

WARFARİN SENSİTİVİTESİNE FARMAKOGENETİK BİR YAKLAŞIM

A Pharmacogenetic Approach to Warfarin Sensitivity

Dr. Ümran Çetinçelik*, Dr. Vedat Köksal, Dr. Atıf Akyol***, Dr. Başak Baksu***, Dr. İnci Davas*****

* Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2.Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Genetik Polikliniği

**Burç Moleküler Genetik Tanı ve Araştırma Laboratuvarı

*** Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2.Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği

ÖZET

Warfarinin optimal dozunun belirlenmesinde yaş, cins, kilo ve birlikte kullanılan diğer ilaçlarla etkileşiminin yanısıra ilacın metabolizmasını düzenleyen CYP2C9 (Sitokrom P450 CYP2C9) genotipinin belirlenmesi de son yıllarda büyük önem kazanmıştır. Biz de over kist rüptürü nedeni ile opere edilmiş ve postoperatif dönemde yaygın ekimoz gelişmiş Warfarin kullanan olgumuzun CYP2C9*3 mutant genotipini heterozigot olarak taşıdığını saptadık. Olgumuzdaki intraabdominal kanama ve yaygın ekimozun gelişmesinde CYP2C9*1*3 mutant genotipinin etyolojik faktör olarak rol oynayabileceği ve Warfarin tedavisi alması planlanan hastalarda tedavi öncesinde CYP2C9 genotipinin belirlenmesinin faydalı olabileceğini vurgulamak istedik.

Anahtar Kelimeler: Warfarin, CYP2C9, over kist rüptürü, ekimoz.

ABSTRACT

In determining the optimal dosage of Warfarin, defining the CYP2C9 genotype (cytochrome p450 CYP2C9) which regulates the metabolism of the medicine has become very important as well as age, sex, weight and interaction with other drugs. We report the case of this patient who had an operation of an ovary cyst rupture and had developed during the post-operative period a widespread echimosis; treated on warfarin, we found out that this patient was carrying the mutant allele CYP2C9*3.

We believe that the CYP2C9*1*3 mutant genotype may contribute to the development of the intra-abdominal hemorrhage and a widespread echimosis; we also wanted to point the fact that defining the CYP2C9 genotype before to start when it's necessary the Warfarin treatment, might be usefull.

Key Words: Warfarin, CYP2C9, ovary cyst rupture, echimosis

GİRİŞ

Farmakogenetik, ilaca verilen yanıt, ilacın yan etkisi ve toksisitesinin gelişmesi bakımından bireyler veya çeşitli toplumlar arasında gözlenen farklılıkların ortaya çıkışında genetik faktörlerin katkısını inceleyen farmakoloji disiplini. Warfarin, terapötik indeksi dar, en sık ve en önemli komplikasyonu kanama olan, yaygın bir şekilde kullanılan bir oral antikoagülandır. Warfarinin optimal dozunun belirlenmesinde yaş, cins, kilo, antikoagülan verilme endikasyonu gibi faktörlerin yanısıra, ilacın metabolizmasında rol alan Sitokrom P450-CYP2C9 enziminin genotipinin belirlenmesi de son yıllarda büyük önem kazanmıştır (1).

S-Warfarinin metabolizmasından sorumlu enzim olan Sitokrom P450 CYP2C9'un, CYP2C9*1 olarak bilinen normal tipinin yanısıra, CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 olarak adlandırılan iki fonksiyonel allelik formu daha bulunmaktadır. CYP2C9*3 varyantı, normal enzim aktivitesinin %5'inden daha azını gösterirken; CYP2C9*2 varyantı da yaklaşık %12'sini göstermektedir (2). Uzun süre antikoagülan tedavi alan hastalarda yapılan genotipleme çalışmalarında, düşük doz Warfarinle (2 mg) INR'si stabilize olmuş hastalar ile minör ya da majör kanama komplikasyonu gelişmiş hastaların CYP2C9*2 ve *3 formlarını anlamlı olarak daha yüksek oranda taşıdıkları gösterilmiştir (3-6). Biz de over kist rüptürü nedeni ile opere edilmiş ve postoperatif dönemde yaygın ekimoz gelişmiş Warfarin kullanan olguda saptadığımız CYP2C9 genotiplemesinin önemini sunduk.

OLGU

Kırk üç yaşında, G1P1 olan kadın hasta, mitral kapak replasmanı nedeniyle 13 yıldır 2,5 mg/gün Warfarin kullanmakta olup akut batın tablosu ile kliniğimize başvurdu. Yapılan eksploratif laparotomide, sağ over kist rüptürü ve batında da bir litre serbest kan izlendi. Sağ salpingoofektomi yapılarak ve hemostaz sağlanarak operasyon tamamlandı. Hastanın postoperatif biyokimya sonuçları normal olup kanama-pıhtılaşma parametrelerinden protrombin aktivitesi %18,5 (70-136), protrombin zamanı 47,7 sn., İNR 4,2, aktive parsiyel tromboplastin zamanı 60 sn. (26-40 sn.), fibrinojen 212, 7 mg/dl (200-400 mg/dl) idi. Postoperatif birinci günde tüm batın ön-yan duvarında ve insizyonu etrafında yaygın ekimozların geliştiği tespit edildi. Ekimozları nedeniyle lokal alkol pansumanı uygulandı. Warfarin kesilerek Enoxaparin 60 mg 1x1 ile birlikte geniş spektrumlu antibiyotik başlandı. Preoperatif hemogram tablosunda Hb 6,4 gr/dl, Hct %19,7, Plt 272.000/L, WBC 14.400/L olması üzerine hastaya perioperatif ve postoperatif dönemde beş ünite taze kan ve üç ünite plazma transfüzyonu yapılan hasta postoperatif onördüncü gününde şifa ile taburcu edildi. İki ay sonra yine akut batın tablosu ile gelen hastaya over kist rüptürü ön tanısı konuldu. Warfarin kullanma zorunluluğu, myoma uterusu ve tekrarlayan intraabdominal kanaması nedeni ile preoperatif hazırlığı takiben total abdominal histerektomi + unilateral salpingoofektomi uygulandı. Preoperatif dönemde Enoxaparin 60 mg 1x1 başlanan hastada postoperatif dönemde tedaviye devam edilerek yedinci gününde şifa ile taburcu edildi.

Tablo 1. Kullanılan oligo dizileri (primerler) ve restriksiyon enzimleri.

Primerler (5'-3')	Pcr ürünü (bp)	Restriksiyon enzimi	Tanmlanan Allel	Referans
aataataatgacagaggtccaga gatgc gatactatgaatttgggacttc	141	NsiI	CYP2C9*3	Sullivan (10)
tacaaatacaatgaaaatatcatg ctaacaaccagactcataatg	691	AvaII	CYP2C9*2	Sullivan (10)

Hasta, öyküsünde günlük Warfarin dozunun 5 mg'a çıktığı ve Warfarinle birlikte analjezik, antibiyotik ve nonsteroid antienflamatuvar (NSAİ) kullanıldığı zamanlarda 1-2 gün süren ekimozlar tarif etmekte idi. Aile öyküsünde, hastanın teyzesinde kapak replasmanı nedeniyle Warfarin kullanımına bağlı kanama komplikasyonu geliştiği bilgisi alındı. Ayrıca hastada tekrarlayan kist rüptürüne bağlı intraabdominal kanama ve birinci operasyonundan sonra gelişen yaygın ekimozun altındaki olası nedenleri araştırmak amacıyla hastaya CYP2C9 genotiplemesi yaptık.

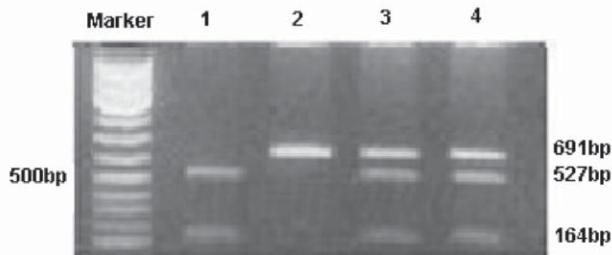
DNA İzolasyonu ve CYP2C9 Genotiplemesi:

Hastadan alınan 5cc EDTA'lı venöz kan örneğinden "Tuzla Çöktürme-Salting Out" yöntemi uygulanarak genomik DNA izolasyonu yapıldı (7). DNA ekstraksiyonunu takiben CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 allellerine spesifik primer dizileri ile pcr yapıldı. Amplifiye olan pcr ürünleri CYP2C9*2 allelini tespit etmek için AvaII, CYP2C9*3 varyantı için de NsiI restriksiyon enzimleri ile 37°C'de 4 saat inkübe edildi. Restriksiyon işlemi tamamlandıktan sonra ürünler %3'lük agaroz-gel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV transillüminatörde bakılarak değerlendirildikten sonra dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

Bu çalışmada kullanılan oligo dizileri (primerler) ile restriksiyon enzimlerine ilişkin bilgiler Tablo 1'de görülmektedir.

CYP2C9*2 Allelinin Belirlenmesi:

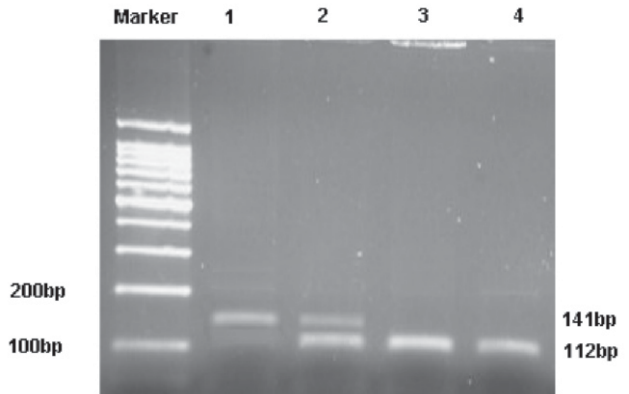
CYP2C9*2 allelini belirlemek amacıyla pcr ürünleri AvaII enzimi ile kesildi. Kesim sonucunda hastanın bu mutant alleli taşımadığı belirlendi. Şekil 1'de CYP2C9*2 alleleline ait jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 1: M: Size Marker; 1: Hasta-Homozigot normal , 2: Homozigot mutant kontrol , 3 ve 4: Heterozigot mutant kontrol

CYP2C9*3 Varyantının Belirlenmesi:

CYP2C9*3 allelini belirlemek amacıyla pcr ürünleri NsiI enzimi ile kesildi. Kesim sonucunda hastanın bu mutant alleli heterozigot olarak taşıdığı (CYP2C9*1*3 genotipi) belirlendi. Şekil 2'de CYP2C9*3 alleleline ait jelin fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 2: M: Size Marker; 1: Homozigot mutant kontrol , 2: Hasta-Heterozigot mutant, 3 ve 4: Homozigot normal

TARTIŞMA

İlaçları metabolize eden enzimleri kodlayan genlerdeki polimorfizmler, genin ürünü olan proteinlerde amino asit değişikliğine yol açabilmekte, bu da proteinin işlevinde azalma ya da artışla sonuçlanmaktadır. Warfarin ve fenitoin gibi terapötik indeksi dar olan ilaçlar, yavaş metabolizörler tarafından alındığında plazma konsantrasyonlarının hızla normalin çok üstüne çıkmasından ve atılımının da gecikmesinden dolayı bu bireylerde ilacın yan etkileri ve toksisite daha çabuk ve daha sık olarak gözlenmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl ortalama 106.000 kişi istenmeyen ilaç reaksiyonlarından (ADR=Adverse Drug Reactions) dolayı yaşamını yitirmektedir. Bu sayı, trafik kazalarından dolayı bir yılda ölen insan sayısından beş kat daha fazladır ve ölüm nedenleri arasında da kalp hastalıkları, kanser ve inmeden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (8).

CYP2C9*2 ve *3 allelik varyantlarının S-Warfarinin metabolizmasında yetersiz kaldığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (9). Tabrizi ve arkadaşları yayınladıkları bir olgu sunumunda, atrium fibrilasyonu nedeniyle 3 mg/gün Warfarin alan doksanbir yaşındaki bir kadın hastanın sağ bacağına gelişen yaygın subkutanöz hematoma nedeniyle hastaya CYP2C9 genotiplenmesi yapmışlar ve hastanın CYP2C9*2 mutant genotipini heterozigot olarak taşıdığını tespit etmişlerdir (10). Yine, Ablin ve arkadaşları, atrium fibrilasyonu ve sağ hemiparezi ile motor afazi nedeniyle haftada 17,5 mg Warfarin kullanan seksenüç yaşındaki erkek hastanın pulmoner konjesyon nedeniyle hospitalize edildikten sonra Warfarinin kesilmesine rağmen kanama olmaksızın INR'sinin yükselmeye devam etmesi üzerine hastaya CYP2C9 genotiplenmesi yapmışlar ve hastanın CYP2C9*3 mutant formunu homozigot olarak taşıdığını tespit etmişlerdir (11). Ayrıca, uzun süre antikoagülan tedavi alan hastalarda yapılan genotipleme çalışmalarında da, düşük doz Warfarinle (2 mg) INR'si stabilize olmuş hastalar ile minör ya da majör kanama komplikasyonu gelişmiş hastaların CYP2C9*2 ve *3 formlarını anlamlı olarak daha yüksek oranda taşıdıkları konfirme edilmiştir (3-6).

Warfarinin antikoagülan etkisi 24 saat içinde ortaya çıkmakta ancak pik yapması 72-96 saate kadar uzayabilmektedir. Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotiklerin Warfarinin antikoagülan etkisini arttırdığı da bilinmektedir (12). Kliniğimize başvurduğu gün, günlük normal Warfarin dozunu alan hastanın postoperatif birinci günden itibaren yoğun bir antibiyoterapi almasının ve hastanın CYP2C9*3 mutant allelini heterozigot olarak taşımasının, gelişen yaygın ekimozun patogeneğinde etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Farmakogenetik ile ilgili bilgilerin artması, ilaçların daha doğru ve yararlı biçimde kullanılmasına olanak sağlayacaktır. Profilaktik amaçla veya tedavi için kullanılan ilaçların dozlarının bireyselleştirilmesi, bu ilaçlardan elde edilecek tedavi yanıtını maksimum düzeye çıkaracak, yan etkiler ve toksik belirtiler gibi istenmeyen etkileri ise en aza indirecektir. Ayrıca genetik polimorfizm nedeniyle ilaçların oluşturduğu farklı plazma konsantrasyonlarından tedavi süresinin kısaltılması amacıyla da yararlanılabilir. Gelecekte rutin genotiplemenin yapılması, ilaç tedavilerinin optimum düzeyde gerçekleştirilmesinde büyük önem taşıyacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Lee CR: Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: A comprehensive review of the in-vitro and human data. *Pharmacogenetics* 2002;12:251-263.
- 2- Chang TKH: Identification of polymorphically expressed CYP2C19 and the wild-type CYP2C9-Ile³⁵⁹ allele as low-K_m catalysts of cyclophosphamide and ifosfamide activation. *Pharmacogenetics* 1997;7:211-221.
- 3- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJJ, Daly AK: Association between polymorphisms of cytochrome P450 CYP2C9 with Warfarin dose requirements and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717-719.
- 4- Taube J, Halshall D, Baglin T: Influence of cytochrome P450 CYP2C9 polymorphisms on Warfarin sensitivity and risk of overanticoagulation in patients on long term treatment. *Blood* 2000;96:1816-1819.
- 5- Higashi M: Influence of CYP2C9 genetic variants on the risk of overanticoagulation and of bleeding event during Warfarin therapy. *JAMA* 2002;287:1690-1698.
- 6- Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, et al.: Genetic modulation of oral anticoagulation with Warfarin. *Thromb Haemost* 2000;84:775-778.
- 7- Miller SA: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3):1215-1219.
- 8- Lazarou J: Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a metaanalysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1200-1205.
- 9- Rettie AE: Impaired S-Warfarin metabolism catalysed by R144C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics*, 1994;4:39-42.
- 10-Tabrizi AR: Genetic susceptibility to hemorrhagic complications during Warfarin therapy. *Surgery* 2001;129:645-646.
- 11-Ablin J: Warfarin therapy in a patient homozygous for the CYP2C9*3 allele. *IMAJ* 2002;4:139-141.
- 12-Chai JS: Improving the safety profile of Warfarin. *Seminars in Haematology*. 2002;39:179-186.