
14. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, 2005; 106: 2329–2333.
15. Harrington DJ, Underwood S, Morse C, Shearer MJ, Tuddenham EG, Mumford AD. Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost*, 2005; 93: 23–26.
16. Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A et al. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb Haemost*, 2007; 98: 570–578.
17. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999; 353: 717–719.
18. Wojtczak A, Skrętkowicz J. Kliniczne znaczenie polimorfizmu wybranych genów cytochromu P-450: rodziny CYP1, podrodziny CYP2A, CYP2B oraz CYP2C. *Pol Merk Lek*, 2009; 153: 248–252.
19. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP 2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HUGENet systemic review and meta-analysis. *Genet Med*, 2005; 7: 87–104.
20. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet*, 2007; 121: 23–34.
21. Tassies D, Freire C, Pijoan J et al. Pharmacogenetics of acenocoumarol: cytochrome P450 CYP2C9 polymorphism influence dose requirements and stability of anticoagulation. *Haematologica*, 2002; 87: 1185–1191.
22. Scott SA, Khasawneh R, Peter I et al. Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups. *Pharmacogenomics*, 2010; 11: 781–791.
23. Eckman MH, Rosand J, Greenberg SM et al. Cost-effectiveness of using pharmacogenetic information in warfarin dosing for patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*, 2009; 150: 73–83.
24. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost*, 2007; 5: 2227–2234.
25. Carlquist JF, McKinney JT, Nicholas ZP et al. Rapid melting curve analysis for genetic variants that underlie inter-individual variability in stable warfarin dosing. *J Thromb Thrombolysis*, 2008; 26: 1–7.
26. Wang J, Lin M, Crenshaw A et al. High-throughput single nucleotide polymorphism genotyping using nanofluidic Dynamic Arrays. *BMC Genomics*, 2009; 10: 561.
27. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*, 2007; 116: 2563–2570.
28. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 2009; 360: 753–764.
29. Gage BF, Eby C, Johnson JA et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 84: 326–331.
30. Le Cam-Duchez V, Fretigny M, Cailleux N et al. Algorithms using clinical and genetic data (CYP2C9, VKORC1) are relevant to predict warfarin dose in patients with different INR targets. *Thromb Res*, 2010; 126: e235-7.