



003447506

НА ПРАВАХ РУКОПИСИ

Загорская Валентина Леонидовна

**ФАРМАКОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И
ЭТНИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА
ГЕНА *VKORC1*, КОДИРУЮЩЕГО СУБЪЕДИНИЦУ 1
ВИТАМИН К ЭПОКСИД РЕДУКТАЗЫ**

14.00.25 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

02 ОКТ 2008

Москва 2008

Работа выполнена в ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова Росздрава на кафедре клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней

Научный руководитель:

Академик РАМН, доктор медицинских наук,
профессор

Кукес Владимир Григорьевич

Научный консультант:

кандидат биологических наук

Игнатъев Илья Владимирович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор

Жердев Владимир Павлович

Доктор биологических наук, профессор

Носиков Валерий Вячеславович

Ведущая организация: ГОУ ВПО Российский Государственный Медико-стоматологический Университет Росздрава (РГМСУ)

Защита диссертации состоится « » 2008 г. в ч на заседании диссертационного совета Д.001.024.01 при ГУ Научно исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова РАМН по адресу: 125315 Москва, Балтийская ул. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в ученой части ГУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАМН по адресу: 125315 Москва, Балтийская ул. 8.

Автореферат разослан « » 2008 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

Доктор медицинских наук

Вальдман Елена Артуровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время в развитых странах основной причиной смертности являются заболевания сердечно-сосудистой системы (ЗССС). По мере того, как постепенно снижается возраст людей, страдающих данными патологиями, эта проблема все больше затрагивает трудоспособное население. Происходит беспрецедентный рост социально-экономической значимости заболеваний сердечно-сосудистой системы во всем мире [Biały et al, 1992].

Когда говорят о смертности в результате заболеваний сердечно-сосудистой системы, имеют в виду, в первую очередь, различного рода тромбозмемблические осложнения (ТЭО). Поэтому предотвращение тромбозмемблических осложнений является основной целью терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы. Уменьшение их частоты способно значительно снизить как общую смертность в результате заболеваний сердечно-сосудистой системы, так и инвалидизацию трудоспособного населения, а значит, привести к снижению нагрузки на здравоохранение [Ndegwa, 2007].

Терапия, направленная на предотвращение тромбозмемблических осложнений, основывается на комплексном применении тромболитических и антикоагулянтных лекарственных средств (ЛС). Главную роль в профилактике ТЭО играют непрямые антикоагулянты, которые применяются в пероральной форме (ПНА). Считается, что длительный прием пероральных непрямых антикоагулянтов (варфарина, аценокумарола, синкумара, прокумона и др.) в индивидуально подобранной дозе способен практически полностью исключить риск развития тромбозмемблики. Эффективность данных ЛС доказана в ходе многочисленных мультицентровых клинических исследований [Wadelus et al., 2007]. Однако существует серьезная проблема применения пероральных непрямых антикоагулянтов, которая заключается в высокой частоте развития

нежелательных лекарственных реакций (НЛР), в основном, в виде феномена чрезмерной гипокоагуляции и вызываемых им внутренних кровотечений.

Терапевтический эффект любого ЛС зависит от его фармакокинетики и фармакодинамики в организме. Фармакокинетика определяется, в основном, особенностями метаболизма (биотрансформации) данного ЛС, а фармакодинамика характеризуется состоянием мишени. Все эти процессы зависят от большого числа различных факторов [Daly et al., 2003].

К настоящему моменту среди клиницистов сложилось понимание того, что важным, а зачастую и главным фактором, определяющим лекарственный ответ организма на воздействие большинства ЛС, являются генетические особенности конкретного пациента [Среденни С.Б., 2004]. В первую очередь речь идет о полиморфизме генов, кодирующих белки системы биотрансформации ЛС и молекулы-мишени ЛС [Кукес В.Г., 2007].

Большинство ПНА метаболизируются системой цитохрома P450, конкретно ее изоформой 2C9 (CYP2C9). Для гена, кодирующего данный белок, известны полиморфные маркеры, ассоциированные с изменением эффективности работы данной структуры (эти полиморфизмы представлены аминокислотными заменами) [Kessler, 2006]. Вопрос генетического полиморфизма CYP2C9 достаточно хорошо изучен. Методики индивидуализации фармакотерапии ПНА на основе идентификации аллельных вариантов CYP2C9*2 и CYP2C9*3 хорошо отработаны на различных этнических группах, и в настоящее время во всем мире ведется активная работа по внедрению их в клиническую практику.

Большинство специалистов сходятся во мнении, что вторым по значимости после CYP2C9 является ген, кодирующий первую субъединицу белкового комплекса витамин К эпоксидредуктазы (VKORC1). В ряде работ показано, что некоторые полиморфизмы в данном гене ассоциированы с изменением сродства кодируемой им молекулы к ПНА [Geisen et al., 2005; Lorient et al., 2006; Jiang et al., 2007].

Анализ имеющихся литературных данных навел нас на предположение о том, что большинство полиморфизмов гена *VKORC1*, о которых пишут исследователи в связи с изучением их роли в терапии пероральными непрямыми антикоагулянтами, могут быть сцеплены между собой. Поэтому из всего списка полиморфизмов мы выбрали один – *G3673A* и исследовали именно его.

Цели и задачи работы. Целью работы явилось фармакогенетическое исследование по изучению ассоциации полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* с особенностями ответа на терапию варфарином.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести идентификацию аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* и сопоставить их частоты в группе популяционного контроля и в клинической группе больных, принимающих варфарин;
2. Проверить, выполняется ли закон Харди-Вайнберга в исследованных группах и входящих в них подгруппах;
3. Оценить взаимосвязь аллелей и генотипов с развитием геморрагий при приеме варфарина;
4. Оценить взаимосвязь аллелей и генотипов с выходом показателя международного нормализованного отношения (МНО) за пределы терапевтического диапазона.

Научная новизна. Впервые изучена частота аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* у русских и показано отсутствие ассоциации данного полиморфного маркера с мерцательной аритмией - наиболее частого показателя к применению варфарина. Впервые в России изучена роль полиморфизма гена *VKORC1*, как фактора риска развития геморрагий и выхода показателя МНО за пределы терапевтического диапазона у больных мерцательной аритмией при приеме

варфарина. Разработан простой и экономически доступный тест для идентификации аллелей полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* на основе метода полимеразной цепной реакции и полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ), рассчитаны прогностическая ценность и специфичность отрицательного и положительного результатов подобного тестирования. Полученные в работе частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* могут представлять интерес для теоретической популяционной генетики.

Практическая значимость работы. Результаты работы составили основу проводимого проспективного клинического исследования по оптимизации терапии варфарином на основе ее индивидуализации с учетом генетических особенностей пациентов (в совокупности с ранее полученными данными по ассоциации генетического полиморфизма *CYP2C9* с особенностями ответа на варфарин у больных с мерцательной аритмией). Данное исследование имеет большое значение для практического здравоохранения России, поскольку позволит принципиально изменить подход к применению варфарина в сторону его расширения.

Апробация работы. Основные результаты доложены и обсуждены на заседании кафедры клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней ММА им. И.М.Сеченова (25 марта 2008 г.), на международной научной конференции «Лекарственные средства и биологически активные соединения» (Гродно, 2007), на научно-практической конференции «Клинико-фармакологические подходы в оптимизации фармакотерапии» (Москва, 2006) и на XI Международном симпозиуме «Новые технологии восстановительной медицины и курортологии» (Салоники, 2006).

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 печатных работ в журналах и сборниках материалов конференций, в том числе 3 статьи, из них - 1 статья в научном журнале, рекомендованном ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация построена по стандартной схеме, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 102 страницах машинописного текста и содержит 25 таблиц и 6 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Описание клинической группы. В исследование были включены 78 больных (42 мужчины и 36 женщин) с мерцательной аритмией (МА). Средний возраст 63 ± 11 года. На момент обследования все больные получали варфарин (Nucomed, Норвегия) в подобранной дозе более одного месяца. Дозировка препарата была подобрана под контролем МНО. После подбора индивидуальной дозы контроль МНО проводили один раз в месяц вместе с осмотром врача. Стабильный терапевтический уровень гипокоегуляции считали достигнутым при показателе международного нормализованного отношения (МНО), находящемся в диапазоне от 2,0 до 3,0.

Описание контрольной группы. Контрольная группа включала в себя 59 практически здоровых людей без МА и каких-либо видимых патологий (35 мужчин и 24 женщины), набранных на добровольной основе. Средний возраст 50 ± 15 лет.

Определение показателя МНО. Определение МНО проводилось с помощью тромбопластина фирмы «Технологический стандарт» (Россия) с международным индексом чувствительности 1,3.

Генотипирование. Генетическое тестирование проводили методом ЦПР-ПДРФ. На первой стадии фрагменты гена, содержащие полиморфные участки, амплифицировали на программируемом термостате «Терцик МС2», производства

НПФ «ДНК-Технология» (Россия). Затем продукты ПЦР подвергли обработке эндонуклеазой рестрикции II типа (рестриктазой) MspI. Специфичные праймеры подобраны с помощью программы PrimerSelect 4.05©1993-2000 DNASTAR Inc. и синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия). Подбор проводился на матрице из банка данных NCBI, содержащей полную последовательность гена VKORC1(AY587020).

Последовательность праймеров:

VC3673-F1 5'-CCAGAAGGGTAGGTGCAACAGTAA- 3'

VC3673-R2 5'-TCACCAAGACGCTAGACCCAATG- 3'

Рестриктаза MspI закуплена в ЗАО «СибЭнзим» (Россия). Промежуточные и окончательные результаты выявляли с помощью электрофореза в вертикальных акриламидных гелях (5% гель длиной 5 см для продуктов амплификации и 10% гель длиной 15 см для продуктов расщепления рестриктазами при напряженности электрического поля 10 В/см). Время, необходимое для разделения фрагментов ДНК подбирали экспериментально. Длины фрагментов анализировали путем сравнения с маркерной ДНК. После окончания электрофореза гели окрашивали раствором бромистого этидия (50 нг/мл) и анализировали в ультрафиолетовом свете (312 нм).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводился с использованием статистической программы Past, version 1.34 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>). Для определения статистической значимости различий частот аллелей и генотипов в группах больных применялся критерий χ^2 , для аллелей применялась поправка Йейтса на непрерывность (вводилась вручную). Относительные риски рассчитывались с помощью программы-калькулятора [Bland et al., 2000]. Значения чувствительности, специфичности, предсказательной ценности положительного (PPV) и отрицательного (NPV)

результатов теста рассчитывались по общепринятым формулам [Флетчер Р., 1998].

Проведение исследования одобрено этическим комитетом ГКБ № 23 им. «Медсантруд» г. Москвы и признано легитимным Комитетом по этике Ассоциации медицинских и фармацевтических вузов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Проверка соответствия частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* соотношению Харди-Вайнберга).

В наше исследование были включены две выборки, в которых проводилось генетическое тестирование по идентификации аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* (таблица 1).

Таблица 1.

Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* в изученных группах

Аллель/ генотип	Контрольная группа N = 59/181	Общая клиническая группа N = 78/156	Выборка из общей клинической группы ² N = 54/108
<i>3673G</i>	0,5678	0,5962	0,5833
<i>3673A</i>	0,4322	0,4038	0,4167
<i>3673GG</i>	0,3051	0,3205	0,3148
<i>3673GA</i>	0,5254	0,5513	0,5370
<i>3673AA</i>	0,1695	0,1282	0,1482

Примечания:

¹ при указании численности групп сначала указано число генотипов (написаний) а затем, через дробь, число аллелей

² Выборка из общей клинической группы включала в себя только пациентов с генотипом *CYP2C9*1*1* по локусу *CYP2C9*

Прежде чем проводить расчеты по проверке статистической достоверности между группами по частотам аллелей и генотипов изучаемого полиморфного маркера, необходимо оценить, выполняется ли в каждой группе или подгруппе закон Харди-Вайнберга.

В контрольной выборке различия между наблюдаемым числом генотипов и ожидаемым, рассчитанным по числу соответствующих аллелей, на основе соотношения Харди-Вайнберга, оказались статистически недостоверными ($p = 0,864$). Это позволяет сделать вывод о том, что размер контрольной выборки вполне соответствует задачам нашего исследования и позволяет проводить сравнительные расчеты с другими выборками.

В общей клинической выборке закон Харди-Вайнберга также выполняется ($p = 0,441$), поэтому она также подходит для дальнейших расчетов по различиям в частотах аллелей и генотипов.

При дальнейших расчетах, согласно задачам исследования, общая клиническая группа двумя различными способами подразделялась на две подгруппы. В первом случае больные делились на тех, у кого развивались геморрагии при приеме варфарина, и на тех, у кого геморрагии не развивались. Во втором случае шло разделение на больных, у которых наблюдался выход показателя МНО за пределы терапевтического диапазона ($MHO > 3$), и на тех, у кого такого выхода не наблюдалось ($MHO \leq 3$).

Несмотря на вычленение из общей клинической группы небольших по численности подгрупп, различающихся по лекарственному ответу, соотношение Харди-Вайнберга во всех этих подгруппах также выполнялось, что позволяет проводить сравнение между данными подгруппами по частотам аллелей и генотипов изучаемого полиморфного маркера.

Согласно литературным данным, полиморфизм гена *VKORC1* – это не единственный наследственный фактор, предрасполагающий к развитию

геморрагий при терапии варфарином [Daly et al., 2003; Gage et al., 2008]. Не менее важным является также полиморфизм гена *CYP2C9* [Peyvand et al., 2004; Lopot et al., 2007; Michaud et al., 2008]. Для оценки независимой роли полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* необходимо было вычленить для анализа из общей клинической группы больных, которые имеют генотип *CYP2C9*1*1* по гену *CYP2C9* (т.е. не имеют функционально-дефектных аллелей данного гена) (см. таблица 1, последняя колонка).

Причем в данной подгруппе также необходимо провести разделение на больных с геморрагиями и без таковых и на больных с выходом МНО за пределы терапевтического диапазона и без такового.

Проведенная проверка показала, что, несмотря на малый размер выделенных подгрупп, соотношение Харди-Вайнберга в них выполняется, а значит, данные подгруппы пригодны для дальнейших расчетов достоверности различий в частотах аллелей и генотипов исследуемого полиморфного маркера.

Наконец, необходимо проверить, не имеется ли неравновесия по сцеплению между полиморфным маркером *G3673A* гена *VKORC1* и полиморфными маркерами гена *CYP2C9*, потому что, в случае наличия такого неравновесия, возможные ассоциации для гена *VKORC1* могут быть следствием сцепления, а не отдельного эффекта данного гена [Rieder et al., 2005]. Для проверки этого необходимо оценить достоверность различий частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между общей клинической выборкой и подгруппой пациентов с генотипом *CYP2C9*1*1*. Результаты проверки приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Оценка достоверности различий частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между общей клинической выборкой и подгруппой пациентов с генотипом *CYP2C9*1*1*

Аллель/ генотип	Общая клиническая группа N = 78 / 156	Пациенты с генотипом <i>CYP2C9*1*1</i> N = 54 / 108	χ^2	p
<i>3673G</i>	0,5962	0,5833	0,007	0,935
<i>3673A</i>	0,4038	0,4167		
<i>3673GG</i>	0,3205	0,3148	0,108	0,947
<i>3673GA</i>	0,5513	0,5370		
<i>3673AA</i>	0,1282	0,1482		

Различия между общей клинической выборкой и подгруппой пациентов с генотипом *CYP2C9*1*1* в частотах аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* статистически не достоверны ($p=0,935$ для аллелей; $p=0,947$ для генотипов), поэтому можно констатировать отсутствие неравновесия по сцеплению между вышеназванными полиморфными маркерами. А значит, все ассоциации, которые будут вытекать из дальнейших расчетов, относятся к гену *VKORC1* и не являются следствием генетического сцепления.

2. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* и МА.

Хотя нет никаких данных, указывающих на возможную взаимосвязь генетического полиморфизма *VKORC1* и мерцательной аритмии, мы обязаны проверить наличие таковой.

Во-первых, это необходимо сделать с точки зрения чистоты эксперимента, так как, в случае существования такой ассоциации, наша клиническая выборка

оказывается перелевантной – ведь тогда получится, что все возможные ассоциации для полиморфизма гена *VKORC1* могут либо быть следствием влияния данного заболевания, либо наоборот, замаскированы данным заболеванием. Во-вторых, в случае, например, гена *CYP2C9* в свое время была выявлена ассоциация с таким маркером сердечнососудистой патологии, как гипертрофия левого желудочка, при том, что такой эффект был неожиданностью, возможность его обнаружения не предполагалась, и до сих пор малопонятно, какова его физиологическая природа [Sychev et al., 2007].

Таблица 3.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между контрольной группой и группой больных с МА (общая клиническая группа)

Аллель/ генотип	Контрольная группа N = 59 / 118	Общая клиническая группа N = 78 / 156	χ^2	p
<i>3673G</i>	0,5678	0,5962	0,121	0,728
<i>3673A</i>	0,4322	0,4038		
<i>3673GG</i>	0,3051	0,3205	0,459	0,795
<i>3673GA</i>	0,5254	0,5513		
<i>3673AA</i>	0,1695	0,1282		

В любом случае, анализ возможной ассоциации полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* с развитием МА был нами выполнен, его результаты представлены в таблицах 3 и 4 (с учетом возможного эффекта гена *CYP2C9*, мы выполнили анализ, как для общей клинической выборки, так и для подгруппы пациентов с генотипом *CYP2C9*1/*1*).

Нам не удалось обнаружить статистически значимых различий в частотах аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* ни между

контрольной группой и группой больных МА, ни между контрольной группой и подгруппой больных мерцательной аритмией с генотипом *CYP2C9*1/*1*.

Таблица 4.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между контрольной группой и подгруппой больных с МА, имеющих генотип *CYP2C9*1/*1*

Аллель/ генотип	Контрольная группа N = 59 / 118	Группа больных с генотипом <i>CYP2C9*1/*1</i> N = 54 / 108	χ^2	p
<i>3673G</i>	0,5678	0,5833	0,010	0,919
<i>3673A</i>	0,4322	0,4167		
<i>3673GG</i>	0,3051	0,3148	0,096	0,953
<i>3673GA</i>	0,5254	0,5370		
<i>3673AA</i>	0,1695	0,1482		

3. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* и развитие геморрагий при терапии варфарином у больных с МА.

Мы провели сравнение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между подгруппами больных с геморрагиями и без таковых, выделенных из общей клинической группы. Аналогичный анализ был проведен также для больных с генотипом *CYP2C9*1/*1* (см. таблица 5).

В общей клинической группе ассоциации полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* с развитием геморрагий при терапии варфарином у больных с МА не наблюдается, а если из их числа исключить всех больных, имеющих функционально-дефектные аллели гена *CYP2C9*, то есть вести расчет только среди больных с генотипом *CYP2C9*1/*1*, ассоциация появляется.

Таблица 5.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* у больных с геморрагиями и без таковых в подгруппе больных с генотипом *CYP2C9*1*1*

Аллель/ генотип	Больные с геморрагиями N = 8 / 16	Больные без геморрагий N = 46 / 92	χ^2	p
<i>3673G</i>	0,3125	0,6304	4,436	0,035
<i>3673A</i>	0,6875	0,3696		
<i>3673GG</i>	0,1250	0,3478	9,382	0,009
<i>3673GA</i>	0,3750	0,5652		
<i>3673AA</i>	0,5000	0,0870		

Из этого можно сделать вывод о том, что генетический полиморфизм *CYP2C9* является более значимым наследственным фактором, приводящим к нарушению биотрансформации варфарина, поэтому в общей клинической выборке он маскирует эффект генетического полиморфизма *VKORC1*. Если же исключить *CYP2C9* обособленное влияние, то эффект *VKORC1* четко проявляется.

Таким образом, нами выявлена ассоциация полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* с развитием геморрагий при терапии варфарином у русских больных с МА. Причем аллель *3673A* и генотип *3673AA* являются факторами риска, предрасполагающими к развитию геморрагий (отношение шансов OR, которое служит мерой относительного риска, составило 3,753 при доверительном интервале $CI_{95\%}$ от 1,202 до 11,720 для аллеля *3673A* и 10,500 при доверительном интервале $CI_{95\%}$ от 1,872 до 58,881 для генотипа *3673AA*, соответственно).

Поскольку в настоящий момент широко дискутируется вопрос о том, полиморфизм какого гена более важен в клиническом плане [Aquilante et al.,

2006; Kessler, 2006; Cho et al., 2007], полученные нами результаты имеют большую практическую и теоретическую ценность. Очевидно, что продукту гена *CYP2C9* принадлежит ведущая роль в формировании лекарственного ответа на терапию ПНА (и, в частности, варфарином). И хотя полученные нами результаты также ставят полиморфизм гена *VKORC1* на второе место после гена *CYP2C9* в качестве причины развития геморрагий при терапии ПНА, мы считаем, что это в достаточной степени условно. В целях индивидуализации терапии варфарином, необходимо проведение генетического тестирования по обоим генам. Только такой комплексный подход может быть в должной мере результативен.

С другой стороны, хочется отметить тот факт, что имеются также пациенты, у которых в генотипе отсутствуют условно дефектные аллели как гена *CYP2C9*, так и гена *VKORC1*. В проведенном нами исследовании был только один такой больной, но, с учетом численности нашей выборки, можно предположить, что доля таких больных в общей популяции составит не менее 1-2%. Поскольку геморрагии, возникающие при терапии ПНА, представляют серьезную опасность для больного, такой процент является вполне достаточным, чтобы привлечь внимание.

Мы полагаем, что генетическое тестирование, основанное на идентификации аллелей и генотипов локусов *CYP2C9* и *VKORC1*, проводимое перед назначением варфарина, уже способно в значительной степени снизить риск развития геморрагий. Поэтому его необходимо как можно быстрее внедрять в клиническую практику. Ведь варфарин и подобные ему ЛС – это реальный шанс повысить продолжительность и качество жизни работоспособного населения, снизить смертность от различного рода тромбозов. Высокий процент НЛР, возникающих сегодня при терапии варфарином (до 20%) – это серьезный барьер на пути широкого внедрения данного ЛС.

Мы рассчитали диагностическую ценность генетического тестирования по идентификации генотипа *3673AA* гена *VKORC1*. Прогностическая

чувствительность положительного теста составила 50%, чувствительность – 50%, прогностическая ценность отрицательного теста – 91% и специфичность – 91%, таким образом, диагностическая эффективность данного теста составила примерно 70%.

С одной стороны, полученные цифры выглядят довольно скромно (хотя, что касается специфичности и прогностической ценности отрицательного теста, это не так). Однако генетическое тестирование на выявление генотипа *3673AA* гена *VKORC1* – это, в своем роде, тест «второго плана». Первую роль мы отводим генетическому тестированию по локусу *CYP2C9*. При таком подходе мы считаем полученные показатели вполне достаточными для внедрения данного теста в клиническую практику.

Что же касается частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* среди русских, то, согласно нашим данным, их значения находятся в соответствии с частотами для других европейских этносов [Сычев с соавт., 2007; Scordo et al., 2001].

4. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* и выход показателя МНО за пределы терапевтического диапазона

МНО — один из основных клинических показателей эффективности терапии непрямыми антикоагулянтами [Сычев, 2004; Lofiot et al., 2006; Benusiglio et al., 2007]. Исходя из вышеописанного, можно сделать предположение о том, что данный показатель будет также зависеть от того, какие аллельные варианты генов *CYP2C9* и *VKORC1* присутствуют у каждого конкретного больного, подвергаемого терапии ПНА.

Мы провели сравнение частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* между подгруппами больных, у которых наблюдался выход за терапевтические значения МНО и тех, у которых этот показатель был в

пределах нормы, выделенных из общей клинической группы. Аналогичный анализ был проведен также для больных с генотипом *CYP2C9*1*1* (см. таблицу 6).

Таблица 6.

Сравнительный анализ частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* у больных с выходом за терапевтические значения МНО (>3) и без такового (≤3) в подгруппе больных с генотипом *CYP2C9*1*1*

Аллель/ генотип	МНО>3 N = 24 / 48	МНО≤3 N = 30 / 60	χ^2	p
<i>3673G</i>	0,4792	0,6667	3,124	0,077
<i>3673A</i>	0,5208	0,3333		
<i>3673GG</i>	0,2500	0,3667	7,081	0,029
<i>3673GA</i>	0,4583	0,6000		
<i>3673AA</i>	0,2917	0,0333		

В общей клинической группе ассоциации полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* с выходом МНО за пределы терапевтического диапазона при терапии варфарином у больных с мерцательной аритмией не наблюдается, а если из их числа исключить всех больных, имеющих функционально-дефектные аллели гена *CYP2C9*, то можно наблюдать тенденцию к ассоциации ($p=0,077$) аллеля *3673A* с выходом показателя МНО за пределы терапевтического диапазона. Причем для генотипа *3673AA* уже имеется не тенденция, а четкая ассоциация ($p=0,029$).

Таким образом, аллель *3673A* и генотип *3673AA* являются факторами риска, предрасполагающими к выходу показателя МНО за пределы терапевтического диапазона (поскольку для аллеля у нас не имелось четкой ассоциации, мы рассчитали OR только для генотипа *3673AA*, оно составило 11,941 при доверительном интервале $CI_{95\%}$ от 1,351 до 105,549). Поскольку размеры нашей

клинической выборки невелики, влияние генетического полиморфизма *CYP2C9*, также как и в случае с гемorragиями маскирует эффект генетического полиморфизма *VKORC1*. Мы полагаем, что на выборке большего размера эффект влияния генетического полиморфизма *VKORC1* на развитие выхода показателя МНО за пределы терапевтического диапазона проявится, независимо от влияния генетического полиморфизма *CYP2C9*.

Мы рассчитали диагностическую ценность генетического тестирования по идентификации генотипа *3673AA* гена *VKORC1* для прогнозирования риска выхода показателя МНО за пределы терапевтического диапазона. Прогностическая чувствительность положительного теста составила 88%, чувствительность – 26%, прогностическая ценность отрицательного теста – 63% и специфичность – 97%, таким образом, диагностическая эффективность данного теста составила примерно 62%.

ВЫВОДЫ

1. Частоты аллелей и генотипов полиморфного маркера *G3673A* гена *VKORC1* у русских незначительно отличаются от таковых среди прочих европеоидов.
2. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* не ассоциирован с развитием мерцательной аритмии у русских.
3. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* не сцеплен с полиморфными маркерами гена *CYP2C9* у русских.
4. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* ассоциирован с развитием гемorragий при терапии варфарином у русских с мерцательной аритмией, имеющих генотип *CYP2C9*1/*1*, причем аллель *3673A* и генотип *3673AA* являются факторами риска развития гемorragий.

5. Полиморфный маркер *G3673A* гена *VKORC1* ассоциирован с выходом показателя международного нормализованного отношения (МНО) за пределы терапевтического диапазона при терапии варфарином у русских с мерцательной аритмией, имеющих генотип *CYP2C9*1/*1*, причем генотип *3673AA* является фактором риска выхода показателя МНО за пределы терапевтического диапазона.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Загорская, В.Л. Генетические аспекты применения антикоагулянта варфарина у больных с сердечнососудистой патологией [Текст] / В.Л. Загорская, В.Г. Кукус, Д.В. Байдак // Материалы XI Международного симпозиума «Новые технологии восстановительной медицины и курортологии» - 2006.- С. 40-41.
2. Байдак, Д.В. Случай кумаринорезистентности у больного с постоянной формой мерцательной аритмии [Текст] / Д.В.Байдак, В.Л.Загорская, И.В.Игнатьев, Р.Е.Казаков, И.А.Мазеркина, Д.А.Сычев // Материалы научно-практической конференции “Клинико-фармакологические подходы в оптимизации фармакотерапии” - 2006. – С. 21 - 22.
3. Сычев, Д.А. Генетическая основа кумаринорезистентности: новый взгляд на старый фармакогенетический феномен [Текст] / Д.А.Сычев, И.В.Игнатьев, В.Г.Кукус, И.Э.Коман, Д.В.Байдак, В.Л.Загорская // Медицинская генетика. - 2006. - № 5. - С. 9 - 11.
4. Байдак, Д.В. Фармакогенетическое тестирование как реальная возможность повышения безопасности при применении непрямых антикоагулянтов [Текст] / Д.В.Байдак, Д.А.Сычев, В.Л.Загорская, И.В.Игнатьев, Р.Е.Казаков, В.Н.Каркищенко, В.Г.Кукус // Биомедицина. - 2006. - № 3. – С. 117 - 118.
5. Сычев, Д.А. Генетическая основа кумаринорезистентности: новое понимание старой проблемы [Текст] / Д.А.Сычев, Д.В.Байдак,

- В.Л.Загорская, И.В.Игнатъев, Р.Е.Казаков, В.Г.Кукес** // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. - 2006. - № 2. - С 50 -52.
6. **Загорская, В.Л.** Генотип 3637AA полиморфного маркера G3673A гена VKORC1 ассоциирован с развитием кровотечений при применении варфарина у больных с генотипом CYP2C9*1/*1 [Текст] / **В.Л.Загорская, И.В.Игнатъев, Е.С.Кроначева, Р.Е.Казаков, Д.А.Сычев, Ю.А.Михеева, Е.П.Панченко, В.Г.Кукес** // Лекарственные средства и биологически активные соединения. Материалы международной научной конференции. - Гродно. - 2007. - С. 54 - 55.
7. **Сычев, Д.А.** Значение фармакогенетических исследований системы биотрансформации и транспортеров для оптимизации фармакотерапии сердечно-сосудистыми лекарственными средствами [Текст] / **Д.А.Сычев, Г.В.Раменская, И.В.Игнатъев, Е.С.Кроначева, Е.П.Панченко, Н.А.Гасанов, А.Н.Леванов, А.В.Антонов, В.Л.Загорская** / Материалы 3-го съезда фармакологов России. «Фармакология практическому здравоохранению». Санкт-Петербург, 23-27 сентября 2007 г // Психофармакология и биологическая наркология. – 2007. – Т. 7 (спец. выпуск), ч. 2. - С. 1972.
8. **Загорская В.Л., Кукес В.Г., Байдак Д.В.** Генетические аспекты применения антикоагулянта варфарина у больных с сердечнососудистой патологией. // Материалы XI Международного симпозиума «Новые технологии восстановительной медицины и курортологии» -2006.- с. 40-41.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПНА	–	пероральные непрямые антикоагулянты
ЛС	–	лекарственное средство
НЛР	–	нежелательные лекарственные реакции
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
ПДРФ	–	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов
п.н.	–	пара нуклеотидов – мера длины фрагмента двунитовой ДНК
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ТЭО	–	тромбоэмболические осложнения
ЗССС	–	заболевания сердечнососудистой системы
МНО	–	международное нормализованное отношение, показатель, характеризующий свертываемость крови, чем он выше, тем свертываемость ниже
МА	–	мерцательная аритмия

Подписано в печать 10 09 2008
Формат 60х90/16 Бумага мелованная Печ л 1
Тираж 100 экз.
Отпечатанов в типографии "Графос"
г Москва, проспект Маршала Жукова, 1