ORIGINAL ARTICLE

Frequency of VKORC1 Gene Polymorphisms and Its Association with Warfarin Dose Requirement in Patients from Mazandaran Province

Ebrahim Salehifar[1],
Fahimeh Farhadi[2],
Ghasem Janbabai[3],
Nematollah Ahangar[4]

[1] Department of Clinical Pharmacy, Thalassemia Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Cancer Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[4] Department of Toxicology/Pharmacology, Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received April 10, 2012; Accepted October 7, 2012)

Abstract

Background and purpose: The aim of this study was to determine the influence of three vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1) polymorphisms (-1639G>A, 1173C>T and 3730G>A) on warfarin dose requirement in patients from Mazandaran province, Iran.

Materials and methods: A total of 29 patients taking warfarin for at least three months with stable dose requirements enrolled in the study. DNA samples from these patients were genotyped for polymorphisms in VKORC1 gene using Real-Time PCR. Statistical analysis was performed to examine the associations between demographic characteristics (e.g. age, sex, weight, height and BMI), genetic factors, and maintenance dose of warfarin.

Results: In -1639G>A polymorphism, 25 patients (86.2%) were AA, two patients (6.9%) were GA and two patients (6.9%) were GG genotype. Mean dose of warfarin in patients with AA genotype was lower but their INR was higher than other two genotypes. In 1173C>T, 26 patients (89.7%) were TT, two patients (6.9%) were CC and one patient (3.4%) was CT. The mean dose of warfarin in patients with CT genotype was also lower but their INR was higher from other two genotypes. In 3730G>A, 28 patients (96.5%) were GG and only one patient (3.5%) was GA. Significant correlation was only seen between -1639G>A polymorphism and warfarin dose requirement.

Conclusion: In the present study, we observed genetic polymorphism in all three regions. -1639G>A polymorphism was important determinants of warfarin dose requirements in our patients. The correlation between dose requirements and INR with polymorphisms was similar to other studies, however, percentage of genotypes in each polymorphism was different from other populations.

Keywords: Polymorphisms, warfarin, VKORC1, INR

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(94): 44-52 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و دوم شماره ۹۴ آبان سال ۱۳۹۱ (۵۲-۴۴)

بررسی فراوانی پلی مرفیسم‌های ژن آنزیم ویتامین K اپوکسید ردوکتاز و ارتباط آن با میزان نیاز به وارفارین در بیماران استان مازندران

ابراهیم صالحی فر [۱]
فهیمه فرهادی [۲]
قاسم جان بابایی [۳]
نعمت الله آهنگر [۴]

چکیده

سابقه و هدف: هدف از انجام مطالعه حاضر ارزیابی نقش ۳ پلی‌مرفیسم مهم، (1639G>A-، 1173C>T و 3730G>A) ژن VKORC1 در میزان نیاز به وارفارین بیماران استان مازندران می باشد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر با ۲۹ بیمار که حداقل ۳ ماه تحت درمان با دوز ثابت داروی وارفارین بودند انجام گرفت. DNA استخراج شده از لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به روش PCR تکثیر شده و محصولات PCR جهت تعیین ژنوتیپ، تعیین توالی شدند. جهت بررسی ارتباط بین داده‌های دموگرافیک بیماران، فاکتورهای ژنتیکی و دوز نگهدارنده وارفارین صورت پذیرفت از آنالیزهای آماری استفاده شد.

یافته‌ها: در ناحیه 1639G>A، ۲۵ بیمار (۸۶/۲ درصد) ژنوتیپ AA، ۲ بیمار (۶/۹ درصد) ژنوتیپ GA و ۲ بیمار (۶/۹ درصد) ژنوتیپ GG بودند. میانگین دوز مصرفی در ژنوتیپ AA نسبت به دو ژنوتیپ دیگر کمتر، اما INR آنان بیش از دو ژنوتیپ دیگر بود. در ناحیه 1173C>T، ۲۶ بیمار (۸۹/۷ درصد) ژنوتیپ TT، ۲ بیمار (۶/۹ درصد) ژنوتیپ CC و یک ۱ بیمار ژنوتیپ CT بودند. در ناحیه 3730G>A، ۲۸ بیمار (۹۶/۵ درصد) ژنوتیپ GG و ۱ بیمار GA بودند. از پلی مورفیسم‌های مورد مطالعه، تنها پلی مورفیسم 1639G>A- ارتباط معنی‌داری با دوز مصرفی وارفارین داشت.

استنتاج: پلی مورفیسم ژنتیکی در هر سه ناحیه 1639G>A-، 1173C>T و 3730G>A ، بیماران مشاهده شد. پلی مورفیسم ناحیه 1639 G>A- در دوز وارفارین مورد نیاز بیماران مؤثر بود. ارتباط دوز مورد نیاز وارفارین و INR حاصله با نوع پلی‌مورفیسم بیماران مطالعه حاضر با دیگر مطالعات همخوانی داشت، اما از نظر درصد ژنوتیپ‌های مشاهده شده در هر ناحیه، تفاوت‌هایی با سایر جمعیت‌ها مشاهده شده است.

واژه های کلیدی: پلی مرفیسم ژنتیکی، وارفارین، VKORC1، INR

مقدمه

وارفارین، سنتز وابسته به ویتامین K فاکتورهای انعقادی وابسته به کلسیم (شامل X,IX,VII,II) را در مسیر خارجی و نیز پروتئین‌های تنظیمی C و S را مهار می‌کند. پیش سازهای این فاکتورهای انعقادی برای

مولف مسئول: نعمت الله آهنگر– ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات علوم دارویی E-mail :dr.n.ahangar@gmail.com
۱. گروه داروسازی بالینی دانشکده داروسازی، مرکز تحقیقات تالاسمی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. مرکز تحقیقات سرطان، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. مرکز تحقیقات علوم دارویی و گروه سم شناسی/داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۱/۱/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۱/۷/۵ تاریخ تصویب : ۱۳۹۱/۷/۱۶

اتصالشان به فسفو لیپید سطحی اندوتلیوم عروق خونی به کربوکسیلاسیون بقایای گلوتامیک اسید توسط γ-گلوتامیل کربوکسیلاز (GGCX) نیاز دارند. واکنش کربوکسیلاسیون سبب تبدیل فرم احیایی ویتامین K (Vitamin K hydroquinone) به ویتامین K اپوکساید می‌گردد. ویتامین K اپوکساید به‌طور برگشت‌پذیر توسط آنزیم ویتامین K اپوکساید ردوکتاز یا ویتامین K اکسیدو ردوکتاز (VKORC: Vitamine K Oxido-reductase Complex) به ویتامین K و vitamin k hydroquinone تبدیل می‌شود(۱). وارفارین آنزیم ویتامین K اپوکساید ردوکتاز (خصوصاً زیر واحد VKORC1) را مهار نموده و به دنبال آن ویتامین K و vitamin k hydroquinone در دسترس بافت را کاهش داده و از فعالیت کربوکسیلازی γ-گلوتامیل کربوکسیلاز جلوگیری می‌کند(۴-۲). ژن VKORC1 انسانی، در بازوی کوتاه کروموزوم ۱۶ قرار داشته بیش از ۵۱۲۶ جفت باز دارد و شامل ۳ منطقه اگزون و ۲ منطقه اینترون می‌باشد که یک پروتئین غشائی کامل با ۱۶۳ اسید آمینه را کد می‌کند(۵). در سال ۲۰۰۵ دو نوع موتاسیون جدید در ژن VKORC1 یافت شد که یکی از آن‌ها در ناحیه اینترون ۱ (1173C>T) و دیگری در ناحیه 3□ UTR (3730G>A) می باشد(۶).

در سال ۲۰۱۰ پلی مورفیسم 1639G>A- نیز معرفی و نشان داده شد که در تغییرات بین فردی پاسخ به وارفارین نقش مهمی دارد(۷). بررسی‌ها نشان داد که پلی مورفیسم در ژن VKORC1 مسئول بروز ۳۰ درصد تغییرات در دوزاژ وارفارین و تفاوت های دوز وارفارین در نژادهای مختلف می‌باشد(۵).

در مطالعه‌ای در جنوب ایران، متوسط نیاز بیماران به وارفارین جهت دستیابی به INR ۲ تا ۳، میلی‌گرم در هفته ۲۷/۲ بوده و جنس، قد، سن، ژنوتیپ CYP2C9 و VKORC1 تأثیر قابل ملاحظه‌ای روی نیاز به وارفارین داشته‌اند(۸). در مطالعه‌ای که اخیراً در انگلستان انجام شده، ۱۴/۵ درصد بیماران ژنوتیپ هموزیگوت AA در ناحیه 1639 G>A- داشته‌اند که با دوز کمتر به INR هدف (۲/۵) رسیده و بیشتر دچار خونریزی شده بودند(۹). در مطالعه‌ای در چین نیز نشان داده شد که بیماران با ژنوتیپ 1639 GA- به دوز نگهدارنده بالاتری از وارفارین در مقایسه با ژنوتیپ AA نیاز دارند(۱۰). با توجه به تفاوت‌های بین فردی و بین قومی در پاسخ به وارفارین، کم وسعت بودن دامنه درمانی وارفارین و در دسترس نبودن اطلاعات کافی در مورد پلی‌مورفیسم‌های ژن VKORC1 در افراد ایرانی، مطالعه حاضر به منظور بررسی پلی‌مورفیسم‌های مذکور در ژن VKORC1 در مازندران انجام شد.

مواد و روش‌ها

افراد مورد مطالعه

بیماران مورد مطالعه، افراد مراجعه کننده به کلینیک فوق تخصصی طوبی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، تحت درمان با وارفارین و زیر نظر پزشک انکولوژیست در فاصله زمانی ۱۳۹۰-۱۳۸۸ بودند. معیارهای ورود به مطالعه شامل، سن ۱۸ سال به بالا، مصرف وارفارین حداقل به مدت ۳ ماه و عدم تغییر دوز دارو در ۱ ماهه قبل بود. معیارهای خروج از مطالعه، شامل بارداری، افرادی که قصد باردار شدن داشته، شیردهی، اختلالات تیروئیدی و مصرف همزمان داروهایی که تداخل دارویی درجه ۱ با وارفاین دارند، بود. اطلاعات دموگرافیک بیماران (سن، جنس، وزن، قد و ایندکس وزنی بدن)، نوع بیماری، داروهای مصرفی و دوزاژ، PT، INR و پارامترهای فارماکوکینتیکی (کلیرانس، حجم توزیع ظاهری و نیمه عمر حذف) تشکیل می داد. دوز وارفارین با یک قرص ۵ میلی گرم شروع و بر اساس PT و INR تعدیل لازم جهت دستیابی به INR هدف انجام شد.

تعیین ژنوتیپ

۵ سی‌سی نمونه خون وریدی از بیماران دریافت و

در فریزر ^{o}C ۷۰ - نگهداری شد. به منظور جلوگیری از انعقاد نمونه‌های خونی، ۰/۵ سی سی از محلول سیترات سدیم ۳/۸ درصد به عنوان ماده ضد انعقاد افزوده گردید. DNA از نمونه‌های خونی با استفاده از محلول DNG™-plus (شرکت سیناژن، ایران) و بر اساس پروتکل مربوطه استخراج گردید. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)، از DNA به‌دست آمده به میزان ۰/۲µl به همراه مخلوط واکنشی زیر در حجم نهایی ۲۰µl استفاده شد: ۰/۲۵µM از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پسرو (شرکت سیناژن، ایران) که مشخصات آن‌ها در جدول شماره ۱ آمد، dNTP ۰/۱µM، ۰/۶۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (Cinnagene, Iran)، ۲µL از 10X PCR buffer، ۱/۵ میلی‌گرم منیزیم کلراید و در نهایت تا حجم نهایی ۲۰µl.آب مقطر استریل، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه Gradient Thermocycler (Bio-Rad, USA) و با شرایط زیر انجام گرفت:

۱. ۹۴ ^{o}C به مدت ۵ دقیقه

۲. ۳۰ سیکل شامل: ۹۴^{o}C به مدت ۳۰ ثانیه، دمای آنیلینگ مناسب هر پرایمر به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲^{o}C به مدت ۳۰ ثانیه

۳. ۷۲^{o}C به مدت ۵ دقیقه

جدول شماره ۱: توالی ها و مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در PCR

پلی مرفیسم	توالی	دمای آنیلینگ (^{o}C)	اندازه محصول PCR (جفت باز)
-1639G>A	F 5□-GCCAGCAGGAGAGGGAAATA-3□ R 5□-AGTTTGGACTACAGGTGCCT-3□	۵۹	۲۸۹
1173C>T	F 5□-TGACATGGAATCCTGACGTG-3□ R 5□- GAGCTGACCAAGGGGGAT-3□	۵۷	۳۶۱
3730G>A	F 5□- AGCCTGATGTGGCTCAGTTT-3□ R 5□- ATAACCACCCTTAAACGCAG-3□	۵۸	۴۶۷

۵µl از محصول هر PCR پس از مخلوط شدن با بافر مخصوص Loading به چاهک های ژل آگارز ۱/۵ درصد افزوده شدند. ژل مورد نظر به هنگام ساخت، توسط اتیدیوم بروماید مورد رنگ آمیزی قرار گرفت. در دو طرف نمونه ها، دو نمونه از DNA Ladder با فواصل ۵۰bp جهت تأیید محصول PCR اضافه گردید. الکتروفورز به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ثابت ۵۰ ولت و در دمای آزمایشگاه انجام شد. جهت رؤیت باندهای مربوطه، پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه Gel Documentation (Bio-Rad, USA) قرار گرفته، تحت نور UV از آن عکس برداری شد. محصولات PCR جهت تعیین توالی (Sequencing) به شرکت APPLIED BIOSYSTEMS در فرانسه ارسال شده، پس از تأیید نهایی توسط نرم افزار BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)، تعیین ژنوتیپ شدند(۵، ۱۱ و ۱۲).

تجزیه و تحلیل اطلاعات

اطلاعات به‌دست آمده با نرم افزار SPSS16 و آزمون‌های توصیفی، Independent sample t-test (جهت مقایسه متغیرها در دو جنس مرد و زن) و Correlation مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و $p<۰/۰۵$ به عنوان اختلاف آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

۲۹ بیمار در مطالعه وارد شدند. مشخصات دموگرافیک بیماران در جدول شماره ۲ ارائه شده است. علت تجویز وارفارین در ۱۸ بیمار (۶۲/۰۷ درصد)،

جدول شماره ۲: مشخصات دموگرافیک بیماران مورد مطالعه

	جنس	تعداد	میانگین	انحراف معیار (SD)	حداقل	حداکثر
سن(سال)	زن	۱۶	۴۵/۶۲	۱۳/۱۱	۲۶	۶۷
	مرد	۱۳	۴۶/۵۴	۱۲/۷۲	۲۴	۶۴
	جمع	۲۹	۴۶/۰۳	۱۲/۷۲	۲۴	۶۷
وزن(kg)	زن	۱۶	۷۱/۵	۱۱/۲۷	۵۰	۱۰۰
	مرد	۱۳	۸۲/۵۴	۱۴/۲۹	۶۲	۱۱۷
	جمع	۲۹	۷۶/۴۵	۱۳/۶۶	۵۰	۱۱۷
قد(cm)	زن	۱۶	۱۶۲/۶۲	۴/۹۴	۱۵۶	۱۷۵
	مرد	۱۳	۱۷۰/۳۱	۱۰/۶۲	۱۶۰	۱۸۷
	جمع	۲۹	۱۶۶/۰۷	۸/۷۵	۱۵۶	۱۸۷
BMI(kg/m^2)	زن	۱۶	۲۷/۰۹	۴/۶۶	۱۹/۰۵	۴۱/۰۹
	مرد	۱۳	۲۸/۳۷	۳/۲۲	۲۳/۳۳	۳۳/۴۶
	جمع	۲۹	۲۷/۶۶	۴/۰۶	۱۹/۰۵	۴۱/۰۹

ترومبوز ورید عمیق (DVT)، ۷ بیمار (۲۴/۱۴ درصد) تعویض دریچه قلبی و ۴ بیمار (۱۳/۷۹ درصد) آمبولی ریوی بوده است. توزیع ژنوتیپ بیماران مطالعه حاضر، در نواحی -1639G>A، 1173C>T، 3730G>A در جدول شماره ۳ ارائه شده است. شایع‌ترین ژنوتیپ مشاهده شده در ناحیه -1639G>A ، ژنوتیپ AA (۸۶/۲ درصد)، در ناحیه 1173C>T، ژنوتیپ TT (۸۹/۷ درصد) و در ناحیه 3730G>A، ژنوتیپ GG (۹۶/۵ درصد) بود (جدول شماره ۳).

میانگین دوز مصرفی وارفارین، پارامترهای فارماکوکینتیکی، PT و INR بیماران مورد مطالعه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. قابل ذکر است اطلاعات فارماکوکینتیکی بیماران، از نتایج پایان نامه شماره ۲۳۴ دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران که روی همین بیماران مطالعه شده بود، استخراج شد(۱۳).

از نظر دوز، پارامترهای فارماکوکینتیکی شامل کلیرانس، حجم توزیع و نیمه عمر حذف، PT و INR در دو جنس تفاوت معنی داری مشاهده نشد. نتایج ارتباط بین دوز وارفارین با داده‌های دموگرافیک در جدول شماره ۵ نشان شده است. همچنین این جدول بیانگر ارتباط معنی‌دار بین دوز مصرفی وارفارین با سن بیماران می‌باشد و آن اینکه با افزایش سن بیماران، دوز وارفارین تجویز شده کمتر بود (p<۰/۰۰۱). به‌علاوه، (p =۰/۰۷) با r = - ۰/۳۴ بین دوز مصرفی وارفارین BMI تفاوت معنی داری به دست آمد (p =۰/۰۷ یا r =۰/۳۴). وجود دارد. بیشترین دوز وارفارین، مربوط به بازه سنی ۳۱-۲۰ بود (۱/۶۱ ± ۹/۳۷ میلی گرم) و کمترین میزان در افراد بین ۷۰- ۶۱ (۱/۲۵ ± ۴/۳۷ میلی گرم) بود. ارتباط بین دوز مصرفی وارفارین با ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول شماره ۶ ارائه شده است. از نتایج مطالعه حاضر، تنها ارتباط معنی‌دار، بین میانگین دوز مصرفی و پلی مورفیسم -1639G>A یافت شد (p<۰/۰۵).

ارتباط بین INR با ژنوتیپ های مورد مطالعه در جدول شماره ۷ ذکر شده است.

جدول شماره ۳: توزیع ژنوتیپی بیماران حاضر در مطالعه

پلی مورفیسم	ژنوتیپ	تعداد	درصد
-1639G>A	AA	۲۵	۸۶/۲
	GG	۲	۶/۹
	GA	۲	۶/۹
1173C>T	CC	۲	۶/۹
	TT	۲۶	۸۹/۷
	CT	۱	۳/۴
3730G>A	AA	۰	۰
	GG	۲۸	۹۶/۵
	GA	۱	۳/۵

جدول شماره ۴: دوز وارفارین، پارامترهای فارماکوکینتیکی، PT و INR بیماران مورد مطالعه

	جنس	تعداد	میانگین	انحراف معیار	حداقل	حداکثر	سطح معنی داری
دوز مصرفی	زن	۱۶	۵/۶۲	۲/۴۱	۱/۲۵	۱۱/۲۵	۰/۹۵
	مرد	۱۳	۵/۶۷	۱/۷۴	۲/۵	۱۰	
	جمع	۲۹	۵/۶۵	۲/۱۰	۱/۲۵	۱۱/۲۵	
کلیرانس (لیتر بر ساعت)	زن	۱۶	۰/۲۳	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۵۰	۰/۳۲
	مرد	۱۳	۰/۲۹	۰/۱۶	۰/۱۴	۰/۶۰	
	جمع	۲۹	۰/۲۶	۰/۱۳	۰/۰۴	۰/۶۰	
نیمه عمر حذف (ساعت)	زن	۱۶	۶۵/۳۲	۴۵/۶۳	۱۷/۴۹	۱۸۶/۵۶	۰/۵۷
	مرد	۱۳	۵۵/۹۰	۴۰/۵۵	۲۸/۶۴	۱۷۴/۰۳	
	جمع	۲۹	۶۱/۵۵	۴۳/۲۰	۱۷/۴۹	۱۸۶/۵۶	
حجم توزیع ظاهری (لیتر)	زن	۱۶	۵/۵۰	۲/۳۷	۳	۹/۶۴	۰/۰۹
	مرد	۱۳	۶/۴۵	۳/۳۴	۳	۱۵/۳۵	
	جمع	۲۹	۵/۹۳	۲/۸۳	۳	۱۵/۳۵	
PT	زن	۱۶	۱۶/۳۹	۱۶/۶۱	۳/۴۰	۱۱/۴۰	۰/۸۷
	مرد	۱۳	۱۶/۶۱	۱۶/۴۹	۳/۹۷	۱۲/۵۰	
	جمع	۲۹	۱۶/۴۹	۱۶/۴۹	۳/۶۰	۱۱/۴۰	
INR	زن	۱۶	۱/۷۹	۰/۴۵	۱/۱۰	۲/۷۰	۰/۴۱
	مرد	۱۳	۱/۶۵	۰/۴۶	۱/۱۰	۲/۴۰	
	جمع	۲۹	۱/۷۳	۰/۴۵	۱/۱۰	۲/۷۰	

جدول شماره ۵: بررسی ارتباط دوز مصرفی وارفارین با داده های دموگرافیک

	ضریب همبستگی پیرسون (r)	سطح معنی داری
سن	- ۰/۶۶	< ۰/۰۰۱
BMI	- ۰/۳۴	۰/۰۷

جدول شماره ۶: ارتباط میانگین دوز مصرفی وارفارین با ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

پلی مورفیسم	سطح معنی داری	ژنوتیپ	تعداد	میانگین	انحراف معیار
-1639G>A	۰/۰۰۳	AA	۲۵	۵/۱۰	۱/۵۷
		GG	۲	۱۰/۶۲	۰/۸۸
		GA	۲	۷/۵۰	۰
		کل	۲۹	۵/۶۵	۲/۱۰
1173C>T	۰/۱۳۳	CC	۲	۱۰	۱/۷۷
		TT	۲۶	۵/۳۳	۱/۷۹
		CT	۱	۵	۰
		کل	۲۹	۵/۶۵	۲/۱۰
3730G>A	۰/۷۶۱	AA	۰	—	—
		GG	۲۸	۵/۶۷	۲/۱۴
		GA	۱	۵	۰
		کل	۲۹	۵/۶۵	۲/۱۰

جدول شماره ۷: ارتباط میانگین INR با ژنوتیپ های مورد مطالعه

پلی مورفیسم	سطح معنی داری	ژنوتیپ	تعداد	میانگین	انحراف معیار
-1639G>A	۰/۲۱۰	AA	۲۵	۱/۷۷	۰/۴۶
		GG	۲	۱/۶۵	۰/۷۱
		GA	۲	۱/۳۵	۰/۳۵
		کل	۲۹	۱/۷۳	۰/۴۵
1173C>T	۰/۳۱۳	CC	۲	۱/۹۰	۰/۴۲
		TT	۲۶	۱/۷۰	۰/۴۶
		CT	۱	۲/۱۰	۰
		کل	۲۹	۱/۷۳	۰/۴۵
3730G>A	۰/۴۱۳	AA	۰	—	—
		GG	۲۸	۱/۷۲	۰/۴۵
		GA	۱	۲/۱۰	۰
		کل	۲۹	۱/۷۳	۰/۴۵

بیماران با ژنوتیپ AA در پلی مورفیسم G>A -۱۶۳۹ که دوز کمتری از وارفارین را دریافت کرده بودند، دارای INR بالاتری بودند. هر چند اختلاف دوز دریافتی معنی‌دار بوده (p = ۰/۰۰۳) اما اختلاف INR معنی‌دار نبود.

بحث

مطالعه حاضر سه پلی‌مورفیسم مهم ژن VKORC1، -1639G>A، 1173C>T و 3730G>A را مورد بررسی قرار داد که در ادامه اهمیت پلی مورفیسم‌های مذکور و نیز نتایج سایر مطالعات با تفصیل بیشتر به شرح زیر می‌باشد.

پلی مورفیسم ناحیه 1639G>A

در مطالعه حاضر، از ۲۹ بیمار بررسی شده، ۲۵ نفر (۸۶/۲ درصد) ژنوتیپ AA و ۲ نفر (۶/۹ درصد)، ژنوتیپ GA و ۲ نفر(۶/۹ درصد)، ژنوتیپ GG بودند میانگین دوز مصرفی در پلی مورفیسم -1639G>A ژنوتیپ AA نسبت به دو ژنوتیپ دیگر کمتر بود امّا INR افراد دارای این ژنوتیپ، بیش از دو ژنوتیپ دیگر بودند. در پژوهش Kwon و همکاران (۲۰۱۱)، پلی مورفیسم -1639G>A در ۳۷ بیمار مصرف کننده وارفارین بررسی شد و شایع‌ترین ژنوتیپ مشاهده شده ژنوتیپ AA بوده (۸۹ درصد) که با مطالعه حاضر همخوانی داشت بیماران با آلل VKORC1 -1639G نسبت به آن هایی که این آلل را نداشتند دوز بالاتر از وارفارین را دریافت کرده بودند(۱۴).

Tatarunas و همکاران (۲۰۱۱) پژوهشی را روی ۸۳ بیمار مصرف کننده وارفارین با INR ثابت ۳/۵-۲ انجام دادند. اکثر بیماران ژنوتیپ GA (۵۴/۲ درصد) و GG (۳۸/۶ درصد) داشتند که فراوانی ژنوتیپ AA بسیار کمتر از مطالعه حاضر از نظر دوز مورد نیاز، افراد با ژنوتیپ GG نیاز به دوز بالاتری در مقایسه با ژنوتیپ AA داشتند (۲/۷ ± ۶/۲۰ میلی گرم در مقابل ۱/۴۰ ± ۳/۵۷ میلی گرم) (۱۵). نتایج مشابهی از نظر پایین‌تر بودن دوز مورد نیاز بیماران با ژنوتیپ AA نسبت به بیماران با ژنوتیپ GG در مطالعه‌ای در آمریکا (۱۶) و آرژانتین (۱۷) گزارش شد.

در مطالعه‌ای در چین نیز نشان داد که بیماران با ژنوتیپ 1639 AG- به دوز نگهدارنده بالاتری از وارفارین در مقایسه با ژنوتیپ AA نیاز دارند و ژنوتیپ VKORC1 همراه با تفاوت‌های مشاهده شده در CYP2C9، CYP4F2، سن و سطح بدن ۴۲ درصد تفاوت در دوز وارفارین را توجیه می‌کنند(۱۰).

در مطالعه‌ای که اخیراً در انگلستان انجام شد نیز نیاز به وارفارین بیماران ژنوتیپ هموزیگوت AA در ناحیه 1639 G>A- جهت دستیابی به INR هدف (۲/۵)، کمتر بوده و این بیماران بیشتر دچار خونریزی شده بودند(۹). در مطالعه‌ای در جنوب ایران، آلل های ژن VKORC1 در ناحیه 1639- بررسی شد. ۵۵/۶ درصد بیماران آلل 1639 AA- داشته اند که مشابه یافته‌های حاصله از نژاد سفیدپوست بوده اما با نژاد چینی (۹۶ درصد) و آمریکایی‌های آفریقایی تبار (۱۳ درصد) اختلاف داشته است. شیوع AA (۸۶/۲ درصد) در مطالعه حاضر از مطالعه انجام شده در شیراز بیشتر بود(۱۸).

پلی مورفیسم ناحیه 1173C>T

در مطالعه حاضر، از ۲۹ بیمار بررسی شده، در ناحیه 1173C>T، ۲۶ نفر(۸۹/۷ درصد) ژنوتیپ TT داشتند. دو بیمار (۶/۹ درصد) ژنوتیپ CC و یک بیمار (۳/۴ درصد) ژنوتیپ CT داشتند که دوز مصرفی در بیمار با ژنوتیپ CT نسبت به دو ژنوتیپ دیگر کمتر اما INR آن

بیشتر بود. نتایج مشابهی توسط D'Andrea و همکاران (۲۰۰۵) و Kosaki و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شد و نشان داده شد که ژنوتیپ هتروزیگوت CT سبب افزایش پاسخ به وارفارین و کاهش دوز مورد نیاز می‌شود(۱۶، ۱۹). شیوع ژنوتیپ CT در مطالعه حاضر کمتر از مطالعات ذکر شده بود. بر اساس مطالعات انجام شده، ژنوتیپ 1639G>A- و 1173C>T به‌عنوان عوامل اصلی دخیل در تعیین دوز وارفارین مورد نیاز معرفی شده‌اند(۲۰، ۲۱).

مطالعه Teh و همکاران(۲۰۱۲) نشان داد، مدلی که شامل سن و واریانت های VKORC1 باشد، ۳۷ درصد از تغییرات دوز وارفارین برای رسیدن به INR ۲ تا ۴ را توجیه می‌کند. بین پارامترهای سن، ژنوتیپ، جنس، وزن و قد فقط پلی مورفیسم‌های 1639G>A و 1173C>T در VKORC1 و سن با دوز وارفارین در ۶ ماه اول ارتباط داشتند(۲۰). نتایج مشابهی توسط Limdi و همکاران (۲۰۱۰) در آمریکا نیز گزارش شد(۲۱).

پلی مورفیسم ناحیه 3730G>A

در مطالعه حاضر، شایع‌ترین پلی مورفیسم مشاهده شده، ژنوتیپ GG (۹۶/۵ درصد) و تنها در بیمار (۳/۵ درصد) ژنوتیپ GA بود که میانگین دوز مصرفی در دو ژنوتیپ تفاوت چندانی با هم نداشته اما INR بیمار دارای ژنوتیپ GA بیش از ژنوتیپ دیگر بود. در مطالعه Botton و همکاران (۲۰۱۱)، ضمن تأکید بر نقش پلی مورفیسم 1639G>A- در میزان نیاز به وارفارین، نشان داد که پلی‌مورفیسم ناحیه 3730G>A در تعیین دوز وارفارین نقشی ندارد(۲۲).

ارتباط بین دوز مصرفی وارفارین و INR با BMI، جنسیت و سن بیماران

ارتباط مثبتی بین INR و BMI بیماران مشاهد شد که این ارتباط معنی دار نبود اما بین INR و سن، ارتباط معنی‌داری مشاهده شد به نحوی که با افزایش سن، نیاز بیماران به وارفارین کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین تفاوتی از نظر دوز مصرفی وارفارین و INR در دو جنس مشاهده نشد.

در مطالعه طیبی خسروشاهی و همکاران (۲۰۱۱)، که به‌صورت چند مرکزی در ۵ شهر بزرگ ایران انجام شد تفاوتی از نظر دوز مورد نیاز وارفارین جهت دستیابی به INR ۲ تا ۳ و منطقه جغرافیایی و جنسیت وجود نداشت. دوز مورد نیاز در افراد مسن به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر بیماران بود و همچنین دوز پیشنهاد شده برای جمعیت ایرانی جهت رسیدن به INR ۲ تا ۳، ۴mg بود(۲۳).

در مطالعه Tatarunas و همکاران (۲۰۱۱) نیز دوز روزانه وارفارین با قد، وزن و BMI بیماران خصوصاً بیماران کمتر از ۶۰ سال سن ارتباط معنی داری نشان داد(۱۵). در مطالعه‌ای که اخیراً در کشور هند انجام شد نیز سن، جنس و BMI ، میزان دریافت ویتامین K، ژنوتیپ CYP2C9 (*2,*3) و ژنوتیپ VKORC1 در میزان مورد نیاز بیماران به وارفارین نقش داشته است(۲۴). قابل ذکر است، میانگین و انحراف معیار INR در مطالعه حاضر ۰/۴۵ ± ۱/۷۳ بود که از مقادیر ذکر شده در سایر مطالعات انجام شده در ایران که روی بیماران با INR در محدوده ۲ تا ۳ انجام شده بود، کمتر است(۱۸، ۲۳).

محدودیت های مطالعه

به منظور بررسی دقیق تر نقش پلی‌مورفیسم ژن VKORC1 در میزان نیاز بیماران به وارفارین و INR، تعداد زیادی از بیمارانی که همراه وارفارین از سایر داروهای قلبی- عروقی همانند آمیودارون استفاده می‌کردند وارد مطالعه نشدند و عملاً به پایین بودن تعداد بیماران مطالعه و دشواری مقایسه زیرگروه‌های مختلف پلی مورفیسمی منجر شده است. گرچه پلی‌مورفیسم‌های مهم VKORC1 در مطالعه حاضر بررسی شدند اما اخیراً دو پلی مورفیسم شامل حذف نوکلئوتید (91delCC) در exon 3 و اضافه شدن نوکلئوتید (51addCT) در exon 3 در مطالعه‌ای در تهران گزارش شده‌اند که با

سابقه خونریزی در طی مصرف وارفارین ارتباط داشته و دوز نگهدارنده این بیماران به‌صورت معنی‌داری با سایر بیماران تفاوت داشته است(۲۵). این پلی‌مورفیسم‌ها در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار نگرفته‌اند.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که پلی‌مورفیسم ژنتیکی در هر سه ناحیه 1639G>A-، 1173C>T و 3730G>A در بیماران مطالعه حاضر مشاهده شد. در ناحیه 1639 G>A-، اغلب بیماران هموزیگوت (AA) بود و علی‌رغم دریافت دوز کمتر، INR بالاتری از افراد هتروزیگوت داشتند. در ناحیه 1173C>T، اغلب افراد هموزیگوت TT بودند و به دوز پایین‌تری در مقایسه با ژنوتیپ CC نیاز داشتند و تنها در بیمار با ژنوتیپ GA ناحیه 3730G>A علی‌رغم دوز یکسان با سایر بیماران که ژنوتیپ هموزیگوت GG داشته‌اند، INR بالاتر بود ارتباط بین دوز مورد نیاز و INR حاصله با نوع پلی‌مورفیسم بیماران شبیه سایر مطالعات بود، هر چند از نظر درصد ژنوتیپ‌های مشاهده شده در هر ناحیه، تفاوت‌هایی با سایر جمعیت‌ها وجود داشت. هم چنین به نظر می‌رسد، علت اصلی عدم وجود ارتباط معنی‌دار بین پلی‌مرفیسم در نواحی 1173C>T و 3730G>A با دوز مصرفی وارفارین تعداد کم نمونه‌ها بود که در بخش محدودیت‌ها به آن پرداخته شده است. در نهایت پیشنهاد می‌شود، بررسی پلی‌مورفیسم‌های دیگر از جمله CYP4F2، پلی مورفیسم 494C>T در ژن F2، پلی‌مورفیسم 1075C>T در VKORC1 که در مطالعات اخیر مطرح شده اند در مطالعات آینده مد نظر قرار گیرند(۱۴). هم چنین، با توجه به تأثیر پلی‌مورفیسم ژنتیکی VKORC1، روی میزان نیاز بیمار به وارفارین و با در نظر گرفتن توصیه‌های علمی جدید، سهولت دسترسی به PCR و تعیین پلی‌مورفیسم بیماران در آزمایشگاه‌های مختلف می‌تواند در تجویز مؤثرتر و کم خطرتر وارفارین مؤثر باشد. علاوه بر این، طراحی مطالعه چند مرکزی در کشور به منظور بررسی پلی‌مورفیسم مسیر CYP2C9 هم زمان با VKORC1 و سایر پلی‌مورفیسم‌هایی که اخیراً مطرح شده‌اند و نیز ارزیابی نقش تداخلات دارویی در بیمارانی که داروهای مشخصی را همراه با وارفارین مصرف می‌کنند در مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود. به عبارتی، به جای حذف چنین بیمارانی، می‌توان نقش تداخلات دارویی را به عنوان یک Covariate در مدل‌های رگرسیونی مورد بررسی قرار داد و در مجموع با در نظر گرفتن اطلاعات دموگرافیکی بیماران، پلی مورفیسم‌های ژنتیکی (CYP2C9، VKORC1 و ...)، سایر داروهای همراه، دوز مورد نیاز برای دستیابی به INR مشخص و دقیق را پیش بینی کرد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر حاصل پایان‌نامه دوره دکتری عمومی داروسازی سرکار خانم فهیمه فرهادی و طرح مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی- درمانی مازندران بوده، نویسندگان مقاله مراتب قدردانی و سپاس خود را از معاونت مذکور اعلام می‌دارند. از جناب آقای دکتر بهرام کاظمی و سرکار خانم دکتر فانک فهیمی از اعضاء هیات علمی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران نیز به جهت همفکری در انجام این پژوهش قدردانی می‌شود.

References

1. Whitlon DS, Sadowski JA, Suttie JW. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin k epoxide reductase inhibition. Biochem 1978; 17(8): 1371-1377.
2. Hirsh J, Fuster V, Ansell J, Halperin JL. American Heart Association/American College of Cardiology Foundation guide to warfarin therapy. J Am Coll Cardiol 2003; 41(9): 1633-1652.

3. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin k epoxide reductase. Nature 2004; 427(6974): 541-544.
4. KodaKimble MA, Young LY, Kradjan WA, Guglielmo BJ, Alldredge BK, Corelli RL, et al. Applied Therapeutics: The clinical use of drugs. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
5. Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Müller CR. VKORC1: molecular target of coumarins. J Thromb Haemost 2007; 5(suppl 1): 1-6.
6. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. Blood 2005; 105(2): 645-649.
7. Villagra D, Duconge J, Windemuth A, Cadilla CL, Kocherla M, Gorowski K, et al. CYP2C9 and VKORC1 genotypes in Puerto Ricans: A case for admixture matching in clinical pharmacogenetic studies. Clin Chim Acta 2010; 411(17-18): 1306-1311.
8. Namazi S, Azarpira N, Hendijani F, Khorshid MB, Vessal G, Mehdipour AR. The impact of genetic polymorphisms and patient characteristics on warfarin dose requirements: a cross-sectional study in Iran. Clin Ther 2010; 32(6): 1050-1060.
9. Lund K, Gaffney D, Spooner R, Etherington AM, Tansey P, Tait RC. Polymorphisms in VKORC1 have more impact than CYP2C9 polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates. Br J Haematol 2012; 158(2): 256-261.
10. Liang R, Li L, Li C, Gao Y, Liu W, Hu D, et al. Impact of CYP2C9*3, VKORC1-1639, CYP4F2rs2108622 genetic polymorphism and clinical factors on warfarin maintenance dose in Han-Chinese patients. J Thromb Thrombolysis 2012; 34(1): 120-125.
11. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. Blood 2005; 106(7): 2329-2333.
12. Ahangar N, Kazemi B, Joriani M. Effects of gonadal steroid hormones on GIRK2 gene transcription in the rat central nervous system. Neurosci Lett 2008; 431(3): 201-205.
13. Shabanian K. Evaluation of warfarin pharmacokinetic parameters and its relation to INR in patients from Mazandaran province. PharmD Thesis 2010, 234, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.
14. Kwon A, Jo SH, Im HJ, Jo YA, Park JY, Kang HJ, et al. Pharmacogenetic distribution of warfarin and its clinical significance in Korean patients during initial anticoagulation therapy. J Thromb Thrombolysis 2011; 32(4): 467-473.
15. Tatarūnas V, Lesauskaitė V, Veikutienė A, Jakuška P, Benetis R. The influence of CYP2C9 and VKORC1 gene polymorphisms on optimal warfarin doses after heart valve replacement. Medicina (Kaunas) 2011; 47(1): 25-30.
16. Gage BF. Pharmacogenetics based coumarin therapy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2006: 467-743.
17. Scibona P, Redal MA, Garfi LG, Arbelbide J, Argibay PF, Belloso WH. Prevalence of CYP2C9 and VKORC1 alleles in the Argentine population and implications for prescribing dosages of anticoagulants. Genet Mol Res 2012; 11(1): 70-76.

18. Azarpira N, Namazi S, Hendijani F, Banan M, Darai M. Investigation of allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and VKORC1 in Iran. Pharmacol Rep 2010; 62(4): 740-746.
19. Kosaki K, Yamaghishi C, Sato R, Semejima H, Fuijita H, Tamura K, et al. 1173C>T polymorphism in VKORC1 modulates the required warfarin dose. Pediatr Cardiol 2006; 27(6): 685-688.
20. Teh LK, Langmia IM, Fazleen Haslinda MH, Ngow HA, Roziah MJ, et al. Clinical relevance of VKORC1 (G-1639A and C1173T) and CYP2C9 *3 among patients on warfarin therapy J Clin Pharm Ther 2012; 37(2): 232-236.
21. 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): 3827-3834.
22. Botton MR, Bandinelli E, Rohde LE, Amon LC, Hutz MH. Influence of genetic, biological and pharmacological factors on warfarin dose in a Southern Brazilian population of European ancestry. Br J Clin Pharmacol 2011; 72(3): 442-450.
23. Tayyebikhosroshahi H, Sanaat Z, Farhoudi M, Keyani S, Khoshjoo F, Tayyebikhosroshahi M. Warfarin maintenance dose in Iranian patients: A cross sectional study in 5 cities of Iran. Neurosciences (Riyadh) 2011; 16(2): 125-128.
24. Pavani A, Naushad SM, Mishra RC, Malempati AR, Pinjala R, Kumar TR, et al. Retrospective evidence for clinical validity of expanded genetic model in warfarin dose optimization in a South Indian population. Pharmacogenomics 2012; 13(8): 869-878.
25. Baniasadi S, Beizaee S, Kazemi B, Behzadnia N, Shafaghi B, Bandehpour M, et al. Novel VKORC1 mutations associated with warfarin sensitivity. Cardiovasc Ther 2011; 29(4): e 1-5.