

**Н. А. Ткачева², А. А. Черноносков¹, Н. В. Кох¹, Е. Н. Воронина¹,
М. Л. Филипенко¹, Г. И. Лифшиц^{1,2}, О. С. Федорова¹**

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

² Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: sandy@niboch.nsc.ru

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГЕНОТИПА VKORC1 C1173T И CYP2C9*2, *3 НА ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ МЕТАБОЛИЗМА ВАРФАРИНА *

Проведено исследование оценки влияния мутаций генов CYP2C9 и C+1173T VKORC1 на фармакокинетические параметры метаболизма варфарина у пациентов. В исследование вошли 18 лиц, принимавших варфарин в качестве антикоагулянтной терапии в течение длительного времени. Каждому больному проводилось генотипирование локусов C+1173T VKORC1, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. Методом масс-спектрометрии определяли концентрацию варфарина в плазме крови через 1, 2, 3, 8, 24, 36, 48 ч после приема лекарства. Построены фармакокинетические кривые и рассчитаны несколько фармакокинетических параметров. Проведен поиск зависимости между числовыми значениями полученных параметров и имеющимися в выборке генотипами. В пределах данной выборки влияние генов CYP2C9*2 и CYP2C9*3 установить не удалось. При оценке влияния гена VKORC1+1173 на фармакокинетические параметры обнаружена зависимость таких параметров, как K , C_{max} , MRT и $T_{1/2}$ от генотипа. Зависимости Cl , T_{max} и V_{ss} от генотипа не обнаружено. Показано, что генетические полиморфизмы гена VKORC1 вносят наибольший вклад в метаболизм варфарина.

Ключевые слова: варфарин, фармакокинетика, метаболизм, генотипирование.

В настоящее время широко назначаемым непрямым антикоагулянтом является варфарин (варфарин никомед, варфарекс, мариван). В Российской Федерации препарат принимают примерно 17 млн пациентов, в анамнезе которых установлены фибрилляция предсердий, венозные и артериальные тромбозы, системные тромбоэмболии, а также при протезах сердечных клапанов. Терапия варфарином (ВФ) продолжается длительное время, иногда пожизненно. Прием ВФ достоверно снижает риск инсульта на 68 %, рецидива системных тромбоэмболий – 75 и венозных или артериальных тромбозов – 90–95 % [1–3].

Индивидуальная терапевтическая доза ВФ варьирует от 1,25 до 10 мг и не может быть объяснена только полом, возрастом и имеющимся заболеванием. Подбор дозы препарата осуществляется на основе значений одного из показателей степени свертываемости крови – МНО (международное нормализованное отношение). У пациентов, принимающих ВФ, МНО должно находиться в диапазоне от 2 до 3. При значениях МНО менее 2 у пациента возможно развитие осложнений в виде тромбозов, а более 4 – возникает риск формирования кровотечений. Как минимум 15 % пациентов испытывали единичные кровотечения во время

* Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционного проекта СО РАН № 90 и федеральной целевой программы № 16.512.11.2073.

приема ВФ [4; 5]. Иногда, несмотря на повышение дозы препарата, желаемого эффекта достичь не удается. Более того, известны случаи отсроченных осложнений, которые возникают через несколько месяцев после индукции терапии ВФ [6].

Принцип действия средства основан на его способности выступать антагонистом витамина К в печени, что непосредственно влияет на синтез нефункциональных факторов коагуляции. Взаимодействие ВФ с витамин-К-эпоксидредуктазным комплексом (VKOR) приводит к блокированию последнего и обуславливает антикоагулянтный эффект. Изменение концентрации комплексов VKOR, доступных для связывания, влечет изменение дозы ВФ, необходимой для достижения терапевтического действия.

В гене VKORC1, который кодирует одну из субъединиц комплекса VKOR, обнаружено более десятка нуклеотидных замен, влияющих на чувствительность пациента к ВФ. Все они находятся в тесном неравновесии по сцеплению и объединены в соответствующие гаплотипы: А – ассоциирован с малыми дозами ВФ, В – с высокими дозами препарата. С полиморфными вариантами гена VKORC1 связано около 25 % вариабельности дозы ВФ.

Основным геном, кодирующим фермент, который осуществляет метаболизм ВФ в организме, является CYP2C9. Изменение его активности в значительной мере может влиять на чувствительность пациента к терапии препаратом. Показано, что вклад генотипа на эффективность лечения ВФ составляет до 40 % [7]. Известно, что распределение генетических полиморфизмов генов, посредством которых осуществляется метаболизм ВФ, в различных популяциях может отличаться [8; 9].

Цель исследования – оценить влияние мутаций генов CYP2C9 и C+1173T VKORC на фармакокинетические параметры метаболизма ВФ у пациентов.

Материал и методы

В исследование включены 18 пациентов, наблюдавшихся в Центре новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск), из них 40 % мужчин и 60 % женщин. Средний возраст исследуемых составил 50 ± 13 лет. У всех больных

в анамнезе диагностированы артериальный или венозный тромбоз, они принимали ВФ в качестве антикоагулянтной терапии в течение длительного времени. На каждого пациента заведена анкета, в которой фиксировали анамнестические сведения, принимаемую дозу ВФ в мг, показатель МНО, сопутствующие заболевания, параллельно принимаемые другие лекарственные препараты, наличие осложнений антикоагулянтной терапии ВФ. Все лица генотипированы по генам CYP2C9 и C+1173T VKORC.

Дизайн исследования одобрен локальным этическим комитетом института, больные подписали информированное согласие на участие в проекте.

Генотипирование. Проводилось генотипирование локусов C+1173T VKORC, CYP2C9*2 и CYP2C9*3. ДНК выделялась из венозной крови фенол-хлороформной экстракцией. Определение полиморфных вариантов генов осуществлялось методом Real-time ПЦР с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплиментарных полиморфной последовательности ДНК.

Пробоподготовка к масс-спектрометрии. Отбор образцов крови пациентов производили через 1, 2, 3, 8, 24, 36, 48 ч после приема стандартной (5 мг) дозы ВФ. Пробирки с кровью центрифугировали в течение 10 мин с частотой 3 000 об./мин, разделяя на фракции. Плазму объемом 1 мл переносили в пробирку на 15 мл, добавляли 1 мл 1 М серной кислоты для осуществления тотального гемолиза. После перемешивания к полученной смеси добавляли 5 мл диэтилового эфира. ВФ экстрагировали из водной фазы в органическую в течение часа при комнатной температуре путем перемешивания с частотой 240 об./мин. После экстракции органическую фазу переносили в чистую пробирку и упаривали на водяной бане при 30 С до полного высыхания. Полученный ВФ растворяли путем поэтапного добавления к сухому остатку по 150 мкл 100 и 50 % ацетонитрила.

Масс-спектрометрия. К аликвотам раствора ВФ, полученного в ходе пробоподготовки, объемом 50 мкл добавляли 250 мкл 50 % ацетонитрила. Итоговый раствор использовали для анализа методом масс-спектрометрии. Интенсивность сигнала ВФ определяли на масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ («Agilent Technologies», США). Анализируемые растворы переносили в ви-

алки объемом 1,5 мл, которые помещали в 56-луночный планшет. С помощью программного комплекса Masshunter («Agilent Technologies», США) задавали положение виалки в планшете и параметры анализа: объем аликвоты (50 мкл), скорость потока элюента (1 мл/мин, 50 % ацетонитрил), время анализа (3 мин), моду измерения (положительная), количество повторов (3–4), диапазон m/z (100–1 000).

Для построения калибровочных зависимостей готовили растворы ВФ с различной концентрацией в диапазоне от 10 до 2 000 нг/мл. Каждую точку регистрировали трижды, данные усредняли. В программе Masshunter для количественного анализа задавали анализируемую массу ВФ в 307 m/z . Находили пик ионной плотности, соответствующий данной массе, и определяли границы пика. Задавая теоретически рассчитанную концентрацию, строили отношение интенсивности сигнала к концентрации. Полученную калибровочную зависимость использовали для расчета концентраций ВФ в анализируемых образцах. Методика обработки анализируемых образцов была такой же, как и при построении калибровочных зависимостей.

Расчет фармакокинетических параметров. Рассчитанные значения концентрации ВФ усредняли для каждой точки. Зависимости концентрации ВФ от времени обрабатывали некомпартментным методом анализа в программе NCOMP 3.1. Для каждого пациента на основе экспериментальных данных рассчитаны и проанализированы наиболее значимые для описания метаболизма ВФ фармакокинетические параметры.

1. Клиренс Cl (мл/ч) – показатель скорости очищения плазмы крови от лекарственного препарата в единицу времени в процессе его биотрансформации и выведения из организма.

2. Среднее время удерживания MRT (ч) – показатель, характеризующий время, которое лекарственный препарат находится в организме.

3. Кажущийся объем распределения V_{ss} (мл/кг) – отношение общего содержания вещества в организме к его сывороточной концентрации.

4. Время полувыведения $T_{1/2}$ (ч) – время, в течение которого концентрация препарата в организме снижается на 50 %.

5. Константа выведения K ($ч^{-1}$) – величина, характеризующая скорость исчезновения препарата из организма путем биотрансформации.

6. Максимальная концентрация C_{max} (нг/мл) – максимально достигаемая концентрация лекарственного средства в организме.

7. Время достижения максимальной концентрации T_{max} (ч) – время, за которое достигается максимальная концентрация.

Поиск зависимостей значений фармакокинетических параметров от генотипа проводили путем сопоставления и анализа отдельных фармакокинетических параметров с аллелями одного или двух генов ($C+1173T$ VKORC и / или CYP2C9).

Результаты исследования и обсуждение

Процесс метаболизма лекарственного средства может быть охарактеризован фармакокинетическими параметрами, которые рассчитываются из изменения концентрации ВФ в крови пациента в зависимости от времени. Пример такой зависимости представлен на рисунке. Фармакокинетическую кривую можно разбить на два участка: рост концентрации ВФ и ее последующее снижение. Увеличение концентрации в основном связано с процессом всасывания ВФ в желудочно-кишечном тракте, тогда как снижение вызвано метаболизмом препарата и его выведением из организма. Показано, что период увеличения концентрации ВФ варьируется от 1 до 6 ч после приема лекарства. Значение максимальной концентрации, достигаемой за это время, установлено в широких пределах – от 150 до 2 500 нг/мл. Снижение уровня ВФ до начальной концентрации наблюдается в течение длительного времени – от 70 до 100 ч.

Для оценки влияния мутаций генов CYP2C9 и $C+1173T$ VKORC на фармакокинетические параметры необходимо было установить связь между числовыми значениями полученных параметров и имеющимися в выборке генотипами. Сочетание аллельных вариантов генов CYP2C9*2, CYP2C9*3 и VKORC1 приводило к различным типам метаболизма ВФ и позволяло выделить быстрый, средний и медленный типы метаболизма. Данные типы тесно коррелируют с эффективной дозой ВФ [10].

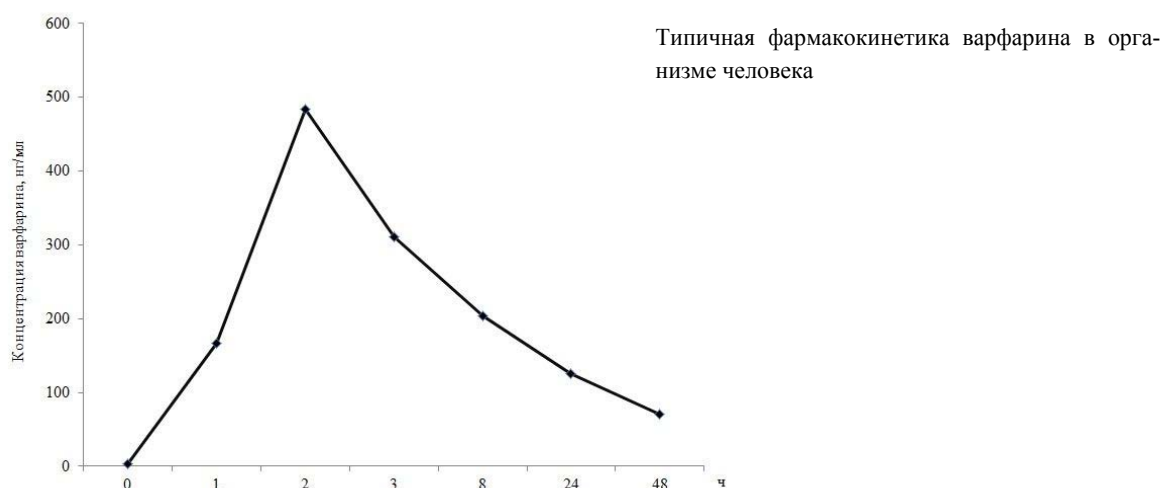


Таблица 1

Частота встречаемости генотипов исследуемых полиморфных локусов у обследованных пациентов ($n = 18$)

Генотип	Количество пациентов	
	абс.	%
CYP2C9*1*1 VKORC1 +1173 CC	7	38,5
CYP2C9*1*1 VKORC1 +1173 CT	4	22,5
CYP2C9*1*1 VKORC1 +1173 TT	4	22,5
CYP2C9*1*2 VKORC1 +1173 CC	1	5,5
CYP2C9*1*2 VKORC1 +1173 CT	1	5,5
CYP2C9*1*3 VKORC1 +1173 TT	1	5,5

Таблица 2

Сопоставление фармакокинетических параметров генам CYP2C9*1*1, VKORC1 +1173

Параметр	CYP2C9*1*1			CYP2C9 VKORC1
	VKORC1 +1173 T/T ($n = 4$)	VKORC1 +1173 C/C ($n = 7$)	VKORC1 +1173 C/T ($n = 4$)	
Cl , мл/ч	$1,3 \pm 1,1$	$1,5 \pm 1,4$	$0,5 \pm 0,5$	$3,0 \pm 6,0$
MRT , ч	41 ± 32	33 ± 11	33 ± 5	31 ± 20
V_{SS} , мл/кг	48 ± 55	51 ± 57	13 ± 13	35 ± 46
K , $\times 10^{-2}$ ч ⁻¹	$2,0 \pm 1,0$	$2,7 \pm 0,6$	$3,4 \pm 0,6$	$3,7 \pm 1,6$
$T_{1/2}$, ч	38 ± 16	25 ± 5	18 ± 6	23 ± 12
T_{max} , ч	$6,4 \pm 7,7$	$1,3 \pm 0,7$	$7,0 \pm 11,0$	$3,0 \pm 6,0$
C_{max} , $\times 10^2$ нг/мл	$2,9 \pm 3,1$	$5,1 \pm 4,0$	$8,3 \pm 7,0$	$4,8 \pm 4,0$

По результатам генотипирования пациентов по обозначенным полиморфным локусам генов CYP2C9 и VKORC1 были получены научные данные (табл. 1).

Ген CYP2C9*3 только в 5 % случаев изученной выборки был представлен аллелями A/C (генотип CYP2C9*1*3), в пределах данной выборки невозможно достоверно установить его вклад в метаболизм ВФ. Поэтому анализ и поиск зависимостей проведен по генам CYP2C9*2 и VKORC1. Анализ проводили как по отдельно взятым генам, так и по двум генам одновременно.

При поиске зависимостей фармакокинетических параметров относительно отдельно взятого гена CYP2C9*2 достоверных результатов не получено, вероятно, вследствие того, что данный ген в 16 из 18 случаев представлен аллелями C/C (генотипы CYP2C9*1*1 и CYP2C9*1*3). При оценке влияния отдельно взятого гена VKORC1 +1173 на фармакокинетические параметры обнаружена зависимость таких параметров, как K , C_{\max} , MRT и $T_{1/2}$ от генотипа. Зависимости Cl , T_{\max} и V_{ss} от генотипа не обнаружено.

Для уточнения полученных данных провели одновременное сопоставление аллелей генов CYP2C9*3 и VKORC1 с фармакокинетическими параметрами (табл. 2).

Установлено, что в ряду CYP2C9*1*1, VKORC1 +1173 – T/T, C/C, C/T наблюдалась тенденция к увеличению значений K , C_{\max} и снижению MRT и $T_{1/2}$. Одновременное снижение MRT и $T_{1/2}$ объясняется тем, что оба параметра характеризуют время выведения препарата из организма. Однако $T_{1/2}$ более точно характеризует процесс метаболизма ВФ. С другой стороны, параметры K и $T_{1/2}$ обратно пропорциональны, хотя $T_{1/2}$ также характеризует скорость выведения препарата из организма. Этим объясняется одновременное увеличение K и снижение $T_{1/2}$. Полученные данные не согласуются с известными данными литературы, согласно которым такие тенденции к росту и падению должны наблюдаться в ряду CYP2C9*1*1, VKORC1 +1173 – T/T; C/T; C/C [8, 10]. Такое отличие, с одной стороны, может являться следствием малой выборки пациентов, с другой – территориальностью проживания обследованных пациентов. Для более точного определения зависимости фармакокинетических параметров от генотипа и повышения достоверности результа-

тов необходимо продолжить исследование и увеличивать выборку пациентов.

Заключение

Проведенное генотипирование обследованных пациентов показало, что распределение генотипов в популяции соответствует среднему распределению. Основным генотипом CYP2C9*2 и CYP2C9*3 является дикий тип (C/C и A/A), тогда как по гену VKORC1 распределение между диким типом и гетерозиготным полиморфным вариантом равномерно.

В ходе исследования оптимизирована методика пробоподготовки и определения ВФ в плазме крови человека. Также разработан алгоритм поиска соответствия фармакокинетических параметров генотипу. Показано, что генетические полиморфизмы гена VKORC1 вносят наибольший вклад в метаболизм ВФ. Генетические полиморфизмы гена VKORC1 значительно влияют на изменение таких фармакокинетических параметров, как среднее время удерживания, константа выведения, время полувыведения, максимальная концентрация. Полученные данные могут служить основой для дальнейших исследований и использоваться для определения влияния генотипа на подбор эффективной дозы ВФ при лечении пациентов.

Список литературы

1. Cannegieter S. C., Rosendaal F. R., Wintzen A. R., Meer F. J. van der, Vandenbroucke J. P., Briet E. Optimal Oral Anticoagulant Therapy in Patients with Mechanical Heart Valves // *N. Engl. J. Med.* 1995. Vol. 333, № 1. P. 11–17.
2. Hart R. G., Benavente O., McBride R., Pearce L. A. Antithrombotic Therapy to Prevent Stroke in Patients with Atrial Fibrillation: a Meta-analysis // *Ann. Intern. Med.* 1999. Vol. 131, № 7. P. 492–501.
3. The Medical Research Council's General Practice Research Framework. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk // *Lancet.* 1998. Vol. 351, № 9098. P. 233–241.
4. Krauth D., Holden A., Knapic N., Liepman M., Ansell J. Safety and Efficacy of Long-

term Oral Anticoagulation in Cancer Patients // *Cancer*. 1987. Vol. 59, № 5. P. 983–985.

5. Levine M., Raskob G., Landefeld C. S., Kearon C. Hemorrhagic Complications of Anticoagulant Treatment // *Chest*. 1998. Vol. 114, № 5. P. 511–523.

6. Stangier J., Rathgen K., Stahle H., Gansser D., Roth W. The Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Tolerability of Dabigatran Etxilate a New Oral Direct Thrombin Inhibitor, in Healthy Male Subjects // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2007. Vol. 64, № 3. P. 292–303.

7. Caldwell M. D., Awad T., Johnson J. A., Gage B. F., Falkowski M., Gardina P., Hubbard J., Turpaz Y., Langae T. Y., Eby C., King C. R., Brower A., Schmelzer J. R., Glurich I., Vidaillet H. J., Yale S. H., Qi Zhang K., Berg R. L., Burmester J. K. CYP4F2 Genetic Variant Alters Required Warfarin Dose // *Blood*. 2008. Vol. 111, № 8. P. 4106–4112.

8. Gage B. F., Eby C., Johnson J. A., Deych E., Rieder M. J., Ridker P. M., Milligan P. E., Grice G., Lenzini P., Rettie A. E., Aquilan-

te C. L., Grosso L., Marsh S., Langae T., Farnett L. E., Voora D., Veenstra D. L., Glynn R. J., Barrett A., McLeod H. L. Use of Pharmacogenetic and Clinical Factors to Predict the Therapeutic Dose of Warfarin // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008. Vol. 84, № 3. P. 362–331.

9. Rieder M. J., Reiner A. P., Gage B. F., Nickerson D. A., Eby C. S., McLeod H. L., Blough D. K., Thummel K. E., Veenstra D. L., Rettie A. E. Effect of VKORC1 Haplotypes on Transcriptional Regulation and Warfarin Dose // *N. Engl. J. Med.* 2005. Vol. 352, № 22. P. 2285–2293.

10. Wu A. H., Wang P., Smith A., Haller C., Drake K., Linder M., Valdes R. Jr. Dosing Algorithm for Warfarin Using CYP2C9 and VKORC1 Genotyping from a Multi-ethnic Population: Comparison with Other Equations // *Pharmacogenomics*. 2008. Vol. 9, № 2. P. 169–178.

Материал поступил в редколлегию 14.06.2011

N. A. Tkacheva, A. A. Chernonosov, N. V. Kokh, E. N. Voronina, M. L. Filipenko,
G. I. Lifshits, O. S. Fedorova

STUDY OF THE INFLUENCE OF GENOTYPE VKORC1 C1173T AND CYP2C9*2, *3 ON THE PHARMACOKINETIC PARAMETERS OF THE WARFARIN METABOLISM

Study assessing the influence of CYP2C9 and C+1173T VKORC1 genes mutations on pharmacokinetic parameters of the warfarin metabolism in residents of the West Siberian region was carried out. In this study 18 patients taking warfarin as anticoagulant therapy for a long time were included. Each patient was genotyped at loci C+1173T VKORC1, CYP2C9*2 and CYP2C9*3. The concentration of warfarin in blood plasma was determined at 1, 2, 3, 8, 24, 36, 48 hours after warfarin taking by mass-spectrometry method. Pharmacokinetic curves were constructed and several pharmacokinetic parameters were calculated. The relationship between the numerical values of the obtained parameters and available in a sample genotypes was analyzed. It was found that effect of genes CYP2C9*2 and CYP2C9*3 could not be ascertained within this sample. The dependence of genotype on pharmacokinetic parameters such as K , C_{max} , MRT and $T_{1/2}$ was determined during assessing the influence of the gene VKORC1+1173 on parameters. The dependence Cl , T_{max} and V_{ss} of genotype were not detected. It was shown that genetic polymorphisms of the gene VKORC1 contribute most to the metabolism of warfarin.

Keywords: warfarin, pharmacokinetics, metabolism, genotyping.