Медико-диагностична лаборатория ЦибаЛаб ЕООД
София 1330, бул."Акад. И. Е. Гешов" 2Е (Бизнес Център Сердика), тел. 920 00 11, 0889 437 403,
www.cibalab.com, e-mail: office@cibalab.com

ЛАБОРАТОРИЯ CibaLab

ТЕСТ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЧУВСТВИТЕЛНОСТ КЪМ АНТИКОАГУЛАНТИ ОТ ГРУПАТА НА КУМАРИНИТЕ

М. Боянова, Д-р Молекулярна биология

1. Същност

Антикоагулантите от групата на кумарините (warfarin – Coumadin® , acenocoumarol – Sintrom® и phenprocoumon - Marcumar®) са ефективни антитромботични лекарствени средства за лечение и превенция на тромбемболични състояния.

Установено е, че вариацията в индивидуалната доза на кумариновите антикоагуланти е предимно генетично обусловена. Главният чернодробен ензим, участващ в метаболизма и клирънса на S-формата на кумарина(активната форма на лекарственото средство) е цитохром P450 изоензим 2C9(CYP2C9). За чувствителността на организма към кумариновите антикоагуланти играят роля:

- генетичните варианти на гените за цитохром P450 изоензим 2C9(CYP2C9)
- гените за витамин К епоксид редуктазата комплекс1(VKORC1)

1.1 Цитохром P450 изоензим 2C9(CYP2C9):

Главният чернодробен ензим, участващ в метаболизма и клирънса на S-формата на кумарина(активната форма на лекарственото средство) е цитохром P450 изоензим 2C9(CYP2C9).

Клинично значение имат два широко разпространени полиморфизми(единични нуклеотидни замени) в CYP2C9 гена:

- *2 (430 C>T) – замяна на цитозин с тимин в позиция 430
- *3 (1075 A>C) – замяна на аденин с цитозин в позиция 1075

Те намаляват активността на ензима, което на свой ред води до понижаване нивото на метаболизиране на кумарина с 30% и с 80% респективно, **а това налага и намаляване на необходимата доза**. При пациенти с един или повече от тези варианти обикновено е необходимо по-дълго време за постигане на стабилен INR поради удължения полуживот на медикамента в циркулацията.

1.2 VKORC1

Антикоагулантите от групата на кумарините (warfarin – Coumadin® , acenocoumarol – Sintrom® и phenprocoumon - Marcumar®) са витамин К антагонисти, т.е. те проявяват терапевтичният си ефект чрез инхибиране на ензим от метаболизма на витамин К – витамин К епоксид редуктаза, което води до намаляване нивата на активираните от витамин К кръвосъсирващи фактори (фактор II, VII, IX и X). Известно е, че полиморфизми (единични нуклеотидни замени) в гена за витамин К епоксид редуктаза комплекс 1 (VKORC1) засягат чувствителността на ензима към кумарина и допринасят за вариацията на необходимата доза между индивидите. Сред тях най-голямо значение има замяната на гуанин с аденин (-1639 G>A).При това се намалява експресията на ензима, което води до понижаване нивата на активираните от витамин К кръвосъсирващи фактори. В резултат на това се повишава чувствителността към кумарина, т.е. антикоагулация се постига при по-ниска доза.

2.Метод на определяне

PCR амплификация с последваща детекция на PCR продуктите с хибридизация.

3.Клинично значение и информативно съдържание

Неподходящо определената доза може да доведе до застрашаващи живота усложнения като кръвоизливи при предозиране или повтарящи се тромботични състояния при недостатъчност на дозата. Внимателно мониториране на кръвната коагулация чрез измерване на протромбиновото време, както и INR (intrenational normalized ratio) е съществено до установяване на стабилна поддържаща доза.

Фармакогенетичният подход при терапията с антикоагуланти:

- Предоставя информация за индивидуалната генетична вариация, засягаща терапевтичния отговор
- Осигурява по-ефективна и безопасна антикоагулантна терапия.

Изследването за наличие на генетични варианти в гена CYP2C9 и VKORC1 дава възможност за:

- Намаляване риска от неподходящо дозиране при започване на терапията и свързаните с това усложнения;
- По-точно определяне на поддържащата доза кумарин;
- Намаляване времето за достигане на стабилна поддържаща доза.

Изследването не замества мониторирането на кръвната коагулация с определяне на протромбиново време и INR, но е в помощ на клинициста за прецизиране на индивидуалната доза.

3.1. Изследването за полиморфизмите ***2**(430 C>T) и ***3**(1075 A>C) в CYP2C9 гена определя статуса за метаболизиране на кумарина и поставя пациента в една от следните три категории:

Нормално метаболизиращ. Представлява норма на капацитета за метаболизиране кумарина. Генотипът CYP2C9*1/*1 означава дивия тип на гена, при който и двете копия на гена не носят полиморфизми.

Умерено метаболизиращ. Хетерозиготно носителство на CYP2C9*1/*2 или CYP2C9*1/*3 , т.е едното копие на гена има генетичен дефект. За оптимален терапевтичен отговор е необходимо намаляване на дозата - при CYP2C9*1/*2 с около 17%, а при CYP2C9*1/*3 с около 36%.

Слабо метаболизиращ. Индивидите, при които и двете копия на гена носят полиморфизъм(CYP2C9*2/*2, CYP2C9*2/*3 или CYP2C9*3/*3), водещ до намалена ензимна активност са застрашени в по-голяма степен от кръвоизливи, което изисква по-голямо намаление на дозата.

Времето за достигане на стабилна поддържаща доза варира в зависмост от CYP2C9 генотипа, както е показано в таблицата по-долу. Препоръчително е коригирането на дозата да се съгласува с установения генотип не по-рано от ден 5-ти.

CYP2C9 генотип	Време за достигане на стабилност на дозата
***1/*1**, нормално метаболизиращ	4- 5 дни
***1/*2** умерено метаболизиращ	8 -10 дни
***1/*3**, умерено метаболизиращ ***2/*2**, ***2/*3**, ***3/*3** слабо метаболизиращ	> 2 – 4 седмици

3.2. Изследването за VKORC1 полиморфизъм -1639 G>A показва чувствителността към кумариновите антикоагуланти. В зависимост от установеният генотип кумариновата чувствителност се определя като:

Ниска – при хомозиготи по нормалния алел (GG)

Умерена - при хетерозиготи (GA, едното копие на гена е с генетичен дефект), необходимо е намаляване на дозата Coumadin® или Sintrom® с 21-28%,

Слаба – при хомозиготи по мутантния алел (AA) е необходимо намаляване на дозата с 27-56%.

3.3. Комбинации от генетични варианти на гените за витамин К епоксид редуктаза комплекс 1 (VKORC1) и цитохром Р 450 изоензим 2С9 (CYP2C9; главният чернодробен ензим, участващ в метаболизма и клирънса на кумарина) ще доведат до **адитивен ефект и допълнително изискване за намаляване на дозата**. Таблицата по-долу представлява примерен модел за илюстриране на относителното намаляване на дозата при комбиниране на различните полиморфизми.

CYP2C9 генотип	VKORC1 генотип		
	GG	*GA*	*AA*
*CYP2C9 *1/*1*	●●●●●	●●●●	●●●
*CYP2C9 *1/*2*	●●●●	●●●	●●◖
*CYP2C9 *1/*3*	●●●◖	●●◖	●●
*CYP2C9 *2/*2*	●●●	●●◖	●●
*CYP2C9 *2/*3*	●●◖	●●	●◖
*CYP2C9 *3/*3*	●●◖	●●	●

Резултатите от изследването трябва да се интерпретират в контекста на индивидуалната клинична ситуация. Във всички случаи е необходимо изясняване за допълнителен прием на други лекарства. Редица медикаменти се метаболизират също от CYP2C9 ензима и ако се приемат паралелно с кумаринови производни това може да доведе до непълно метаболизиране на кумарина поради конкуренция за действието на ензима; други лекарствени средства инхибират ензима.

Индикации за изследване:

- При пациенти с необходимост от започване на терапия с антикоагуланти от групата на кумариновите производни
- При пациенти със започната терапия с антикоагуланти от групата на кумариновите производни с история за нестабилен INR

4.Материал за изследване

Венозна кръв с K2EDTA антикоагулант

Библиографска справка:

1.Becquemont L.Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice.Eur J Clin Pharmacol. 2008 Oct;64(10):953-60.

2.Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F.The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen.Blood. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.

3.Spreafico M, Lodigiani C, van Leeuwen Y, Pizzotti D, Rota LL, Rosendaal F, Mannucci PM, Peyvandi F.Effects of CYP2C9 and VKORC1 on INR variations and dose requirements during initial phase of anticoagulant therapy.Pharmacogenomics. 2008 Sep;9(9):1237-50.

4.Montes R, Ruiz de Gaona E, Martínez-González MA, Alberca I, Hermida J.The c.-1639G > A polymorphism of the VKORC1 gene is a major determinant of the response to acenocoumarol in anticoagulated patients.Br J Haematol. 2006 Apr;133(2):183-7.

07.11.2013г. *С пожелания за ползотворна съвместна дейност:*

(Д-р Д. Петкова –управител)