DOI: 10.48305/jims.v41.i742.0980

مجله دانشکده پزشکی اصفهان | سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۴۲/هفته‌ی دوم دی ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۶ | تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۷ | تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۱۴

بررسی فارماکوژنتیک وارفارین با ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9 و VKORC1 و تعیین حساسیت و مقاومت به وارفارین در جمعیت جنوب ایران

جواد جهانگیری[۱]، بابک شیرازی یگانه[۲]، اردشیر بهمنی‌مهر[۳]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: از سال ۱۹۵۰، وارفارین به‌عنوان ضد انعقاد برای درمان و پیشگیری از شرایط ترومبوآمبولی استفاده می‌شود. عوامل مختلفی همچون سن، وزن، رژیم غذایی و عوامل ژنتیکی مثل ژن CYP2C9 وVKORC1 در تعیین دوز وارفارین مؤثر هستند. این مطالعه جهت ارزیابی پلی‌مورفیسم‌های رایج در بیماران تحت درمان با وارفارین انجام شد.

روش‌ها: مطالعه‌ی مقطعی حاضر در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه بیمارستان شهید دستغیب انجام گرفت. در مجموع ۹۹ بیمار برای این مطالعه انتخاب شدند که به دلایل مختلف، از جمله مشکلات قلبی، وارفارین دریافت می‌کردند. پلی‌مورفیسم‌های ژن CYP2C9 و VKORC1 به روش Multiplex PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: فراوانی افراد با آلل ۱*۱*، ۳*۱*، ۳*۲* و ۳*۳* برای ژن CYP2C9 به ترتیب ۱، ۹/۱، ۱۹/۲ و ۷۰/۲ درصد و برای ژن VKORC1 -1639G>A آلل GA با ۵۲/۵ درصد بیش‌ترین فراوانی را داشت و پس از آن GG و AA به ترتیب با ۳۴/۳ و ۱۳/۱ درصد بیش‌ترین فراوانی را داشتند.

نتیجه‌گیری: حضور پلی‌مورفیسم ژن CYP2C9 و VKORC1 اثر مهمی بر دوز وارفارین مورد نیاز برای حفظ INR در محدوده‌ی ۳-۲ دارد. در این مطالعه‌ی آلل CYPC2CP*3*3 و VKORC1 -1639G>A شایع‌ترین پلی‌مورفیسم‌های موجود بود. در مطالعه‌ی حاضر، ما نشان دادیم که ترکیب سن، وزن و ژنوتیپ CYP2C9 و VKORC1، تخمین بهترین دوز نگهداری وارفارین را ممکن می‌سازند. می‌توان با معادله‌ی رگرسیون نیاز دوز هفتگی وارفارین را محاسبه و به تعیین دوز آغازین این دارو به افرادی با شرایط مشابه کمک کرد.

واژگان کلیدی: وارفارین؛ ژنتیک پلی‌مورفیسم؛ پروتئین CYP2C9 انسانی؛ پروتئین VKORC1 انسانی

ارجاع: جهانگیری جواد، شیرازی یگانه بابک، بهمنی‌مهر اردشیر. **بررسی فارماکوژنتیک وارفارین با ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9 و VKORC1 و تعیین حساسیت و مقاومت به وارفارین در جمعیت جنوب ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۴۲): ۹۸۷-۹۸۰

مقدمه

از سال ۱۹۵۰، گروه دارویی کومادین‌ها، مانند وارفارین، به‌عنوان ضد انعقاد برای درمان و پیشگیری از شرایط ترومبوآمبولی مورد استفاده گسترده‌ای قرار گرفته‌اند. تصور می‌شود که وارفارین با مهار کردن زیرواحد C1 از کمپلکس آنزیمی اپوکسید ردوکتاز ویتامین K (VKORC1) در ساخت فاکتورهای انعقادی دخالت می‌کند و در نتیجه ساخت دوباره‌ی اپوکسید را کاهش می‌دهد. میزان کاهش آن به میزان دوزاژ مصرفی و تا حدی ژنوتیپ VKORC1 بیمار وابسته است. مدت اثر ضد انعقادی یک دوز از وارفارین ۲ تا ۵ روز است و معمولاً ۲۴ ساعت پس از مصرف دارو رخ می‌دهد. ضد انعقادها هیچ اثر مستقیمی روی یک ترومبوز تثبیت‌شده ندارند و آسیب ایسکمی بافت را معکوس نمی‌کنند. با این حال، هدف درمان ضد انعقادها، هنگام وقوع ترومبوز، جلوگیری از گسترش بیشتر لخته‌ی شکل گرفته و جلوگیری از عوارض جانبی ثانویه است که ممکن است منجر به عوارض جدی و احتمالاً مرگبار شود (۱).

عدم توانایی در نظر گرفتن تفاوت‌های فردی و درون فردی در پاسخ به دارو پیش‌بینی دقیق دوز دارو را غیرممکن می‌کند و موجب نگرانی می‌شود. تخمین زده شده است که تقریباً نیمی از بیماران مبتلا

۱- متخصص پاتولوژی، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

۲- استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

۳- دکترای ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: بابک شیرازی یگانه: استادیار، گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ایران

Email: shirazpathology@gmail.com

به فیبریلاسیون دهلیزی واجد شرایط که از درمان با وارفارین سود می‌برند، به دلیل خطرات مربوط به آن و هزینه‌های نظارت، دارو را دریافت نمی‌کنند (۲).

وارفارین اغلب به‌صورت تجربی تجویز می‌گردد. بدین‌صورت که ابتدا دوز اولیه تجویز شده و در ادامه حداقل هفته‌ای یک باز میزان INR اندازه‌گیری و دوز بعدی تنظیم می‌گردد. دوز اولیه اغلب مبتنی بر جمعیت متوسط (به‌عنوان مثال، ۳–۵ میلی‌گرم در روز) است، اما دوز پایدار برای رسیدن به INR۲–۳ می‌تواند محدوده‌ای از ۲۰–۱ میلی‌گرم در روز را در برگیرد. برای رسیدن به دوز مناسب، ممکن است هفته‌ها تا ماها طول کشد و در طی این مدت بیمار در معرض خطر خونریزی و یا ترومبوآمبولی قرار دارد.

کومادین، به وسیله‌ی آنزیم‌های میکروزومال کبدی (سیتوکروم P-450) به متابولیت‌های هیدروکسیله‌ی غیرفعال (مسیر غالب) و به وسیله‌ی آنزیم‌های ردوکتاز به دیگر متابولیت‌ها (وارفارین الکل‌ها) متابولیزه می‌شود. ایزوآنزیم‌های سیتوکروم P450 درگیر در متابولیسم وارفارین شامل 2C9, 2C19, 2C8, 2C18,1A2 و 3A4 هستند. 2C9 به احتمال زیاد شکل اصلی P-450 کبد انسان است که فعالیت in vivo وارفارین را تعدیل می‌کند. پلی‌مورفیسم VKORC1 و CYP2C9 بین جمعیت‌ها در دوزهای وارفارین تفاوت ایجاد می‌کند، اما سهم آن‌ها در تنوع بین جمعیت‌ها ممکن است در هر جمعیت متفاوت باشد؛ به‌طوری‌که ژاپنی‌ها نسبت به دو جمعیت قفقازی و آفریقایی–آمریکایی در معرض مهار بیشتر تولید پروترومبین قرار دارند. شیوع VKORC1 1173 C> T در ژاپن (۸۹/۱ درصد) نسبت به قفقازی (۴۲/۲ درصد) و آمریکایی‌های آفریقایی‌تبار (۸/۶ درصد) بیشتر است. مقدار متوسط مصرف وارفارین در قفقازی‌ها نسبت به بیماران ژاپنی (۵/۵ در برابر ۳/۵ میلی‌گرم/ روز) به میزان قابل توجهی بالاتر بود (۳).

عوامل غیرژنتیک دخیل در متابولیسم این دارو شامل سن، نژاد، شاخص توده‌ی بدنی BMI (Body mass index)، جنسیت، سیگار کشیدن، نارسایی کلیوی یا کبدی، درمان‌های دارویی، تغذیه‌ی روده‌ای، میزان مصرف غذایی ویتامین K و اختلال جذب یا حذف سریع این ویتامین است (٤). تنوع دوز وارفارین تا حد زیادی به ژنتیک وابسته است که می‌توان آن را با پلی‌مورفیسم C1173T و G-1639A کمپلکس ویتامین k اپوکساید ردوکتاز زیر واحد ۱ (VKORC1) و *۲ و *۳ آلل سیتوکروم P-450 (CYP) 2C9 [CYP2C9] آنزیمی نشان داد که آن را به شکل غیرفعال متابولیزه می‌کند (۵).

CYP2C9 آنزیم کبدی متابولیزه‌کننده‌ی دارو از سوپر خانواده‌ی CYP450 است. ژن CYP2C9 بیش از ۳۰ آلل مختلف دارد. افراد هموزیگوت آلل مرجع CYP2C9 (*CYP2C9*1*) دارای فنوتیپ متابولیزه کننده نرمال هستند. وارفارین مهارکننده‌ی رقابتی VKOR و محصول ژن VKORC1 است. جهش بدمعنی (Missense mutatio) در کدون ۱۶۳۹ ژن VKORC1 باعث کاهش مقاومت به وارفارین می‌شود.

تفاوت‌های نژادی در توزیع ژنتیکی VKORC1 -1639G>A وجود دارد. حدود ۵۰ درصد از سفید پوستان ژنوتیپ GA (با حساسیت متوسط) دارند؛ در حالی‌که ژنوتیپ AA (بیشترین حساسیت، دوزاژ کم) در آسیایی‌ها و ژنو تیپ GG (کمترین حساسیت، دوزاژ بالا) در آمریکایی‌های آفریقایی‌تبار غالب است (٦).

برای کاهش خطرات ناشی از مصرف وارفارین، یک الگوریتم فارماکوژنتیک طراحی شده است که میزان دوز شروع وارفارین را تخمین می‌زند. در این الگوریتم، علاوه بر فاکتورهای کلینیکی، عوامل ژنتیکی گفته شده نیز گنجانده شده است. سازمان غذا و داروی آمریکا FDA (Food and Drug Administration) به گنجاندن بررسی ژنوتیپی VKORC1 و CYP2C9 در برچسب محصول کومادین / وارفارین توصیه کرده است (۷). با تعیین وضعیت پلی‌مرفیسم آلل‌های CYP2C9 و VKORC1 در افرادی که به تازگی شروع به مصرف داروی وارفارین می‌کنند، می‌توان به تعیین دوز آغازین این دارو به افرادی با شرایط مشابه کمک کرد که در کاهش خطر مصرف دارو و عوارض ناشی از آن مؤثر خواهد بود.

در یک آزمایش تصادفی کنترل شده بر روی ٤٥٥ بیمار مصرف‌کننده‌ی وارفارین (۳۵۳ بیمار از انگلیس و ۱۰۲ بیمار از سوئد) در طی سال‌های ۲۰۱۱ تا ۲۰۱۳، نتایج زیر حاصل شد: به‌طور قابل توجهی تعداد موارد ضد انعقاد بیش از حد (INR ≥ ٤/۰) در گروه مبتنی بر ژنوتیپ کمتر بود (۵۷ نفر در مقایسه با ۷۹ نفر در گروه شاهد). میانگین زمان رسیدن به محدوده‌ی درمانی INR برای گروه مبتنی بر ژنوتیپ ۲۱ روز و برای گروه شاهد ۲۹ روز بود (۸).

لذا با توجه به روند رو به پیشرفت بیماری قلبی– عروقی، این مطالعه جهت ارزیابی پلی‌مورفیسم‌های رایج در بیماران تحت درمان با وارفارین انجام شد تا علاوه بر برآورد فراوانی ژنوتیپ و انواع واریانت پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9 و VKORC1 در جمعیت جنوب ایران، میزان حساسیت و مقاومت به وارفارین در هاپلوتیپ‌های مختلف ژنوتیپی نیز سنجیده شود.

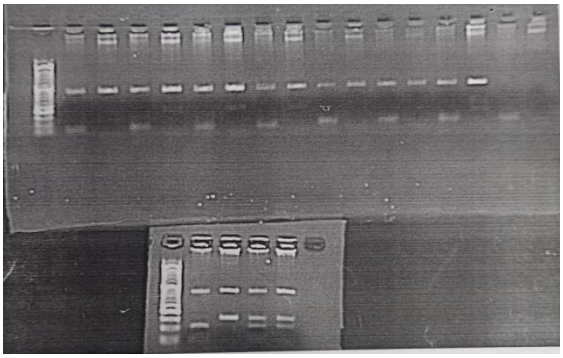
روش‌ها

این مطالعه‌ی مقطعی در سال ۱۳۹۹ در آزمایشگاه بیمارستان شهید دستغیب شیراز انجام گرفت. ۹۹ بیمار مصرف‌کننده‌ی وارفارین با سابقه‌ی بیماری‌های قلبی– عروقی و مشکلات انعقادی وارد مطالعه

شدند. مصرف وارفارین در آن‌ها به دوز ثابت و میزان PT و INR مناسب رسیده بود. این گروه به صورت تصادفی از بین مراجعه‌کنندگان به آزمایشگاه انتخاب شدند (فرد سالم به‌عنوان گروه شاهد انتخاب شد) و به‌منظور رعایت اصول اخلاقی، پس از ارائه‌ی توضیحات لازم به بیمار، رضایت‌نامه از فرد دریافت و چک‌لیست تکمیل گردید. شرکت‌کنندگان از لحاظ سن، جنسیت، وزن، قد، مدت مصرف داروی وارفارین، میزان مصرف داروی وارفارین در سه ماه گذشته، میزان PT و INR، علت مصرف داروی وارفارین، بیماری‌های زمینه‌ای، استعمال دخانیات، سابقه‌ی شیمی‌درمانی و انواع اعمال جراحی مورد پرسش قرار گرفتند. سپس خون‌گیری از بیماران انجام شد و نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های لازم به آزمایشگاه بیمارستان شهید دستغیب منتقل شدند. هر یک از افراد برای انجام آزمایش‌های مولکولی حدود ٦ سی‌سی خون در فالکون‌های ۱۰ سی‌سی جمع‌آوری شد که به‌منظور جلوگیری از انعقاد، ۳۵۰ میکرولیتر EDTA در آن ریخته شده بود. نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

در این مطالعه برای تشخیص سریع ژنوتیپ پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9، CYP3C9 و VKORC1، به کمک پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)، تکنیک ARMS PCR به صورت Multiplex PCR انجام شد. بدین صورت که از چندین جفت پرایمر درون یک مخلوط PCR برای تولید آمپلیکون‌ها در سایزهای مختلف استفاده شد که مخصوص توالی‌های مختلف DNA هستند. در این روش، با ترفیع روش ارزیابی مولکولی به روش Multiplex PCR چند پلی‌مورفیسم در دو تیوپ به صورت ARMS Mutiplex PCR NORMAL و ARMS Multiplex PCR Mutant و یک مرحله PCR انجام شد. برای انجام درست واکنش PCR دمای اتصال برای هر جفت پرایمر بهینه شد. جدول ۱، پرایمرهای مورد استفاده جهت انجام ARMS PCR را نشان می‌دهد.

به این ترتیب، محصولات PCR برای بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9، CYP3C9 و VKORC1 الکتروفورز شدند (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR برای بررسی پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9، CYP3C9 و VKORC1

جدول ۲، برنامه‌ی PCR جهت تکثیر پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9، CYP3C9 و VKORC1 را نشان می‌دهد.

پس از تعیین توزیع نرمال داده‌ها نتایج کمی با F-test (برای مطالعه اثرگذاری عوامل مختلف و انتخاب مؤثرترین فاکتور) و نتایج کیفی با آزمون X2 مقایسه شدند. از آنالیز آماری رگرسیون لجستیک برای تعیین میزان وابستگی هاپلوتیپ‌های معرفی شده و میزان وارفارین مصرفی و کنترل اثر عوامل مداخله‌گر استفاده شد. همچنین مقایسه‌ی میانگین اختلاف میزان دوز پیشنهادی در گروه‌های مختلف با آزمون t مستقل مورد بررسی قرار گرفت و میزان مثبت کاذب و منفی کاذب در بیماران مشخص و نزدیک‌ترین مدل به دوز واقعی بیان شد.

این مقاله با کد اخلاق IR.SUMS.MED.REC.۱۳۹۹.۰۳۸ در دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب گردید.

یافته‌ها

در مجموع ۹۹ بیمار (٥٦ مرد و ٤٣ زن) برای این مطالعه انتخاب شدند. اندیکاسیون اصلی برای ضد انعقاد شامل ٤٥ مورد تعویض دریچه‌ی میترال، ۱۹ مورد گرفتگی عروق قلب و ۱۲ مورد ترومبوز وریدی عمقی بود. میانه‌ی سنی برای آقایان ٦٠ سال و برای خانم‌ها ۵۸ سال بود. جدول ۳، خصوصیات جمعیت مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده برای انجام ARMS PCR

پلی‌مورفیسم ژن	Primers	Sequence (5' to 3')	طول محصول
CYP2C9*2	CYP2C9*2-N	GGGAAGAGGAGCATTGAGCACC	bp ۱۰۹
	CYP2C9*2-M	GGGAAGAGGAGCATTGAGCACT	
CYP2C9*3	CYP2C9*3-N	TGCACGAGGTCCAGAGAAACC	bp ۱۵۹
	CYP2C9*3M	TGCACGAGGTCCAGAGAGACA	
VKORC1	VKORC1-N	GAAGACCTGAAAAACAACCATTGGACG	bp ۳۸۳
	VKORC1-M	GAAGACCTGAAAAACAACCATTGGACA	

N: normal, M: mutant

جدول ۲. برنامه‌ی PCR جهت تکثیر پلی‌مورفیسم ژن‌های CYP2C9، CYP3C9 و VKORC1

برنامه		زمان	دما (درجه‌ی سانتی‌گراد)
دناتوراسیون اولیه		۵ دقیقه	۹۵
تکثیر (۳۵ سیکل)	دناتوراسیون	۱ دقیقه	۹۴
	اتصال	۹۰ ثانیه	۶۴-۵۸
	تکثیر	۲ دقیقه	۷۲
تکثیر نهایی		۱ دقیقه	۷۲

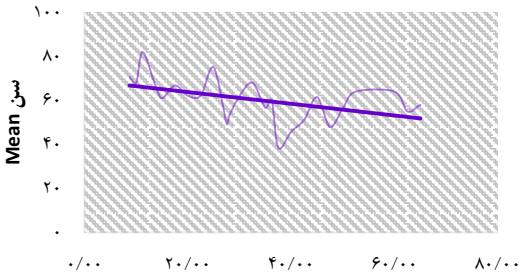
بعد از PCR محصول آن الکتروفورز شد و روی ژل آگاروز ۳ درصد انتقال یافت و ژنوتیپ‌ها

جنسیت، تأثیر معنی‌داری بر میانگین دوز مورد نیاز هفتگی وارفارین نداشت (۲۹/۳ میلی‌گرم برای زنان و ۳۰/۶ میلی‌گرم برای مردان، P = ۰/۲۳). قد بدن نیز تأثیر معنی‌داری بر میانگین دوز مورد نیاز هفتگی وارفارین نداشت (P = ۰/۷۱). در مقابل آنالیز همبستگی ساده داده‌ها نشان داد که دوز وارفارین به طور قابل‌توجهی با سن همبستگی منفی داشت (r = −۰/۴۰۵، P < ۰/۰۰۱) و همچنین با وزن بدن همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت (r = ۰/۲۲۶، P = ۰/۲۶). شکل ۲ رابطه‌ی میزان مصرف هفتگی وارفارین را در مقایسه با سن نشان می‌دهد. شکل ۳ رابطه‌ی میزان مصرف هفتگی وارفارین را در مقایسه با وزن نشان می‌دهد.

جدول ۳. خصوصیات جمعیت مورد مطالعه

متغیرها	
سن، میانه (دامنه)	
مرد	۶۰ (۸۵-۲۶)
زن	۵۸ (۸۳-۲۷)
جنسیت، تعداد (درصد)	
مرد	۵۶ (۵۶/۶)
زن	۴۳ (۴۳/۴)
میانگین (دامنه)	۴/۲۸ (۱/۲۵-۹/۲۸)
CYP2C9 ژنوتیپ، تعداد (درصد)	
*1*1	۱ (۱)
*1*2	۰ (۰)
*1*3	۹ (۹/۱)
*2*2	۰ (۰)
*2*3	۱۹ (۱۹/۲)
*3*3	۷۰ (۷۰/۷)
VKORC1 ژنوتیپ، تعداد (درصد)	
GG	۳۴ (۳۴/۳)
GA	۵۲ (۵۲/۵)
AA	۱۳ (۱۳/۱)

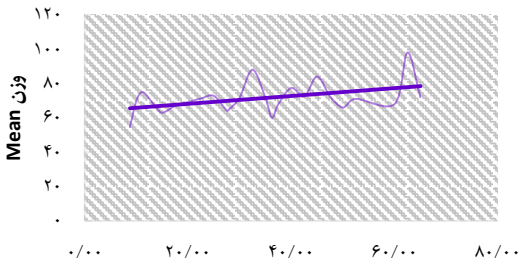
همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است، سن، وزن و ژنوتیپ تناسب بهتری برای تخمین دوز وارفارین نسبت به مدل حاوی سن یا ژنوتیپ به تنهایی ایجاد کرد که بزرگ‌ترین مقدار R^2 را ارائه می‌دهد. جدول ٤، معادله‌ی رگرسیون را به منظور محاسبه‌ی نیاز دوز هفتگی وارفارین، بر حسب سن، ژنوتیپ و وزن نشان می‌دهد. ارتباط میزان مصرف وارفارین و ژنوتیپ VKORC1 با استفاده از آزمون ANOVA با P < ۰/۰۰۱ به این صورت است GA (۲٦/٤ ± ۹/۲۱)، GG (۳۹/۸۱ ± ۱۱/۹۵).



شکل ۲. رابطه‌ی میزان مصرف هفتگی وارفارین در مقایسه با سن

میزان مصرف وارفارین در ژنوتیپ AA کمتر است.

ارتباط میزان مصرف وارفارین و ژنوتیپ CYP2C9*3 با استفاده از آزمون t مستقل با P < ۰/۰۰۱ به این صورت می‌باشد AC (۱۵/۷۹ ± ٦/٥٤)، CC (۳۱/۷۱ ± ۱۲/۰۸).



شکل۳. رابطه‌ی میزان مصرف هفتگی وارفارین در مقایسه با وزن

میزان مصرف وارفارین در ژنوتیپ CYP2C9*3 کمتر است.

ارتباط میزان مصرف وارفارین و ژنوتیپ CYP2C9*2 با استفاده از آزمون ANOVA با P = ۰/٦۷ به این صورت است TT (۲٤/٦۸ ± ۱۸/۷۷)، CT (۲۹/۱۳ ± ۱٤/٥۱)، CC (۳۰/۳۱ ± ۱۲/۱۳).

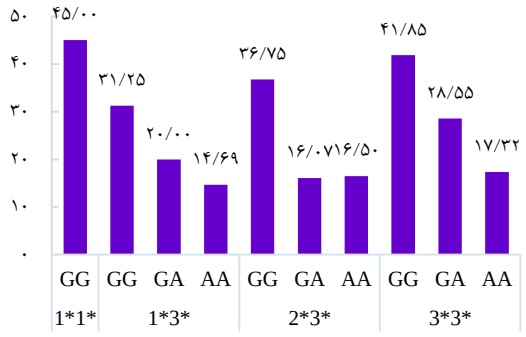
میزان مصرف وارفارین در ژنوتیپ CYP2C9*2 کمتر است.

شکل ٤ ارتباط میزان مصرف هفتگی وارفارین را با ژنوتیپ‌های CYPC9*2، CYPC9*3 و VKORC1 نشان می‌دهد.

جدول٤. معادله‌ی رگرسیون به‌منظور محاسبه‌ی نیاز دوز هفتگی وارفارین، بر حسب سن، ژنوتیپ و وزن

متغیرها	فرمول رگرسیون	P	میزان R^2 (درصد)
سن	۴۶/۹۲ –۰/۲۸	۰/۰۰۱	۱۰/۹
CYP2C9 ژنوتیپ	۴۷/۶۳ –۱۵/۹۲ (CYP2C*3)	۰/۰۰۱	۱۶/۴
VKORC1 ژنوتیپ	۵۱/۲۳ –۱۲/۰۱ (VKORC1)	۰/۰۰۱	۳۸/۶
وزن	۱۴/۸۴ + ۰/۲۱	۰/۰۲۶	۵/۱
سن، وزن CYP2C9 ,ژنوتیپ ,	۶۶/۶۳ – ۹/۷۹ (VKORC1)	۰/۰۰۱	۵۲/۷
VKORC1ژنوتیپ	–۹/۶۹ (CYP2C9*3)		
	+ ۰/۰۷۹ (Weight) – ۰/۲۳۵ (Age)		

سن: سن بر حسب سال، ژنوتیپ CYPC9*3: عدد ۱ برای CC و عدد ۲ برای AC، ژنوتیپ VKORC1: عدد ۱ برای GG، عدد ۲ برای GA و عدد ۳ برای AA، وزن: وزن بر حسب کیلوگرم



شکل٤. ارتباط میزان مصرف هفتگی وارفارین با ژنوتیپ‌های CYPC9*2، CYPC9*3 و VKORC1

بحث

در مطالعه‌ی حاضر، در مورد نقش ژنوتیپ CYP2C9 و VKORC1، سن، قد و وزن در میزان مصرف داروی وارفارین بررسی کردیم و مشخص شد سن بیمار، وزن و پلی‌مورفیسم ژنتیکی CYP2C9 و VKORC1 با اختلاف ٦٥ درصدی در نیاز به دوز وارفارین روزانه نقش بسزایی دارند. همانند مطالعه‌ی Takahashi و همکاران (۳)، متوجه شدیم که نیاز به دوز با سن مرتبط است و مقدار تقریباً ۰/٤ میلی‌گرم در روز در هر دهه بین سنین ۲۰ تا ۹۰ سال، بدون در نظر گرفتن ژنو تیپ و وزن بیمار، کاهش می‌یابد. بنابراین، نتایج این پژوهش مطابقت چشمگیری با نتایج مطالعات قبلی دارد (۲) که نشان داد، پلی‌مورفیسم CYP2C9 و سن به طور قابل‌توجهی بر پاک‌سازی وارفارین و در نتیجه نیاز به دوز وارفارین تأثیر می‌گذارند.

اگرچه بیماران به طور مساوی در طول ۷ دهه مورد مطالعه پخش نشده بودند. نتایج ما ارتباط شناخته شده بین ژنوتیپ CYP2C9 و دوز وارفارین روزانه را گسترش می‌دهد. همچنین تفاوت‌های قابل توجهی در میانگین دوز مورد نیاز بین هر یک از آلل‌های متغیر در مقایسه با نوع وحشی وجود داشت.

متأسفانه، با وجود جستجوی بیماران با دوز پایین، تنها یک بیمار با ژنوتیپ 1*1* وجود داشت و برای ژنوتیپ ۲*۲* و ۲*۱* هیچ بیماری وجود نداشت، بنابراین دوزهای پیش‌بینی شده برای این ژنوتیپ‌ها باید با احتیاط استفاده شود. همچنین تأیید می‌کنیم که حاملان ژنوتیپ VKORC1 (-1639) AA، نسبت به افراد دارای ژنوتیپ GA یا GG، به دوز روزانه‌ی کمتری از وارفارین نیاز دارند. در حال حاضر، طیف وسیعی از پلی‌مورفیسم‌ها در آن توصیف شده‌اند. Bodin و همکاران نشان دادند که ژنوتیپ VKORC1 تغییرپذیری ۳۷ درصدی را در پاسخ به آسنوکومارین (Acenocoumarin) در داوطلبان سالم را توجیه می‌کند (۹).

داده‌های فعلی یافته‌های گزارش‌های قبلی (٦-٤) در مورد پاسخ ضد انعقاد را تأیید کرد و همچنین تأثیر ژنوتیپ VKORC1 نیاز کمتر به دوز وارفارین را نشان داد. در این مطالعه، ما همبستگی‌های مثبت قابل توجهی بین دوز وارفارین با میزان سن و وزن را نشان دادیم که سهم قابل توجهی در نیازهای هفتگی وارفارین در مدل رگرسیون داشت و تفاوت معنی‌داری نیز در دوز وارفارین بین بیماران زن و مرد نداشتیم و لذا جنسیت، هیچ سهم معنی‌داری در مدل رگرسیون نداشت.

در یک مطالعه‌ی کوهورت بر روی ۱۹۱ بیمار در آمریکا، تفاوت آماری معنی داری درمصرف هفتگی وارفارین در بیماران چاق (٤١ میلی‌گرم) در مقایسه با بیماران کم وزن (٢٤/٤ میلی‌گرم) وجود داشت (۱۰).

در مطالعه‌ی دیگری بر روی ۹٦ بیمار در آمریکا؛ میانگین مصرف هفتگی وارفارین در گروه‌های ۲۰ تا ٤۹ سال حدود ۵۱ میلی‌گرم بود؛ در حالی‌که در گروه ۸۰-۸۹ سال، تقریباً نصف، ٢٤/٨٢ میلی‌گرم بود (۱۱).

با توجه به طراحی این مطالعه، نقش وضعیت ویتامین K و نیاز به دوز وارفارین مورد بررسی قرار نگرفت. یک مطالعه که تأثیر ویتامین K را بر ضد انعقاد وارفارین بررسی کرد، ارتباط منفی چشگیری را غلظت ویتامین K پلاسما با INR بیمار نشان داد (۱۲). همچنین احتمال دارد که تغییرپذیری فردی در نیاز به مصرف

وارفارین، حداقل تا حدی، به عوامل ژنتیکی دیگر از جمله پلی‌مورفیسم در آپولیپوپروتئین E، مقاومت چند دارویی ۱ (MDR1) (۱۳)، ژن رمزکننده‌ی فاکتورهای انعقادی وابسته به ویتامین K (۱٤) و احتمالاً ژن‌های رمزکننده‌ی اجزای اضافی کمپلکس ویتامین K اپوکسید ردوکتاز مربوط باشد (۱۵).

تفاوت‌های فردی در پاک‌سازی وارفارین یکی از عوامل مهم در تغییرپذیری مشاهده شده در نیاز به دوز است. همان‌طور که انتظار می‌رفت، دوز وارفارین، سن، ژنوتیپ و وزن بدن تأثیر قابل‌توجهی بر پاک‌سازی وارفارین داشت.

در مطالعه‌ی حاضر، ما نشان داده‌ایم که ترکیب سن، ژنوتیپ CYP2C9 و VKORC1 و وزن تخمین بهترین دوز نگهداری وارفارین را ممکن می‌سازند. این امر به وضوح عدم کفایت رژیم‌های دارویی فعلی و نیاز به حرکت به‌سمت رویکرد فردی‌تر برای درمان با وارفارین را برجسته می‌کند. در حال حاضر، برای ارزیابی الگوریتم‌های اندازه‌گیری به مطالعات آینده‌نگر بالینی نیاز است که سهم سن، ژنوتیپ، و وزن را در اختیار قرار می‌دهند تا امکان تعیین دوز وارفارین را در طول هر دو مرحله شروع و نگهداری درمان فراهم آورند.

فراوان‌ترین پلی‌مورفیسم در جمعیت مورد مطالعه، آلل CYP2CP*۳*۳ و VCORC1 G>A است. در مطالعه‌ی Rad و همکاران بر روی ۹۵ بیمار مراجعه کننده به بیمارستان مدرس تهران، فراوانی افراد با آلل ۱*۱*، ۱*۲*، ۱*۳*، ۱*۳* و ۲*۳* برای ژن CYP2C9 به ترتیب ٦۸/٤۲، ۱۰/۵۲، ۱۸/۹٤ و ۲/۱ درصد بود که نشان داد، آلل ۱*۱* فراوان‌ترین آلل بوده است (۱٦).

در مطالعه‌ی طباطبایی و همکاران بر روی ۲۰۰ بیمار با اختلالات قلبی- عروقی در منطقه‌ی شمال غرب ایران، میزان فراوانی پلی‌مورفیسم و نوع ژنوتیپ درگیر VKORC1 در دو جنس مؤنث و مذکر ژنوتیپ نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت به ترتیب ۲۱/٦، ۵۳/۷ و ۲٤/۵ درصد در زنان و ۲۲/۳، ٦۰/٦ و ۱۷/۰۲ درصد در مردان مشاهده شد (۱۷) که با جمعیت مورد بررسی ما نیز همخوانی داشت.

در مطالعه‌ی Emadian Razavi و همکاران بر روی ۱۱۵ بیمار در شهر بیرجند، فراوانی ژنوتیپ‌های نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت جهش‌یافته واریانت VCORC1 G>A به ترتیب ٤۸/۷، ۳۸/۹ و ۱۲/٤ درصد بدست آمد که میزان فراوانی ژنوتیپ هموزیگوت با نتایج بدست آمده ما مشابه بود (۱۸).

با توجه به تفاوت ژنوتیپی ژن CYP2C9 در نقاط مختلف شمال و جنوب ایران که باعث تفاوت در دوزاژ وارفارین می‌شود، بهتر است از تجویز دوزاژ مشابه به افراد اجتناب شود؛ فراوانی آلل CYP2CP*۱*۱ در بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان مدرس تهران غالب بوده (۱٦) ولی در جمعیت ما آلل CYP2CP*۳*۳ غالب می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد، حضور پلی‌مورفیسم ژن CYP2C9 و VKORC1 اثر مهمی بر دوز وارفارین مورد نیاز برای حفظ INR در محدوده‌ی ۳-۲ دارد. در این مطالعه آلل CYPC2CP*3*3 و VKORC1 -1639G>A شایع‌ترین پلی‌مورفیسم‌های موجود بود. همچنین ما نشان دادیم که ترکیب سن، وزن و ژنوتیپ CYP2C9 و VKORC1، بهترین تخمین دوز نگهداری وارفارین را ممکن می‌سازند. در این میان تفاوت معنی‌داری در دوز وارفارین بین بیماران زن و مرد نداشتیم، لذا جنسیت هیچ سهم معنی‌داری در مدل رگرسیون نداشت.

تشکر و قدردانی

این مقاله منتج از پایان‌نامه‌ی مقطع دستیاری رشته‌ی آسیب‌شناسی به شماره ۹۸-۰۱-۰۱-۱۹۵۷۱ که در دانشگاه علوم پزشکی شیراز تصویب و مورد حمایت مالی دانشگاه قرار گرفت. بدین‌وسیله از زحمات استاد شیرازی تقدیر و تشکر می‌شود.

References

1. Patel S, Preuss CV, Bhutani J, Patel N. Warfarin. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024.
2. Gedge J. A comparison of a low-dose warfarin induction regimen with the modified Fennerty regimen in elderly inpatients. Age Ageing 2000; 29(1): 31-4.
3. Takahashi H, Wilkinson GR, Nutescu EA, Morita T, Ritchie MD, Scordo MG, et al. Different contributions of polymorphisms in VKORC1 and CYP2C9 to intra- and inter-population differences in maintenance dose of warfarin in Japanese, Caucasians and African-Americans. Pharmacogenet Genomics 2006; 16(2): 101-10.
4. Taşkın BD, Kula S, Ergün MA, Altun D, Olguntürk R, Tunaoğlu FS, et al. The effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms on warfarin dose requirements in a pediatric population. Anatol J Cardiol 2016; 16(10): 791-6.
5. Shalia KK, Doshi SM, Parikh S, Pawar PP, Divekar SS, Varma SP, et al. Prevalence of VKORC1 and CYP2C9 gene polymorphisms in Indian population and its effect on warfarin response. J Assoc Physicians India 2012; 60: 34-8.
6. Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. Blood 2010; 115(18): 3827-34.

7. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. Clin Pharmacol Ther 2010; 87(5): 572-8.
8. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. N Engl J Med 2013; 369(24): 2294-303.
9. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, Robert A, Dubert L, Funck-Brentano C, et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. Blood 2005; 106(1): 135-40.
10. Tellor KB, Nguyen SN, Bultas AC, Armbruster AL, Greenwald NA, Yancey AM. Evaluation of the impact of body mass index on warfarin requirements in hospitalized patients. Ther Adv Cardiovasc Dis 2018; 12(8): 207-16.
11. Khoury G, Sheikh-Taha M. Effect of age and sex on warfarin dosing. Clin Pharmacol 2014; 6: 103-6.
12. Anand SS, Yusuf S. Oral anticoagulant therapy in patients with coronary artery disease: A meta-analysis. JAMA 1999; 282(21): 2058-67.
13. Wadelius M, Sörlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PKE, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. Pharmacogenomics J 2004; 4(1): 40-8.
14. Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S, Aono H, Inoue K, Koide T, et al. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and γ-glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. Blood 2004; 103(7): 2630-5.
15. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature 2004; 427(6974): 537-41.
16. Rad F, Hamidpour M, Saadat H, Poopak B. Evaluation of common polymorphism of CYP2C9 in Warfarin-treated patients [in Persian]. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2016; 12(4): 340-6.
17. Tabatabaei SM, Monfaredan A, Bargahi N, Dabiri Oskuei S. Study of polymorphism frequency of 1639G> A gene from VKORC1 in patients with cardiovascular disorders in the northwestern area of Iran [in Persian]. J Arak Uni Med Sci 2012; 15(4): 40-6.
18. Emadian Razavi F, Zarban A, Hajipoor F, Naseri M. The allele frequency of CYP2C9 and VKORC1 in the Southern Khorasan population. Res Pharma Sci 2017; 12(3): 211-21.

DOI: *10.48305/jims.v41.i742.0980*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 742, 2nd Week, January 2024**

Received: 06.01.2023 Accepted: 28.12.2023 Published: 04.01.2024

Pharmacogenetics Study of Warfarin by Genotyping of CYP2C9 and VKORC1 Polymorphism to Determination of Sensitivity and Resistance to Warfarin in the Population of Southern Iran

Javad Jahangiri[1], Babak Shirazi Yeganeh[2], Ardeshir Bahmanimehr[3]

Original Article

Abstract

Background: Since 1950, warfarin has been widely used as an anticoagulant medication for the prevention and treatment of thromboembolism. Various factors such as age, weight, diet, and genetic factors such as CYP2C9 and VKORC1 genes are involved in determining the dose of warfarin. This study was conducted to evaluate common polymorphisms in patients treated with warfarin.

Methods: The present cross-sectional study was conducted in the laboratory of Shahid Dastghib Hospital in Shiraz, Iran, in 2019. A total of 99 patients were selected for this study. Patients were receiving warfarin for various reasons, including heart problems. CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms were investigated by a multiplex PCR method.

Findings: The haplotype frequencies of CYP2C9 alleles with *1*1, *1*3, *2*3, and *3*3 combinations were 1, 9.1, 19.2, and 70.2 percent, respectively. Among VKORC1 -1639G> A gene, allele GA, by 52.5%, was most frequent, followed by GG and AA with 34.3%, and 13.1% respectively.

Conclusion: The results showed a significant effect of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on the required starting dose of warfarin to maintain INR in the range of 2-3. The CYPC2CP * 3*3* and VKORC1 -1639 G>A alleles were the most common polymorphisms in the studied population. The combination of age, weight, and haplotype genotypes of CYP2C9 and VKORC1 was the best predictive value. We can calculate the weekly dose of warfarin with the regression equation and help determine the starting dose of this drug for people with similar conditions.

Keywords: Warfarin; Genetic polymorphism; Human CYP2C9 protein; Human VKORC1 protein

Citation: Jahangiri J, Shirazi Yeganeh B, Bahmanimehr A. **Pharmacogenetics Study of Warfarin by Genotyping of CYP2C9 and VKORC1 Polymorphism to Determination of Sensitivity and Resistance to Warfarin in the Population of Southern Iran.** J Isfahan Med Sch 2024; 41(742): 980-7.

1- MD, Department of Pathology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
2- Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
3- PhD, Department of Medical Genetic, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Babak Shirazi Yeganeh, Assistant Professor, Department of Pathology, School of Medicine, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran; Email: shirazpathology@gmail.com