

Разработка технологии диагностики наследственных генетических вариантов, определяющих чувствительность к варфарину, методом однонуклеотидного удлинения праймеров

Бабушкина Н.П., Гончарова И.А., Голубенко М.В.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинской генетики, г. Томск, Россия, nad.babushkina@medgenetics.ru

Варфарин назначается большому количеству пациентов при различных заболеваниях, однако существуют 20-кратные межиндивидуальные различия требуемой дозировки; превышение же необходимой дозы чревато осложнениями в виде кровотечений различной локализации, вплоть до развития жизнеугрожающих состояний. Известны генетические факторы, оказывающие существенное влияние на метаболизм варфарина в организме. Цель настоящего исследования заключалась в разработке набора олигонуклеотидов и методики генотипирования генетических полиморфизмов, влияющих на эффективность действия варфарина. Разработанная мультиплексная панель включает 6 полиморфных вариантов в генах биотрансформации, сочетания генотипов которых определяют подбор правильной дозы варфарина: *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910), *VKORC1* (rs9923231, rs8050894), *CYP4F2* (rs2108622) и *GGCX* (rs11676382). Для разработки набора проб были проанализированы тип генотипируемых замен, и характеристики ДНК в регионе данных SNP; возможность мультиплексирования проверяли на основании результатов реакции с набором Primer Focus Kit. Проведено мультиплексное генотипирование контрольных образцов ДНК с известными генотипами. Генотипы, определенные методом SNaPshot-анализа соответствовали полученным стандартными методами. Таким образом, разработана и верифицирована панель проб для мультиплексного генотипирования шести SNP, связанных с индивидуальной чувствительностью к варфарину. Использование в клинической практике результатов данного анализа позволит повысить эффективность антикоагулянтной терапии и снизить частоту проявления побочных эффектов.

Ключевые слова: SNaPshot, варфарин, SNP.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Работа частично поддержана ФЦП «Кадры» (гос. контракт № П977 от 20.08.2009 г.)

The developing of technology for diagnostics of genetic variants, that determine the sensitivity to warfarin, using the single nucleotide primer extension method

Babushkina N.P.*, Goncharova I.A., Golubenko M.V.

Research Institute of Medical Genetics, Tomsk NRMС, Tomsk, Russia.

* Corresponding author: nad.babushkina@medgenetics.ru (N.P. Babushkina)

Warfarin is prescribed to a lot of patients with different pathologies, however there are individual differences of required dosage up to twenty times. Overdosage can cause health complications like different localized bleeding, up to if threatening condition. There are genetics factors, that influences on warfarin metabolism in the human body. The point of this research is the development of set of oligonucleotide and genotyping of genetic polymorphism, that influence on warfarin effect. The developed multiplex panel (мультиплексная панель) includes six polymorphic variants in biotransformation genes, and their combination determine correct warfarin dose: *CYP2C9* (rs1799853, rs1057910), *VKORC1* (rs9923231, rs8050894), *CYP4F2* (rs2108622) and *GGCX* (rs11676382). Genetic replacement types and DNA characteristics in SNP region were analysed to develop the sample set. The multiplexing opportunity was checked according to the results of the reaction with Primer Focus Kit. Multiplex genotyping of DNA control samples with known genotypes was performed. Genotypes which were identified using SNaPshot, corresponds to those, identified using standard method. In summary, sample panel for multiplex genotyping of six SNP was developed and verified, SNP are connected with individual warfarin sensibility. Using these results in clinical practice can increase efficiency of anticoagulant therapy and decrease side effects frequency.

Key words: SNaPshot, warfarin, SNP.

Введение

В настоящее время общеизвестно, что практически для любых лекарственных препаратов существуют межиндивидуальные различия в их эффективности и, даже, безопасности, поскольку побочные реакции на препараты могут быть чрезвычайно разнообразными. Как эффективность действия лекарственных препаратов, так и их побочные эффекты, зависят от многих изменяющихся параметров. Генетические факторы оказывают существенное влияние на индивидуальные особенности ответа на лекарственную терапию: вклад генетических факторов в вариабельность реакции составляет от 20 до 95%. На сегодняшний день накоплено множество примеров, доказывающих, что подобные особенности обусловлены полиморфизмом генов, кодирующих ферменты метаболизма лекарств, молекулы-переносчики лекарств и рецепторы, взаимодействующие с лекарствами.

Основная часть генетической изменчивости, лежащей в основе индивидуального ответа на лекарственные препараты, относится к однонуклеотидным заменам. Разработка методов генотипирования этих важных для прогнозирования лекарственного ответа SNP является актуальной, а внедрение таких разработок в практику генетического тестирования, в конечном счете, позволит четко «адресовать» терапию каждому пациенту.

Имеющиеся на сегодня данные об ассоциациях генетических полиморфизмов с индивидуальным ответом на некоторые лекарственные средства уже позволяют рекомендовать ряд полиморфных вариантов для «персонализированной медицины», т.е. использовать генетическую информацию при выборе лекарств или при подборе индивидуальной терапевтической дозы. Одним из таких препаратов является варфарин — антикоагулянт непрямого действия, назначаемый для предотвращения тромботических и тромбоэмболических осложнений при различных заболеваниях. Варфарин назначается более чем 30 миллионам пациентов в год, однако его назначение осложнено тем, что существуют 20-кратные межиндивидуальные различия требуемой дозировки [1—3]. При лечении варфарином очень часто возникают осложнения в виде кровотечений различной локализации, которые могут приводить к жизнеугрожающим состояниям. Эффективная для лечения доза препарата находится на грани развития кровотечения, поэтому дозировка при приеме варфарина должна быть очень точной. Известно наличие генетических факторов, оказывающих существенное влияние на метаболизм варфарина в организме.

Действие варфарина заключается снижении выработки организмом витамина К, что приводит к угнетению продукции витамин К-зависимых факторов свертываемости крови. Поэтому, ключевыми ферментами фармакодинамики и фармакокинетики варфарина являются цитохромы CYP2C9 (метаболизует S-варфарин, более активную из двух форм варфарина) и CYP4F2 (метаболизует витамин К), VKORC1 (вита-

мин К эпоксидредуктазный комплекс, принимает участие в синтезе витамина К, ингибируется варфарином), GGCX (задействован в синтезе витамин К-зависимых факторов свертываемости крови) [4—7]. Из всех генетических детерминант действия варфарина в организме полиморфизм в гене CYP2C9 определяет 12,4 % вариабельности дозы, VKORC1 — 32,4%, CYP4F2 — 1,9%, GGCX — 0,6% [6]. Цель настоящего исследования заключалась в разработке набора олигонуклеотидов и методики генотипирования генетических полиморфизмов, влияющих на эффективность действия варфарина.

Материалы и методы

Разработанная нами мультиплексная панель включает 6 полиморфных вариантов в генах биотрансформации: CYP2C9 (rs1799853, rs1057910), VKORC1 (rs9923231, rs8050894), CYP4F2 (rs2108622) и GGCX (rs11676382). Особенности сочетания генотипов этих вариантов определяют подбор правильной дозы варфарина.

Для мультиплексного генотипирования был выбран метод минисеквенирования SNaPshot. Метод основан на однонуклеотидном удлинении проб, позволяет в одной реакции анализировать порядка 10 SNP. Анализ включает в себя несколько этапов. После предварительной ПЦР-амплификации проводили ферментативную очистку продуктов реакции от неинкорпорированных dNTP и праймеров. Затем осуществляли реакцию минисеквенирования, включающую в себя отжиг на продуктах амплификации олигонуклеотидных проб, заканчивающихся непосредственно перед анализируемой заменой, с последующим однонуклеотидным удлинением проб флюоресцентно мечеными дидезоксинуклеозидтрифосфатами («терминаторами»). Реакцию минисеквенирования проводили с использованием набора SNaPshot® Multiplex Kit согласно протоколу фирмы-производителя («Applied Biosystems», США). В результате реакции получают фрагменты одной длины, различающиеся на один 3'-концевой флюоресцентно меченый нуклеотид. Все типы «терминаторов» помечены флюоресцентными красителями (для А это краситель dR6G, для С — dTAMRA™, для G — dR110, для Т (U) — dROX™). После очистки продуктов реакции от неинкорпорированных «терминаторов», пробы, удлинённые на один меченый ddNTP, разделяли капиллярным электрофорезом на автоматическом ДНК-анализаторе («Applied Biosystems», США). Анализ данных проводится с использованием программного обеспечения для фрагментного анализа GenoMapper v4.1. В результате для каждого SNP, в зависимости от гетерозиготного или гомозиготного генотипа, регистрируется 1 или 2 пика (накладывающихся или пространственно разнесенных), окрашенных в разные цвета.

Для проведения SNaPshot-анализа использовали наборы SNaPshot® Multiplex Kit и Primer Focus kit согласно протоколам фирмы-производителя («Applied Biosys-

tems», США). Для разработки проб и ПЦР-праймеров использовали программы Vector NTI и Primer3 [8–9]. Пробы подбирали с учетом рекомендаций «Applied Biosystems»: различия по длине проб должно составлять не менее четырех нуклеотидов, температура плавления 58–62°C; отсутствие альтернативных сайтов отжига в других ПЦР-продуктах мультиплекса. Возможность мультиплексирования и диапазон ожидаемых сигналов определялись в реакции безматричного удлинения проб с набором Primer Focus kit («Applied Biosystems», США). Для верификации панели использовали образцы ДНК с уже известными генотипами, полученными стандартными методами анализа.

Результаты

В разрабатываемую панель были включены полиморфные варианты, оказывающие существенное влияние на активность ключевых ферментов метаболизма варфарина. Так, rs1799853, rs1057910 приводят к значительному снижению ферментативной активности CYP2C9 (для гомозигот по производным аллелям она составляет 12% и 5% соответственно, по сравнению с исходным вариантом). Локализованный в функциональном промоторе гена *VKORC1* rs9923231 влияет на уровень экспрессии этого гена, совместно с rs8050894 маркирует гаплотип, ассоциированный со снижением чувствительности к варфарину. Несинонимичная замена в гене *CYP4F2* (rs2108622), существенно снижает активность данного фермента; интронный вариант rs11676382 в гене *GGCX* ассоциирован со снижением терапевтической дозы варфарина [4, 10–15].

Для разработки набора проб были проанализированы тип генотипируемых замен, и характеристики ДНК в регионе данных SNP, а именно: температуры плавления, потенциально возможные варианты образования

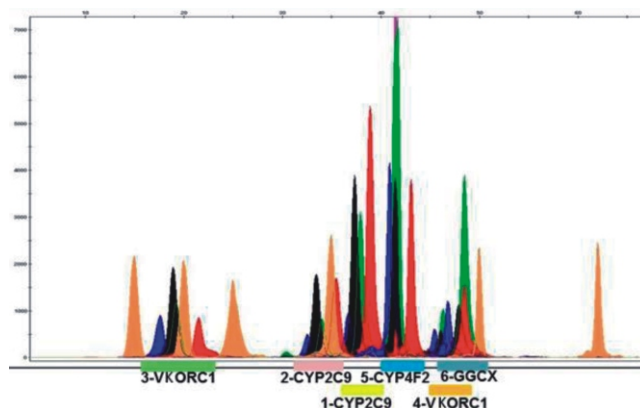


Рис. 1. Виртуальная панель на гены ферментов биотрансформации.

вторичных структур (повторы, палиндромы, димеры, петли) с оценкой их энергии Гиббсона; наличие в непосредственной близости других замен. При проведении SNaPshot-анализа критичной является мультиплексная реакция именно на этапе минисеквенирования, этап предварительной ПЦР может проводиться фактически с любыми праймерами на данные фрагменты ДНК. Тем не менее, обязательной является проверка специфичности отжига проб только на «свой» ПЦР-продукт; степень гомологии пробы и прочих продуктов амплификации от 70% в настоящем исследовании была выбрана пороговой. Затем проверялись потенциально возможные варианты димеров проб. Возможность мультиплексирования проверяли на основании результатов реакции с набором Primer Focus Kit. При получении неудовлетворительных результатов любого этапа проверки, олигонуклеотидные последовательности подбирались заново (рис. 1, таблица).

С учетом вышесказанного, было подобрано 6 проб и 6 пар праймеров. После чего, с использованием набора

Таблица

Этап проверки возможности генотипирования по результатам реакции с набором Primer Focus Kit

Проба	Положение нуклеотида относительно линейки молекулярной массы								Длина пробы, п.н.
	А (зел.)		Т (кр.)		С (черн.)		G (син.)		
	min	max	min	max	min	max	min	max	
1 — CYP2C9	41,65	42,25	42,2	43	41,15	41,95	40,2	41,4	32
2 — CYP2C9	33,1	34,4	34,8	35,8	32,8	34,1	31,75	33,1	23
3 — VCORC1	18,4	19,8	20,8	22,3	18,2	19,5	16,85	18,1	20
4 — VCORC1	45,8	46,9	46,7	47,8	45,6	46,6	44,9	45,9	45
5 — CYP4F2	40,85	42,2	42,4	43,6	40,8	41,8	40,4	41,4	36
6 — GGCX	46,45	47,55	46,5	47,4	45,9	46,9	44,95	45,8	41

Примечание. Из таблицы видно, что имеют место наложения проб 1 и 5 по аллелю Т, а также 4 и 6 по аллелю G. Чтобы устранить наложения, была пересмотрена структура проб, в результате чего проба к CYP2C9 была укорочена на 4 нуклеотида, что приводит к сдвигу точки чтения влево по шкале маркера молекулярного веса (новое положение нуклеотидов: А (37,5–38,1), Т (39,0–41,0), С (37,1–39,0), G (36,5–37,4)); проба к GGCX, — напротив, удлинена на 4 нуклеотида (происходит сдвиг чтения вправо; новое положение нуклеотидов: А (49,3–51,0), Т (49,5–51,0), С (48,1–49,9), G (46,5–49,9)).

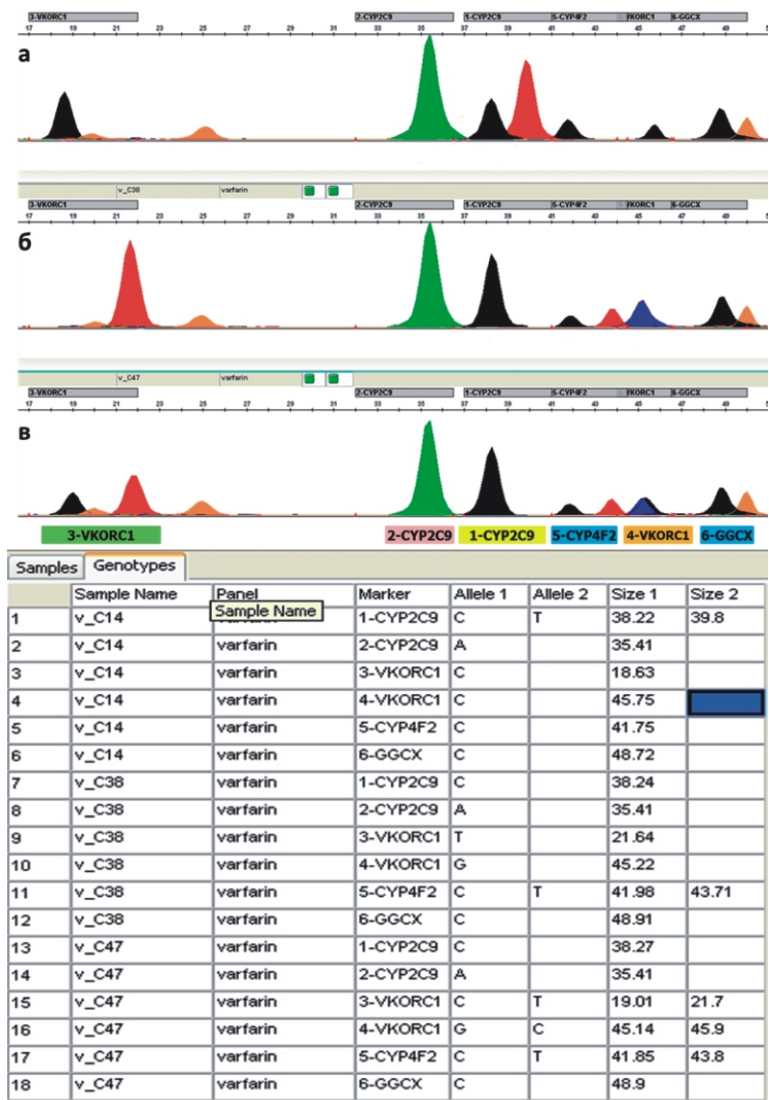


Рис. 2. Панель ферментов для анализа полиморфизмов генов метаболизма варфарина, пример анализа данных для проб 1, 2, 3, 4, 5, 6 соответственно: а – СТ, АА, СС, СС, СС, СС; б – СС, АА, ТТ, GG, СТ, СС; в – СС, АА, СТ, CG, СТ, СС; оранжевые пики – маркер длины LIZ 120.

SNaPshot Multiplex Kit, было проведено генотипирование 8 контрольных образцов ДНК с известными генотипами (рис. 2). Для автоматического анализа генотипов в программе GenoMapper v4.1. устанавливаются бины — границы диапазона длины фрагмента, в котором, согласно результатам реакции с Primer Focus Kit должен находиться сигнал от соответствующего аллеля. Автоматически программой пик определяется как находящийся в данной области только при попадании в пределы бина его вершины, в то время как продукты SNaPshot-реакции не всегда оказываются локализованы строго в пределах бинов, а могут быть немного сдвинуты влево. Поэтому, требуется визуальный контроль результатов автоматического анализа. Определенные методом SNaPshot генотипы во всех случаях соответствовали генотипам, полученным другими методами. Таким образом, разработанная па-

нель олигонуклеотидных проб позволяет анализировать выбранные полиморфизмы в мультиплексной реакции путем SNaPshot-анализа.

Заключение

Была разработана панель олигонуклеотидных проб для мультиплексного генотипирования шести SNP (rs1799853, rs1057910, rs9923231, rs8050894, rs2108622 и rs11676382), связанных с индивидуальной чувствительностью к варфарину. Предполагается, что определение генотипов по данной панели должно осуществляться методом одноклеотидного удлинения праймеров флюоресцентно мечеными дидезокси-«терминаторами» с последующим разделением продуктов реакции на капиллярном ДНК-анализаторе, что позволяет проводить мультиплексный анализ и автоматизировать про-

цесс генотипирования. Использование в клинической практике данной панели позволит сократить время получения результатов генотипирования, что будет способствовать скорейшему подбору пациентам адекватной дозы варфарина и снизить частоту проявления побочных эффектов.

Список литературы

1. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM et al. Randomized Trial of Genotype-Guided Versus Standard Warfarin Dosing in Patients Initiating Oral Anticoagulation. *Circulation*. 2007. V. 116. P.2563-2570.
2. The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*Estimation of the Warfarin Dose with Clinical and Pharmacogenetic Data. *N Engl J Med* 2009. V. 60. P.753-64.
3. Roth JA, Bradley K, Thummel KE et al. Alcohol misuse, genetics, and major bleeding among warfarin therapy patients in a community setting. *Pharmacoeconomics and drug safety*. 2015. V.24. P. 619-627. DOI: 10.1002/pds.3769
4. King CR, Deych E, Milligan P et al. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. *Thromb Haemost*. 2010. V.104(4). P. 750-754. doi:10.1160/TH09-11-0763.
5. Kamali X, Wulasihan M, Yang Y-C et al. Association of GGX gene polymorphism with warfarin dose in atrial fibrillation population in Xinjiang. *Lipids in Health and Disease*. 2013. V. 12. P. 149-153. <http://www.lipidworld.com/content/12/1/149>
6. Kumar DK, Shewade DG, Lioriot M-A et al. Effect of CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 and GGX genetic variants on warfarin maintenance dose and explicating a new pharmacogenetic algorithm in South Indian population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014. V.70. P. 47-56. DOI 10.1007/s00228-013-1581-x
7. Li S, Zou Y, Wang X et al. Warfarin Dosage Response Related Pharmacogenetics in Chinese Population. *PLoS ONE*. 2015. V.10(1). e0116463. doi:10.1371/journal.
8. Rozen S., and Skaletsky H.J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, 2000. P. 365-386.
9. Lu G, Moriyama EN. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Brief Bioinform*. 2004;5(4):378-388.
10. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, et al. A Genome-Wide Association Study Confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as Principal Genetic Determinants of Warfarin Dose. *PLoS Genet*. 2009. V. 5(3): e1000433. doi:10.1371/journal.pgen.1000433
11. Cen H-J, Zeng W-T, Leng X-Y et al. CYP4F2 rs2108622: a minor significant genetic factor of warfarin dose in Han Chinese patients with mechanical heart valve replacement. *Br J Clin Pharmacol*. V. 70 (2). P. 234-240. DOI:10.1111/j.1365-2125.2010.03698.x
12. Ferder NS, Eby CS, Deych E et al. Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during the initial weeks of therapy. *J Thromb Haemost*. 2010. V. 8. P. 95-100. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03677.x
13. Moreau C, Bajolle F, Siguret V et al. Vitamin K antagonists in children with heart disease: height and VKORC1 genotype are the main determinants of the warfarin dose requirement. *Blood*. 2012. V.119 (3). DOI 10.1182/blood-2011-07-365502.
14. Tian L, Zhang J, Xiao S et al. Impact of polymorphisms of the GGX gene on maintenancwarfarin dose in Chinese populations: Systematic review and meta-analysis. *Meta Gene*. 2015. V. 5. P.43-5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mgene.2015.05.003>
15. Sun X 2, Yu W?Y, Ma W?L et al. Impact of the CYP4F2 gene polymorphisms on the warfarin maintenance dose: A systematic review and meta-analysis. *Biomedical Reports*. 2016. V. 4. P.498-506. DOI: 10.3892/br.2016.599