

ФАРМАКОГЕНЕТИКА ВАРФАРИНА



ФАРМАКОГЕНЕТИКА ВАРФАРИНА

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ПОЛИМОРФИЗМОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С МЕТАБОЛИЗМОМ «ВАРФАРИНА», МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (ФАРМАКОГЕНЕТИКА ВАРФАРИН). РУ 2010/0863

Антикоагулянт – лекарственное вещество, угнетающее активность свертывающей системы крови и препятствующее образованию тромбов.

Различают антикоагулянты:

- ❖ **прямого действия**, понижающие активность тромбина в крови (например гепарин, герудин и др.);
- ❖ **непрямого действия** – производные оксикумарина, индандиола, конкурентно ингибируют редуктазу витамина К, чем тормозят активирование последнего в организме и прекращают синтез К-витаминзависимых плазменных факторов гемостаза — II, VII, IX, X.

«Варфарин» – наиболее широко применяемое в мире лекарственное средство, антикоагулянт непрямого действия. «Варфарин» был синтезирован еще в 40-х годах прошлого века, однако в нашей стране он начал применяться только в 2001 г. Популярность «Варфарина» обусловлена, во-первых, высокой эффективностью, а во-вторых – удобством применения.

Показания к назначению «Варфарина»:

- ❖ лечение и профилактика тромбоза и тромбоемболии сосудов:
 - острый венозный тромбоз;
 - тромбоемболия 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 тромбоемболия легочной артерии;
- ❖ протезирование клапанов сердца и сосудов;
- ❖ тромбоз периферических, коронарных и мозговых артерий;
- ❖ вторичная профилактика тромбоза и тромбоемболии 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. Риск осложнений может существенно повышаться в тех случаях, когда параллельно назначаются другие лекарственные средства.

Генетические факторы наравне с клиническими являются значимыми в подборе индивидуальных доз «Варфарина».

- ❖ **Генетические факторы** определяют до 53-54 % варибельности дозы.
- ❖ **Клинические факторы** определяют варибельность дозы на 17-21 %.

Наиболее значимые гены, определяющие индивидуальную реакцию на терапию «Варфарином»:

- CYP2C9,
- CYP4F2,
- VKORC1.

Цитохромы **CYP2C9** и **CYP4F2** – это ферменты, отвечающие за метаболизм «Варфарина» в организме. 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).

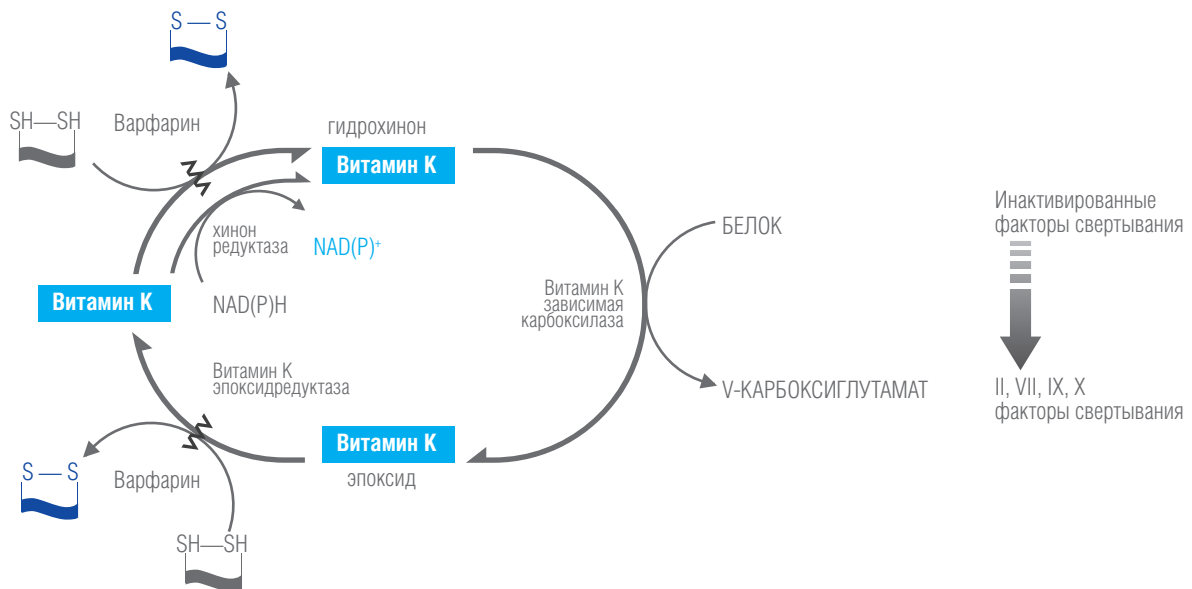


Рис. 1. Фармакология «Варфарина» и цикл витамина К

VKORC1 – это субъединица 1 комплекса *эпоксидредуктаза–витамин К*, ключевого фермента цикла витамина К. «Варфарин» ингибирует этот фермент, реализуя таким образом антикоагулянтный эффект за счет ингибирования процесса активации факторов свертывания.

Полиморфизмы CYP2C9 и CYP4F2 ассоциированы с изменением функциональной активности ферментов, что влияет на скорость выведения «Варфарина» из организма и, соответственно, на индивидуальную чувствительность к антикоагулянтной терапии (рис. 2).

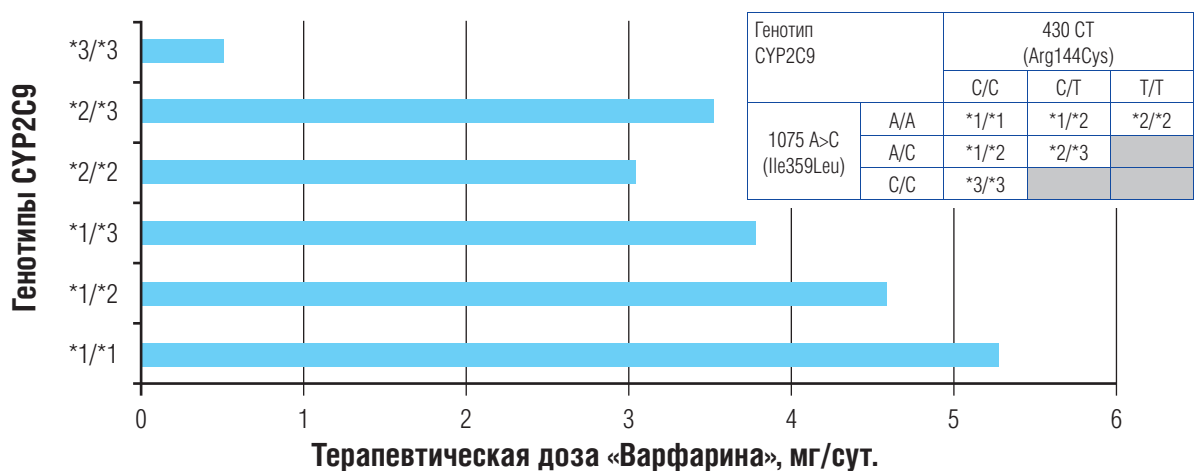


Рис. 2. Различная чувствительность к «Варфарину» в зависимости от генотипа

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 browser address bar displays 'http://www.warfarindosing.org/Source/InitialDose.aspx'. The website header includes the logo 'WARFARINDOSING' and the URL 'www.WarfarinDosing.org'. A left sidebar contains navigation links: Warfarin Dosing, Outcomes, Hemorrhage Risk, Patient Education, Contact Us, References, Glossary, and About Us. Below these links, it shows 'User: Patient: Version 17.4 Build : June 29, 2009'. The main content area is titled 'Required Patient Information' and contains the following fields:

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

Below this is the 'Genetic Information' section with the following fields:

- 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]

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 CYP2C9, 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 31,5 %.

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.

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 примыкающих 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.

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

Преимущества данной технологии являются:

- ❖ **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 примыкающих 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» разработала набор реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом «Варфарина», методом ПЦР в режиме реального времени (ФармакоГенетика Варфарин).

Технические характеристики и состав набора реагентов

Количество тестов в наборе	48 тестов
Формат реагентов	Нераскапанный
Taq-АТ-полимераза	1 пробирка (96 мкл)
Масло минеральное	1 флакон (3,84 мл)
ПЦР-буфер	2 пробирки (по 960 мкл)
Исследуемые полиморфизмы	1 пробирка VKORC1: -1639 G>A – 960 мкл 1 пробирка CYP2C9: 430 C>T – 960 мкл 1 пробирка CYP2C9: 1075 A>C – 960 мкл 1 пробирка CYP4F2: 1347 C>T – 960 мкл
Материал для анализа	Цельная кровь
Срок годности	6 месяцев
Температура хранения	+2... +8 °С -20 °С (для Taq-АТ-полимеразы)

Технология:

- ПЦР-плавление;
- использование других технологических платформ не допускается.

Реагенты для выделения ДНК:

- ПРОБА-РАПИД-ГЕНЕТИКА;
- ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА.

Минимальное количество ДНК для анализа:

1,0 нг на амплификационную пробирку.

Дополнительные реагенты:

реагенты для контроля качества ДНК (КВМ) – для детектирующего амплификатора ДТ-322.

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 термоциклером в режиме реального времени;
- штатив и насадка на микроцентрифугу (вортекс) для стрипованного пластика.

Преимущества использования набора реагентов для определения генетических полиморфизмов, ассоциированных с метаболизмом «Варфарина», методом ПЦР в режиме реального времени:

- технологичность (стандартные методики ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени);
- высокая скорость (для определения генотипа пациента требуется не более суток);
- автоматическая выдача результатов (для приборов серии ДТ);
- низкая стоимость анализа;
- высокая чувствительность (технология позволяет достоверно отличать аллельные состояния гена друг от друга);
- одновременная детекция – в одной пробирке определяются два аллельных варианта гена;
- внутренний контроль (ВК) позволяет оценить количество ДНК в амплификационной пробирке и исключить ошибки генотипирования.

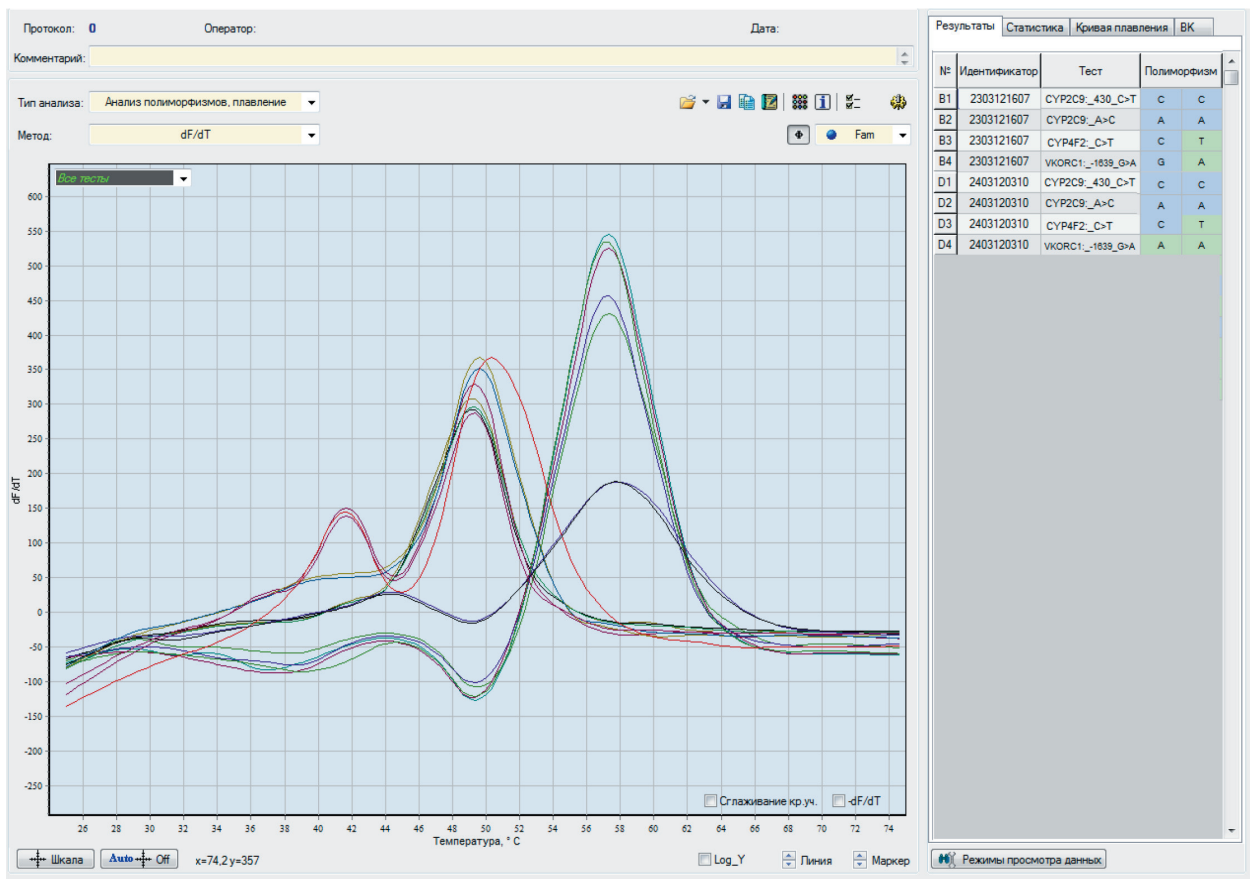
Оборудование, необходимое для проведения анализа:

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 (для ДТ-322 функция контроля количества ДНК в каждой пробирке не поддерживается) (рис. 4).



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

Приборы **серии ДТ** оснащены специально разработанным русскоязычным программным обеспечением, поддерживающим **автоматическую** обработку данных и выдачу результатов исследования в удобной для интерпретации форме. Уникальные технические характеристики приборов позволяют сократить время амплификации до 1 часа 20 минут, а общее время проведения анализа – до 2 часов 30 минут. Это значительно экономит время исследования и обеспечивает высокую пропускную способность лаборатории.



Кроме того, программа позволяет выдавать результаты в **удобной и наглядной форме** для анализа полученных данных врачами-клиницистами.

№	Наименование исследования	Результаты		Ср
1	CYP2C9:_430_C>T	C	C	28,5
2	CYP2C9:_A>C	A	A	28,5
3	CYP4F2:_C>T	C	T	28,0
4	VKORC1:_-1639_G>A	G	A	28,5
5	CYP2C9:_430_C>T	C	C	28,0
6	CYP2C9:_A>C	A	A	28,5
7	CYP4F2:_C>T	C	T	28,5
8	VKORC1:_-1639_G>A	A	A	28,0

Дополнительные исследования:

Определение МНО:

- базовое значение МНО перед началом терапии;
- лабораторный контроль каждые 4-8 недель в процессе антикоагулянтной терапии.

Генетические полиморфизмы, ассоциированные с метаболизмом фармацевтических препаратов

Ген	Функция гена	Полиморфизм	Идентификатор*	Возможные генотипы	Ассоциации/эффекты
CYP2C9 – цитохром P 450	Кодирует фермент, участвующий в метаболизме S-изомера «Варфарина»	430 C>T (Arg144Cys)	rs1799853	C/C	Без особенностей
				C/T	Снижение функциональной активности фермента, увеличение времени метаболизма «Варфарина»
				T/T	Без особенностей
CYP4F2 – лейкотриен В4 омега – гидроксилаза 1, семейства цитохрома P 450	Кодирует фермент, участвующий в цикле витамина К, как регулятор образования и активации факторов свертывания крови	1075 A>C (Ile359Leu)	rs1057910	A/A	Без особенностей
				A/C	Снижение функциональной активности фермента, увеличение времени метаболизма «Варфарина»
				C/C	Без особенностей
VKORC1 – субъединица 1 фермента эпоксиэстеразы витамина К	Кодирует субъединицу фермента, который участвует в образовании активной формы витамина К и последующей активации факторов свертывания крови	1347 C>T (Val433Met)	rs2108622	C/C	Без особенностей
				C/T	Снижение функциональной активности фермента
				T/T	Без особенностей
		-1639 G>A	rs9923231	G/G	Без особенностей
				G/A	Дефицит фермента, снижение интенсивности образования
				A/A	активной формы витамина К

* Обозначение в базе данных dbSNP Национального центра биотехнологической информации США (National Center for Biotechnological Information, NCBI)





Контакты офиса:

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

Телефон горячей линии:

8 800 200-75-16 (звонок по России бесплатный)