

ФАРМАКОГЕНЕТИКА ВАРФАРИН КЛОПИДОГРЕЛ

ФАРМАКОГЕНЕТИКА

КОМПЛЕКТ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ ВАРФАРИНА, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «ФАРМАКОГЕНЕТИКА ВАРФАРИН» № ФСР 2010/08633

В настоящее время генетические особенности человека расцениваются как ведущий фактор, определяющий чувствительность пациента к оральным антикоагулянтам, а следовательно и обуславливающий величину поддерживающей дозы орального антикоагулянта.

Лечение непрямыми антикоагулянтами требует решения двух задач: подбор терапевтической дозы препарата при максимально коротком времени индукции без эпизодов чрезмерной гипокоагуляции и кровотечения и поддержание постоянного оптимального уровня гипокоагуляции.

Варфарин — антикоагулянт непрямого действия.

Показания к назначению варфарина:

- ❖ лечение и профилактика тромбоза и тромбоэмболии сосудов:
 - острый венозный тромбоз;
 - тромбоэмболия легочной артерии;
- ❖ послеоперационный тромбоз;
- ❖ повторный инфаркт миокарда;
- ❖ в качестве дополнительного лекарственного средства при проведении хирургического или тромболитического лечения тромбоза, а также при электрической кардиоверсии мерцательной аритмии;
- ❖ рецидивирующий венозный тромбоз;
- ❖ повторная тромбоэмболия легочной артерии;
- ❖ протезирование клапанов сердца и сосудов;
- ❖ тромбоз периферических, коронарных и мозговых артерий;
- ❖ вторичная профилактика тромбоза и тромбоэмболии после инфаркта миокарда и при мерцании предсердий.

При использовании варфарина необходимо проводить измерение **МНО** (*международного нормализованного отношения*), т.к. основным осложнением терапии являются кровотечения, которые могут оказаться фатальными.

Генетические факторы наравне с клиническими являются значимыми в подборе индивидуальных доз варфарина.

- ❖ **Генетические факторы** определяют до 53–54% вариабельности дозы.
- ❖ **Клинические факторы** определяют вариабельность дозы на 17–21%.

Наиболее значимые гены, определяющие индивидуальную реакцию на терапию варфарином:

- CYP2C9;
- CYP4F2;
- VKORC1.

Они принимают участие в обмене в основном S-изомера варфарина, являющегося в 5 раз более активным, чем R-изомер, и потому имеющим большее клиническое значение (рис. 1).

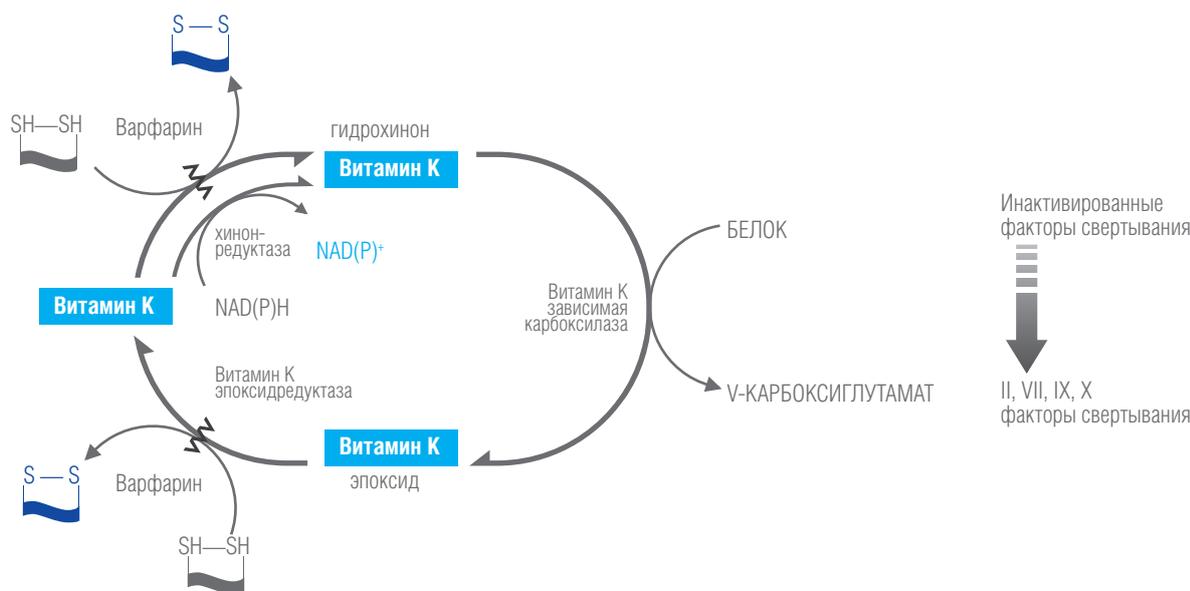


Рис. 1. Фармакология варфарина и цикл витамина К

CYP2C9 — главный фермент метаболизма оральных антикоагулянтов, в том числе варфарина. На сегодняшний день для данного гена выявлено более 20 аллельных вариантов или полиморфизмов. Самым распространенным аллельным вариантом является *CYP2C9*1* (*CYP2C9* 430 CC и *CYP2C9* 1075 AA — аллель дикого типа), при котором скорость метаболизма варфарина стандартна. Обладателей подобного генотипа принято называть «распространенными» метаболизаторами: метаболизм оральных антикоагулянтов проходит с нормальной интенсивностью, а среднетерапевтические дозы и уровни МНО являются для таких людей наиболее приемлемыми.

Носители аллельных вариантов *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3* (*CYP2C9*2* — *CYP2C9* 430 CT и TT, *CYP2C9*3* — *CYP2C9* 1075 AC и CC) являются «медленными» метаболизаторами. Именно у носителей такого генотипа риск развития геморрагических осложнений наиболее велик (рис. 2).

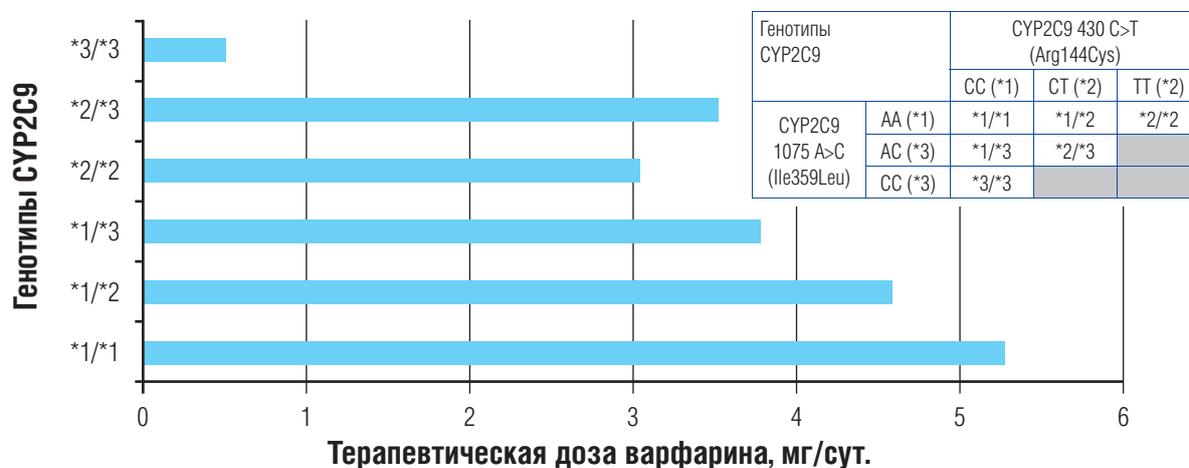


Рис. 2. Различная чувствительность к варфарину в зависимости от генотипа

Так, у гомозигот CYP2C9*2/*2 и CYP2C9*3/*3 метаболизм варфарина снижен в большей степени, чем у гетерозигот CYP2C9*1/*2 и CYP2C9*1/*3. Самая низкая активность CYP2C9 наблюдается у гомозигот CYP2C9*3/*3: она составляет, по мнению некоторых авторов, около 5% от нормы. Пациенты с функционально-дефектными аллелями CYP2C9*2 и CYP2C9*3 требуют более длительной процедуры титрования дозы варфарина до уровня поддерживающей. Кроме того, они могут демонстрировать внезапное чрезмерное повышение уровня МНО — как в период подбора дозы варфарина, так и при длительной терапии.

VKORC1 — трансмембранный белок, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов, является мишенью для непрямых антикоагулянтов. Полиморфизм гена *VKORC1* (наиболее значимый: G1639A) связывают с кумаринорезистентностью и образованием так называемого фенотипа кровотечений, возникающего из-за врожденного дефицита витамин К-зависимых факторов свертывания крови.

Существуют два основных гаплотипа, которые отличаются по чувствительности к варфарину в зависимости от расы:

- *низко-дозовый гаплотип группы (А)*: у этнических представителей белой расы (в большей степени) и азиатов (в меньшей степени), как правило, отмечается большая чувствительность к действию варфарина — более быстрое достижение целевого уровня МНО, но и более частые кровотечения;
- *высоко-дозовый гаплотип группы (В)*: афроамериканцы относительно устойчивы к действию варфарина.

CYP4F2 — лейкотриен-В4-омега-гидроксилаза-1, семейство цитохрома Р 450. Кодирован фермент, участвующий в цикле витамина К как регулятор образования и активации факторов свертывания крови. У носителей генотипа СС по полиморфному маркеру V433M гена *CYP4F2* отмечается низкая скорость биотрансформации витамина К до неактивных метаболитов в печени, что объясняет более высокую чувствительность этих пациентов к оральным антикоагулянтам.

Для расчета индивидуальной дозы варфарина разработаны специальные алгоритмы, наиболее известный находится на сайте WarfarinDosing.org (рис. 3).

The screenshot shows the WarfarinDosing.org website interface. The main heading is "WARFARINDOSING" with the URL "www.WarfarinDosing.org". On the left, there is a navigation menu with links: Warfarin Dosing, Outcomes, Hemorrhage Risk, Patient Education, Contact Us, References, Glossary, and About Us. The main content area is a form titled "Required Patient Information" and "Genetic Information".

Required Patient Information:

- Age: []
- Sex: [-Select-]
- Ethnicity: [-Select-]
- Race: [-Select-]
- Weight: [] lbs or [] kgs
- Height: ([] feet and [] inches) or ([] cms)
- Smokes: [-Select-]
- Liver Disease: [-Select-]
- Indication: [-Select-]
- Baseline INR: []
- Target INR: [] Randomize & Blind
- Amiodarone/Cordarone® Dose: [] mg/day
- Statin/HMG CoA Reductase Inhibitor: [-Select-]
- Any azole (eg. Fluconazole): [-Select-]
- Sulfamethoxazole/Septtra/Bactrim/Cotrim/Sulfatrim: [-Select-]

Genetic Information:

- VKORC1-1639/3673: [Not available/pending]
- CYP4F2 V433M: [Not available/pending]
- GGCX rs11676382: [Not available/pending]
- CYP2C9*2: [Not available/pending]
- CYP2C9*3: [Not available/pending]
- CYP2C9*5: [Not available/pending]
- CYP2C9*6: [Not available/pending]

At the bottom left, there is a footer: "User: Patient: Version 17.4 Build : June 29, 2009".

Рис. 3. WarfarinDosing.org

Они основаны на оценке как клинических (возраст, пол, национальность пациента, образ жизни (курение), наличие или отсутствие заболеваний печени, текущее и целевое МНО, прием лекарств, модулирующих действие варфарина, и т.д.), так и генетических факторов (генотипы CYP29C, CYP4F2, VKORC1 и т.д.).

Для реализации фармакогенетического подхода к подбору дозы варфарина в российской популяции и под эгидой Российского кардиологического общества (РКО), Всероссийского научного общества кардиологов (ВНОК) и Национального общества по атеротромбозу (НОАТ) было организовано рандомизированное, проспективное исследование ВАРФАГЕН. Было установлено, что среди пациентов Российской Федерации, нуждающихся в приеме варфарина, суммарная частота встречаемости генотипов, определяющих клинически значимое нарушение чувствительности к варфарину, составляет более 30%.

Показания к генетическому анализу

- ❖ Пациенты из высокой группы риска кровотечений на фоне приема непрямых антикоагулянтов:
 - пациенты, имеющие повторные кровотечения или геморрагические осложнения в анамнезе;
 - пожилые пациенты (75 лет и старше);
 - пациенты с сопутствующими заболеваниями печени (при двукратно возросшем уровне трансаминаз АЛТ или АСТ, а также в том случае, когда альбумин <3,6 г/дл);
 - пациенты с сопутствующими заболеваниями почек (с клиренсом креатинина <30 мл/мин);
 - пациенты с тромбоцитопенией;
 - пациенты с сахарным диабетом;
 - пациенты, принимающие лекарственные препараты, которые потенцируют действие антагонистов витамина К (аллопуринол, амиодарон, анаболические стероиды, парацетамол, ацетилсалициловая кислота, ко-тримоксазол, витамин Е, даназол, дизопирамид, дисульфирам, флуконазол, изониазид, ифосфамид, кетопрофен, клотримоксазол, клофибрат, ловастатин, метронидазол, миконазол, налидиксовая кислота, кетоконазол, норфлоксацин, омепразол, офлоксацин, пароксетин, пропafenон, сульфинпиразон, симвастатин, сулиндак, тамоксифен, тетрациклин, левотироксин натрия, тиклопидин, толметин, флувоксамин, фенилбутазон, фенитоин, фторурацил, хинидин, хлоралгидрат, цефалоспорины, циметидин, ципрофлоксацин, эритромицин);
 - пациенты женского пола;
 - пациенты, употребляющие алкоголь;
 - плановое назначение варфарина;
- ❖ Длительный прием варфарина.
- ❖ Неустойчивость значений МНО.

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ КЛОПИДОГРЕЛА, МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ «ФАРМАКОГЕНЕТИКА КЛОПИДОГРЕЛ» №РЗН 2020/9678

Антиагреганты играют ключевую роль в предотвращении развития атеротромбоза. Доказана польза от применения антиагрегантов для вторичной профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Прием препаратов, подавляющих функцию тромбоцитов, приводит к уменьшению количества случаев инфаркта миокарда, инсульта и атеротромбоза другой локализации.

Выделяют 5 классов антиагрегантов, различающихся по механизму действия.

- Класс I — ингибиторы циклооксигеназы-1 — ЦОГ-1 (ацетилсалициловая кислота).
- Класс II — антагонисты рецепторов P2Y₁₂ — тиклопидин, клопидогрель, прасугрель, тикагрелор.
- Класс III — ингибиторы гликопротеина (ГП) IIb/IIIa — абциксимаб, эптифибатид, тирофибан.
- Класс IV — ингибиторы фосфодиэстеразы.
- Класс V — ингибиторы рецепторов тромбина PAR.

Клопидогрель — один из наиболее широко применяемых в настоящее время в мире антиагрегантов, который необратимо ингибирует рецептор аденозиндифосфата (ADP, кодируемый геном P2RY₁₂) на тромбоцитах, что в свою очередь ингибирует фибриногеновый рецептор (GP IIb/IIIa, кодируемый геном ITGB3).

Фармакологический ответ на клопидогрель отличается значительной вариабельностью, которая может быть обусловлена двумя независимыми группами факторов: клинико-демографическими (включая взаимодействие с другими лекарственными средствами) и генетическими.

К первой группе факторов относятся: пол и возраст пациента; ИМТ; наличие заболеваний, таких как сахарный диабет, системное воспаление, острый коронарный синдром, хроническая сердечная недостаточность, почечная недостаточность; прием лекарственных средств (в том числе: ингибиторов протонной помпы, блокаторов кальциевых каналов, статинов, антикоагулянтов-производных кумарина, рифампицина, кетоконазола); уровень липопротеидов низкой плотности, глюкозы и креатинина; скорость клубочковой фильтрации по формуле MDRD и т.д.

К ведущим генетическим факторам, влияющим на антиагрегантный эффект клопидогреля, относят однонуклеотидные полиморфизмы в генах цитохромов CYP P450 и гене ABCB1 (от англ. ATP-binding cassette, subfamily B, или MDR1), кодирующем белок-транспортер, который отвечает за выведение из клетки лекарственных препаратов.

Наибольшую клиническую значимость имеют полиморфизмы гена CYP2C19, перечисленные ниже.

- Аллельный вариант CYP2C19*1 («дикий тип») — определяет референсный уровень ферментативной активности CYP2C19, соответствующий нормальному уровню биотрансформации клопидогреля. Носителей аллельного варианта CYP2C19*1 относят к так называемым «нормальным метаболитаторам».
- Аллельный вариант CYP2C19 rs4244285 (с.681G>A), или CYP2C19*2, — частота встречаемости колеблется в зависимости от расовой принадлежности: порядка 15–20% — у европеоидов и представителей негроидной расы, а у монголоидов — 30–35%. Аллельный вариант определяет низкую ферментативную активность цитохрома и, как следствие, приводит к уменьшению антиагрегантного эффекта клопидогреля.
- Аллельный вариант CYP2C19 rs4986893 (с.636G>A), или CYP2C19*3, — частота встречаемости существенно ниже, чем аллельного варианта CYP2C19*2, но тоже имеет место зависимость от принадлежности к той или иной расе: не превышает 1% у представителей европеоидной и негроидной рас; у монголоидной расы варьирует от 2 до 10%. Эффект аллельного варианта CYP2C19*3 сходен с таковым для CYP2C19*2: снижение ферментативной активности цитохрома.

В совокупности носителей аллельных вариантов CYP2C19*2 и CYP2C19*3 относят к категории «слабый метаболизатор» («медленный метаболизатор»). Клинически это сопряжено с высокими рисками тромбозов при лечении пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС) и назначении двойной антиагрегантной терапии с ацетилсалициловой кислотой (АСК) при выполнении первичного экстренного, отсроченного, спасительного чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ). На фоне низкой эффективности терапии суточная доза клопидогрела может быть увеличена либо (если отсутствуют специфические противопоказания) предпочтительным будет использование иных антагонистов рецепторов P2Y12.

Другие аллели, ассоциируемые с ослабленным метаболизмом, включают CYP2C19*4, *5, *6, *7 и *8, но встречаются чрезвычайно редко (менее 1% в разных популяциях).

- Аллельный вариант CYP2C19 rs12248560 (с.-806C>T), или CYP2C19*17, — встречается с частотой до 5% в монголоидной расе и до 25% у европеоидов и представителей негроидной расы. Эффект CYP2C19*17 обусловлен повышенной экспрессией фермента и, как следствие, более высоким уровнем метаболизма клопидогрела. Носителей аллельного варианта *17 определяют как «быстрых метаболизаторов». Клинически это может проявляться в виде развития кровотечений при приеме стандартных доз клопидогрела, что потребует снижения суточной дозы препарата или его замены на другие антиагреганты II класса.

Сочетания аллельных вариантов складываются в фенотипические группы: «нормальный», «медленный», «быстрый» и «промежуточный» метаболизаторы (таблица 1).

Таблица 1. Сочетание аллельных вариантов и фенотипических групп, ассоциированных с метаболизмом клопидогрела

Аллельные варианты		CYP2C19			
		*1	*2	*3	*17
CYP2C19	*1	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*1/*17
	*2	*1/*2	*2/*2	*2/*3	*2/*17
	*3	*1/*3	*2/*3	*3/*3	*3/*17
	*17	*1/*17	*2/*17	*3/*17	*17/*17

- нормальный метаболизатор
 — промежуточный метаболизатор (с ослабленным метаболизмом)
 — медленный метаболизатор
 — быстрый метаболизатор
 — фенотипическая группа не установлена

Однонуклеотидные замены в гене ABCB1 (с.3435 C>T) сопряжены с более высокой частотой тромботических осложнений у носителей генотипа TT. Повышен риск неблагоприятных сердечно-сосудистых событий (кардиальная смерть, инфаркт миокарда) при лечении клопидогрелом ОКС или инфаркта миокарда.

Показания к генетическому анализу:

- ❖ прогнозирование эффективности терапии с использованием клопидогрела;
- ❖ оценка рисков развития нежелательных лекарственных реакций;
- ❖ прогнозирование межлекарственных взаимодействий при назначении клопидогрела.

Технология анализа генетических полиморфизмов (single nucleotide polymorphisms — SNPs)

В случае возникновения замены в нуклеотидной последовательности ДНК возможно обнаружение трех вариантов генотипа: *гомозиготы с исходной последовательностью нуклеотидов, гетерозиготы и гомозиготы с заменой в последовательности нуклеотидов.*

Технология **ПЦР с анализом кривых плавления** дает возможность идентифицировать фрагменты ДНК путем детекции изменений в уровне флуоресценции комплекса *фрагмент–проба* (меченный флуорофором олигонуклеотидный зонд) на этапе его денатурации и последующего построения графика кривой плавления.

Компания «ДНК-Технология» предлагает уникальную технологию выявления и идентификации SNP методом ПЦР с анализом кривых плавления.

Технология включает следующие этапы:

- ❖ амплификация искомой последовательности ДНК;
- ❖ гибридизация ампликонов с олигонуклеотидами (*пробами*), мечеными флуорофорами;
- ❖ образование *комплементарных* и *частично комплементарных* дуплексов;
- ❖ плавление (денатурация) дуплексов;
- ❖ детекция флуоресценции с последующим построением и анализом кривых плавления.

Для определения нуклеотидной последовательности, образовавшейся в процессе амплификации, используют *метод примающихся проб (kissing probes, или резонансный перенос энергии).*

В его основе лежит использование двух типов олигонуклеотидов (*проб*), гибридизующихся на матрицу при низкой температуре в непосредственной близости друг от друга. Один из олигонуклеотидов метят флуоресцентным донором, другой — акцептором (гасителем). Идентификация нуклеотидной последовательности образца осуществляется в процессе *плавления дуплексов* (результат гибридизации фрагментов ДНК и олигонуклеотидных зондов), которое происходит при последовательном увеличении температуры реакционной смеси.

Преимуществом данного подхода является *использование специфических флуорофоров*, снижающих риск детектирования неспецифических продуктов амплификации, как происходит при использовании интеркалирующих красителей.

Преимущества технологии

- ❖ **Использование Taq-полимеразы, блокированной специфическими антителами**, на этапе амплификации искомого участка ДНК с праймерами, общими для обоих вариантов последовательности:
 - реализация «горячего старта» без применения парафина;
 - предотвращение неспецифического отжига праймеров;
 - повышение чувствительности комплектов реагентов.
- ❖ Для повышения надежности типирования компания «ДНК-Технология» использует **модификацию метода примающихся проб**:
 - *сиквенс-специфичные типизирующие олигонуклеотиды*;
 - *одновременная гибридизация с двумя альтернативными типизирующими зондами*, мечеными различными флуорофорами, что позволяет определять *оба варианта* искомой последовательности в *одной пробирке*, в отличие от систем с интеркалирующими красителями, где для определения одного SNP необходимо использовать две пробирки для разделения аллельных вариантов.
- ❖ **Автоматическое генотипирование и интерпретация результатов в режиме реального времени** с использованием специализированного программного обеспечения.
- ❖ **Возможность визуальной интерпретации результатов** за счет определения разницы температур плавления не менее 4–5 °С для аллельных вариантов одного гена.

Компания «ДНК-Технология» предлагает набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом фармацевтических препаратов, методом полимеразной цепной реакции («ФармакоГенетика»):

- ❖ комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом варфарина, методом ПЦР в режиме реального времени «ФармакоГенетика Варфарин»;
- ❖ набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом клопидогрела, методом ПЦР в режиме реального времени «ФармакоГенетика Клопидогрел».

Технические характеристики и состав набора реагентов

Наименование	Выявляемые показатели	Количество пробирок
Комплект реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом варфарина, методом ПЦР в режиме реального времени «ФармакоГенетика Варфарин»	<ul style="list-style-type: none"> • CYP2C9: 430 C>T (Arg144Cys) • CYP2C9: A>C (Ile359Leu) • CYP4F2: C>T (Val433Met) • VKORC1: -1639 G>A • ВК 	48
Набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом клопидогрела, методом ПЦР в режиме реального времени «ФармакоГенетика Клопидогрел»	<ul style="list-style-type: none"> • ABCB1: 3435 C>T • CYP2C19: 681 G>A *2 (P227P) • CYP2C19: 636 G>A *3 (W212X) • CYP2C19: -806 C>T *17 • ВК 	48

Реагенты для выделения ДНК:

- «ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА»;
- «ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА».

Для проведения анализа необходимы следующие расходные материалы и оборудование:

- микропробирки (или микропробирки в стрипах) объемом 0,2 мл для ПЦР-анализа, адаптированные для работы с амплификатором, детектирующим в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Оборудование, необходимое для проведения анализа:

набор реагентов предназначен для использования в лабораториях, оснащенных **детектирующими амплификаторами для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени (приборы серии «ДТ» производства ООО «НПО ДНК-Технология»): «ДТлайт», «ДТпрайм» и «ДТ-96» (рис. 4).**

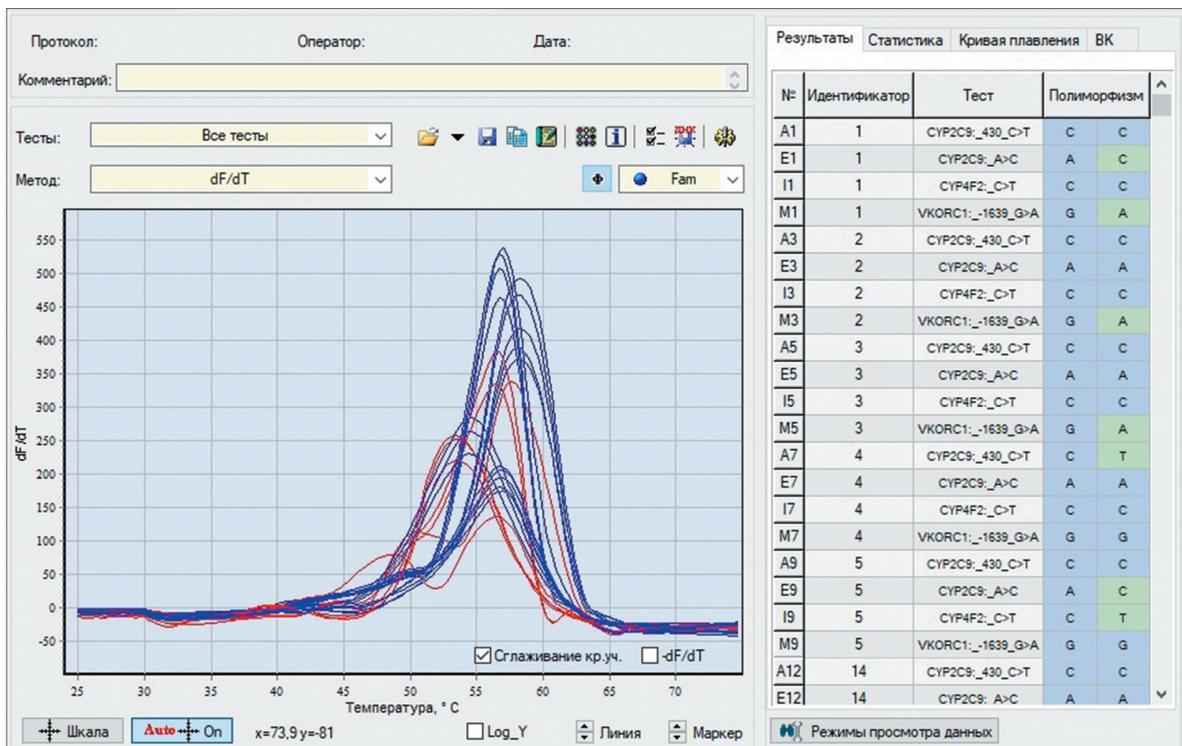


Рис. 4. Приборы производства компании «ДНК-Технология»

Программное обеспечение:

учет и интерпретация результатов реакции осуществляются автоматически для приборов серии «ДТ» производства ООО «НПО ДНК-Технология» (рис. 5).

A



Определение генетического полиморфизма

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание



Информация о лаборатории

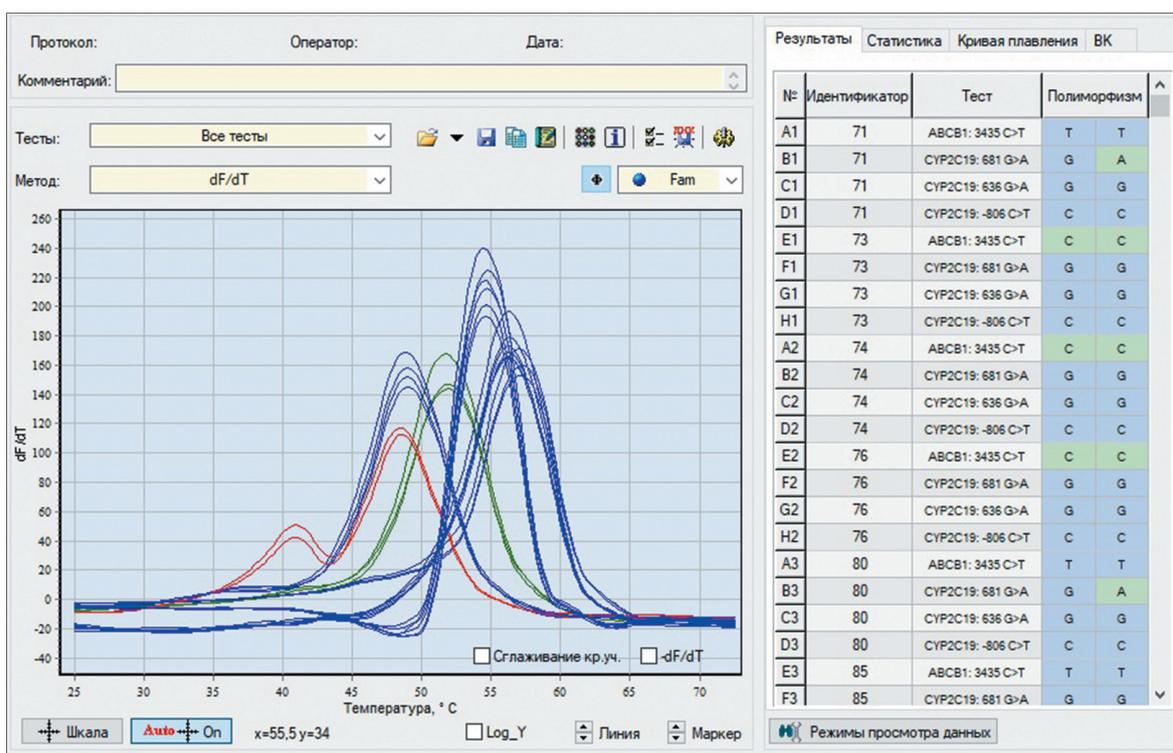
Идентификация образца: 1

№	Наименование исследования	Результаты
		Генотип
1	CYP2C9:_430_C>T	C C
2	CYP2C9:_A>C	A C
3	CYP4F2:_C>T	C C
4	VKORC1:_1639_G>A	G A

Исследование выполнил

Дата
 Подпись

Б



Определение генетического полиморфизма

Дата
 Номер пробирки
 Ф.И.О. пациента
 Пол
 Возраст
 Организация
 Врач
 Примечание



Информация о лаборатории

Идентификация образца: 71

№	Наименование исследования	Результаты
		Генотип
1	ABCB1:_3435_C>T	T T
2	CYP2C19:_681_G>A	G A
3	CYP2C19:_636_G>A	G G
4	CYP2C19:_-806_C>T	C C

Исследование выполнил

Дата
 Подпись

Рис. 5. Результаты анализа в формате Rt (приборы серии «ДТ») с использованием набора реагентов «ФармакоГенетика»

А — анализ оптических измерений (канал Fam) и бланк выдачи результатов «ФармакоГенетика Варфарин»
Б — анализ оптических измерений (канал Fam) и бланк выдачи результатов «ФармакоГенетика Клопидогрел»

Внимание! Информация, содержащаяся в рекламном буклете, может не совпадать с актуальной версией спецификации на указанный продукт. Версия 060-1.



060-1 2020.07.14

Контакты офиса:

ООО «ДНК-Технология». Адрес: Москва, Варшавское шоссе, д. 125ж, корп. 6.
Тел./факс: +7 495 640-17-71; www.dna-technology.ru, mail@dna-technology.ru

Служба клиентской поддержки:

8 800 200-75-15 (звонок по России бесплатный); hotline@dna-technology.ru

