

Farmakogenetika warfarinu



**Sekce pro trombózu a hemostázu České hematologické společnosti
České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně**

P.Kessler

Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov

vydáno 16:03:2006 u příležitosti konání XII. Pařížkových dní

dostupné na www.thrombosis.cz a www.pr-lab.cz

Farmakogenetika warfarinu

P.Kessler

Oddělení hematologie a transfuziologie Nemocnice Pelhřimov

Souhrn

Mezi osobami léčenými warfarinem existují výrazné rozdíly ve velikosti dávky potřebné k dosažení optimálního léčebného účinku. Kromě zevních vlivů (interakce s léky a potravou) se zde významně uplatňují genetické dispozice. Polymorfismy cytochromu P 450 2C9 ovlivňují rychlost odbourávání S-warfarinu, polymorfismy VKORC1 ovlivňují kvantitu i kvalitu epoxid reduktázy – enzymu jehož blokáda je podstatou mechanismu účinku kumarinových antikoagulancií. Tyto 2 geny jsou zodpovědné za nejméně 50% variability účinku warfarinu. Efekt warfarinu je dále určován genetickými variantami gama-karboxylázy, protrombinu, faktorů VII a IX. V dohledné době lze očekávat další výsledky farmakogenetického výzkumu a klinické studie, zkoumající význam těchto poznatků v klinické praxi.

Úvod

Od dob prvních klinických zkušeností s kumarinovými antikoagulancií jsou známou skutečností velké interindividuální rozdíly ve velikosti dávky, nutné k dosažení terapeutického efektu i intraindividuální kolísání účinku v závislosti na lékových interakcích, metabolickém stavu a příjmu potravy. Složitý mechanismus účinku warfarinu a jeho biotransformace s uplatněním řady enzymatických systémů nabízí vysvětlení této inter- i intraindividuální variability působením řady zevních mechanismů i genetických determinant daného jedince. Farmakogenetika - vědní obor zkoumající vliv genetické výbavy jedince na účinnost a bezpečnost léků - se začala nesmírně dynamicky rozvíjet zejména v posledních letech v souvislosti s programem dekódování lidského genomu. Polymorfismy a mutace genů determinujících biotransformační enzymy, transportní molekuly nebo receptory mohou měnit jejich expresi, aktivitu a afinitu k lékům a tak ovlivňovat farmakokinetiku i farmakodynamiku.

Doposud byly identifikovány 2 stěžejní geny, jejichž polymorfismus hraje zásadní roli v individuální senzitivitě vůči warfarinu, jak bylo shodně ověřeno v několika studiích z posledních let. První z nich (CYP2C9) ovlivňuje biotransformaci warfarinu, druhý (VKORC1) determinuje cílový enzym blokováný warfarinem. Kromě toho se uplatňují i polymorfismy dalších genů, determinujících jednotlivé vitamin K dependentní proteiny a zasahující do metabolismu vitamínu K.

Biotransformace kumarinových antikoagulancií

Odbourávání warfarinu a ostatních kumarinových antikoagulancií v mikrozomech jaterních buněk je uskutečňováno cytochromovým systémem P 450, jehož enzymy katalyzují příslušné hydroxylační reakce. Izoenzymy P 450 jsou specifické pro jednotlivé medikamenty i pro jejich optické izomery. Warfarin je podáván ve formě racemické směsi, přičemž S-warfarin má kratší poločas (cca 33 hod.), je ale 4-5x účinnější, než R-izomer (poločas cca 45 hod.) a tedy ovlivnění jeho koncentrace má významnější vliv na změnu účinnosti [1,2]. Odbourávání S-warfarinu se uskutečňuje především prostřednictvím cytochromálního izoenzymu CYP2C9, zatímco katabolismus R-warfarinu prostřednictvím izoenzymů CYP1A2 a CYP2C19 [3,4]. Izoenzym CYP3A4 se podílí na odbourávání obou isomerů warfarinu, byť méně významně. Stěžejní význam pro vztah dávka/efekt má tedy z hlediska biotransformace warfarinu CYP2C9. Naproti tomu u acenokumarolu je odbourávání S-izomeru natolik rychlé, že pro výsledný efekt má stěžejní význam R-acenokumarol [5].

Polymorfismus CYP2C9

Vzhledem k stěžejnímu významu CYP2C9 pro metabolismus warfarinu i řady dalších léků (phenytoin, losartan, tolbutamid, některá nesteroidní antirevmatika) [6,7,8] byl jeho gen podroben důkladné analýze s cílem vyhledání polymorfismů a zjištění jejich efektu na účinnost warfarinu. U bělochů bylo identifikováno celkem 132 polymorfismů, sdružených do 6 velkých skupin příbuzných haplotypů [9]. Většina zjištěných variant nemá významnější vliv na účinnost warfarinu, i když v některých případech byl zjištěn jejich vliv na metabolismus jiných léků, např. losartanu [10]. Podstatný význam pro biotransformaci S-warfarinu mají varianty CYP2C9*2,*3,*11. Některé varianty (CYP2C9*5,*6) byly zjištěny jen u afričanů nebo afro-američanů [11,12].

Varianty CYP2C9*2,*3 jsou významně zastoupeny v bělošské populaci na rozdíl od populace asijské [13] a byly zkoumány v řadě studií. Výsledky byly shrnuty v metaanalýze, zahrnující 2775 pacientů [14]: Bylo zjištěno 12,2% nosičů alely CYP2C9*2 a 7,9% nosičů alely CYP2C9*3. Oproti homozygotům alely CYP2C9*1(wild typ) potřebovali k udržení cílového INR nosiči alely CYP2C9*2 dávku warfarinu o 17% nižší, nosiči alely CYP2C9*3 dávku o 37% nižší. Relativní riziko krvácení bylo u nosičů CYP2C9*2 1.91 (1.16-3.17) a u nosičů CYP2C9*3 1.77 (1.07-2.91).

Význam variant CYP2C9*2,*3 byl prokázán v úvodu léčby [15], efekt byl patrný již 4. den po zahájení léčby. V průběhu prvních 24 dní došlo častěji k překročení horní hranice INR – u nosičů 2C9*2 v 65% a u nosičů 2C9*3 v 66%, oproti 33% u homozygotům 2C9*1/*1. I při léčbě v podmínkách antikoagulační kliniky vede přítomnost alel CYP2C9*2,*3, k častějšímu laboratornímu předávkování a k prodloužení času do stabilizace INR [16].

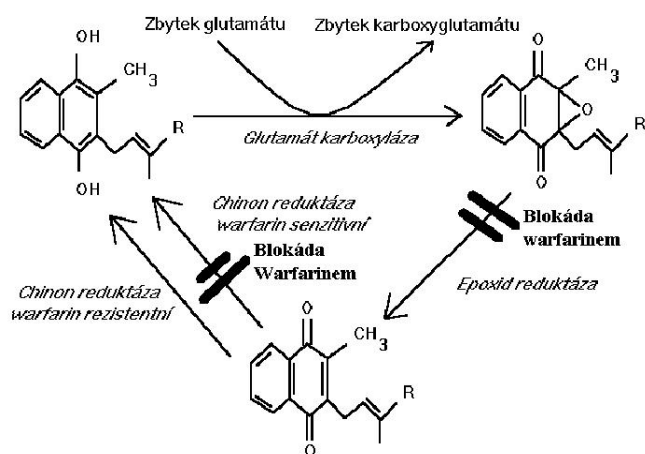
Varianta CYP2C9*3 vede i ke zvýšené senzitivitě vůči acenokumarolu [17] a varianty CYP2C9*2,*3 vůči phenprocoumonu [18], i když krvácivých komplikací bylo zaznamenáno více jen u varianty CYP2C9*3 [19].

Varianta CYP2C9*11 se vyskytuje u cca 1% kavkazské a afroamerické populace. Heterozygotní nosiči této mutace potřebují udržovací dávku warfarinu o cca 33% nižší, než homozygoti CYP2C9*1, pomalejší odbourávání S-warfarinu je způsobeno kratším poločasem genového produktu, jehož enzymatická aktivita není snížena [20].

Mechanismus účinku kumarinových antikoagulancií

Koagulační faktory II, VII, IX, X a regulační bílkoviny protein C a protein S obsahují ve své molekule zbytky kyseliny glutamové, které jsou posttranslačně karboxylovány na zbytky kyseliny gama-karboxyglutamové. Gama-karboxylové skupiny jsou nezbytné pro vazbu těchto faktorů na fosfolipidové povrchy, nutnou pro vznik komplexů, v nichž jsou faktory koagulační kaskády aktivovány [21]. Tato karboxylační reakce je asociována s cyklem vitamínu K (obrázek č.1).

Obrázek č.1.



Při nedostatku vitamínu K vážne karboxylace zbytků kyseliny glutamové a uvedené koagulační faktory jsou uvolňovány do oběhu ve formě se sníženou až nulovou funkční kapacitou (PIVKA). Kumarinová antikoagulační léčba ireversibilně inhibuje vitamin K-epoxidreduktázu a chinonreduktázu. Tím zabraňuje recirkulaci hydrochinonové formy vitamínu K a navozují situaci podobnou jeho nedostatku [22,23].

Polymorfismus VKORC1

Gen VKORC1 kóduje transmembránový protein o 163 aminokyselinách, tvořící podjednotku komplexu epoxid

reduktázy. Bylo odhaleno celkem 28 polymorfismů tohoto genu. Polymorfismus 1173C>T v intronu 1 vede k rozdílné senzitivitě vůči warfarinu – průměrná denní udržovací dávka warfarinu byla 6.2 mg u pacientů s genotypem 1173CC, 4,8 mg u pacientů s genotypem CT a 3,5 mg u osob s genotypem TT [24]. Polymorfismus v promotorové oblasti (1639 G>A) vede k rozdílné produkci epoxid reduktázy a nosiči genotypu AA potřebují významně nižší dávku warfarinu k dosažení cílového INR. Zatímco v čínské populaci výrazně dominuje alela 1639A, u příslušníků kavkazské rasy převažuje alela 1639G. Zdá se, že jde o jeden z mechanismů vysvětlujících vyšší citlivost asijské rasy k warfarinu [25]. Nedávno bylo sekvenací genu VKORC1 identifikováno 28 polymorfismů, z toho 10 běžných a od těchto odvozených 5 haplotypů v nekódující oblasti genu s výskytem v populaci >5%. Tyto haplotypy byly zařazeny do 2 skupin (A,B), které se od sebe významně liší průměrnou dávkou warfarinu – 2,7 mg pro A/A, 4,9 mg pro A/B, 6,2 mg pro B/B. Mechanismem genového efektu v tomto případě je ovlivnění intenzity transkripce, jak bylo zjištěno kvantifikací mRNA [26].

Kromě uvedených běžných polymorfismů byly popsány i vzácné mutace VKORC1, způsobující rezistenci k warfarinu a k dalším kumarinovým antikoagulačním [27,28,29], existují i mutace, podmiňující kombinovanou deficienci vitamínu K dependentních koagulačních faktorů 2. typu [28,30].

Mutace dalších genů ve vztahu k účinku warfarinu

Existují zatím ojedinělé zprávy o dalších mutacích, zvyšujících účinnost warfarinu [31]. Jde o mutace 402G>A a 401 G>T genu faktoru VII, mutaci (CAA repeat)_n genu gama-glutamyl karboxylázy a mutaci 165Thr>Met genu protrombinu [31,32], bezprostřední vztah k dávce warfarinu je méně významný, než u polymorfismů CYP2C9 nebo VKORC1 a mechanismus není zcela objasněn - hladiny protrombinu u neléčených jedinců s polymorfismy 165Thr>Met se navzájem neliší [32].

Mutace podmiňující krvácení v terapeutickém rozmezí INR

Naštěstí vzácná mutace genu propeptidu faktoru IX, postihující vazebné místo pro gama-glutamyl karboxylázu způsobuje v situaci nedostatku vitamínu K (a tedy i při léčbě warfarinem) poruchu karboxylace faktoru IX, vedoucí k jeho těžké deficienci, disproporcionální ke snížení ostatních vitamínu K dependentních faktorů. Tito pacienti pak při léčbě warfarinem trpí těžkými krvácivými komplikacemi i v terapeutickém rozmezí INR. Podezření na tento typ poruchy je snadno ověřitelné vyšetřením APTT, které je výrazně prodloužené [33].

Závěr

Poznatky současné farmakogenetiky objasňují již nejméně 50% interindividuální variability v citlivosti vůči warfarinu, další výsledky jsou očekávatelné v blízké budoucnosti. Lze předpokládat jejich uplatnění v klinické praxi s cílem snížit riziko krvácivých komplikací především v úvodu léčby a urychlit stabilizaci v cílovém INR. Analýza mechanismu působení mutací genů faktorů VII a II by mohla vést k identifikaci pacientů s vyšším rizikem krvácivých nebo trombotických komplikací v léčebném rozmezí INR.

Literatura

1. Buckley, N.A., Dawson, A.H.: Drug interactions with warfarin. *The medical J. of Australia*, 1992, 157: 479-483.
2. Palareti, G., Legnani, C.: Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic - pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet*. 1996 Apr;30(4):300-13.
3. Wienkers, L.C., Wurden, C.J., Storch, E., et al.: Formation of (R)-8-hydroxywarfarin in human liver microsomes. A new metabolic marker for the (S)-mephenytoin hydroxylase, P4502C19. *Drug metab. dispos.* 1996, 24 (6): 610-614.
4. Yamazaki, H., Shimada, T.: Human liver cytochrome P 450 enzymes involved in the 7-hydroxylation of R- and S-warfarin enantiomers. *Biochem. Pharmacol.* 1997, 54,(11):1195-1203.
5. Hermans JJ, Thijssen HH.: Human liver microsomal metabolism of the enantiomers of warfarin and acenocoumarol: P450 isozyme diversity determines the differences in their pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 1993 Sep;110(1):482-90.
6. Lee AY, Kim MJ, Chey WY, et al.: Genetic polymorphism of cytochrome P450 2C9 in diphenylhydantoin-induced cutaneous adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004 May;60(3):155-9.
7. Zhang Y, Zhong D, Si D, et al.: Lornoxicam pharmacokinetics in relation to cytochrome P450 2C9 genotype. *Br J Clin Pharmacol.* 2005 Jan;59(1):14-7.
8. Babaoglu MO, Yasar U, Sandberg M, et al.: CYP2C9 genetic variants and losartan oxidation in a Turkish population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2004 Jul;60(5):337-42.
9. Veenstra DL, Blough DK, Higashi MK, et al.: CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2005 May;77(5):353-64.
10. Allabi AC, Gala JL, Horsmans Y, et al.: Functional impact of CYP2C95, CYP2C96, CYP2C98, and CYP2C911 in vivo among black Africans. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Aug;76(2):113-8.
11. Dickmann LJ, Rettie AE, Kneller MB, et al.: Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. *Mol Pharmacol.* 2001 Aug;60(2):382-7.
12. Kidd RS, Curry TB, Gallagher S, Edeki T, Blaisdell J, Goldstein JA.: Identification of a null allele of CYP2C9 in an African-American exhibiting toxicity to phenytoin. *Pharmacogenetics.* 2001 Dec;11(9):803-8.
13. Takahashi H, Echizen H.: Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(8):587-603
14. Sanderson S, Emery J, Higgins J. : CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Genet Med.* 2005 Feb;7(2):97-104.
15. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. : CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Mar;75(3):198-203.
16. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, et al.: Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA.* 2002 Apr 3;287(13):1690-8.
17. Hermida J, Zarza J, Alberca I, et al.: Differential effects of 2C9*3 and 2C9*2 variants of cytochrome P-450 CYP2C9 on sensitivity to acenocoumarol. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):4237-9.
18. Schalekamp T, Oosterhof M, van Meegen E, van Der Meer FJ et al.: Effects of cytochrome P450 2C9 polymorphisms on phenprocoumon anticoagulation status. *Clin Pharmacol Ther.* 2004 Nov;76(5):409-17.
19. Hummers-Pradier E, Hess S, Adham IM, Papke T, Pieske B, Kochen MM.: Determination of bleeding risk using genetic markers in patients taking phenprocoumon. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003 Jul;59(3):213-9.
20. Tai G, Farin F, Rieder MJ, Dreisbach AW, Veenstra DL et al.: In-vitro and in-vivo effects of the CYP2C9*11 polymorphism on warfarin metabolism and dose. *Pharmacogenet Genomics.* 2005 Jul;15(7):475-481.
21. Nelsestuen, GL Role of gamma-carboxyglutamic acid: an unusual transition required for calcium-dependent binding of prothrombin to phospholipid. *J Biol Chem* 1976;251,5648-5656
22. Fasco, MJ, Hildebrandt, EF, Suttie, JW Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *J Biol Chem* 1982;257,11210-11212
23. Choonara, IA, Malia, RG, Haynes, BP, et al The relationship between inhibition of vitamin K 1,2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 1988;25,1-7
24. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M et al.: A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):645-9.
25. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, et al.: A novel functional VKORC1 promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. *Hum Mol Genet.* 2005 Jul 1;14(13):1745-51.
26. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al.: Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 2005 Jun 2;352(22):2285-93.
27. M.M. Samama, L. L. Bodin, M. H. Horellou, et al.: Presence of a T383G Mutation in the Vitamin K Epoxide Reductase Gene (VKORC1) in a Patient Resistant to Four Different Vitamin K Antagonists. Abstract # 4068, 46th ASH Annual meeting, San Diego, Dec. 4-7, 2004.
28. J. Oldenburg, S. Rost, A. Fregin, et al.: Mutations in the VKORC1 Gene Cause Warfarin Resistance, Warfarin Sensitivity and Combined Deficiency of Vitamin K Dependent Coagulation Factors. Abstract # 277, 46th ASH Annual meeting, San Diego, Dec. 4-7, 2004.
29. Harrington DJ, Underwood S, Morse C, et al.: Pharmacodynamic resistance to warfarin associated with a Val66Met substitution in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1. *Thromb Haemost.* 2005 Jan;93(1):23-6.
30. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al.: Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004 Feb 5;427(6974):537-41.
31. Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, et al.: Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and gamma-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood.* 2004 Apr 1;103(7):2630-5.
32. D'Ambrosio RL, D'Andrea G, Cappucci F, et al.: Polymorphisms in factor II and factor VII genes modulate oral anticoagulation with warfarin. *Haematologica.* 2004 Dec;89(12):1510-6.
33. J. Oldenburg, E.M. Quenzel, U. Harbrecht, et al.: Missense mutations at ALA-10 in the factor IX propeptide: an insignificant variant in normal life but a decisive cause of bleeding during oral anticoagulant therapy. *Br. J. Haematol.* 1997, 98: 240-244.

prim. MUDr. Petr Kessler
 Oddělení hematologie a transfuziologie
 Nemocnice Pelhřimov
 Slovanského Bratrství 710
 393 38 Pelhřimov
pkessler@hospital-pe.cz