

## ФАРМАКОГЕНЕТИКА НА ЛЕКАРСТВЕНИЯ ОТГОВОР ПРИ ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ И ВАРФАРИН

Р. ЦВЕОВА<sup>1</sup>, А. ДИМИТРОВА-КАРАМФИЛОВА<sup>2</sup>, Р. САРЪЕВА<sup>1</sup>, О. БЕЛЧЕВА<sup>1</sup>, Г. НАЧЕВ<sup>3</sup>, В. МИТЕВ<sup>1</sup> и Р. КЪНЕВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Център по молекулна медицина, Катедра "Медицинска химия и биохимия",  
Медицински факултет, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Клинична лаборатория, УМБАЛ "Св. Екатерина" – София

<sup>3</sup>Клиника по сърдечно-съдова хирургия, Катедра по сърдечно-съдова хирургия,  
УМБАЛ "Св. Екатерина" – София

## PHARMACOGENETICS OF DRUG RESPONSE IN ACENOCOUMAROL AND WARFARIN TREATMENT

R. TZVEOVA<sup>1</sup>, A. DIMITROVA-KARAMFILOVA<sup>2</sup>, R. SARAEVA<sup>1</sup>, O. BELTCHEVA<sup>1</sup>, G. NACHEV<sup>3</sup>, V. MITEV<sup>1</sup> AND R. KANEVA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Medicine Center, Department of Medical Chemistry and Biochemistry,  
Medical Faculty, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Department of Clinical Laboratory UMHAT "Sv. Ekaterina" – Sofia

<sup>3</sup>Department of Cardiovascular surgery, UMHAT "Sv. Ekaterina" – Sofia

**Резюме.** Аценокумаролът и варфаринът са кумаринови антикоагуланти, широко използвани за превенция и лечение на артериален и венозен тромбоемболизъм. Въпреки рутинното им приложение за лечение и профилактика на тромбоемболични усложнения, тези медикаменти имат тесен терапевтичен индекс, което е свързано с повишен риск от усложнения като тромбоза или кръвене. Определянето на оптималната доза на тези медикаменти често отнема време поради големите разлики, наблюдавани при отделните пациенти. Изследванията показват, че голямата вариабилност в индивидуалния отговор към терапията с аценокумарол и варфарин, се дължи на диетични, екологични и генетични фактори. Сред генетичните фактори най-добре проучен е клиничният ефект на различните алелни варианти в гените CYP2C9 и VKORC1. Генът VKORC1 кодира субединица 1 на витамин К-епоксид-редуктазия комплекс, участващ в цикъла на витамин К, докато CYP2C9 кодира ензима цитохром P450 2C9, участващ в метаболизма на кумариновите антикоагуланти. Установено е, че полиморфни варианти в тези два гена са отговорни за приблизително 30% от индивидуалните различия при дозирането на двата медикамента. През последните години бяха открити и други генетични фактори, които, макар и по-слабо, влияят върху метаболизма на аценокумарол и варфарин (в това число полиморфни варианти в гените APOE, GGCX, EPXH1, PROC и др.). Сред по-важните негенетични фактори, които допринасят за индивидуалните различия при определянето на оптималната доза на аценокумарола и варфарина, са възрастта, хранителният режим, височината и теглото на пациентите. Ефект оказват и потенциални лекарствени взаимодействия, като например приемане на кумариновите производни заедно с амиодарон и други лекарства.

**Ключови думи:** аценокумарол, варфарин, отговор към терапията, генетични фактори, негенетични фактори

**Summary.** Acenocoumarol and warfarin are coumarin anticoagulants that are widely used in the prevention and treatment of arterial and venous thromboembolism in many European countries. Although coumarin anticoagulants are widely prescribed for the treatment of thromboembolic events, these

medications have a narrow therapeutic index and their application may cause thrombosis or bleeding, when the dose is subtherapeutic or supratherapeutic, respectively. Therefore, the adjustment of the dose is often necessary because of large inter-individual variations in acenocoumarol and warfarin treatment. There is large variation in acenocoumarol and warfarin response as a result of dietary, environmental and genetic factors, which makes defining optimal dose difficult. It is well known that allelic variants in CYP2C9 and VKORC1 genes affect the maintenance dose of coumarin anticoagulants. VKORC1 encodes vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (VKORC1), enzymes involved in vitamin K cycle and metabolism. CYP2C9 encodes cytochrome P450 2C9. The polymorphic variants in both genes are responsible for over 30% of the individual variations in acenocoumarol and warfarin dosing. In recent years other genetic factors were found which influence the metabolism of warfarin and acenocoumarol (including polymorphic variants in APOE, GGX, EPXH1, PROC, etc.). Other important factors are age, diet, height and weight of patients and potential drug interactions, such as co-administration of amiodarone and other medications.

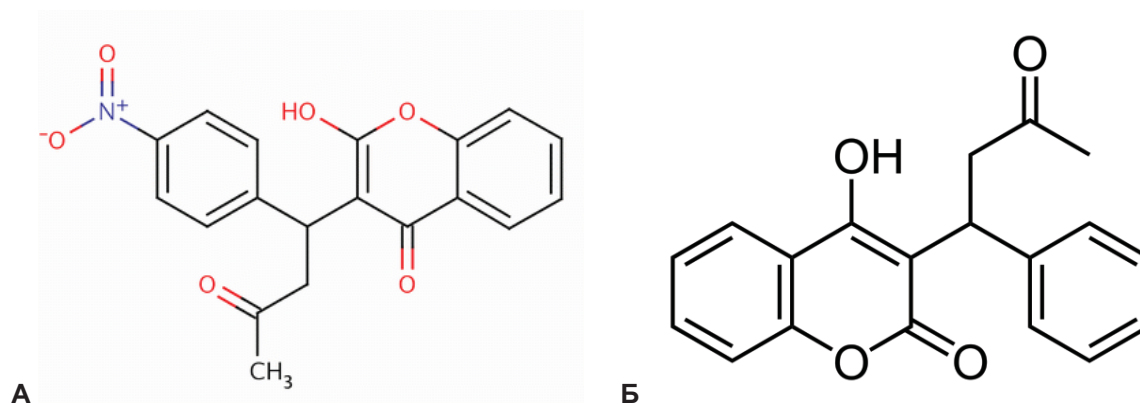
**Key words:** acenocoumarol, warfarin, therapeutic response, genetic factor, non-genetic factor

Аценокумаролът и варфаринът са производни на 4-хидроксикумарин, като двата медикамента са широко прилагани за лечение, първична и вторична превенция на различни тромбоемболични заболявания, в това число артериален и венозен тромбоемболизъм, мозъчен инсулт, при смяна на аортна или митрална сърдечна клапа, сърдечна аритмия и др., в много европейски държави като Испания, Холандия, Италия и Франция [1], в България (за аценокумарол) и Канада, САЩ (за варфарин) [2] (фиг. 1).

Недостатък на терапията с тези медикаменти е техният тесен терапевтичен обхват и голямата вариабилност в индивидуалния отговор на приложеното лечение. Направе-

ни са много усилия за подобряване на лечението с кумаринови антикоагуланти, но въпреки всичко рискът от усложнения остава значителен. Към момента за мониторинг на антикоагулантния ефект на аценокумарол и варфарин се използва измерването на т. нар. INR (международно нормализирано отношение).

**Целта** на обзора е да се предостави цялостен поглед върху фармакогенетиката на аценокумарол и варфарин, като се обърне по-специално внимание върху влиянието на генетичните полиморфизми относно фармакокинетичната и фармакодинамичната вариабилност на тези медикаменти, имащи отношение към тяхното дозиране.



**Фиг. 1.** Химична структура: на А) аценокумарол; Б) варфарин (Източник: <http://en.wikipedia.org>)

## **ФАРМАКОКИНЕТИКА НА АЦЕНОКУМАРОЛ И ВАРФАРИН**

Фармакокинетичните проучвания показват, че при хората кумарините се абсорбират напълно в гастроинтестиналния тракт, достигайки максимална концентрация в кръвта 90 min след орален прием. В черния дроб тези съединения се метаболизират от два компонента на комплекса цитохром P450 (CYP2C9 и CYP2A6) главно до 7-хидроксикумарин, който е с по-ниска токсичност. Кумариновите производни почти напълно се отстраняват от системната циркулация до 1-2 часа след прием (полуживот за екскреция с урината). Само малка фракция, около 2-6% (с полуживот около 36-42 h), достига в интактно състояние до системната циркулация и се свързва към плазмените протеини, главно албумин [3].

Сред 4-хидроксикумарините варфарин е най-широко прилаганият антикоагулант за лечение и профилактика на тромбоемболични заболявания. Наличният в клиничната практика варфарин е рацемична смес от два активни оптични изомера, R и S изоформи. Техните фармакокинетични и фармакодинамични характеристики се различават значително. S-варфаринът е 5 пъти по-активен в сравнение с R-изоформата [3].

След перорално приложение приблизително цялото количество рацемичен варфарин се свързва с албумин, но само свободната форма на съединението е фармакологично активна. След това варфарин се метаболизира в черния дроб и бъбреците с последващо производство на неактивни метаболити, които се секретират в урината и изпражненията. Човешкото цитохром P-450 семейство играе ключова роля в метаболизма на варфарин, като ензими от него участват в катализирането на процеси на хидроксилиране и получаване на серия от монохидроксилирани метаболити чрез регио- и стерео-селективни реакции. Метаболизмът на варфарин се осъществява основно чрез действието на 3 различни цитохром P450 ензима: CYP2C9, CYP1A2 и CYP3A. R-варфарин се метаболизира от различни изоформи, предимно CYP1A2 и

CYP3A4. От друга страна, S-варфарин се метаболизира до 7-хидроксиварфарин предимно от CYP2C9. Други цитохром P450 ензими произвеждат вторични метаболити като 9- и 10-дехидроварфарин (CYP3A4) и 6-, 7- и 10-хидроксиварфарин (CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19) [3].

Варфаринът може да бъде открит в плазмата един час след перорално приложение, като пик в концентрацията му се достига от два до осем часа по-късно. Времето на полуживот на рацемичния варфарин варира от 20 до 60 часа и продължителността на действието му продължава до пет дни. Така, максималният ефект на дозата настъпва до 48 часа след приложение и ефектът му се задържа за следващите няколко дни [3].

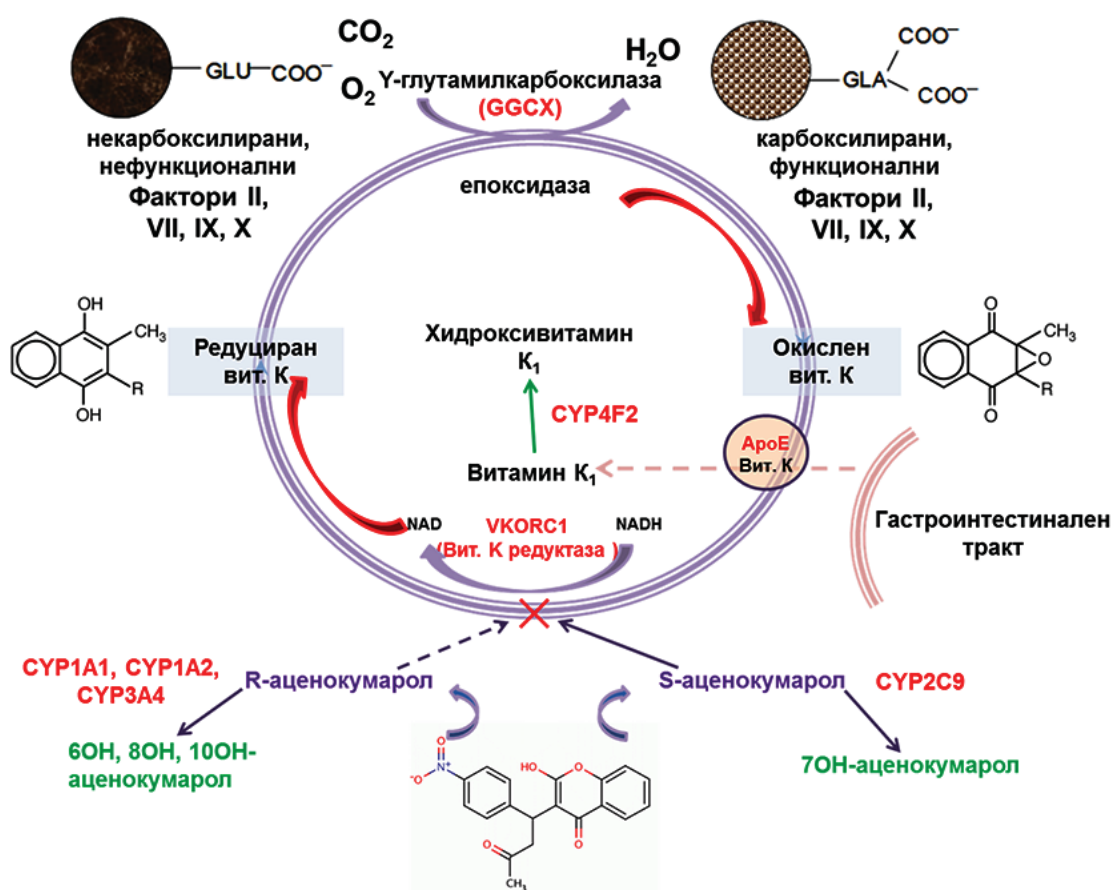
От своя страна, аценокумаролът има абсолютна бионаличност след перорално приложение най-малко 60% и показва много ниски плазмени концентрации (1-3%) [4]. Аценокумарол се трансформира в 6-, 7- и 8-хидроксиаценокумарол и два диастереомерични алкохола: amino- и ацетамидо-аценокумарол. 8-хидрокси метаболитът се произвежда в по-малка степен в сравнение с другите две хидроксилни форми. In vitro 100% от S-аценокумарол и приблизително 60% от R-енантиомера се хидроксилират от ензима CYP2C9. 6- и 7-хидроксилираните метаболити и остатъчни количества от изходното съединение се отделят през бъбреците в тяхната неконюгирана форма [11]. Единичната перорална доза от рацемична смес от енантиомерите на аценокумарол се отделя в урината (65%) и фекалиите (35%). Плазменият клирънс на S-аценокумарол е много по-висок от този на R-аценокумарол (28,5 срещу 1,9 l/h). Поради този факт времето на полуживот на S-аценокумарол е много по-кратко от това на R-аценокумарол (1,8 срещу 6,6 часа) [5, 6].

## **МЕХАНИЗЪМ НА ДЕЙСТВИЕ НА АЦЕНОКУМАРОЛ И ВАРФАРИН**

Аценокумаролът и варфаринът са антагонисти на витамин K, мастноразтворим витамин, необходим за активирането на четири от факторите на кръвосъсирване

(II-протромбин, VII, IX и X), както и на физиологичните инхибитори на хемостазата протеин С и S. Тези фактори са гликопротеини с остатъци от глутаминова киселина (Glu), които се трансформират посредством  $\gamma$ -карбоксилиране до  $\gamma$ -карбоксиглутаминови ( $\gamma$ -карбокси-Glu) остатъци. Свързването на калций към тези остатъци води до конформационни промени в структурата на факторите на кръвосъсирване, които са необходими за осъществяване на техните функции

в коагулационната каскада. Стъпката на  $\gamma$ -карбоксилиране се катализира от витамин К-зависимия ензим  $\gamma$ -глутамилкарбоксилаза (GGCX). По време на стъпката на карбоксилиране витамин К хидрохинонът се окислява до витамин К-2,3-епоксид, който бързо се редуцира с цел предотвратяване на натрупването на витамин К в тъканите. Първата стъпка в този редукционен процес се катализира от витамин К-епоксид-редуктазния комплекс (VKOR) [7] (фиг. 2).



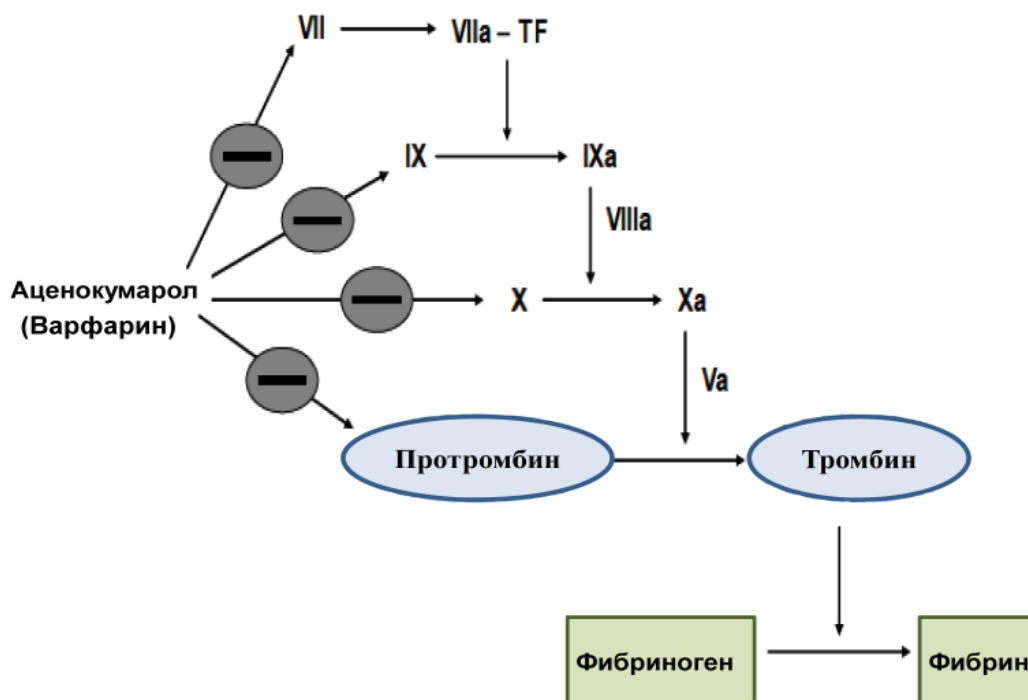
Фиг. 2. Механизъм на действие на аценокумарол посредством инхибиране на цикъла на витамин К (преработено по [7]). Подобен механизъм на действие има и варфаринът

Всички кумаринови производни инхибират витамин К-епоксид редуктазата (VKOR), което е основа на техния антикоагулантен ефект. Това от своя страна води до изчерпване на редуцираната форма на витамин К

(витамин КН<sub>2</sub>). Тъй като витамин К е кофактор, необходим при реакцията на карбоксилиране на N-крайните глутаматни остатъци на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирване, това ограничава процеса на кар-

боксилане и последващото активиране на коагулационните фактори. Синтезът на витамин К-зависими коагулационни фактори II, VII, IX, X и физиологичните инхибитори С и S се инхибира, което води до хипокоагулабилитет и удължаване времето на съсирване,

измерено с протромбиновото време (фиг. 3). Пълният ефект на действието на кумарините се проявява след няколко дни, защото полуживотът на факторите на кръвосъсирване варира от 1/4 ден за фактор VII до 2 1/2 дни за протромбин [8].



Фиг. 3. Инхибиращо действие на аценокумарол и варфарин върху факторите на кръвосъсирване II, VII, IX и X и потискане на коагулационната каскада (преработено по [9])

#### Роля на генетичните фактори при оптимизиране на терапията с аценокумарол и варфарин

Един от главните проблеми на терапията с кумаринови антикоагуланти е тесният им терапевтичен индекс. Съществува голямо разнообразие в отговора към терапията с тези медикаменти, дължащо се на влиянието на хранителния режим, възраст, пол, раса, прием на други медикаменти, заболявания на черния дроб и щитовидната жлеза, исхемична болест на сърцето, треска, малигнени заболявания и не на последно място – генетични фактори, което прави трудно определянето на оптималната доза антикоагулант [8] (фиг. 4).

Добре известно е, че полиморфни варианти в гените CYP2C9 (цитохром P450 2C9) и VKORC1 (субединица 1 на витамин К-епоксид-редуктазния комплекс) оказват съществено влияние върху поддържащата доза аценокумарол и варфарин. VKORC1 кодира субединица 1 на витамин К-епоксид-редуктазния комплекс (VKORC1) – ензим, участващ в цикъла на витамин К и обмяната на веществата. CYP2C9 кодира ензим от групата на цитохром P450 (цитохром P450 2C9). Полиморфните варианти в тези два гена са отговорни за над 30% от индивидуалните вариации в дозирането на двата медикамента. Други важни фактори, оказващи влияние, са възраст на пациента, хранителен режим,



**Фиг. 4.** Предполагаеми механизми, водещи до вариабилност в индивидуалния отговор към аценокумарол и варфарин (преработено по [10])

височина и тегло, потенциални лекарствени взаимодействия, като например едновременното приложение на амиодарон и други лекарствени средства, които могат да повишат или да понижат активното действие на аценокумарол и варфарин. Едновременно носителство на генотипи CYP2C9\*2/\*3, VKORC1 1173TT и VKORC1-1639AA е свързано с висок риск от тромбози [11].

Полиморфни варианти в гени, участващи в транспорта, метаболизма и функцията на витамин К, също биха могли да имат отношение към чувствителността при терапия с аценокумарол и варфарин. Някои изследователи установяват такъв независим ефект на гена GGCX, кодиращ ензима  $\gamma$ -глутамил-карбоксилаза, който катализира процеса на карбоксилиране на факторите на кръвосъсирване от коагулационната каскада [12-15]. Други проучвания обаче не успяват да потвърдят този ефект [16, 17].

Съществуват данни за слабо влияние на полиморфни варианти и в гените за коагу-

ционни фактори VII и X, в EPHX1, кодиращ микрозомна епоксид-хидролаза (субединица на VKORC, притежаваща витамин К-свързващо място), в APOE, кодиращ чернодробния лиганд ApoE (участващ в усвояването на витамин К) и PROC, кодиращ деактивиращ протеин С на коагулационен фактор Va и VIIIa [18-25]. Влияние оказват и полиморфизми в други гени, отговорни за синтеза на ензими от системата P450 – т. напр. Caldwell и съавт. описват вариант в CYP4F2, който обяснява приблизително 2% от вариабилността в дневната поддържаща доза аценокумарол [8].

През последните няколко години са разработени няколко фармакогенетични алгоритъма за дозиране на аценокумарол и варфарин при различни популационни групи. Посредством търсене в базата данни PubMed на NCBI, бяха идентифицирани няколко такива модела за аценокумарол [26-33] (табл. 1 и 2) и повече от десет за варфарин [34-43]. Всички те включват както клинични променливи (възраст, пол, индекс на телес-

Таблица 1. Основни характеристики на фармакогенетичните алгоритми за дозиране на аценокумарол при различни популационни групи

Изследователска група	Година	Националност	Брой на изследваните пациенти	Полиморфни варианти в различни гени	Клинични фактори	R <sup>2</sup> (%)	MAE (мг/ден) във валидиращата група
Markatos et al. [27]	2008	Гърция	98	CYP2C9, VKORC1	възраст, пол, комедикация	55.0%	–
van Schie et al. [33]	2011	Холандия	400	CYP2C9, VKORC1	възраст, височина, тегло, пол, комедикация	56.0%	0.52
Borobia et al. [28]	2012	Испания	117	CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, APOE	възраст, ИТМ, комедикация	60.6%	0.54
Rathore et al. [32]	2012	Индия	125	CYP2C9, VKORC1, CYP4F2, GGXX	възраст, тегло, височина, BSA, пол, тютюнопушене, диагноза	41.4%	0.71
Cerezo-Manchado et al. [31]	2013	Испания	973	CYP2C9, VKORC1, CYP4F2	възраст, BSA, пол	50.0%	–
Kumar et al. [29]	2013	Индия	170	CYP2C9, VKORC1	възраст, ИТМ	32.5%	–
Radu Pop et al. [26]	2013	Румъния	200	CYP2C9, VKORC1	възраст, ИТМ	41.4%	0.78
Wolkaniin-Bartnik et al. [30]	2013	Полша	167	CYP2C9, VKORC1	възраст, ИТМ	49.0%	0.63
Tzveova et al.	2015	България	119	CYP2C9, VKORC1	диагноза, пол, възраст, тегло, прием на амиодарон	46.5%	0.89

на маса – ИТМ, съпътстващо лечение, прием на витамин К), така и генетични фактори (полиморфни варианти в гените CYP2C9, VKORC1, APOE и CYP4F2) [26-33].

Тъй като основното лекарство, използвано за лечение и превенция на тромбоемболични събития в България, е аценокумарол, следващите таблици представят основните характеристики на фармакогенетичните алгоритми за дозиране именно на това лекарство при различни популационни групи.

Първият дозиращ алгоритъм за предсказване на оптималната поддържаща доза аценокумарол е публикуван през 2008 год. от изследователската група на Markatos et al. [30]. Моделът е създаден за гръцката популация и включва генотипите за полиморфни варианти в гените CYP2C9 и VKORC1 като генетични фактори и възрастта като клиничен показател. Взети заедно в множествен регресионен модел, тези фактори обясняват 55.0% от промяната в дозата индиректен антикоагулант. Проучването е ретроспективно и е проведено при 98 пациенти на антикоагулантна терапия [30].

През 2011 г. VanSchie et al. развиват алгоритми за дозиране на аценокумарол и фенпрокумон при датската популация [27]. Авторите валидират създадения от тях модел за аценокумарол в независима група пациенти със същата етническа принадлежност. Фактори като генотипи на CYP2C9 и VKORC1, тегло, височина, пол, възраст и прием на амиодарон са включени в множествения регресионен модел, за който е определено, че обяснява 56.0% от вариативността в дозата на изследвания медикамент [27].

В проучването на Rathore et al. от 2012 год. е използвана стъпкова множествена линейна регресия, включваща като независими променливи възраст, пол, височина, тегло, повърхност

на тялото, информация за тютюнопушене, генотипи за VKORC1-1639G > A, CYP4F2 V366MG > A, CYP2C9\*2,\*3 и GGCX 12970C > G за генериране на фармакогенетичен алгоритъм, обясняващ 41.4% от вариабилността в дозата аценокумарол [28].

През 2012 год. Vorobia et al. изследват влиянието на клинични и генетични фактори върху стабилната доза аценокумарол при група от 117 пациенти като създаденият от тях фармакогенетичен алгоритъм включва клинични фактори (възраст, ИТМ и съпътстваща терапия) и генетични варианти в гените VKORC1, CYP2C9, CYP4F2 и APOE. При провеждане на статистическия анализ е установено, че клиничните фактори обясняват 20% от вариабилността в терапевтичната доза антикоагулант, който нараства до 60.6% при включване на фармакогенетичните променливи [33].

Cerezo-Manchado et al. публикуват подобно проучване през 2011 год., проведено върху 973 ретроспективно проследени пациенти, като така създаденият модел за определяне на оптималната доза аценокумарол е валидиран в независима група от 2683 пациенти. Най-добрият регресионен модел за определяне на оптималната терапевтична доза медикамент включва клинични фактори (възраст, ИТМ, повърхност на тялото) и полиморфни варианти в гените VKORC1, CYP2C9 и CYP4F, като този модел обяснява 50.0% от вариабилността в стабилната доза антикоагулант [32].

През 2013 год. Kumar et al. публикуват фармакогенетичен алгоритъм, базиран на данните за 170 пациенти на терапия с аценокумарол след хирургична интервенция за смяна на сърдечна клапа. След провеждане на множествен анализ е определено, че възрастта, ИТМ, както и полиморфните варианти CYP2C9\*2, CYP2C9\*3 и VKORC1 (-1639 G > A) допринасят за 30.4% от вариабилността в дневната поддържаща доза антикоагулант [31].

През 2013 год. колективът на RaduPop et al. публикува изследване, при което са анализирани връзката между носителството на полиморфни варианти в гените

CYP2C9 и VKORC1 и седмичната доза аценокумарол при румънски пациенти, като авторите прилагат множествена линейна регресия за получаване на фармакогенетичен алгоритъм за предсказване на оптималната доза медикамент. Седмичната доза аценокумарол е използвана като зависима променлива (логаритмично трансформирана). В регресионния модел са включени следните клинични променливи: възраст, пол, ИТМ, диагноза за дълбока венозна тромбоза (ДВТ) или предсърдно мъждене (ПМ). Възрастта и ИТМ определят съответно 11.8% и 7% от промяната в дозата медикамент, докато получените фармакогенетичен алгоритъм обяснява 41.4% от тази вариабилност [29].

Изследването на Wolkanin-Bartnik et al. включва 235 пациенти от Института по кардиология (Варшава, Полша) с показания за антикоагулантна терапия поради смяна на сърдечна клапа и/или предсърдно мъждене. Множественият линейно-регресионен анализ е проведен чрез използването на логаритмично-трансформирана ефективна доза медикамент като зависима променлива и генотипите за проучваните полиморфни варианти в гените CYP2C9 и VKORC1, както и други клинични показатели, като независими предиктори на терапевтичния отговор. На база на извършените статистически анализи е определено, че взети заедно, изследваните клинични и генетични фактори обясняват 49.0% от вариабилността в дозата аценокумарол [26].

През 2015 год. наш екип към Центъра по молекулна медицина, катедра „Медицинска химия и биохимия“ на Медицински университет – София, също публикува математически алгоритъм за дозиране на аценокумарол, специфичен за българската популация [44].

Всички изброени алгоритми са популационно-специфични и съдържат различни показатели като променливи, поради което обясняват различен процент от вариабилността в терапевтичната доза аценокумарол.



**Таблица 2. Математически алгоритми за дозиране на аценокумарол при различните фармакогенетични проучвания**

Проучване	Регресионен модел
Markatos et al., 2008 [27]	Доза (mg/ден) = anti log*[1.083 – 0.004* възраст – 0.188* (VKORC1 – 1639 генотип) – 0.073*(CYP2C9 генотип)] <sup>1</sup>
Van Schie et al., 2011 [33]	Доза (mg/седмица) = 4.117 – (при CYP2C9*1/*1 генотип) – 0.093 (при CYP2C9*1/*2 генотип) – 0.519 (при CYP2C9*1/*3 генотип) – 0.435 (при CYP2C9*2/*2 генотип) – 0.466 (при CYP2C9*2/*3 генотип) – 1.375 (при CYP2C9*3/*3 генотип) – 0 (при VKORC1 – 1639 GG генотип) – 0.572 (при VKORC1 – 1639 GA генотип) – 1.267 (при VKORC1 – 1639 AA генотип) – 0.027*(възраст в год.) + 0.271 (ако е жена) + 0.009*(височина в см) + 0.010 *(тегло в kg) – 0.377 (ако приема амиодарон)
Borobia et al., 2012 [28]	Доза (mg/ден) = A – 0.294* (възраст в год) + 0.240*(ИТМ) + 0.119* (прием на медикаменти, индуциращи системата на CYP) – 0.142* (ако приема амиодарон) – 0.257* (при CYP2C9*1/*3 генотип) – 0.253* (при CYP2C9*2*2 или CYP2C9*2*3 или CYP2C9*3*3 генотип) – 0.150* (при VKORC1 – 1639 GA генотип) – 0.533* (при VKORC1 – 1639 AA генотип) + 0.199* (при CYP4F2 V433M генотип) + 0.123* (при ApoE rs7412TT генотип) <sup>2</sup>
Rathore et al., 2012 [32]	Доза (mg/ден) = 3.082–0.013* (тютюнопушене, 1 за пушачи 0 за непушач) – 0.433* (пол, 1 за мъже и 0 за жени) – 0.004* (възраст в години) + индикация* (0.327 за ДВТ и – 0.092 за смяна на аортна клапа) + 0.026* (височина в см) + 0.151 *(тегло в kg) – 7.660* (повърхност на тялото) – 0.862* (при VKORC1 – 1639 GA генотип) – 2.257* (при VKORC1 – 1639 AA генотип) – 0.049* (при CYP2C9*1*2 генотип) – 0.456* (при CYP2C9*1*3 генотип) + 0.449* (при CYP4F2 V433M генотип) + 0.230* (при CYP4F2 V433M генотип) + 0.245* (при GGCX CG генотип) + 1.055* (при GGCX GG генотип)
Cerezo-Manchado et al., 2013 [31]	Доза (mg/седмица) = A + [(-ay2-by+c) × (dz2+ez+f)] + [VKORC1-1639 GG или GA или AA] + [CYP4F2 TT или CT или CC] + [CYP2C9*1*1 или*1*2, или *1*3, или *2*2, или *2*3, или *3*3] <sup>3</sup>
Kumar et al., 2013 [29]	Log (доза) (mg/ден) = 0.399 – 0.005*(възраст в год.) + 0.012* (ИТМ) – 0.171*(при CYP2C9*2 алел) – 0.072* (при CYP2C9*3 алел) – 0.144* (при VKORC1G > A алел) <sup>4</sup>
Radu Pop et al., 2013 [26]	Log (доза) (mg/седмица) = 1.402 – 0.005* (възраст в год.) + 0.009* (ИТМ) – 0.094* (при CYP2C9*2 алел) – 0.099* (при CYP2C9*3 алел) – 0.135* (при VKORC1 – 1639 GA генотип) – 0.285 (при VKORC1 – 1639 AA генотип) <sup>5</sup>
Wolkanin-Bartnik et al., 2013 [26]	Доза (mg/ден) = 3.268 + 1.477* (VKORC – 1639 GG) + 0.476* (VKORC1 – 1639 GA) + 0.451* (CYP2C9*1*1) – 0.043* (възраст в год.) + 0.0169* (тегло в kg)
Tzveova et al., 2015 [44]	Доза (mg/ден) = 7.451 – 0.061* (възраст в год.) + 0.008* (тегло в kg) + 0.05* диагноза (0 за други; 1 за смяна на аортна или митрална клапа; 2 за тромбоза – БТЕ или ДВТ) – 0.347* пол (0 за жени; 1 за мъже) + 0.119* (ако приема амиодарон) + 1.222* (0 за VKORC – 1639 GG; 1 за VKORC – 1639 GA; 2 за VKORC – 1639 AA) – 1.110* (0 за CYP2C9*1*1; 1 за CYP2C9*1*2; 2 за CYP2C9*2*2) – 0.279* (0 за CYP2C9*1*1; 1 за CYP2C9*1*3; 2 за CYP2C9*3*3) <sup>6</sup>

<sup>1</sup>VKORC1 генотип – 1 за GG, 2 за GA, 3 за AA и CYP2C9 генотип – 1 за CYP2C9\*1\*1, 2 за CYP2C9\*1\*2, 3 за CYP2C9\*1\*3, 4 за CYP2C9\*2\*2 и 5 за CYP2C9\*2\*3.

<sup>2</sup>CYP индуктори – фенитоин, карбамазепин и рифампин. VV – хомозиготи V433V за CYP4F2; VM – хетерозиготи V433M за CYP4F2; MM – хомозиготи M433M за CYP4F2.

<sup>3</sup>A, a, б, в, г, д, е са константи; Y: възраст в години; Z: квадратен корен от (височина в см) × (тегло в kg)/3600; VKORC1 GG, VKORC1 GA, VKORC1 AA: различни константи за rs2323991 генотипи, = 1, ако не е наличен полиморфен алел; CYP4F2 TT, CYP4F2 CT, CYP4F2 CC: различни константи за rs2108622 генотипи, = 1, ако не е наличен полиморфен алел; CYP2C9\*1\*1, CYP2C9\*1\*2, CYP2C9\*1\*3, CYP2C9\*2\*2, CYP2C9\*2\*3, CYP2C9\*3\*3: различни константи за rs1799853 и rs1057910 генотипи, = 1, ако не са налични полиморфни алели. Крайният резултат на този алгоритъм трябва да бъде повдигнат на квадрат за изчисляване на оптималната седмична доза в mg.

<sup>4</sup>Стойност 0 за GG, 1 за GA и 2 за AA по отношение на VKORC1 (-1639 G > A) генотип. Стойност 0, 1, 2 за броя на CYP2C9\*2 и CYP2C9\*3 алели.

<sup>5</sup>Поради липсата на хомозиготни носители на полиморфни алели за CYP2C9 авторите разделят пациентите в две основни групи: носители на CYP2C9\*2 алел и носители на CYP2C9\*3 алел. Пациентите с генотип CYP2C9\*3 авторите включват и в двете групи.

<sup>6</sup>ДВТ – дълбока венозна тромбоза; БТЕ – белодробен тромбоемболизъм

**ГЕНИ, ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ,  
КОИТО ПОВЛИЯВАТ ТЕРАПЕВТИЧНАТА ДОЗА  
ПРИ ЛЕЧЕНИЕ С АЦЕНОКУМАРОЛ И ВАРФАРИН**

*CYP2C9 (цитохром P450 2C9)*

Генът CYP2C9 е разположен в локус 10q24.2, обхваща регион от 55 kb и съдържа 9 екзона, транслиращи се в белтък от 490 аминокиселини (AK). Той се характеризира с висока полиморфност. Към настоящия момент в него са открити над 30 несинонимни варианта, с висока междуетническа вариабилност в честотата. Най-честият алел е CYP2C9\*1 (див тип) и доминира при всички етнически групи. При Кавказките популации други два често срещани алела са CYP2C9\*2 (rs1799853, 430C > T, 8-19%) и CYP2C9\*3 (rs1057910, 1075A > C, 4-16%). Двата варианта засягат кодиращата част на гена и водят до аминокиселинни замени в изоензима, което води до понижаване в метаболитния му капацитет [7]. Някои наскоро установени полиморфизми в този ген, водещи до понижена (CYP2C9\*5, CYP2C9\*11) или липсваща (CYP2C9\*6) ензимна активност, са идентифицирани при афроамериканци с ниска алелна честота [8].

Носителството на полиморфни варианти в CYP2C9 се свързва с изискването на значително по-ниски дози аценокумарол и варфарин и повишен риск от кръвоизливи [15, 45-48].

*VKORC1 (витамин К-епоксид-редуктазен комплекс субединица 1)*

Витамин К-епоксид-редуктазата (VKOR) е молекулярна цел за действието на индиректните антикоагуланти, затова идентифицирането и молекулярното характеризиране на гена VKORC1 е повратна точка в изясняването на фармакогенетиката на оралната антикоагулантна терапия [49]. Ензимът участва в цикъла на витамин К, като генетичните варианти във VKORC1 са свързани с дефицит на витамин К-зависимите фактори на кръвосъсирване (II, IIV, IX и X) от коагулационната каскада и повишена чувствителност към терапия с кумаринови антикоагуланти. Проведени са голям брой проучвания за изясняване вли-

янието на тези варианти върху отговора към лекарствена терапия с аценокумарол и варфарин. Носителството на полиморфен вариант -1639G > A в промотора на гена се свързва с изискване за по-ниски дози медикамент [31-33, 50-55]. Полиморфизмът 1173C > T в интрон 1 на VKORC1 се намира в неравновесна скаченост с -1639G > A в промотора на гена, отговарящ за изискването на ниска доза медикамент [49]. Именно затова VKORC1 -1639G > A се очертава като полиморфен вариант с най-голямо значение по отношение на фармакогенетичния отговор при терапия с кумаринови антикоагуланти. Установено е, че понижаваната VKOR активност е свързана именно с носителството на този полиморфен вариант [49].

В допълнение към полиморфния вариант в промоторната област на гена VKORC1 (-1639G > A) такива в некодиращите региони също допринасят значително за определяне на медикаментозната поддържаща доза [56-58]. Установено е също така, че хаплотипите на гена VKORC1 са свързани с голяма вариация в изискваната доза антикоагулант. Предишни изследвания разглеждат хаплотипи 2B, 3 и 4, като носителите на тези варианти се нуждаят от по-високи дози медикамент в сравнение с носителите на дивия тип [56-58].

*CYP4F2 (цитохром P450 4F2) и CYP2C18 (цитохром P450 2C18)*

Освен генетични полиморфизми в гените CYP2C9 и VKORC1, различни проучвания съобщават, че варианти в гена CYP4F2 (rs2108622; V433M; 1347C > T) също са важни предиктори на дневната поддържаща доза антикоагулант, като допринасят за около 1-2% от вариабилността в дозата [59, 60]. Този фактор е включен в няколко от описаните алгоритми за предсказване на оптималната поддържаща доза медикамент [28, 59, 61].

Проучване на целия геном, проведено от Teichert et al., показва, че освен клинични променливи, като възраст, пол, индекс на телесна маса и прицелно INR, генетични полиморфизми в гените CYP2C9, VKORC1, CYP4F2 и CYP2C18 определят 48,8% от вариабилността в дозата аценокумарол [62].

Година по-рано, 2008, изследователският колектив на Caldwell et al. докладва, че полиморфен вариант rs2108622 (кодиращ аминокиселинна замяна V433M) в гена CYP4F2 води до необходимост от лечение с по-високи дози варфарин при американци [63].

Механизмът, по който вариации в гена CYP4F2 оказват влияние върху дозирането на варфарин и аценокумарол, остава неизяснен към настоящия момент. Съществуват обаче някои предположения, които би било добре да бъдат дискутирани. Според Caldwell et al. (2008) този ефект се медира непряко чрез производството на 20-НЕТЕ (20-хидроксиеркозатетраенова киселина), реакция, катализирана от ензима CYP4F2. Освен това авторите предполагат, че същият ензим може да играе роля в обмяната на витамин К1 (филоквинон), евентуално чрез хидроксилиране на неговата странична верига [63]. Засега е известна аналогична реакция на хидроксилиране на витамин Е, която също се катализира от CYP4F2 [64-66].

През 2009 год. екипът на G. Matthew et al. си поставя за цел да изследва механизма на влияние на полиморфните варианти в гена CYP4F2 по отношение на антикоагулантната терапия като проучи ролята на ензима в метаболизма на витамин К1 в черния дроб.

In vitro метаболитни експерименти и точна хроматография – тандем масспектрометричен анализ, показват, че рекомбинантен CYP4F2 ензим (суперзоми) и човешки чернодробни микросоми в присъствие на NADPH участват в трансформацията на витамин К1 до единичен краен продукт. Скринингът на всички комерсиално налични P450 суперзоми показва, че единствено CYP4F2 е способен да метаболизира витамин К1 до този продукт. Екипът провежда генотипиране на човешки чернодробни микросоми за rs2108622, като резултатът показва намалено окисление на витамин К1 и по-ниска концентрация на протеин CYP4F2 при носителите на полиморфен алел 433M.

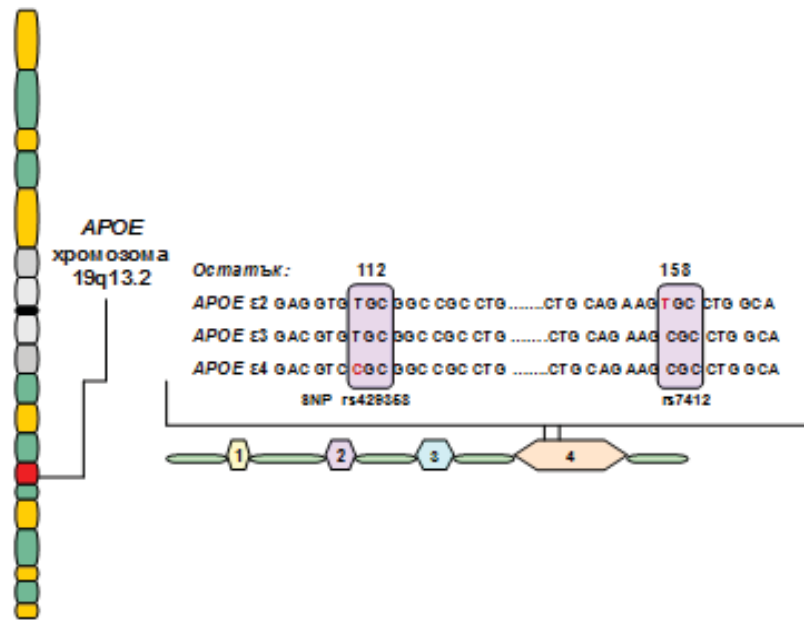
Тези данни са показател, че CYP4F2 е витамин К1 оксидаза и носителите на полиморфен алел за CYP4F2 V433M имат намалена способност да метаболизират витамин К1. Поради това пациентите с полиморфен алел за rs2108622 е по-вероятно да имат повишени чернодробни нива на витамина, налагащо прием на по-висока доза индиректен антикоагулант за предизвикване на оптимален антикоагулантен отговор [67].

#### *АРОЕ (аполипопротеин Е)*

Генът за аполипопротеин ε (АРОЕ) се намира върху дългото рамо на 19 хромозома в район 13.2. Той е член на аполипопротеиновото мултигенно семейство, включващо още гените АРОА-I, АРОА-II, АРОС-I, АРОС-II и АРОС-III. Кодиращите региони на тези гени са съставени от тандемни повтори на 11 кодона, което предполага, че те са се развили посредством дублиране на прекурсорен ген [68].

Генът за АроЕ се състои от четири екзона и три интрона, обхващащи 3597 нуклеотида, и кодира полипептид от 299 аминокиселини. Белтъкът се синтезира предимно в черния дроб, но също така и в мозък, далак, бъбреци, полови жлези, надбъбречни жлези и др. [69].

Генът АРОЕ е високополиморфен с три алела: \*ε2, \*ε3, и \*ε4. Тези алели могат да бъдат обединени в шест различни генотипа: АРОЕ \*ε2/\*ε2, АРОЕ \*ε3/\*ε3, АРОЕ \*ε4/\*ε4, АРОЕ \*ε2/\*ε3, АРОЕ \*ε3/\*ε4 и АРОЕ \*ε2/\*ε4 (фиг. 5) [70]. Трите алела произвеждат три изоформи на аполипопротеина – Е2, Е3 и Е4, които се различават по аминокиселините в позиции 112 и 158 на белтъчния продукт. Изоформата АроЕ 3 съдържа цистеин в 112 и аргинин в 158 позиция, АроЕ 2 има цистеин в двете позиции, а АроЕ 4 има аргинин на двете места [71]. Полиморфизмите в АРОЕ оказват значителен ефект върху нивата на аполипопротеините в кръвта: алелът \*ε2 се свързва с по-високи от характерните за дивия тип концентрации на белтъка, а алелът \*ε4 с по-ниски [72].



**Фиг. 5.** АПОЕ е локализиран върху хромозома 19 и притежава три различни алела, които са сравнително често срещани при различните популации (АПОЕ \*ε2, АПОЕ \*ε3 и АПОЕ \*ε4) [70]

Трите алела на гена АПОЕ са представени с различна честота при отделните популации [72]. При населението от Северна Европа (финландци, немци) се наблюдават по-високи честоти (~ 14-19%) на \*ε4 алел в сравнение с населението на Южна Европа (французи, италианци) (~ 7-12%). Нигерийци, японци и финландци имат относително ниски честоти (~ 3-4%) на \*ε2 [72]. Американските мексиканци и американските индианци също имат ниски честоти (~ 2-4 %) на \*ε2 алел. В група, състояща се от девет племена на южноамерикански индианци, няма нито един случай на \*ε2.

Ефектът на генотипа на АПОЕ би могъл да бъде частично обяснен с промяна на транспорта и усвояването на витамин К от гастроинтестиналния тракт към черния дроб (ЧД) – носителите на алела АПОЕ\*ε4 показват по-бързо усвояване на липопротеините в ЧД и по-ниски нива на циркулиращ витамин К в сравнение с носителите на алели АПОЕ\*ε2 и АПОЕ\*ε3. Следователно пациенти, носещи АПОЕ\*ε4 алел, поемат ускорено витамин К в черния дроб и се нуждаят от по-висока доза индиректен антикоагулант [19]. Този модулиращ ефект е потвърден при афроамериканци, но не и сред представителите на европеидната раса. Това предполага,

че е възможно ефектът на АПОЕ генотипа да бъде популационно специфичен.

#### GGCX (γ-глутамил карбоксилаза)

Генът GGCX е с големина 13 кб. Разположен е върху втора хромозома (локус 2p11.2), притежава 15 екзона и кодира ензима витамин К-зависима γ-глутамил карбоксилаза [73]. Това е интегрален, мембранен, микрозомален ензим, локализиран в зърнестия ендоплазмен ретикулум. Той карбоксилира глутаматните остатъци, разположени в Gla домена на витамин К-зависимите коагулационни фактори. Реакцията на карбоксилиране е зависима от наличието на редуциран витамин К, който се превръща във витамин К епоксид по време на карбоксилиращия процес. Регенерацията на редуцираната форма на витамин К се извършва от ензима витамин К епоксид редуктаза [74].

В гена GGCX са установени три редки мутации, водещи до дефицит на всички витамин К-зависими фактори на кръвосъсирването. При японските пациенти на терапия с кумаринов антикоагулант (в този случай варфарин) микросателитен маркер в интрон 6 на GGCX (CAA повтор), е независимо свързан с повишена чувствителност към лечение с този тип медикаменти. Хетерозиготите за 13, 14, 15 или 16 повтор или хомозиготите

за 13 повтора, се нуждаят от по-високи поддържащи дози, в сравнение с пациенти, носители на по-малък брой повтори [12].

През 2007 год. изследователският колектив на Kimura et al. установяват, че несинонимен вариант Arg325Gln в рамките на екзон 8 на GGCX е свързан с междуиндивидуалната вариабилност в антикоагулантната доза [75]. Полиморфизмът се намира в областта, където са разположени аминокиселинните остатъци 343-355, които посредничат при взаимодействието на ензима с неговия субстрат [76].

Въпреки наличието на тези данни, са необходими по-големи проучвания при различни етнически групи, за да се изясни влиянието на GGCX по отношение на терапията с кумаринови производни [22].

#### *CALU (калуменин)*

Генът CALU е разположен върху хромозома 7 (7q32) и се състои от 6 екзона. Той кодира белтък от групата на шапероните с дължина от 315 аминокиселини, наречен калуменин. Калуменинът е член на CREC подсемейство на Ca<sup>2+</sup> свързващите протеини (Cab-45, ретикулокалбин, ERK-45 и калуменин), за които е характерно наличието на т. нар. Efhand мотив, участващ в свързването на Ca<sup>2+</sup>. Въпреки хидрофилния си и кисел характер, калуменинът участва в образуването на комплекси с мембранни белтъци. Калуменин се свързва с голям протеинов комплекс като шаперон и регулира дейността и чувствителността към индиректни антикоагуланти на витамин К-зависимата система за карбоксилиране [77].

При 100 пациенти от различни етноси, подложени на антикоагулантна терапия, са изследвани следните полиморфизми: CYP2C9\*2, CYP2C9\*3, VKORC1 G1542C и CALU G11A (определен на базата на нуклеотидната позиция от транслационното стартово място). Комбинираният генотипен анализ показва, че носителите на див тип алел за CYP2C9 и VKORC1 и мутантен алел за CALU се нуждаят от най-високи дози антикоагулант (варфарин). Освен това е установен и пациент, носител на два полиморфни алела за G11A, приемащ екстремно високи дози медикамент – 20 mg/дн. Последващи анализи показват, че хетерозиготните пациенти се нуждаят от значимо по-високи дози антикоа-

гулант в сравнение с тези с див тип генотип (0.27 vs. 0.18,  $p < 0.02$ ) [22].

Тези резултати са в съответствие с ролята на калуменина като ендогенен регулатор на цикъла на витамин К. Това предполага, че полиморфизмът G11A, водещ до аминокиселинна замяна Arg4Glu в N-крайния сигнален пептиден домейн, може да има функционално отражение върху ензима. Установено е, че експресията на CALU в COS-1 клетки води до потискане на активността на VKOR. Смята се, че този ефект обяснява появата на резистентност към кумаринови антикоагуланти при индивиди с променена експресия на този ген [22].

Друго изследване установява, че при носителите на VKORC1 1173T алел чувствителността към терапия с варфарин се модулира от комбинацията с полиморфен вариант A29809G в гена за калуменин [78]. Носителите на двата варианта (27% от всички пациенти) достигат най-високи стойности на INR [2.26 (1.70–3.32)] и се нуждаят от най-ниски дози антикоагулант ( $14.1 \pm 5.1$  mg/седмица). Всички тези резултати предполагат, че калуменинът е нов потенциален генетичен фактор за включване във фармакогенетиката на антикоагулантната терапия.

#### *mEH (микрозомална епоксид хидролаза)*

Човешката микрозомална епоксид хидролаза се кодира от гена EPHX1, разположен върху първа хромозома (локус 1q42.12) [79]. EPHX1 включва 9 екзона и е с големина 35.48 kb. Кодираният от него протеин съдържа 455 аминокиселинни остатъка [21].

Микрозомалната епоксид хидролаза е ксенобиотик-метаболизиращ ензим, който детоксикира реактивни епоксиди до по-водоразтворими съединения. Предполага се, че това е една от субединиците на комплекса VKOR и вероятно се закрепя в мембраната на ендоплазмения ретикулум с един трансмембранен домен. По-ранни проучвания показват, че mEH е свързващо звено във витамин К-епоксид-редуктазния комплекс [80].

В кодиращия регион на гена EPHX1 са идентифицирани два полиморфни варианта. Единият е T612C, който води до замяна на тирозин с хистидин в 113 позиция в белтъчната молекула (Tyr113His, rs1051740). Другият полиморфизъм (A691G) води до за-

мяна на хистидин с аргинин в 139 позиция (His139Arg, rs2234922). Установено е, че вариантът T612C оказва влияние върху дозирването на кумариновите производни [23].

Изследвани са и други функционални полиморфизми в EPHX1 във връзка с чувствителността към кумаринови производни. Резултатите от метаанализ показват, че rs2292566 G > A (синонимен вариант) силно корелира с необходимостта от по-висока поддържаща доза кумарини (варфарин). Същото проучване не открива взаимодействие на rs4653436 A > G (5'-край на гена) с поддържащата доза антикоагулант. Допълнителен анализ на подгрупите на базата на стратификация по етнос сочи, че вариантът rs2292566 G > A корелира положително с дозата приеман медикамент при представителите на бялата раса, но не и при азиатци. Не е наблюдавана асоциация между rs4653436 A > G и поддържащата доза кумариново производно както при бялата раса, така и при азиатци [21].

#### *ABCB1 (гликопротеин P)*

След като се абсорбират в тънките черва, кумарините се транспортират до хепатоцитите от мембранный транспортер гликопротеин P (означаван още като MDR1). Генът, който го кодира (ABCB1), е локализиран върху седма хромозома (локус 7q21.12) и съдържа 29 екзона [81].

През 2007 год. Saraeva et al. публикуват изследване, в което оценяват влиянието на три полиморфни варианта в гена ABCB1 (61A > G, 2677G > T, и 3435C > T) по отношение на необходимата оптимална доза аценокумарол при българи. Въпросните полиморфизми се асоциират с промени в експресията на гликопротеин-P. Според авторите това е първото проучване, търсещо връзка между носителството на определени генетични вариации в ABCB1 и чувствителността на индивидите към лекарствена терапия с аценокумарол. За целите на изследването пациентите са разделени в три основни групи – приемачи ниски ( $\leq 7$  mg/седмица), средни ( $> 7$  mg и  $< 28$  mg/седмица) и високи ( $\geq 28$  mg/седмица) дози антикоагулант. Различията в генотипното разпределение на полиморфни варианти 61A > G и 2677G > T, установени сред трите изследвани групи, са показали близки до

статистически значимите стойности (съответно  $p = 0.061$  и  $0.080$ ). Статистически значимо различие в генотипното разпределение за 3435C > T между трите изследвани групи не е установено, т.е. той не показва асоциация с чувствителността на индивидите към лекарствена терапия с прилагания медикамент. Въпреки това при разглеждане на хаплотипа 2677G > T/3435C > T се демонстрират статистически значими различия в разпределението му между трите групи с различно дозово изискване ( $p = 0.03$ ). Колективът установява, че 2677GG/3435CC хаплотипът се асоциира с изискването на по-ниски дози аценокумарол, докато 2677TT/3435TT и/или 2677GT/3435TT хаплотипите – с изискването на по-високи дози медикамент [45].

Получени са и положителни резултати за връзката на полиморфен вариант C3435T в 26 екзон на гена ABCB1 с отговора към лекарствена терапия с кумаринови производни (варфарин) при кавказката раса. В едно изследване при шведи е установено, че алел T за същия този маркер е представен със значимо по-висока честота в групата на нискодозовите пациенти в сравнение с останалите групи. При носителите на генотип CT и TT протеинът има ниска активност в хепатоцитите, което води до високи нива на индиректен антикоагулант, респективно аценокумарол, в прицелните клетки. Това обяснява защо тези пациенти проявяват повишена чувствителност към кумаринови производни [82].

#### **ПОЛИМОРФНИ ВАРИАНТИ В ГЕНИ, КОДИРАЩИ МИКРО-РНК**

Микро-РНК са малки едноверижни молекули, които играят важна роля в регулирането на различни физиологични и патологични процеси. Изследване на Сиссаси и съавт. от 2015 год. е свързано с търсенето на потенциална асоциация между оптималната доза варфарин и носителството на полиморфни варианти в гени, кодиращи микро-РНК. Според авторите VKORC1 съдържа еволюционно консервативно свързващо място за една микро-РНК, Mir-133. Нещо повече, в човешки хепатоцити Mir-133 се коекспресира конститутивно заедно с VKORC1. Тъй като белтъчният продукт на гена VKORC1 е основната молекулярна мише-

на при терапия с варфарин и аценокумарол, целта на Сиссаси и съавт. е да се провери дали генетични вариации в MIR133A1, MIR133A2 и MIR133B могат да допринесат за вариабилността в оптималната доза медикамент.

В хода на проучването чрез директно секвениране са идентифицирани 4 полиморфни варианта в гена MIR133A2 и още един в MIR133B. Авторите установяват, че трите полиморфни варианта в MIR133A2 се намират в пълна неравновесна скаченост и корелират с антикоагулантната доза: за всеки от тези полиморфизми пациенти, носители на генотипи GA или AA, се нуждаят от значително по-висока средна седмична доза медикамент в сравнение с носителите на див тип генотип ( $P = 0.019$ ). Освен това носителите на хаплотип GC в MIR133A2 изискват значително по-ниска поддържаща доза, в сравнение с носителите на други хаплотипи ( $P = 0.012$ ). Множественият линейнорегресионен анализ потвърждава, че rs45547937 (като основен маркерен полиморфен вариант) в MIR133A2 вероятно има отношение към междуиндивидуалната вариабилност при терапия с кумаринови антикоагуланти ( $P = 0.016$ ). Тези резултати водят до предположението, че полиморфни варианти в гените за различни микро-РНК могат потенциално да повлияват вариабилността в терапевтичната доза антикоагулант [83].

#### *GATA4 (GATA-свързващ протеин 4)*

GATA4 е разположен върху осма хромозома (локус 8p23.1). Кодираща транскрипционен фактор (GATA-свързващ протеин 4) от типа „цинкови пръсти“, който е член на т.нар. GATA семейство. Членовете на това семейство разпознават GATA мотива, присъстващ в промоторите на много гени (RefSeq, Apr 2015).

Въз основа на неотдавнашно откритие за ролята на GATA4 в контрола на експресията на гена CYP2C9 [84], изследователската група на Jeong и съавт. тества възможния ефект на различните генотипи на GATA4 върху вариабилността в дозата варфарин при 201 корейски пациенти със сърдечни клапни протези. Два единични нуклеотидни полиморфизма, rs2645400 (G > T) и rs4841588 (G > T), показват значима връзка с оптималната поддържаща доза антикоагулант при пациенти, носители на див тип

генотип за CYP2C9. В резултат на проведеното изследване беше установено, че хомозиготните носители на по-редките алели за тези два варианта се нуждаят от значително по-високи дози от медикамента, в сравнение с носителите на друг тип генотипи (съответно  $5.94 \pm 1.73$  в сравнение с  $5.34 \pm 1.88$  mg,  $P = 0.026$ ;  $5.94 \pm 1.66$  в сравнение с  $5.37 \pm 1.92$ ,  $P = 0.036$ ). Множественият регресионен анализ показва, че двете комбинации от алели за изследваните полиморфизми в гена GATA4, rs867858 (G > T)/rs10090884 (A > C) и rs2645400 (G > T)/rs4841588 (G > T), допринасят за увеличение от 36.4 до 40.9% на общата вариабилност в дозата кумаринов антикоагулант. Според проведеното проучване полиморфни варианти в GATA4 биха могли да подпомогнат определянето на оптималната доза медикамент посредством регулация на експресията на CYP2C9 [85].

Подобно проучване е проведено и при пациенти, лекувани с аценокумарол и фенпрокумон. През 2012 год. екипът на Van Schie et al. прави изследване на 4 полиморфни варианта в гена GATA4, като проверява асоциацията на подбраните маркери с поддържащите дози на тези медикаменти. Най-голяма разлика в поддържащите дози е установена за rs3735814 при пациенти, подложени на терапия с аценокумарол и носители на див тип алел за CYP2C9. Установено е, че необходимата доза антикоагулант намалява с 2.92 mg/дн. [86].

#### **РЕЗИСТЕНТНОСТ КЪМ ТЕРАПИЯ С АЦЕНОКУМАРОЛ И ВАРФАРИН**

Резистентност към терапия с кумаринови антикоагуланти се наблюдава изключително рядко. Това състояние може да бъде унаследено или придобито. Предполагемите механизми в основата на това явление включват фармакокинетични и фармакодинамични взаимодействия. Фармакокинетичната основа на тази резистентност се обяснява с лекарствени взаимодействия, резултат от едновременното ангажиране на метаболизиращия ензим CYP2C9 и в по-малка степен на ензимите CYP1A1, CYP1A2 и CYP3A4. Теоретично, високата степен на очистване на кумарино-

вите антикоагуланти от бъбреците (бъбречен клирънс) би могла да обясни проявата на резистентност в хода на терапията с тези антикоагуланти или при пристъпване към такъв тип лечение [87]. Засилен клирънс и липса на отговор към терапия с различни медикаменти се наблюдава основно при наличие на дупликации на гени, което повишава ензимната активност на метаболизиращите ензими. Предполага се, че дупликации на гена за CYP2C9 могат да доведат до проявата на резистентност към терапия с кумаринови антикоагуланти, но към момента такива случаи не са докладвани.

От своя страна фармакодинамичният механизъм, водещ до частична или пълна резистентност в контекста на аценокумарол и варфарин, се дължи на мутации в гена VKORC1. По-голяма част от тези мутации са идентифицирани при пациенти с наследствена терапевтична резистентност [88]. Тук се отнасят Val29Leu, Ala41Ser, Arg58Gly, Val66Met, Leu128Arg, Val45Ala и Asp36Tyr [88-90]. Последната мутация е открита при 15% от изследваните етиопци и показва силна статистически значима връзка с изискването на много високи дози варфарин, респективно аценокумарол [89].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Към момента с най-голямо влияние по отношение на интериндивидуалната и междуличностната вариабилност в чувствителността към терапията с кумаринови производни имат полиморфните варианти в гените CYP2C9 и VKORC1. Създадените генотип-базирани алгоритми обясняват по-голям процент от промяната в дозата в сравнение с клиничните показатели и негенетичните предиктори като възраст и тегло. Независимо от обширните генетични изследвания, търсенето на нови фармакогенетични мишени продължава. По-голяма част от тези изследвания са проведени върху най-широко предписвания индиректен антикоагулант при американци, европейци и азиатци, а именно варфарин. Подобни проучвания по отношение на аценокумарол все още липсват или не са достатъчно информативни. Но би могло да се предположи, че поради сходния си механизъм на действие и метаболизъм, направените откри-

тия при единия медикамент биха могли да се дискутират в контекста на другия и впоследствие да бъдат потвърдени при провеждане на молекулярно-биологични анализи.

### Библиография

1. Pengo V, Pegoraro C, Cucchini U, Iliceto S. Worldwide management of oral anticoagulant therapy: the ISAM study. *Journal of thrombosis and thrombolysis*. 2006;21(1):73-7.
2. Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Archives of internal medicine*. 2005 23;165(10):1095-106.
3. D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M. Oral anticoagulants: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors. *Blood reviews*. 2008;22(3):127-40.
4. Alberio L. Oral anticoagulation with vitamin K antagonists. *Ther Umsch*. 2003 Jan;60(1):5-9.
5. Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47(9):565-94.
6. Thijssen HH, Drittij MJ, Vervoort LM, de Vries-Hanje JC. Altered pharmacokinetics of R- and S-acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9\*3. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;70(3):292-8.
7. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, et al. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med*. 2008;10(2):139-50.
8. Schalekamp T, de Boer A. Pharmacogenetics of oral anticoagulant therapy. *Current pharmaceutical design*. 2010;16(2):187-203.
9. Osman A. Studies on warfarin treatment with emphasis on interindividual variations and drug monitoring. Linköping University Medical Dissertations No 1000, 2007.
10. Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Clopidogrel pathway. *Pharmacogenetics and genomics*. 2010 Jul;20(7):463-5.
11. Kovac MK, Rakicevic LB, Radojkovic DP. Extreme sensitivity to acenocoumarol therapy in patient with both VKORC1-1639 A/A and CYP2C9\*1/\*3 genotypes. *J Thromb Thrombolysis*. 2011 Oct;32(3):368-71.
12. Chen LY, Eriksson N, Gwilliam R, et al. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) microsatellite and warfarin dosing. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3673-4.
13. Wadelius M, Chen LY, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCCX polymorphisms associated with warfarin dose. *The pharmacogenomics journal*. 2005;5(4):262-70.
14. Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, et al. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of CYP4F2 and GGCCX polymorphisms. *Thrombosis research*. 2014;134(3):604-9.
15. Krishna Kumar D, Shewade DG, Lorient MA, et al. An acenocoumarol dosing algorithm exploiting clinical and genetic factors in South Indian (Dravidian) population. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2015;71(2):173-81.
16. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, et al. CYP4F2 1347 G > A & GGCCX 12970 C > G polymorphisms: frequency in north Indians & their effect on dosing of acenocoumarol oral anticoagulant. *Ind J M R*. 2014;139(4):572-8.
17. Hamadeh IS, Shahin MH, Lima SM, et al. Impact of GGCCX, STX1B and FPGS Polymorphisms on Warfarin Dose Requirements in European-Americans and Egyptians. *Clinical and translational science*. 2016;9(1):36-42.
18. Jimenez-Varo E, Canadas-Garre M, Gutierrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernandez MA. Prediction of stable acenocoumarol dose by a pharmacogenetic algorithm. *Pharmacogenetics and genomics*. 2014;24(10):501-13.
19. Kohnke H, Sorlin K, Granath G, Wadelius M. Warfarin dose related to apolipoprotein E (APOE) genotype. *Eur. J. Clin. Pharmacol*. 2005;61(5-6):381-8.



20. Kimmel SE, Christie J, Kealey C, et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. *The pharmacogenomics journal*. 2008;8(1):53-60.
21. Liu HQ, Zhang CP, Zhang CZ, Liu XC, Liu ZJ. Influence of two common polymorphisms in the EPHX1 gene on warfarin maintenance dosage: a meta-analysis. *BioMed Res Int*. 2015;2015:564149.
22. Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost*. 2006;95(2):205-11.
23. Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, et al. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;77(5):365-72.
24. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet*. 2007;121(1):23-34.
25. Lee MT, Chen CH, Chou CH, et al. Genetic determinants of warfarin dosing in the Han-Chinese population. *Pharmacogenomics*. 2009;10(12):1905-13.
26. Wolkani-Bartnik J, Pogorzelska H, Szperl M, et al. Impact of genetic and clinical factors on dose requirements and quality of anticoagulation therapy in Polish patients receiving acenocoumarol: dosing calculation algorithm. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(11):611-8.
27. van Schie RM, Wessels JA, le Cessie S, et al. Loading and maintenance dose algorithms for phenprocoumon and acenocoumarol using patient characteristics and pharmacogenetic data. *Eur Heart J*. 2011;32(15):1909-17.
28. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, et al. Therapeutic dosing of acenocoumarol: proposal of a population specific pharmacogenetic dosing algorithm and its validation in north Indians. *PLoS One*. 2012;7(5):e37844.
29. Pop TR, Vesa SC, Trifa AP, Crisan S, Buzoianu AD. An acenocoumarol dose algorithm based on a South-Eastern European population. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013 Jun 18.
30. Markatos CN, Grouzi E, Politou M, et al. VKORC1 and CYP2C9 allelic variants influence acenocoumarol dose requirements in Greek patients. *Pharmacogenomics*. 2008;9(11):1631-8.
31. Krishna Kumar D, Madhan S, Balachander J, et al. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms on mean daily maintenance dose of acenocoumarol in South Indian patients. *Thromb Res*. 2013;131(4):363-7.
32. Cerezo-Manchado JJ, Rosafalco M, Anton AI, et al. Creating a genotype-based dosing algorithm for acenocoumarol steady dose. *Thromb Haemost*. 2013;109(1):146-53.
33. Borobia AM, Lubomirov R, Ramirez E, et al. An acenocoumarol dosing algorithm using clinical and pharmacogenetic data in Spanish patients with thromboembolic disease. *PLoS One*. 2012;7(7):e41360.
34. Wu AH, Wang P, Smith A, et al. Dosing algorithm for warfarin using CYP2C9 and VKORC1 genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. *Pharmacogenomics*. 2008;9(2):169-78.
35. Gong IY, Tirona RG, Schwarz UI, et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy. *Blood*. 2011 15;118(11):3163-71.
36. Wells PS, Majeed H, Kassem S, et al. A regression model to predict warfarin dose from clinical variables and polymorphisms in CYP2C9, CYP4F2, and VKORC1: Derivation in a sample with predominantly a history of venous thromboembolism. *Thrombosis research*. 2010;125(6):e259-64.
37. Cini M, Legnani C, Cosmi B, et al. A new warfarin dosing algorithm including VKORC1 3730 G > A polymorphism: comparison with results obtained by other published algorithms. *Eur. J Clin Pharmacol*. 2012;68(8):1167-74.
38. Zambon CF, Pengo V, Padriani R, et al. VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. *Pharmacogenomics*. 2011;12(1):15-25.
39. Herman D, Peternel P, Stegnar M, Breskvar K, Dolzan V. The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. *Thromb Haemost*. 2006;95(5):782-7.
40. Tham LS, Goh BC, Nafziger A, et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Therap* 2006;80(4):346-55.
41. Cho HJ, On YK, Bang OY, et al. Development and comparison of a warfarin-dosing algorithm for Korean patients with atrial fibrillation. *Clin Therap* 2011;33(10):1371-80.
42. Choi JR, Kim JO, Kang DR, et al. Proposal of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm in Korean patients. *J Hum Gen* 2011;56(4):290-5.
43. Pathare A, Al Khabori M, Alkindi S, et al. Warfarin pharmacogenetics: development of a dosing algorithm for Omani patients. *J Hum Gen* 2012;57(10):665-9.
44. Tzveova R, Dimitrova-Karamfilova A, Saraeva R, et al. Estimation and validation of acenocoumarol dosing algorithms in Bulgarian patients with cardiovascular diseases. *Personalized medicine*. 2015(12(3)):211-22.
45. Saraeva RB, Paskaleva ID, Doncheva E, Eap CB, Ganey VS. Pharmacogenetics of acenocoumarol: CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP3A4, CYP3A5 and ABCB1 gene polymorphisms and dose requirements. *J Clin Pharm Ther*. 2007;32(6):641-9.
46. Kalpana SR, Bharath G, Manjunath CN, Christopher R. Influence of VKORC1 and CYP2C9 Polymorphisms on Daily Acenocoumarol Dose Requirement in South Indian Patients With Mechanical Heart Valves. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2016 Jun 22.
47. Dimitrova-Karamfilova A, Tzveova R, Chilingirova N, et al. Acenocoumarol Pharmacogenetic Dosing Algorithms and Their Application in Two Bulgarian Patients with Low Anticoagulant Requirements. *Biochemical genetics*. 2015;53(11-12):334-50.
48. Jimenez-Varo E, Canadas-Garre M, Gutierrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernandez MA. Prediction of stable acenocoumarol dose by a pharmacogenetic algorithm. *Pharmacogenetics and genomics*. ;24(10):501-13.
49. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, et al. Pharmacogenetic aspects of coumarinic oral anticoagulant therapies. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(3):222-9.
50. Bazan NS, Sabry NA, Rizk A, Mokhtar S, Badary O. Validation of pharmacogenetic algorithms and warfarin dosing table in Egyptian patients. *Int J Clin Pharm*. 2012;34(6):837-44.
51. Bodin L, Verstuyft C, Tregouet DA, et al. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*. 2005 1;106(1):135-40.
52. Buzoianu AD, Militaru FC, Vesa SC, et al. The impact of the CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on acenocoumarol dose requirements in a Romanian population. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;50(3):166-70.
53. Kaur A, Khan F, Agrawal SS, et al. Cytochrome P450 (CYP2C9\*2,\*3) & vitamin-K epoxide reductase complex (VKORC1 -1639G<A) gene polymorphisms & their effect on acenocoumarol dose in patients with mechanical heart valve replacement. *Indian J Med Res*. 2013;137(1):203-9.
54. Kovac MK, Maslac AR, Rakicevic LB, Radojkovic DP. The c.-1639G>A polymorphism of the VKORC1 gene in Serbian population: retrospective study of the variability in response to oral anticoagulant therapy. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2010;21(6):558-63.
55. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, et al. VKORC1 and CYP2C9 genotypes and acenocoumarol anticoagulation status: interaction between both genotypes affects overanticoagulation. *Clin Pharmacol Therap* 2006;80(1):13-22.

56. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005 2;352(22):2285-93.
57. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemost*. 2007;5(11):2227-34.
58. Verde Z, Ruiz JR, Santiago C, et al. A novel, single algorithm approach to predict acenocoumarol dose based on CYP2C9 and VKORC1 allele variants. *PLoS One*. 2010;5(6):e11210.
59. Perez-Andreu V, Roldan V, Anton AI, et al. Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. *Blood*. 2009 14;113(20):4977-9.
60. Lee KE, Chang BC, Kim HO, et al. Effects of CYP4F2 gene polymorphisms on warfarin clearance and sensitivity in Korean patients with mechanical cardiac valves. *Therap Drug Monitoring*. 2012;34(3):275-82.
61. Pavani A, Naushad SM, Mishra RC, et al. Retrospective evidence for clinical validity of expanded genetic model in warfarin dose optimization in a South Indian population. *Pharmacogenomics*. 2012;13(8):869-78.
62. Teichert M, Eijgelsheim M, Rivadeneira F, et al. A genome-wide association study of acenocoumarol maintenance dosage. *Hum Mol Genet*. 2009 1;18(19):3758-68.
63. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*. 2008 15;111(8):4106-12.
64. Sontag TJ, Parker RS. Cytochrome P450 omega-hydroxylase pathway of tocopherol catabolism. Novel mechanism of regulation of vitamin E status. *The Journal of biological chemistry*. 2002 12;277(28):25290-6.
65. Sontag TJ, Parker RS. Influence of major structural features of tocopherols and tocotrienols on their omega-oxidation by tocopherol-omega-hydroxylase. *Journal of lipid research*. 2007;48(5):1090-8.
66. Hardwick JP. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochemical pharmacology*. 2008 15;75(12):2263-75.
67. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Molecular pharmacology*. 2009;75(6):1337-46.
68. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988 29;240(4852):622-30.
69. Anoop S, Misra A, Meena K, Luthra K. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular & coronary heart diseases. *Indian J Med Res*.; 132:363-78.
70. Laws SM, Hone E, Gandy S, Martins RN. Expanding the association between the APOE gene and the risk of Alzheimer's disease: possible roles for APOE promoter polymorphisms and alterations in APOE transcription. *J Neurochem*. 2003;84(6):1215-36.
71. Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis*. 1988;8(1):1-21.
72. Eichner JE, Dunn ST, Perveen G, et al. Apolipoprotein E polymorphism and cardiovascular disease: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 2002 15;155(6):487-95.
73. Wu SM, Stafford DW, Frazier LD, et al. Genomic sequence and transcription start site for the human gamma-glutamyl carboxylase. *Blood*. 1997 1;89(11):4058-62.
74. Brenner B, Sanchez-Vega B, Wu SM, et al. A missense mutation in gamma-glutamyl carboxylase gene causes combined deficiency of all vitamin K-dependent blood coagulation factors. *Blood*. 1998 15;92(12):4554-9.
75. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, et al. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, gamma-glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res*. 2007;120(2):181-6.
76. Pudota BN, Hommema EL, Hallgren KW, et al. Identification of sequences within the gamma-carboxylase that represent a novel contact site with vitamin K-dependent proteins and that are required for activity. *J Biol Chemistry*. 2001 14;276(50):46878-86.
77. Wajih N, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. The inhibitory effect of calumenin on the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. Characterization of the system in normal and warfarin-resistant rats. *J Biol Chemistry*. 2004 11;279(24):25276-83.
78. Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, et al. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol. *J Thromb Haemost*. 2007;5(8):1701-6.
79. Hassett C, Robinson KB, Beck NB, Omiecinski CJ. The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics*. 1994 15;23(2):433-42.
80. Cain D, Hutson SM, Wallin R. Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chemistry*. 1997 14;272(46):29068-75.
81. Das A, Balan S, Banerjee M, Radhakrishnan K. Drug resistance in epilepsy and the ABCB1 gene: The clinical perspective. *Indian J Hum Gen* 2011;17 Suppl 1:S12-21.
82. Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *The pharmacogenomics journal*. 2004;4(1):40-8.
83. Ciccacci C, Rufini S, Politi C, et al. Could MicroRNA polymorphisms influence warfarin dosing? A pharmacogenetics study on mir133 genes. *Thromb Res*. 2015 Jun 18.
84. Mwinyi J, Nekvindova J, Cavaco I, et al. New insights into the regulation of CYP2C9 gene expression: the role of the transcription factor GATA-4. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 2009;38(3):415-21.
85. Jeong E, Lee KE, Jeong H, Chang BC, Gwak HS. Impact of GATA4 variants on stable warfarin doses in patients with prosthetic heart valves. *The pharmacogenomics journal*. 2015;15(1):33-7.
86. van Schie RM, Wessels JA, Verhoef TI, et al. Evaluation of the effect of genetic variations in GATA-4 on the phenprocoumon and acenocoumarol maintenance dose. *Pharmacogenomics*. 2012;13(16):1917-23.
87. Sinxadi P, Blockman M. Warfarin resistance. *Cardiovasc J Afr*. 2008;19(4):215-7.
88. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004 5;427(6974):537-41.
89. Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H, et al. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2477-80.
90. Rettie AE, Tai G. The pharmacogenomics of warfarin: closing in on personalized medicine. *Mol Interv*. 2006;6(4):223-7.

✉ Адрес за кореспонденция:

д-р Р. Цвеова  
Клиника "Медицинска химия и биохимия"  
Център по молекулярна медицина  
Медицински университет  
ул. "Здраве" № 2  
1431 София

✉ Address for correspondence:

R.Tzveova, MD  
Department of Medical Chemistry and Biochemistry  
Molecular Medicine Center  
Medical University  
2 Zdrave st.  
Bg – 1431 Sofia