

# Utjecaj kombinacije polimorfizma gena CYP2C9, VKORC1 i MDR1 na individualizaciju terapije varfarinom

---

**Makar-Aušperger, Ksenija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:397494>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-04**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
MEDICINSKI FAKULTET

**Ksenija Makar-Aušperger**

**Utjecaj kombinacije polimorfizma  
gena CYP2C9, VKORC1 i MDR1 na  
individualizaciju terapije varfarinom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

Disertacija je izrađena u Zavodu za kliničku farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada : prof. dr. sc. Nada Božina

Voditeljica Kliničke jedinice za farmakogenomiku i individualizaciju terapije  
Kliničkog bolničkog centra Zagreb  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Ovaj rad posvećujem mojim najmilijima, NINI i ZDRAVKU. Moja obitelj je bila i jest uvijek uz mene.

Najveća zahvala za pomoć, poticaj i znanje koje mi je podarila ide prof. dr Nadi Božina, voditeljici Kliničke jedinice za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Ona nije samo mentorica, ona je najbolja prijateljica. Prejednostavno zvuči da je vjerovala u mene i kada ja nisam, no to je moja najiskrenija misao. I zato joj posebno hvala. Ovog rada doista ne bi bilo da ona nije bila uz mene.

Zahvaljujem svom šefu, prof. dr Igoru Francetiću koji je također brinuo o napredovanju mojeg rada, pomogao mi savjetom i pružio pomoć kadgod sam zapela ili se umorila.

Velika zahvala svim mojim kolegama na Odjelu Zavoda za kliničku farmakologiju koji su mi pomogli oko pronalaženja i praćenja ispitanika, a posebno dr.sc. Viktoriji Erdeljić Turk koja je na samom kraju kada je uvijek najteže, imala posebnu poticajnu ulogu.

Hvala i brojnim kolegama, profesorima, specijalistima i specijalizantima Klinike za unutarnje bolesti i Klinike za bolesti srca i krvnih žila koji su spremno prihvatili provođenje ispitivanja u sklopu izrade moje disertacije te su mi pomogli oko prikupljanja podataka.

Zahvaljujem sr Marijani Križić Erceg koja je nesebično prikupljala i donosila povijesti bolesti kad god sam ih trebala.

Bez svih nabrojenih ovaj rad ne bi bio gotov.

Ukoliko vrijedi, dio je njihovih zasluga.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ABCB1	o ATP ovisan transporter; od engl. ATB binding cassette transporter B1
ADP	adenozin difosfat
APOE	apolipoprotein E
ASK	acetilsalicilna kiselina
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
BMI	indeks tjelesne mase; od engl. Body Mass Index
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc	kongestivna bolest srca 1, hipertenzija 1, dob 1, diabetes mellitus 1, moždani udar 2-V-vaskularna bolest 1, dob 1, spol 1; od engl. –congestive heart failure 1, H-hypertension 1, A-Age >75 2, D-diabetes mellitus 1, S-stroke 2-V-vascular disease 1, A-age 1, Sc –sex category
CHADS <sub>2</sub>	kongestivna bolest srca 1, hipertenzija 1, dob 1, diabetes mellitus 1, moždani udar 2; od engl. C-congestive heart failure 1, H-hypertension 1, A-Age >75 1, D-diabetes mellitus 1, S-stroke 2
CYP2C9	citokrom P450 podjedinica 2C9
DVT	dubinskovenska tromboza
EM	brzi metabolizator; od engl extensive metabolizer
FA	fibrilacija atrijska
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove; od engl-. Food and Drug Administration
FG skupina	skupina s farmakogenetičkom predikcijom doze varfarina
GGT	gama glutamil transferaza
NYHA	klasifikacija srčanog zatajenja od New York Heart Association
IM	umjereni metabolizator; od engl. intermediate metabolizer

INR	Međunarodni normalizirani omjer; od engl. International Normalized Ratio
KH2	reducirani oblik vitamina K
LMWH	heparin niske molekularne težine; od engl. Low Molecular Weight Heparin
MDR1	protein rezistentan na lijekove; od engl. multidrug resistance protein 1
NFG skupina	kontrolna skupina s uvođenjem varfarina prema kliničkim obilježajima, bez učinjene farmakogenetike
OAK	oralni antikoagulansi
PAF	faktor koji aktivira trombocite; od engl. Platelet activation factor
PCR	polimerazna lančana reakcija; od engl. polymerase chain reaction
PE	plućna embolija
PM	spori metabolizator; od engl. poor metabolizer
PV	protrombinsko vrijeme
SNP	jednonukleotidni polimorfizam, od engl. single nucleotide polymorfismus

UEM	ultrabrzi metabolizator; od engl. ultraextensive metabolizer
UZ	ultrazvuk
TE	tromboembolizam
TIA	tranzitorni ishemički napadaj; od engl. transitory ischemic attack
VKORC1	vitamin K epoksid reduktaza podjedinica 1
wt	divlji tip; od engl. <i>wild type</i>
vWF	von Willebrandtov faktor

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. HEMOSTAZA.....	1
1.2. KOAGULACIJA	
KRVI.....	1
1.2.1. VITAMIN K.....	3
1.2.2. CIKLUS VITAMINA K.....	5
1.2.3. TROMBOZA I EMBOLIJA.....	6
1.3. VARFARIN.....	7
1.3.1. FARMAKOKINETIKA VARFARINA.....	8
1.3.2. FARMAKODINAMIKA VARFARINA.....	10
1.3.3. MJESTO VARFARINA U TERAPIJI-INDIKACIJE ZA PRIMJENU.....	11
1.3.4. NUSPOJAVE VARFARINA.....	12
1.3.5. INTERAKCIJE VARFARINA.....	14
1.3.6. DODATNI UTJECAJI NA DOZU I UČINAK VARFARINA.....	17
1.3.7. FARMAKOGENETIKA VARFARINA.....	19
1.3.7.1. POLIMORFIZAM GENA CYP2C9.....	21
1.3.7.2. POLIMORFIZAM GENA VKORC1.....	23
1.3.7.3. KOMBINIRANI UTJECAJ POLIMORFIZMA GENA CYP2C9 I VKORC1 NA TERAPIJU VARFARINOM.....	24
1.3.7.4. POLIMORFIZAM GENA MDR1/ABCB1.....	24
1.3.7.5. ALGORITMI PRIMJENE VARFARINA ZASNOVANI NA FARMAKOGENETICI.....	29
1.3.7.6. OSTALI MOGUĆI FARMAKOGENETIČKI UTJECAJI.....	31
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	33
<b>3. CILJEVI I SVRHA ISPITIVANJA</b> .....	34
<b>4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA</b> .....	36
4.1. ISPITANICI.....	37
4.2. INDIKACIJE ZA PRIMJENU VARFARINA.....	39
4.2.1. PLUĆNA EMBOLIJA (PE).....	39
4.2.2. DUBINSKOVENSKA TROMBOZA (DVT).....	41
4.2.3. ATRIJSKA FIBRILACIJA (AF).....	42
4.3. GENOTIPIZACIJA.....	44
4.3.1. GENOTIPIZACIJA CYP2C9.....	44
4.3.2. GENOTIPIZACIJA MDR1/ABCB1.....	46
4.3.3. GENOTIPIZACIJA VKORC1.....	48
4.4. STATISTIČKA	
OBRADA.....	48
<b>5. REZULTATI</b> .....	50
5.1. ISPITANICI.....	50
5.1.1. DEMOGRAFSKE OSOBINE.....	50
5.1.2. BOLESNICI I TJELESNA TEŽINA.....	53
5.1.3. BOLESNICI I NAVIKE PUŠENJA I UZIMANJA ALKOHOLA.....	54
5.1.4. LABORATORIJSKI NALAZI NA POČETKU ISPITIVANJA.....	55



5.2.	PRIMJENA VARFARINA I DRUGIH LIJEKOVA.....	58
5.2.1.	INDIKACIJE ZA PRIMJENU VARFARINA.....	58
5.2.2.	ISTODOBNA PRIMJENA DRUGIH LIJEKOVA.....	59
5.2.3.	DOZA VARFARINA.....	63
5.2.4.	POSTIZANJE CILJNOG INR.....	66
5.3.	GENETIKA.....	69
5.3.1.	UČESTALOST GENOTIPOVA.....	69
5.3.2.	POSTIZANJE STABILNOG ANTIKOAGULACIJSKOG UČINKA.....	70
5.3.3.	GENETIČKE VARIJANTE U ODNOSU NA PROMATRANE PARAMETRE.....	71
5.3.4.	INTERAKCIJE GENA <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> I <i>MDR1</i> .....	74
5.3.5.	INTERAKCIJE GENOTIPOVA <i>MDR1</i> I <i>CYP2C9</i> U PREDIKCIJI POSTIZANJA TERAPIJSKOG RASPONA INR.....	75
5.4.	NUSPOJAVE.....	76
6.	RASPRAVA.....	79
7.	ZAKLJUČCI.....	96
8.	SAŽETAK.....	97
9.	ABSTRACT.....	98
10.	LITERATURA.....	99
11.	BIOGRAFIJA.....	115
12.	PRILOG 1.....	116
13.	PRILOG 2.....	118

## 1. UVOD

### 1.1. Hemostaza

Hemostaza je pojam fiziološkog vrlo precizno reguliranog dinamičkog procesa kojim se održava tekuće stanje krvi, ograničava ili zaustavlja krvarenje kad ono već nastupi uz istodobno izbjegavanje tromboze krvnih žila sa svim posljedicama do kojih tromboza može dovesti<sup>1</sup>. Proces je vrlo kompleksno reguliran i ovisi o delikatnoj ravnoteži između brojnih sustava. Sustavi uključeni u hemostatski proces su vaskularni sustav, koagulacijski sustav, fibrinolitički sustav, trombociti, kininski sustav, sustav serinskih proteaza i sustav komplemenata<sup>2</sup>.

### 1.2. Koagulacija krvi

Proces koagulacije je kompleksni proces kojim se u konačnici formiraju krvni ugrušci, a proces koagulacije predstavlja važan dio hemostaze kojim se nastoji prekinuti gubitak krvi iz ozlijeđene krvne žile. Poremećaj koagulacije može dovesti s jedne strane do povećanog rizika od krvarenja i do samog krvarenja, a s druge strane do tromboze pa je pažljiva ravnoteža između ta dva događaja posebno važna.

Hemostaza započinje lokalnom vazokonstrikcijom (trenutna reakcija na ozljedu) i kompresijom ozlijeđenih krvnih žila samom krvi koja okružuje tkivo. Ozljeda zida krvne žile potiče aktivaciju trombocita i proizvodnju fibrina koji kombinirano stvaraju ugrušak.

Ozljeda endotela krvne žile dovodi do izlaganja subendotelijalnih proteina (primarno kolagena) cirkulirajućim trombocitima<sup>3</sup>. Oni se vežu na kolagen preko svojih specifičnih površinskih glikoproteinskih receptora Ia/IIa. Daljnju adheziju pojačava von Willebrandov faktor (vWF) koji se oslobađa iz endotela i trombocita i stvara vezu s trombocitnim glikoproteinom Ib/IX. Ta adhezija također aktivira trombocite iz čijih se granula oslobađaju adenzin - difosfat (ADP), serotonin (5-HT), faktor koji aktivira trombocite (PAF - od engl. platelet activation factor), vWF, trombocitni faktor 4 i vrlo snažan vazokonstriktor i aktivator (daljnje!) agregacije trombocita, tromboksan A<sub>2</sub>.

Sadržaj granula aktivira kaskadu G-proteinskog receptora koja rezultira povišenjem koncentracije kalcija u citosolu trombocita. Kalcij pak nadalje aktivira protein kinazu C, a ona

fosfolipazu A2. Fosfolipaza mijenja membranski IIb/IIIa receptor čime se povećava afinitet za vezanje fibrina. Aktivirani trombociti pritom mijenjaju oblik (sferični postaju zvjezdasti).

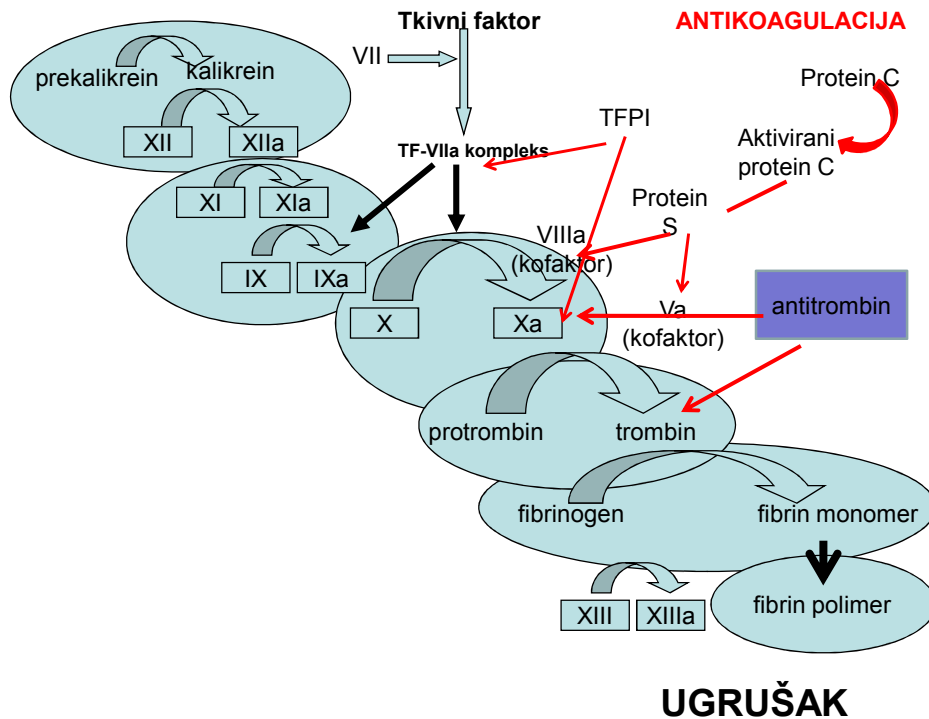
Daljnji proces koagulacije odvija se poput kaskade i čine je dva temeljna puta<sup>2</sup>. Prvi je intrinzički put ili danas bolje poznat kao kontaktni aktivirajući put i put tkivnog faktora (nekada zvan ekstrinzički put). Primarnim putem za početak koagulacije smatra se put tkivnog faktora, a on predstavlja seriju reakcija kojima se zimogen (inaktivirani enzimski prekursor), serinska proteaza i njegov glikoproteinski kofaktor aktiviraju i postaju aktivne komponente koje kataliziraju sljedeću reakciju u kaskadi što završava nastankom fibrina.

U procesu koagulacije sudjeluje niz faktora koagulacije. U jetri se sintetiziraju oni koji su ovisni o vitaminu K. Općenito može se reći da su faktori koagulacije serinske proteaze osim FVIII i FV koji su glikoproteini i FXIII koji je transglutaminaza. Već je navedeno da faktori koagulacije cirkuliraju u plazmi kao inaktivni zimogeni.

Vanjski put počinje nakon ozljede krvne žile gdje faktor VII napušta cirkulaciju i dolazi u kontakt s tkivnim faktorom čime se formira aktivirani kompleks TF - FVIIa. Kompleks aktivira FIX i FX. S druge strane je FVII aktiviran trombinom FXIa, FXII i FXa. Aktivacija FX (u FXa) je gotovo istodobno inhibirana tkivnim faktorom puta. FX i njegov kofaktor FVa stvaraju kompleks protrombinaze koja aktivira protrombin u trombin.

Unutarnji put počinje formacijom primarnog kompleksa na kolagenu preko kininogena visoke molekularne težine, prekalikreina i FXII (Hagemanov faktor). Prekalikrein se konvertira u kalikrein, a FXII postaje FXIIa. Dalje FXIIa pretvara FXI u FXIa, a on aktivira FIX. Faktor IX sa svojim kofaktorom VIIIa stvara kompleks tenaze koji aktivira FX u FXa.

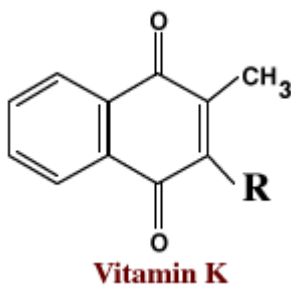
Antitrombin, protein S i C su prirodni antikoagulantni proteini koji omogućavaju kontrolu i ravnotežu u procesu koagulacije krvi. Kako krvarenje može ugroziti život tako su osobito važni ugrađeni kontrolni mehanizmi u procesu koagulacije. Antitrombin inhibira koagulacijske faktore vanjskog i unutarnjeg puta, a aktivirani protein C zajedno s proteinom S dovodi do degradacije faktora Va i VIIIa te na taj način smanjuje aktivaciju protrombina i faktora X. Slika 1 predstavlja kaskadu koagulacije, unutarnji i vanjski put.



SLIKA 1. 2.1. Unutarnji i vanjski put koagulacije

### 1.2.1. Vitamin K

Vitamin K je vitamin topiv u masti i esencijalan je vitamin potreban za funkciju nekoliko važnih proteina uključenih u zgrušavanje krvi<sup>3</sup>.



SLIKA 1.2.1.1. Vitamin K-kemijska struktura

Postoje najmanje 2 različite prirodne tvari koje nazivamo vitamin K<sub>1</sub> i vitamin K<sub>2</sub>. Vitamin K<sub>1</sub> ili filokinon je 2-metil-3-fetil-1,4-naftokinon koji je nađen u biljkama i jedini je prirodni vitamin K dostupan za terapijsku primjenu. Vitamin K<sub>2</sub> predstavlja seriju oblika-formi

(menakinoni) čija se sinteza u značajnoj mjeri odvija u gram pozitivnim bakterijama i bakterijama u crijevu.

Iako je vitamin K topljiv u masti, vrlo su male zalihe u organizmu te se također vrlo brzo i prazne u slučaju nedovoljnog unosa. Deficit je ipak u zdravih ljudi vrlo rijedak iz više razloga: nalazimo ga u hrani koju unosimo, ciklus vitamina K ne dozvoljava gubitak i crijevne bakterije ga sintetiziraju iako se ne zna je li količina koja se apsorbira i iskorištava značajna. Rizik od manjka je izražen u osoba koje uzimaju antagoniste vitamina K (antikoagulanse) i u bolesnika sa značajnim oštećenjem ili bolestima jetre. Zato u bolesnika s bolestima jetre nadoknađujemo vitamin K pokušavajući normalizirati parametre koagulacije koji su obično poremećeni i prema kojima procjenjujemo funkciju jetre.

Vitamin K se apsorbira u crijevima. Uz dovoljno žučnih soli, filokinon se u potpunosti apsorbira i nakon toga inkorporira u hilomikrone čvrsto udružene s trigliceridima i lipoproteinima.

Unos u jetru odvija se preko apolipoprotein E (APOE) specifičnog receptorskog unosa<sup>4</sup>. Gen *APOE* ima nekoliko poznatih polimorfizama pa se i unos vitamina K u jetru razlikuje prema različitim alelima te se zna da je unos povezan s polimorfizmima kako slijedi  $*E_2 < *E_3 < *E_4$ <sup>5</sup>.

Nakon apsorpcije filokinon se metabolizira u jetri, ali u nedostatku unosa, njegova količina se ubrzano smanjuje<sup>6</sup>. S druge strane uskladištenje vitamina K u drugim tkivima je izuzetno malo. Filokinon se brzo dalje metabolizira u jače polarne metabolite koji se izlučuju putem žuči i urina. Iz svega navedenoga može se zaključiti kako je malo uskladištenih rezervi vitamina K u ljudskom organizmu. Ipak, i u uvjetima smanjenje sekrecije žuči i smanjene apsorpcije vitamina K, hipoprotrombinemija se javlja sporo tijekom razdoblja od nekoliko tjedana.

Vitamin K je u procesu koagulacije važan za aktivaciju osnovnih faktora koagulacije, a to su faktor II (protrombin), VII, IX i X.

O vitaminu K ovisni faktori koagulacije sintetiziraju se u jetri, pa je posljedično pri teškim oštećenjima jetre (zatajivanje) smanjena sinteza navedenih faktora i povećan rizik nekontroliranog krvarenja<sup>7</sup>. Navedeni faktori koagulacije su bez vitamina K inaktivni prekursori.

Vitamin K je esencijalni kofaktor, koenzim, za mikrosomalni enzimski sustav koji aktivira prekursore koagulacijskih faktora tako da katalizira karboksilaciju aminokiseline (glutaminske kiseline), što rezultira konverzijom u gama ( $\gamma$ )-karboksigliutaminsku kiselinu<sup>8,9</sup>. Nastanak nove aminokiseline omogućuje proteinu vezanje za kalcij što dovodi do vezanja za

fosfolipidnu površinu, a oboje je nužno za koagulacijsku kaskadu i formiranje krvnog ugruška.

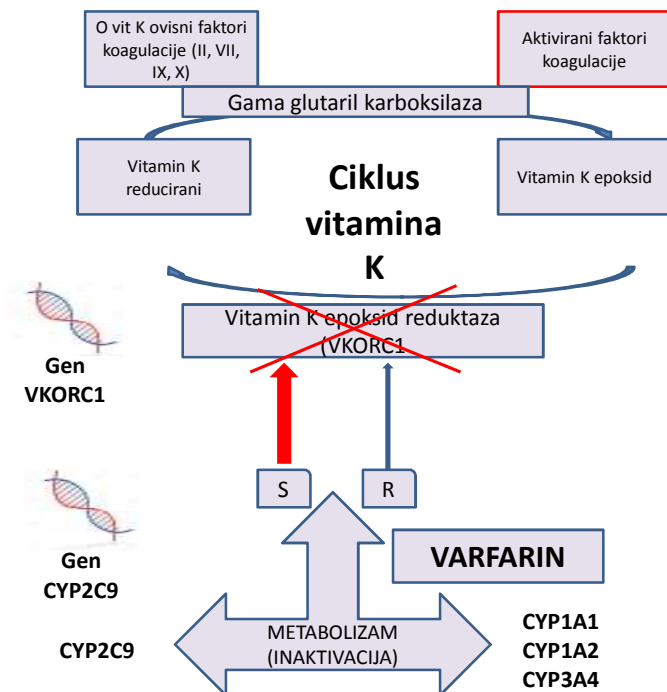
Sposobnost vezanja iona kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) je potrebno za aktivaciju 7 faktora zgrušavanja krvi ovisnih o vitaminu K u koaguluacijskoj kaskadi. Karboksilacija specifičnih ostataka glutaminske kiseline u tim proteinima upravo omogućava vezanje kalcija.

### 1.2.2. Ciklus vitamina K

Uz prisustvo kalcijevih iona, karboksilacija dovodi do konformacijskih promjena u koagulacijskim faktorima (ovisnima o vitaminu K- faktor II, VII, IX i X). Navednom gama karboksilacijom, faktori II, VII, IX i X postaju aktivni, a pritom reducirani oblik vitamina K (hidrokinon) ( $\text{KH}_2$ ) postaje inaktivni vitamin K epoksid. Vitamin K epoksid je oksidirani oblik vitamina K i zapravo je nusprodukt karboksilacije. Nadalje, enzim vitamin K epoksid reduktaza (VKORC1) obnavlja vitamin K<sup>10</sup>. Antikoagulacija nastaje kada varfarin inhibira enzim VKORC1 te ne dolazi do aktivacije faktora koagulacije.

Iz ovoga jasno proizlazi da učinak primijenjenih kumarinskih antikoagulansa može biti smanjen primjenom vitamina K (terapijska primjena ili uzimanjem veće količine vitamina K iz hrane). Važno je istaći da velika količina vitamina K iz hrane može u potpunosti blokirati učinak varfarina. Treba istaći kako bolesnici u kojih se primijene veće količine vitamina K mogu biti rezistentni na daljnju primjenu varfarina i kroz tjedan dana jer se vitamin K akumulira u jetri i postaje dostupan za kumarinski osjetljivu reduktazu.

Promjene u unosu vitamina K su posebno važne u bolesnika na dugotrajnoj (trajnoj) terapiji varfarina u kojih se bilježi i osjetljivost na fluktuacije unosa vitamina K<sup>11,12</sup> hranom, najvećim dijelom biljnog porijekla. Značajne fluktuacije u unosu vitamina K javljaju se u bolesnih i zdravih pojedinaca<sup>13</sup>.



SLIKA 1.2.1.2. Ciklus vitamina K i metabolizam varfarina

Najočitiji primjer kako povećan unos vitamina K može utjecati na smanjeni antikoagulacijski učinak varfarina je redukcijska dijeta koja se sastoji u povećanom unosu zelenog povrća<sup>11</sup>. Smanjeni unos vitamina K, obrnuto, u bolesnika koji uzimaju antibiotike može pojačati antikoagulacijski učinak varfarina, kao i u onih koji dobivaju samo parenteralnu nadoknadu tekućine bez nadoknade vitamina K u stanjima smanjene apsorpcije masti.

Vitamin K se terapijski primjenjuje u stanjima manjka i stanjima hipersaturacije s peroralnim antikoagulansima kumarinskog tipa. Istaknuto je već prije, kako se vitamin K primjenjuje u bolesnika s bolestima jetre u kojih su ozbiljno poremećeni parametri koagulacije kao znak oštećenja funkcije jetre. Unatoč tomu što vitamin K negativno utječe na parametre koagulacije već se dugo zna da je za njihove stabilne vrijednosti nužan i stabilni unos vitamina K<sup>14</sup>.

### 1.2.3. Tromboza i embolija

Tromboza i aktivacija koagulacije se normalno ne događaju unutar zdrave intaktne krvne žile<sup>3</sup>, no u stanjima oštećene krvne žile (bilo kojeg uzroka) može doći do njihova razvoja s ozbiljnim komplikacijama. Naime, tromboza i embolija dovode načelno do ishemije i nekroze zahvaćenog tkiva. Čimbenici rizika za pretjeranu koagulaciju su kirurški zahvati, maligne

bolesti, nepokretnost (imobilizacija), povećana tjelesna težina, primjena nekih lijekova (oralni kontraceptivi), a manji dio se odnosi na predisponirajuće faktore (trombofilija) u koje uključujemo najčešće antifosfolipidni sindrom, deficit faktora V Leiden i druge genetičke poremećaje.

Kako bi se spriječila patološka koagulacija i razvoj tromboze u različitim stanjima kada se indicira profilaktička primjena lijekova, primjenjuju se peroralni antikoagulacijski lijekovi. Još uvijek širom svijeta, najčešće je to varfarin iako se na tržištu nalaze novi s drugačijim mehanizmom djelovanja, koji su također odobreni i za indikacije u kojima se primjenjuje i varfarin. Noviji antikoagulacijski lijekovi dabigatran, rivaroksaban, apiksiban (i drugi koji su u kliničkim istraživanjima) su prema kliničkim ispitivanjima vrlo učinkoviti, stupaju u manji broj interakcija s lijekovima i hranom, imaju čak i manji broj nuspojava, no postoje i otkrivaju se i značajna ograničenja u njihovoj primjeni (nemogućnost primjene u bolesnika s oštećenom funkcijom bubrega, nedostatak antidota koji bi mogao prekinuti moguću pretjeranu antikoagulaciju, posebna stanja u kojima su čak kontraindicirani i dr.).

Osim u profilaktičkoj primjeni, i liječenje tromboze odnosno embolije provodi se nakon početne primjene heparina (danas gotovo isključivo heparina niske molekularne težine) primjenom antikoagulantne terapije gdje je opet varfarin lijek izbora u najvećeg broja bolesnika.

Tromboza i embolija su važni uzročnici morbiditeta i mortaliteta, a često se povezuju s razvijenom aterosklerozom i drugim kardiovaskularnim bolestima. Kliničke posljedice tromboze i/ili embolije mogu biti vrlo ozbiljne pa su prevencija i terapija posebno važni.

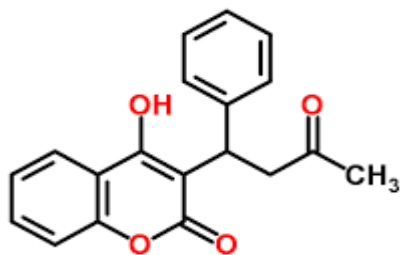
### **1.3. Varfarin**

Varfarin je učinkoviti peroralni antikoagulantni lijek koji se već više od 50 godina primjenjuje u terapiji i prevenciji arterijskih i venskih tromboembolijskih događaja i predstavlja najčešće korišten lijek u kliničkoj praksi u cijelom svijetu<sup>15</sup>. Lijek je uveden u kliničku praksu 1954. godine kada ga je registrirala Američka Uprava za hranu i lijekove (FDA od engl. Food and Drug Administration)<sup>16</sup>. Noviji podaci navode da je u Sjedinjenim Američkim Državama u 2004. godini propisano više od 30 milijuna recepata za varfarin<sup>17</sup>. Iako se radi o lijeku koji se široko primjenjuje i o njegovoj primjeni puno zna, zbog svojih posebnih karakteristika koje otežavaju uzimanje, lijek i dalje ostaje vrlo diferentan za primjenu. Naime, radi se o lijeku koji ima izrazito uzak terapijski indeks i široke intra- i interindividualne razlike u doziranju.



Njegov učinak zahtijeva pažljivo praćenje parametara koagulacije<sup>18, 19</sup>, a doza ovisi o nizu čimbenika uključujući dob, spol, prehranu, primjenu drugih lijekova i popratne bolesti<sup>20, 21</sup>. Najčešća komplikacija antikoagulantnog liječenja varfarinom je krvarenje<sup>22, 23</sup>. Iako je do sada učinjeno mnogo kako bi se primjena učinila sigurnijom još uvijek je rizik te komplikacije izrazito visok. Osobito se taj rizik odnosi na rizik od ozbiljnih krvarenja<sup>24</sup>, a danas se zna kako je rizik od krvarenja veći na samom početku primjene lijeka<sup>25,26</sup>.

Varfarin je racemična mješavina dva optički aktivna izomera, R i S - enantiomera, u gotovo jednakim proporcijama. Ipak, S - varfarin je 3-5 puta potentniji antagonist vitamina K nego R-enantiomer<sup>27, 28</sup>. U uvjetima stabilne ravnoteže, procjenjuje se da je S-enantiomer odgovoran za 60% - 70% antikoagulantnog učinka, a R enantiomer za 30% - 40%<sup>29</sup>.



SLIKA 1.3.1. Kemijska struktura varfarina

Važnost varfarina uočava se ne samo zbog kompleksnosti njegove primjene nego i po tome što je Američka Uprava za hranu i lijekove 16.8.2007. godine u uputu koja se prilaže varfarinu stavila informaciju o farmakogenetičkom testiranju kako bi ohrabrila (ali ne i zahtijevala) zdravstvene djelatnike da pri početnom određivanju doze lijeka uzmu u obzir i farmakogenetičke informacije<sup>30, 31</sup>. Varfarin je tako jedan od prvih lijekova koji je dobio uputu o genotipizaciji. Pritom FDA nije predložila i specifične metode kojima bi se koristila genetička informacija u predviđanju individualne doze u bolesnika.

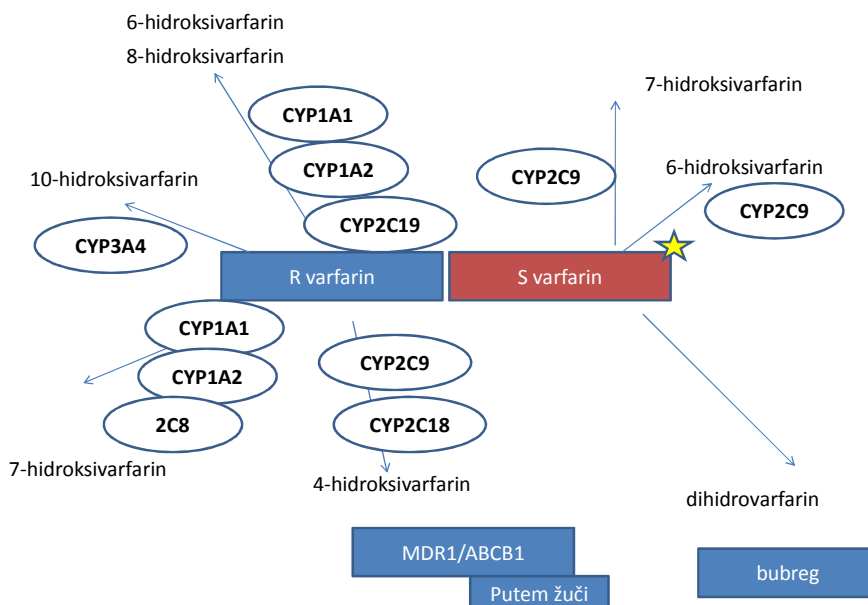
### 1.3.1. Farmakokinetika varfarina

Varfarin se, nakon peroralne primjene, brzo i vrlo dobro apsorbira iz gastrointestinalnog trakta s vrlo malim interindividualnim razlikama<sup>32</sup>. Čini se da apsorpcija nije smanjena kod sindroma kratkog crijeva što ukazuje da je proksimalni dio gastrointestinalnog trakta mjesto

apsorpcije<sup>33, 34</sup>, a općenito se može reći da hrana ne mijenja farmakokinetiku lijeka. Varfarin ima vrlo dobru bioraspoloživost od 80%-100% što pak ukazuje na zanemarivi prvi prolaz kroz jetru<sup>35</sup>, a lijek se dobro apsorbira iz želuca i gornjeg gastrointestinalnog trakta. Maksimalnu koncentraciju u krvi doseže u zdravih dobrovoljaca 90 minuta nakon oralne primjene<sup>36</sup>, a postoje i podaci da je maksimalna koncentracija u plazmi 2-6 sati nakon oralne primjene<sup>37</sup>. Volumen distribucije je 0,14 L/kg.

Lijek se 99 % veže za bjelančevine plazme (najvećim dijelom vezan je na albumine) i akumulira u jetri gdje se metabolizira. Slobodna frakcija je 0,5%-1%<sup>38</sup>. Značajno veću nevezanu frakciju nalazimo u bolesnika s malignim bolestima<sup>39</sup>. Također je smanjeno vezanje na bjelančevine u uremičkih bolesnika, no klinička značajnost toga nije utvrđena<sup>38</sup>.

Varfarin se ekstenzivno metabolizira u jetri putem citokroma P450, a pritom treba istaći kako se oba stereoizomera, R i S izomeri varfarina, metaboliziraju različitim putevima. No oba se metaboliziraju preko citokrom P450 enzima do inaktivnih metabolita koji se izlučuju stolicom i urinom<sup>32</sup>. Točnije, S - enantiomer se metabolizira preko CYP2C9 u 7 hidroksilat, a metabolit se dalje konjugira i izlučuje putem žuči, dijelom dekonjugira i reapsorbira. Metabolizam R-enantiomera ide preko CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 i CYP2C19<sup>32</sup>, a metabolizira se redukcijom postraničnog lanca do sekundarnih alkohola koji se izlučuju u urinu. Metaboliti su minimalno aktivni ili potpuno neaktivni<sup>40</sup>.



SLIKA 1.3.1.1. Farmakokinetika varfarina

Metaboliti varfarina se najvećim dijelom izlučuju putem bubrega (gotovo 92% oralno primijenjenog varfarina), a manjim dijelom putem žuči.

Poluvrijeme života iznosi 36-42 sata. Maksimalni farmakološki učinak postiže se za 48 sati, a trajanje djelovanja je od 2-5 dana. Antikoagulantni učinak se prati laboratorijskim parametrima koagulacije, protrombinskim vremenom (PV) i internacionalnim normaliziranim omjerom (INR) uz pažljivo praćenje kliničke slike bolesnika. Za najveći dio bolesti i stanja INR bi trebao biti između 2,0-3,0<sup>41</sup>.

### 1.3.2. Farmakodinamika varfarina

Antikoagulantni učinak varfarina je neizravni. Varfarin postiže antikoagulantni učinak tako da inhibira ciklus vitamina K u jetri. Vitamin K je esencijalan za posttranslacijsku modifikaciju djelomično nepotpunih faktora koagulacije II, VII, IX i X koji se sintetiziraju u jetri. Aktivni faktori koagulacije se formiraju karboksilacijom prekursora tijekom koje se vitamin K oksidira u vitamin K 2,3-epoksid. Nakon te reakcije vitamin K se mora reducirati kako bi se reaktivirao. Redukcija vitamina K obavlja se preko enzima vitamin K epoksid reduktaze (VKOR), a varfarin blokira ciklus inhibirajući navedenu redukciju nastalog oksidiranog oblika natrag u vitamin K<sup>42</sup> (vidi sliku 1.2.2.1).

To dovodi do nagomilavanja epoksida i gubitka (manjka) vitamina K što smanjuje sintezu aktiviranih faktora koagulacije. Na taj se način značajno djeluje na koagulaciju (sprječava je) i to je temelj djelovanja varfarina.

Antikoagulantni učinak varfarina pratio se donedavno kontrolom protrombinskog vremena (PV). Protrombinsko vrijeme predstavlja odgovor na redukciju 3 od 4 o vitaminu K ovisnih faktora koagulacije (faktora II, VII i X) čija je koncentracija u plazmi smanjena djelovanjem varfarina sukladno s njihovim poluvremenom. Tako u prvih nekoliko dana PV pokazuje smanjenje faktora VII čije je poluvrijeme oko otprilike 6h. Kako iza toga slijedi redukcija faktora X i II dolazi do prolongacije PV.

U današnje vrijeme, PV kao parametar praćenja antikoagulantnog učinka gotovo u potpunosti je zamijenjen praćenjem INR (od engl. International Normalized Ratio) koji je nakon prihvaćanja i preporuke Svjetske zdravstvene organizacije od 1982. godine u širokoj primjeni<sup>43, 44</sup>.

### 1.3.3. Mjesto varfarina u terapiji – indikacije za primjenu

Varfarin je još uvijek oralni antikoagulans izbora za najveći broj vanbolničkih pacijenata (i bolničkih) u terapiji i profilaksi venskih i arterijskih tromboembolijskih poremećaja<sup>32</sup>.

Klinička učinkovitost oralnih antikoagulansa je utemeljena u nizu kliničkih stanja prema rezultatima dobro planiranih kliničkih pokusa<sup>32</sup>. Oralni antikoagulansi su učinkoviti u primarnoj i sekundarnoj prevenciji venskog tromboembolizma i plućne embolije, prevenciji sistemskih embolija u bolesnika s umjetnim srčanim valvulama ili nevalvularnom atrijskom fibrilacijom, u prevenciji akutnog infarkta miokarda u bolesnika s perifernom arterijskom bolesti, u prevenciji moždanog udara, rekurentnog infarkta miokarda, smrtnog ishoda u bolesnika s akutnim infarktom i u prevenciji akutnog infarkta u bolesnika s visokim rizikom.

U literaturi se do sada nalazilo brojnih potvrda njegove široke primjene<sup>45, 46, 47, 48</sup>, a najnovije smjernice za njegovu primjenu obuhvaćaju primjenu u prevenciji embolizma u visoko rizičnih bolesnika s kardiovaskularnim bolestima koje uključuju kroničnu fibrilaciju atrijske, bolest mitralne valvule, stanje nakon implantacije umjetne srčane valvule, liječenje i prevencija duboke venske tromboze, liječenje i prevencija plućne embolije<sup>49</sup>. Naravno, najnovije smjernice spominju ravnopravni status u odnosu na učinak i novijih antikoagulantnih lijekova (dabigatran, rivaroksaban, apiksaban, edoksaban).

Za većinu indikacija prihvaćen je umjereni antikoagulacijski učinak koji se mjeri INR-om od 2,0-3,0<sup>44</sup> iako treba istaći kako se sve više u literaturi navodi kao neuspjeh terapije ili neadekvatna antikoaguliranost tek kod INR većeg od 4,0.

Oralni antikoagulansi su, nadalje, učinkoviti u prevenciji duboke venske tromboze nakon elektivne zamjene zgloba kuka<sup>50</sup> i velikih ginekoloških operacija<sup>51</sup>.

Vrlo dobri dokazi postoje i za prevenciju tromboembolijskih događaja u bolesnika s umjetnim srčanim valvulama iz pokusa koji je pokazao značajno manju učestalost tromboembolijskih komplikacija u tih bolesnika<sup>52</sup>, a novije studije su dokazale kako je dodatak još i acetilsalicilne kiseline (ASK) od 100 mg učinkovitiji od varfarina samog<sup>53</sup>. Povećani rizik krvarenja ostaje upitan kod istodobne primjene antikoagulantne i antitrombotične terapije. Naime već se 1999. godine pokazala kontraverznom primjena u akutnom infarktu miokarda gdje je intenzivna antikoagulacija učinkovita, ali povezana sa značajno većim brojem velikih krvarenja, dok umjerena antikoagulacija (niske doze varfarina zajedno s ASK) nije bila značajno bolja od ASK same<sup>54</sup>.

Možda je najbolje dokumentirana primjena varfarina u bolesnika s atrijskom fibrilacijom, jednim od najčešćih poremećaja srčanog ritma. Naime postoje mnogobrojni klinički pokusi o učinkovitoj primjeni oralnih antikoagulanasa u prevenciji moždanog udara u bolesnika s atrijskom fibrilacijom s istovremeno malim apsolutnim rizikom za intrakranijska krvarenja. Već su 1994. godine istraživači Skupine za atrijsku fibrilaciju (Atrial Fibrillation Investigators) objavili da primjena varfarina smanjuje relativni rizik za ishemički moždani udar za 67%, a kombinirani krajnji cilj (iz kliničkog ispitivanja) smrtnog ishoda, moždanog udara i sistemske embolije za 48%<sup>55</sup>. Godišnji rizik za moždani udar je smanjen s 4,5 % na 1,4%. Varfarin se i u toj studiji kao i već prije<sup>56, 57, 58</sup> pokazao učinkovitiji u prevenciji moždanog udara u bolesnika s nereumatskom valvularnom atrijskom fibrilacijom od ASK. Unatoč vrlo dobrim dokazima da njegova primjena smanjuje rizik za ishemički moždani udar u bolesnika s atrijskom fibrilacijom za 69%<sup>59</sup> smatra se da je varfarin općenito, propisan u svega polovice bolesnika koji imaju jasnu indikaciju za antikoagulaciju i unatoč što je rizik za ishemički moždani udar od 2-17 puta viši nego u bolesnika sa sinus ritmom<sup>60</sup>.

Uzrok nedovoljne i suboptimalne primjene je dijelom u propisivačima (liječnicima) i njihovoj neopravdanoj sumnji da se korist iz kliničkih pokusa ne može jednostavno prevesti u kliničku praksu<sup>61</sup> jer se pri probiranju bolesnika koji bi se uključili u klinički pokus, ne uključuju oni starije životne dobi i oni s relativnom kontraindikacijom za primjenu lijeka. Dio razloga je i u samom varfarinu koji ima spori nastup djelovanja, uski terapijski indeks, značajne farmakokinetičke i farmakodinamske varijabilnosti<sup>62</sup> i stupa u mnoge interakcije lijek-lijek i lijek-hrana i čije djelovanje zahtijeva pažljivu laboratorijsku kontrolu pa i osobitu pažnju liječnika-praktičara. Stoga se i sami liječnici ponekad ne odlučuju za njegovu primjenu iako je u potpunosti opravdana.

Neopravdani strah od primjene varfarina može se pretpostaviti i u drugim kliničkim indikacijama od strane liječnika i od strane bolesnika. Jedino edukacija može doprinijeti da se lijek propisuje u skladu s medicinom temeljenom na dokazima.

#### 1.3.4. Nuspojave varfarina

Nuspojave varfarina su brojne<sup>32</sup>.

Od kardiovaskularnih se opisuje sindrom kolesterolskih embolusa koji uključuje sustavnu ateroemboliju i kolesterolske mikroemboluse, a mogu se javiti u bolesnika s mnogobrojnim

znacima i simptomima. Tako su opisani sindrom purpurnih prstiju na nogama, retikularni livedo, osip, gangrena okrajina i organa, nagla i intenzivna bol u nogama, stopalima i prstima, bolni ulkusi na stopalima, mijalgija, abdominalna bol, bol u leđima, hematurija, bubrežno zatajivanje, hipertenzija, cerebralna ishemija, infarkt leđne moždine, pankreatitis, sindrom poliarteritisa ili bilo koje druge posljedice kompromitiranja vaskularnog protoka uzrokovanog embolijom. Bubrezi su najčešći visceralni organi u kojima se nalaze opisane komplikacije, a slijede gušterača, slezena i jetra. Sindrom purpurnih prstiju je karakteriziran išaranom kožom prstiju purpurnom bojom koji se najčešće javlja od 3. do 20. tjedna nakon uvođenja terapije varfarinom, ali može i kasnije. Iako je najčešće reverzibilna nuspojava, dugotrajno može zaostati promijenjena boja kože. Ponekad sindrom može progredirati do gangrene i nekroze te dovesti do amputacije. Pretpostavlja se da je mehanizam uzrokovan toksičnim učinkom varfarina na kapilare. Jasna povezanost kolesterolskih embolusa i antikoagulantne terapije nije dokazana iako je rizik za navedenu nuspojavu uključen u uputu o lijeku <sup>63</sup>.

Uz primjenu varfarina opisuje se razvoj hematoperikarda i tamponade srca u bolesnika tijekom liječenja plućne embolije<sup>64</sup> što predstavlja krvarenje u sklopu kardioavaskularnih nuspojava.

Hipotenzija se ne opisuje često, ali je moguća osobito u bolesnika s pretjeranom antikoagulacijom.

Krvarenje je najčešća i najopasnija nuspojava (komplikacija) terapije varfarinom <sup>65</sup>, <sup>66</sup>. Učestalost se opisuje u 2%-48% bolesnika, a odraz je pretjerana antikoagulantnog učinka. U svakog bolesnika u kojih se krvarenje javi, treba tražiti organski uzrok krvarenja, kao i procijeniti mogućnost interakcija kao uzroka krvarenja. Antikoagulantni učinak traje i do 48 sati nakon prestanka primjene lijeka što nalaže praćenje bolesnika kroz to vrijeme. Krvarenje uključuje epistaksu, hemoptizu, hematuriju, gingivalno krvarenje, razvoj potkožnih krvarenja (modrica), vaginalno krvarenje, subkonjunktivalno krvarenje. Ozbiljnim (velikim) krvarenjima se smatraju intracerebralno i retroperitonejsko krvarenje, ono koje izravno dovodi do smrtnog ishoda ili rezultira produljenom hospitalizacijom i potrebom za transfuzijom <sup>65</sup>. Rizični faktori za krvarenje uključuju intenzitet antikoagulantnog učinka, bolesnikove značajke, istovremenu primjenu lijekova koji potencijalno mogu stupiti u interakcije i duljinu terapije <sup>66</sup>.

Alopecija je poznata i relativno česta nuspojava koja se javlja u rasponu od 5% pa sve do 78% bolesnika <sup>67</sup>. Javlja se tijekom akutne i dugotrajne primjene, s prosječnim gubitkom kose koja ponovo naraste nakon prestanka primjene lijeka. Od kožnih nuspojava moguće su urtikarija, makulopapulozni osip, a vrlo je dobro opisana i objašnjena opasna nekroza kože koja nije

česta, ali može rezultirati s obimnim mutilirajućim zahvatima (amputacijama donjih ekstremiteta, dojki u žena i dubokim defektima kože)<sup>68</sup>. Najčešće se javlja u prvih 10 dana od početka terapije, ali se opisuje i tijekom kronične primjene. Glavni predisponirajući faktor je manjak proteina C (ali i proteina S i antitrombina III, kao i prisustvo faktora V Leiden i lupus antikoagulant) pa se u tih bolesnika preporučuje poseban oprez pri uvođenju terapije, a kako bi se smanjio rizik, na početku primjene se preporučuje istodobna primjena heparina (standardnog ili heparina niske molekularne težine) i varfarina tijekom 3-5 dana. Nekroza kože se može javiti i u bolesnika koji nemaju navedene predisponirajuće faktore.

Od gastrointestinalnih nuspojava najznačajnije je i opet krvarenje. Gastrointestinalni trakt je prema jednoj studiji u kojoj se procjenjivala terapija u odnosu na rizik po život ugrožavajućih krvarenja tijekom varfarinske terapije, mjesto krvarenja u 2/3 bolesnika. Od velikih krvarenja opisuju su melena, hemoptoa, ali i veliki intra - i retroperitonealni hematomi.

Od neuroloških nuspojava najopasnije je intracerebralno krvarenje koje može dovesti do teških posljedica i smrtnih ishoda. Kako se radi o jednoj od najozbiljnijih nuspojava varfarina uopće, u svih bolesnika na toj terapiji treba u slučaju pojave neuroloških simptoma posumnjati na moguće krvarenje u središnji živčani sustav. Odustvo simptoma drugih krvarenja (vanjskih) ne isključuje dijagnozu intracerebralnog krvarenja. Najopasnije razdoblje (kod kronične terapije) je unutar godinu dana od početka terapije te se u tom razdoblju preporučuje pažljivija kontrola parametara koagulacije.

Ono što je posebno važno jest da je rizik za hemoragične događaje povišen u prvim tjednima terapije i prelazi 7%-10%, uključujući i 2%-5% velikih krvarenja<sup>66</sup>. Taj je rizik 10 puta veći na početku terapije u usporedbi s rizikom nakon 12 mjeseca terapije<sup>64</sup>. Upravo stoga nastoji se unaprijed, prije započinjanja terapije, procijeniti najadekvatnija doza kojom bi se smanjio taj rizik.

Rjeđe nuspojave su hematološke nuspojave koje uključuju anemiju i eozinofiliju te osteoporotične frakture koje se najčešće opisuju u starijih muških bolesnika.

### 1.3.5. Interakcije varfarina s drugim lijekovima

Brojne su interakcije varfarina i drugih lijekova<sup>32</sup>. Ozbiljne su one koje dovode do povećanog rizika za pojavu krvarenja ili dovode do smanjenja učinka i mogućnosti retromboze te zahtijevaju promjenu dozu. U velikoj bazi podataka (Micromedex) opisano je 228 interakcija

lijekova (uključujući i biljne pripravke) s varfarinom <sup>32</sup>. Interakcije se obično dijele u blage, umjerene i ozbiljne, ali mehanizam nastanka nije uvijek jasno protumačen.

Općenito, može se istaknuti kako najčešće nema apsolutne kontraindikacije za istodobnu primjenu drugih lijekova i varfarina, ali kod ozbiljnih interakcija istodobna primjena zahtijeva pažljivije kliničko praćenje bolesnika i češće laboratorijsko praćenje (PV/INR) učinka te prema potrebi modificiranje doze.

U svakodnevnoj praksi vrlo često se uz varfarin istovremeno propisuju kardiovaskularni lijekovi, hipolipemici, nesteroidni antireumatici, antibiotici jer se, također vrlo često radi o starijim bolesnicima koji imaju brojne popratne bolesti pa i brojne lijekove u kroničnoj terapiji.

Značajne interakcije bilježe se s induktorima mikrosomalnih enzima (npr. antikonvulzivi-karbamazepin) jetre uz čiju primjenu se varfarin obično mora primjenjivati u značajno višim dozama (12 mg-15 mg pa i više, na dan). S obzirom na ubrzani metabolizam varfarina (učinak karbamazepina), uz uobičajene doze ne uočava se adekvatni terapijski učinak. Kad se karbamazepin dodaje varfarinu potrebno je pažljivo praćenje parametara koagulacije i obično se doza varfarina povisuje, a kod prestanka primjene karbamazepina se ona obično reducira<sup>69</sup>. Stabilizacija doze varfarina i antikoagulantnog učinka se postiže 4-6 tjedana nakon dodavanja ili prestanka primjene karbamazepina.

Vrlo snažni induktor mikrosomalnih jetrenih enzima je rifampicin koji kod istovremene primjene pojačava klirens varfarina i antikoagulacijski učinak je izrazito snižen. Doza varfarina se u pravilu mora dvostruko povisiti, a zabilježena su značajna krvarenja nakon prestanka primjene rifampicina <sup>70</sup>.

Jednako tako vrlo značajna je interakcija s antiaritmikom amiodaronom. Mehanizam djelovanja je smanjeni metabolizam varfarina kojim kod istodobne primjene dolazi do produljenja PV i povećanog rizika za krvarenje. Važno je istaći da istodobna primjena međutim nije kontraindicirana, a amiodaron smanjuje metabolizam varfarina unutar tjedan dana od početka istodobne primjene i utjecaj na metabolizam može trajati i do 3 mjeseca nakon što je amiodaron prekinut (zbog izuzetno dugog  $t_{1/2}$  amiodarona). Kombinacija lijekova ima veći rizik za postizanjem INR većeg od 5 nego pojedinačna terapija. To se obično razvija unutar 12 tjedana od početka primjene, a nove smjernice kod primjene varfarina uz već primijenjeni amiodaron, preporučuju empirijski niže doze varfarina za 35%-65% uz pažljivo praćenje INR u tom razdoblju <sup>71</sup>.

Acetilsalicilina kiselina i drugi salicilati s varfarinom stupaju u ozbiljnu interakciju kod koje je povećan rizik od krvarenja. U višim dozama od 6 g/dan ASK ima izravni



hipoprotrombinemički učinak, dok se kod primjene niskih doza očituje antiagregacijski učinak na trombocite. Primjena nije apsolutno kontraindicirana, ali bi se trebala izbjegavati kad god je to moguće <sup>71</sup>. Slično je i sa svim nesteroidnim antireumaticima iako su različiti podaci za diklofenak, ketoprofen, naproksen, indometacin. Mehanizam je uglavnom jednak i radi se o inhibiciji adhezije i agregacije trombocita. Kombinacija varfarina i nesteroidnih antireumatika koji moguće dovode do razvoja gastričnih erozija, značajno povisuje rizik od krvarenja <sup>72</sup>.

Od drugih antitrombotičkih lijekova, tiklopidin samo povisuje koncentraciju R - varfarina i time stupa u klinički beznačajnu interakciju, no istovremena primjena klopidogrela povećava značajno rizik od krvarenja jer se pojavljuje dodatni antikoagulacijski učinak te se zahtijeva pažljivo kliničko i laboratorijsko praćenje bolesnika <sup>32</sup>.

Istovremena primjena paracetamola pojačava hipoprotrombinemički učinak inhibicijom metabolizma varfarina. Pokazalo se da doza od 4 g/dan (koja je maksimalna doza paracetamola) utječe na povišenje INR. Ipak, paracetamol ostaje analgetik i antipiretik izbora u bolesnika s varfarinom u terapiji sve dok se izbjegavaju više doze od maksimalnih i primjena kroz dulje vrijeme. Pažljivo praćenje parametara koagulacije i kliničkih znakova krvarenja se u tim slučajevima preporučuje.

Od antibiotika važna je i klinički značajna interakcija s metronidazolom <sup>73</sup>. Mehanizam nastanka interakcije je inhibicija metabolizma varfarina i smanjenje njegova klirensa, a za napomenuti je kako lokalno primijenjeni metronidazol (npr. vaginalete ili kreme) ne utječe na parametre koagulacije što je logično jer se kod lokalne primjene pretpostavlja da nema značajnije sustavne apsorpcije.

Od kinolona u literaturi se spominje umjerena interakcija sa ciprofloksacinom i norfloksacinom nepoznatog mehanizma nastanka te ozbiljna s moksifloksacinom koja zahtijeva prekid primjene moksifloksacina ukoliko INR bude značajno povišen <sup>74</sup>.

Kloksacilin značajno smanjuje antikoagulacijski učinak te je kod istovremene primjene potrebno prekontrolirati INR između 4. - 7. dana nakon uvođenja lijeka kao i 3 tjedna nakon prestanka primjene <sup>75</sup>.

Značajna je interakcija kombinacije sulfametoksazola i trimetoprima <sup>76</sup> s varfarinom zbog pojačanog hipoprotrombinemičkog učinka. Mehanizam nastanka je inhibicija metabolizma varfarina, ali i zamjena varfarina s veznih mjesta na albuminu.

U novijim studijama opisuje se i povišenje INR od 31% u bolesnika na stabilnoj dozi varfarina u kojih je zbog akutne bolesti primijenjen azitromicin <sup>77</sup>.

Fenofibrat stupa u ozbiljnu interakciju s pojačanim antikoagulacijskim učinkom i rizikom za krvarenje nepoznatim mehanizmom, a zahtijeva i do 30% smanjenje doze varfarina.

Statini općenito povišuju INR i rizik od krvarenja, a kod istovremene primjene simvastatina opisuje se i povišen rizik od rabdomiolize te se bolesnicima preporučuje osim praćenja parametara koagulacije i praćenje kreatinfosfokinaze (CK) <sup>78</sup> kako bi se na vrijeme uočila ova značajna interakcija, odnosno nuspojava. Ističemo kako se varfarin i statini vrlo često mogu naći propisani i istog bolesnika jer se obično radi o bolesnicima s istodobno prisutnim kardiovaskularnim bolestima, poremećajem srčanog ritma i hiperlipoproteinemijom.

Varfarin stupa u interakcije i s biljnim pripravcima koji se također široko primjenjuju iako velika većina njih nema dokazano djelovanje. Najpoznatije su interakcije: s pripravcima *Gingka bilobae* koja može dovesti do ozbiljnih krvarenja (opisana intrakranijska krvarenja), s pripravcima *Gospine trave* koji umanjuju antikoagulacijski učinak, kao i preparati soje koji u sebi sadrže velike količine vitamina K.

#### 1.3.6. Dodatni utjecaji na dozu i učinak varfarina

Doza varfarina, stabilnost antikoagulacije i povećani rizik od krvarenja su podložni različitim utjecajima <sup>46</sup>.

Osobne kliničke karakteristike bolesnika značajno utječu na dozu i učinak varfarina. Osnovno, antikoagulacijski učinak varfarina ovisi o dobi bolesnika. Što je bolesnik starije životne dobi zahtijeva manje doze varfarina, odnosno postiže se jači antikoagulacijski učinak lijeka u starijih bolesnika. To je do sada uspjelo dokazati u nekoliko studija <sup>79, 80</sup>, a Khamali je 2004. godine <sup>81</sup> ustvrdio kako je u dobi od 55 godina potrebno za isti učinak 4,9 mg varfarina na dan, a u dobi od 85 godina 3,1 mg/dan lijeka. Istovremeno je pokazao kako je klirens varfarina uz dob, ovisan i o genetskom profilu CYP2C9. Tako su gore navedene doze zabilježene uz genotip CYP2C9\*2, a u bolesnika s genotipom CYP2C9\*3 su one niže i u dobi od 55 godina su prosječne doze od 3,8 mg, a u dobi od 85 godina 2 mg.

Već sljedeće godine objavljeni su rezultati prospektivne kohortne studije koja je utvrdila inverznu povezanost doze varfarina i dobi u snažnu povezanost doze sa spolom <sup>82</sup>. Utvrđen je raspon u medijanu tjedne doze od 22 mg za žene starije od 80 godina do 45 mg za muškarce u dobi do 50 godina. Tjedna doza se smanjivala za 0,4 mg po godini i u prosjeku je u žena trebalo 4,5 mg varfarina tjedno manje nego u muškaraca. Prema tim rezultatima u bolesnika starijih od 70 godina života, preporučena doza od 5 mg/dan bila je previsoka u 82% žena i u

65% muškaraca. Na temelju toga se zaključilo da bi u velike većine gerijatrijskih bolesnika trebalo započeti i održavati terapiju s prosječno nižim dozama varfarina.

Tjelesna težina moguće također utječe na dozu varfarina. Ranija istraživanja su pokazala da je indeks tjelesne težine (BMI, od engl. Body Mass Index) povezan s prosječnom dnevnom dozom varfarina<sup>83</sup>, dok je unos vitamina K samo marginalno pozitivno povezan s dozom održavanja<sup>84</sup>. Debljina je jedan od faktora koji moguće utječe na dozu, koji se do sada nije previše ispitivao ni kod primjene drugih lijekova, a koji može utjecati na incijalni učinak lijekova pa tako i varfarina. Retrospektivno ispitivanje Wallace i suradnika iz 2013. godine utvrdilo je da se u 71% bolesnika normalne tjelesne težine postiže do otpusta iz bolnice uredna terapijska vrijednost INR u odnosu na 42% adipoznih i 38% onih koji se tzv. morbidne debljine. Adipoznim bolesnicima je potrebno duže vrijeme do postizanja terapijskih vrijednosti INR i trebaju više prosječne dnevne doze za isti antikoagulacijski učinak<sup>85</sup>.

Poznato je da dozu varfarina treba prilagoditi i kliničkom stanju organizma, odnosno istodobnim popratnim bolestima. Vrlo često u bolesnika koji su na terapiji varfarinom bilježimo istodobno još nekoliko popratnih bolesti jer se najčešće i radi o bolesnicima starije životne dobi s već naznačenim brojnim oštećenjima organa<sup>86</sup>.

Prema studiji kohorti iz 2001. godine samo oštećenje jetre i kongestivno zatajenje srca imaju značajni utjecaj na primjenu varfarina i dovode do povećanog rizika za pretjeranu antikoagulaciju uz povišenje INR preko 6,0<sup>87</sup>. Ipak ne postoje preporuke za smanjenjem doze u bolesnika s ozbiljnim zatajenjem jetre nego se preporučuje pažljivije praćenje INR s obzirom na mogući jači antikoagulacijski učinak. Od akutnih bolesti, u gore navedenoj studiji, povećani rizik za pojačani antikoagulacijski učinak utvrđen je još kod dugotrajnih proljeva (zbog smanjene apsorpcije vitamina K) i povišenja tjelesne temperature<sup>88</sup>.

Vitamin K je dobro poznati čimbenik koji utječe na antikoagulacijski učinak varfarina. Povećani unos vitamina K odnosno hrane bogate vitaminom K značajno smanjuje njegov antikoagulacijski učinak<sup>12</sup>. No neke studije nisu utvrdile klinički značajni utjecaj unosa hrane bogate vitaminom K na protrombinsko vrijeme kao niti da je koncentracija vitamina K u plazmi povezana s dozom održavanja varfarina<sup>21</sup>.

Iza toga novija su istraživanja pokazala kako promjene u prehrani i unosu vitamina K mogu utjecati na antikoagulantni učinak varfarina. Čak i vrlo kratko razdoblje smanjenog unosa vitamina K dovelo je do povećane senzitivnosti varfarina, a povećani unos hrane koja sadrži vitamin K može smanjiti antikoagulantni učinak koji može trajati i nekoliko dana iza toga<sup>88</sup>. Sconce i suradnici su dokazali kako je bolesnika u kojih se bilježila slaba kontrola antikoagulantnog učinka trajno i značajno bio manji unos vitamina K<sup>89</sup>. To je kasnije dovelo

do istraživanja koje je pokazalo da bi trajna nadoknada vitamina K mogla poboljšati kontrolu antikoagulacijskog učinka<sup>90</sup>. Zaključno, preporučuje se umjereni i stabilni unos vitamina K za postizanje stabilne doze i antikoagulacijskog učinka.

Iz svega navedenoga može se zaključiti da se kod određivanja doze već i samo na temelju kliničkih osobina bolesnika mora doza varfarina vrlo individualno titrirati.

Interakcije s lijekovima su prije navedene.

### 1.3.7. Farmakogenetika varfarina

Farmakogenetika je znanstvena disciplina koja proučava vezu između genetičke predispozicije pojedinca i njegove sposobnosti da metabolizira farmakološki aktivne tvari. Osnovni zadatak joj je utvrditi utjecaj gena na individualne varijacije u odgovoru na (uglavnom) neki lijek, ali i druge egzogene tvari. Genotipizacija pak predstavlja dijagnostički postupak ispitivanja i identifikacije genskog polimorfizma, odnosno ispitivanje DNA zapisa gena koji kodira proteine/enzime uključene u metabolizam lijeka. Pritom genski polimorfizam definiramo učestalošću neke mutirane varijante gena u populaciji većom od 1%. Ipak treba napomenuti da utvrđeni genski polimorfizam nema uvijek kliničku značajnost. Genske promjene rezultiraju određenim fenotipom. Fenotip pak utječe na farmakokinetičke parametre koji uključuju apsorpciju, metabolizam i sekreciju lijekova, a kod farmakodinamike fenotip određuje prvenstveno receptorsko mjesto pa time u učinkovitost lijeka.

Genski polimorfizam određuje nekoliko fenotipova u odnosu na intenzitet metabolizma lijeka:

a) fenotip jasno izraženog (brzog) metabolizma (EM, od engl. *extensive metabolizer*). Takav fenotip je najčešći u populaciji s oba potpuno funkcionalna alela (divlji genotip, od engl. *wilde type wt/wt*)

b) fenotip slabog (sporog) metabolizma (PM, od engl. *poor metabolizer*) autosomno je recesivno svojstvo nastalo mutacijom i/ili delecijom oba alela s fenotipskom ekspresijom u vidu akumulacije lijeka (ova) supstrata zbog smanjene ili dokinute aktivnosti enzima (genotip mut/mut)

c) fenotip izrazito pojačanog metabolizma (UEM, od engl. *ultraextensive metabolizer*) autosomno je dominantno svojstvo posljedično amplifikaciji gena s osobinom ubrzane razgradnje lijeka-supstrata

d) fenotip srednjeg metabolizma (IM, od engl. *intermediate metabolizer*) nalazi se u heterozigota s jednim mutiranim i drugim funkcionalnim alelom, prenosi se autosomno recesivno, a metabolizam lijeka može biti normalan ili smanjen ( genotip wt/mut).

Rezultati farmakogenetičke analize s genotipizacijom polimorfnih alela i egzaktnim određivanjem fenotipa omogućuju prije primjene lijeka odabir najbolje moguće doze lijeka čime se mogu prevenirati nuspojave uzrokovane preniskom ili previsokom dozom lijeka <sup>91</sup>, odnosno unaprijed se nuspojave mogu i predvidjeti pa tako i izbjeći.

Za metabolizam različitih egzogenih i endogenih tvari u ljudskom organizmu jedan od najvažnijih enzimskih sustava je onaj citokroma P450 (CYP) u jetri. Navedeni sustav CYP predstavlja najvažniji oksidativni sustav uključen u biotransformaciju lijekova (faza I). Opisano je preko 50 enzima sustava CYP, no u metabolizam lijekova je uključeno samo nekoliko (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5). Oni metaboliziraju 90% svih lijekova <sup>92</sup>. Najvećim dijelom su enzimi smješteni u membranama endoplazmatskog retikuluma u jetri, ali ih nalazimo i u drugim tkivima (crijevu, bubrezima, posteljici, plućima i mozgu). U odnosu na lijekove imaju važnu ulogu u regulaciji njihova učinka i trajanja aktivnosti lijeka kao i u detoksikaciji.

Enzimi CYP su iznimno polimorfni i uz individualnu pokazuju i varijabilnu interetničku zastupljenost pojedinih alelnih varijanti<sup>93</sup>. *CYP2D6*, *2C19* i *2C9* polimorfizam se smatra odgovornim za najčešće varijacije u metabolizmu faze I lijekova jer se 80% današnjih lijekova metabolizira tim enzimima<sup>94</sup>. *CYP2C9* je klinički značajan enzim koji pokazuje multiple genetičke varijante s potencijalnim utjecajem na učinak i razvoj nuspojava lijekova koji se najvećim dijelom metaboliziraju tim enzimom. Studije su ukazale da su pritom najvažniji aleli *CYP2C9\*2* i *\*3* <sup>94</sup>.

Upravo preko enzima *CYP2C9* se metabolizira i varfarin.

No za učinak varfarina nisu samo odgovorni geni koji kodiraju enzime uključene u njegov metabolizam. Učinak varfarina temelji se i na učinku na inhibiciju ciklusa vitamina K u jetri koji je važan za sintezu, odnosno aktivaciju faktora koagulacije II, VII, IX i X. Aktivni faktori koagulacije se formiraju karboksilacijom prekursora tijekom koje se vitamin K oksidira u vitamin K 2,3-epoksid. Nakon te reakcije vitamin K se mora reducirati kako bi se reaktivirao. Redukcija vitamina K obavlja se preko enzima vitamin K epoksid reduktaze (VKOR), a varfarin blokira ciklus inhibirajući navedenu redukciju nastalog oksidiranog oblika natrag u vitamin K<sup>42</sup>. Nagomilavanje epoksida, smanjuje sintezu aktiviranih faktora koagulacije što je temelj djelovanja varfarina jer se sprječava koagulacija krvi. I gen za enzim vitamin K epoksid reduktazu (*VCOR1*) može biti polimorfan pa se time može mijenjati učinak varfarina. Istovremeno u posljednje vrijeme sve se više pojavljuju dokazi kako je transport varfarina preko stanične membrane, npr. u jetri, moguće posredovan P-glikoproteinom (*MDR1* od engl.

multidrug resistance protein 1) koji je kodiran genom *ABCB1* (od engl. ATP binding cassette transporter B1). Međutim dokazi su nedostadni i manje vjerojatni s obzirom na vrlo dobru bioraspoloživost varfarina. No kako je polimorfizam gena *ABCB1* do sada povezan s promjenama u mRNA, ekspresijom proteina i farmakokinetikom brojnih lijekova, moguće je da ima utjecaja i na farmakokinetiku varfarina <sup>94</sup>.

#### 1.3.7.1. Polimorfizam gena *CYP2C9*

*CYP2C9* je glavni izoenzim *CYP2C* koja inače ima 4 funkcionalna gena. Procjenjuje se da je *CYP2C9* odgovoran za metabolički klirens i do 15% svih lijekova koji prolaze fazu I metabolizma <sup>95</sup>. Supstrati navedenog enzima su različiti protuupalni lijekovi (nesteroidni antireumatici - diklofenak, naproksen, piroksikam, celekoksib, ibuprofen i dr.), oralni hipoglikemici (tolbutamid, glipizid i dr.), diuretici (torasemid), blokatori angiotenzinskih receptora (losartan, kandesartan i dr.), antiepileptici (fenitoin), statini (fluvastatin), ciklofosfamid, tamoksifen i oralni antikoagulansi (varfarin). *CYP2C9* pokazuje značajan genetički polimorfizam i do 40% bijele populacije su nositelji alela koji kodiraju potpuno ili djelomično nefunkcionalne oblike enzima <sup>95</sup>.

Gen *CYP2C9* je smješten na kromosomu 10q24.

Prve indicije o polimorfizmu gena *CYP2C9* dolaze iz ranih 80-ih kada je i došlo do potvrde postojanja *CYP2C9*\*2 i \*3 sa značajnom učestalosti unutar bijele populacije <sup>96</sup>. Kasnija istraživanja su potvrdila da, kako je već navedeno i do 40% bijelaca nosi jedan ili više različitih varijanti *CYP2C9* <sup>94</sup>.

Otkriveno je više od 30 alelnih varijanti za *CYP2C9*. Tri alela *CYP2C9* \*1, \*2 i \*3 su najčešći u brojnim etničkim skupinama. Najčešći je \*1 koji se smatra „divljim tipom“, a predstavlja aminokiseline Arg144/Ile359. Zamjenom citozina u tiamin (C>T) na nukleotidu 430 na eksonu 3 nastaje Cys144/Ile359 (*CYP2C9*\*2), a zamjenom adenina u citozin (A>C) na nukleotidu 1075 na eksonu 7 nastaje Arg144/Leu359 (*CYP2C9*\*3) alelna varijanta. Slične su promjena na eksonu 7 i za polimorfizam \*4 (1076 T > C) i polimorfizam \*5 (1080 C > G). Aleli \*1, \*2 i \*3 stvaraju šest različitih genotipova: \*1/\*1 (wt/wt), \*1/\*2, \*1/\*3, \*2/\*2, \*2/\*3, \*3/\*3. Najučestaliji je alel divljeg tipa *CYP2C9* (wt), a homozigotni nositelji ovog alela imaju normalni metabolički fenotip i pripadaju brzim metabolizatorima <sup>96</sup>. Aleli \*2 i \*3 povezani su sa značajnim smanjenjem metabolizma različitih supstrata *CYP2C9* u odnosu na divlji tip alela i smatraju se važnim rizičnim čimbenicima za moguće nuspojave, poput krvarenja u slučaju varfarina.

Homozigotni nositelji dva mutirana alela pripadaju sporom metaboličkom fenotipu, dok za nositelje jednog normalnog i jednog insuficijentnog alela kažemo da pripadaju intermedijarnom metaboličkom fenotipu.

Učestalost polimorfizma se vrlo značajno razlikuje u etničkim skupinama.

U bijelaca otprilike 2/3 populacije su nositelji wt (1\*1\*) genotipa i imaju visoku ekspresiju i dobru funkciju enzima, a jedna trećina su nositelji genotipa 1\*/2\* i 1\*/3\* s intermedijarnom funkcijom enzima. Do 3% populacije su nositelji genotipa \*2/\*2, \*2/\*3 ili \*3/\*3 i imaju slabu aktivnost enzima CYP2C9.

Polimorfizmi CYP2C9\*2 i \*3 koji su češći u bijelaca, rjeđe su zastupljeni u Afroamerikanaca (svega u 1-2%)<sup>96</sup>. U istoj populaciji Afroamerikanaca otkriven je i polimorfizam specifičan za tu populaciju, a ustanovljen je u ispitanika koji je razvio nuspojavu na fenitoin. Polimorfizam CYP2C9\*3 je vrlo rijedak u Koreji i Istočnoj Aziji (1-2%), dok alel CYP2C9\*2 uopće nije pronađen u toj populaciji<sup>97</sup>. Rezultati istraživanja u Hrvatskoj su bili u skladu s navedenom distribucijom u bijeloj rasi<sup>98</sup>. Brojne su studije koje su ukazivale na jednaku, ali i različitu učestalost u podskupinama bijelačke populacije.

Aleli \*2,\*3 su udruženi sa smanjenom enzimskom aktivnošću a time i usporenim (ili smanjenim) klirensom varfarina. Svaki od tih polimorfizama može se pojaviti u homozigotnom ili heterozigotnom obliku a prisustvo oba polimorfizma rezultira složenom (engl. *compound heterozygote*) heterozigotnom formom CP2C9\*2/\*3. Različiti polimorfizmi CYP2C9 imaju različiti učinak na klirens varfarina što konačno rezultira varijabilnim kliničkim učincima. Istraživanja navode da u usporedbi s brzim metabolizatorima koji su homozigoti za \*1 (wt) alel, homozigoti za alel \*2 imaju smanjenu aktivnost enzima na 12%, dok u homozigota za alel \*3, aktivnost enzima iznosi svega 5% aktivnosti brzih metabolizatora<sup>99</sup>. Odnosno, metabolizam varfarina je u nositelja alela \*2 smanjen za 30-50%, a u nositelja alela \*3 za 90%<sup>100</sup>. Sustavnim pregledom i meta analiza 9 pokusa utvrdila je da su potrebne dnevne doze varfarina bile niže za 17% u nositelja alela CYP2C9\*2 odnosno za 37% u nositelja alela CYP2C9\*3<sup>45</sup>.

Jasno je iz svega navedenoga kako polimorfizam CYP2C9 ima i kliničku značajnost. Mutirani geni dovode do smanjene aktivnosti enzima, usporenog metabolizma i posljedično do nižih potrebnih dnevnih doza održavanja varfarina što se pokazalo u nizu kliničkih pokusa<sup>12, 81, 100</sup>. Bolesnici s varijantnim alelima CYP2C9 (osobito \*3 i kombinacije \*2\*3) mogu imati povišen INR, potrebno im je dulje vrijeme do postizanja stabilne doze varfarina i imaju veći rizik za ozbiljna i ugrožavajuća krvarenja posebice tijekom uvođenja terapije, odnosno u razdoblju titracije doze.

Kako je navedeno metabolizam varfarina odvija se različitim metaboličkim putevima za S i R - enantiomere. S-enantiomer se metabolizira uglavnom preko CYP2C9, a R-enantiomer preko CYP3A4, 1A2 i 1A1. U posljednje vrijeme navode se neki manje važni metabolički putevi za S-varfarin (2C8, 2C18, 2C19), a za R varfarin osim navedenih, spominju se 2C8, 2C18, 2C19 i 3A5. Do sada nema objavljenih studija koje bi upućivale da polimorfizam navedenih enzima ima utjecaj na doziranje varfarina<sup>45</sup>.

#### 1.3.7.2. Polimorfizam gena *VKORC1*

Geni uključeni u ciklus vitamina K, također imaju veliku ulogu u odgovoru na primjenu varfarina. Varfarin, kao i drugi antagonisti vitamina K, postiže svoj antikoagulantni učinak prevenirajući regeneraciju vitamina K mehanizmom inhibicije enzima vitamin K epoksid reduktaze (VKOR). Taj multiproteinski kompleks reciklira vitamin K 2,3-epoksid u vitamin K hidrokinon, koji je važan kofaktor za posttranslacijsku gama karboksilaciju faktora koagulacije (faktor II -protrombin, VII, IX i X). Iako je enzim identificiran još 1974. godine bilo je potrebno 30 godina da se utvrdi gen koji je odgovoran za sintezu navedenog enzima.

Rezultati identifikacije gena objavljeni su istodobno od dva autora 2004. godine<sup>101, 102</sup>, a vrlo brzo se ustvrdilo kako polimorfizam gena *VKORC1* bitno određuje učinak varfarina jer se prema tomu razlikuje i enzimsko aktivnost.

Otkrivene su i protumačene rijetke mutacije koje dovode do rezistencije na varfarin<sup>100</sup>. I daljnja su brojna istraživanja pokazala da je jednonukleotidni polimorfizam (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphisms*) *VKORC1* vrlo jasno povezan s dozom održavanja varfarina i to u različitim populacijama<sup>45, 102, 103, 104, 105</sup>.

2004. godine identificirani su SNPs u *VKORC1*<sup>102</sup>. Autori su identificirali 10 nekodirajućih SNP i definirali niz od 4SNP. Za SNP na poziciji 6853G/C je ustanovljeno da je odgovoran za 21-25% varijabilnosti dnevne doze varfarina. Najčešći polimorfizmi su 1173C>T ili 6484/rs9934438/ na intronu 1 te na promotorskoj regiji 1639G>A ili 3673/rs99232321/ koji utječu na interindividualnu razliku u dozi varfarin. Polimorfizam korelira s ekspresijom gena i posljedično varijabilnom aktivnosti vitamina K epoksid reduktaze, pa tako nositelji genotipa GG trebaju više doze varfarina zbog veće „endogene“ aktivnosti VKOR. Studije su ukazale da je alel -1639G koji je prisutan u haplotipovima *VKORC1* \*1, \*3 i \*4 udružen s uobičajenom „normalnom“ dozom varfarina, dok polimorfizam -1639G>A dovodi do smanjenja jetrene ekspresije *VKORC1* i do smanjenja potrebne doze lijeka. Istovremeno,



alelna varijanta -1639A koja je u veznoj neravnoteži (engl. *linkage disequilibrium*) s alelima 1173C>T, 6484C>T, 6853G>C, 7566C>T, prisutna je u haplotipu *VKORC1*\*2 i doprinosi povećanju osjetljivosti za varfarin. Nositelji tih haplotipova iziskuju znatno niže doze varfarina u postizanju terapijskog učinka. Iz literature se doznaje kako je prosječna dnevna terapijska doza varfarina za nositelja genotipa CC 2,7-3,4 mg (haplotip AA), 4,3-4,9 mg za genotip C/G (haplotip A/B) i 6,0-6,2 mg za genotip GG (haplotip BB). To je istraživanje potvrđeno i u švedskoj studiji gdje se uz ostalo dokazalo kako bolesnici s haplotipom AA osim što zahtijevaju manje doze lijeka, imaju u većem postotku INR iznad terapijske granice (hipersaturacija), osobito u prvih 4 tjedna terapije<sup>105</sup>.

### 1.3.7.3. Kombinirani utjecaj polimorfizma gena *CYP2C9* i *VKORC1* na terapiju varfarinom

Kako je već navedeno genski polimorfizmi *CYP2C9* i *VKORC1* imaju značajni i dokazani upliv na poluvijek života i vrijeme za postizanje stabilne doze varfarina što je jasno dovelo do istraživanja o njihovom zajedničkom utjecaju pri uvođenju terapije na mnoge parametre kao što su: vrijeme potrebno za postizanje prvog ciljnog INR, na vrijeme provedeno u okviru terapijskog raspona INR, na vrijeme potrebno da se postigne stabilna doza održavanja, na potrebnu dozu ovisnu o genotipu, na rizik krvarenja ovisno o genotipu, učinak interakcije s drugim lijekovima. Brojni su pokusi pokazali kako kombinacija genetičkih varijacija *CYP2C9* i *VKORC1* može biti vrlo značajan modulator varijabilnosti terapije varfarinom. Prema literaturnim podacima polimorfizmi gena *CYP2C9* i *VKORC1* su odgovorni za 30-35%, prema nekim autorima i do 50-60% varijabilnosti doze varfarina<sup>45, 103, 106</sup>. Upravo je već 2005. godine Sconce sa suradnicima ukazala da se uključivanjem parametara farmakogenetičke analize *CYP2C9* i *VKORC1* uz kliničke parametre dob, visina i tjelesna težina može predvidjeti 55% varijabilnosti dnevne doze varfarina. Te je varijable uključila u jedan od prvih algoritama za izračunavanje najadekvatnije doze varfarina.

Naime klinički faktori su odgovorni samo za 17-21% varijabilnosti<sup>107</sup>. Prema nekim studijama je utjecaj polimorfizma *VKORC1* značajniji od utjecaja *CYP2C9* na dozu lijeka, dok je u drugima polimorfizam *CYP2C9*<sup>45</sup> imao veći utjecaj.

Naime Schwartz je u retrospektivnoj studiji zaključio kako bolesnici s jednim ili dva haplotipa A alela *VKORC1* postižu ciljni terapijski INR u kraćem vremenu, no u kraćem vremenu dostižu i supratherapijski INR >4 za razliku od haplotipa B („divljeg“). Istovremeno u

njegovoj studiji genotip *CYP2C9* nije imao učinak na vrijeme postizanja terapijskog INR, ali je imao učinak na ranije postizanje suprat terapijskog INR>4 tako da su nositelji alelnih varijanti *CYP2C9* \*2 i \*3 trebali kraće vrijeme za postizanje INR>4 u odnosu na divlji \*1 alel<sup>108</sup>.

Dvije su druge studije utvrdile podjednaki utjecaj varijabilnosti oba gena<sup>45, 109</sup>.

#### 1.3.7.4. Polimorfizam gena *MDR1/ABCB1*

Transportni proteini imaju važnu ulogu u regulaciji apsorpcije, raspodjele i izlučivanja mnogih lijekova. Jednu od važnih skupina transportnih proteina ovisnih o ATP s funkcijom prijenosa supstrata iz stanice predstavlja superporodica transportera ABC (od engl. ATP-binding cassette transporter)<sup>110</sup>. Opisani su brojni različiti transporteri koji su prema osnovi homologije i organizacije domena svrstani u sedam podporodica s dobro opisanim fiziološkim i farmakološkim funkcijama. Kao i kod drugih proteina, mogući je genetički polimorfizam transportera ABC i najčešće su SNP (u obliku supstitucije, delecije ili insercije jednog nukleotida). Navedeni SNP može imati utjecaj na aktivnost proteina<sup>111</sup>. Kako se nalaze u crijevima, na krvno-mozgovnoj brani, jetri i bubrezima, njihova tkivna rasprostranjenost je ključna za farmakokinetiku pa imaju važnu ulogu u apsorpciji, distribuciji i izlučivanju endogenih supstrata ali i ksenobiotika. Zbog povezanosti genskih varijanti s ekspresijom proteina ili funkcijom transportera o kojoj postoje jasni dokazi, navedeni transporteri imaju i bitan utjecaj na sistemsku izloženost lijeku i na njegovu toksičnost<sup>112</sup>.

Najbolje do sada proučen transporter je P-glikoprotein (Pgp) kodiran genom *ABCB1* ili *MDR1*<sup>113</sup>. Pgp je integralni membranski protein s funkcijom prijenosa tvari iz stanice i s membrane prema van. Njegova fiziološka funkcija je zaštita stanice od toksičnih tvari. Mnogi su lijekovi supstrati Pgp, stoga aktivnost Pgp utječe na njihove farmakokinetičke parametre, međusobne interakcije i terapijsku učinkovitost. Među najvažnijima su opioidi, loperamid, morfin, peroralni antikoagulans dabigatran, digoksin, imunosupresivi ciklosporin, takrolimus, sirolimus, inhibitori proteaza, statini, mnogi antineoplastici te različiti endogeni supstrati poput lipida, bilirubina i drugih.

Pgp je prvotno otkriven u malignim stanicama gdje visoka ekspresija i aktivnost Pgp čini maligne stanice otpornima na terapiju mnogim lijekovima. Pgp je također prisutan u različitim drugim nemalignim stanicama i organima poput crijeva, posteljice, bubrega, jetre, gušterače, testisa, krvno-mozgovnoj brani, limfocita, te makrofaga s ulogom moduliranja

bioraspoloživosti lijeka. U crijevima Pgp kontrolira apsorpciju lijeka nakon ingestije<sup>112</sup>. Iz navedenoga je jasno da povećana ekspresija Pgp u crijevima može smanjiti apsorpciju lijekova koji su supstrati Pgp što dovodi do smanjene koncentracije lijeka u plazmi i smanjenog učinka. Ukoliko je smanjena ekspresija i funkcija Pgp, postižu se suprat terapijske koncentracije koje mogu dovesti do toksičnosti lijeka.

Važno je istaći da su utvrđeni brojni lijekovi koji su inhibitori Pgp. Među njima su amiodaron, antimikotici, makrolidni antibiotici, inhibitori HIV proteaze, inhibitori protonske crpke, verapamil i drugi. Među poznatije induktore pripadaju rifampicin, efavirenz, ali i ekstrakt *Gospine trave* (hipericin).

Primjer tipične interakcije lijekova na razini Pgp je znatno veća bioraspoloživost glikozida digitalisa (digoksina) uz peroralnu primjenu kalcijevog antagonista verapamila. Također su novija ispitivanja ukazala da bi nuspojave, preventivno neočekivana krvarenja novijih oralnih antikoagulansa poput dabigatrana mogle biti upravo rezultat interakcija dabigatrana s istodobno primijenjenim lijekovima a koje se dešavaju na razini Pgp.

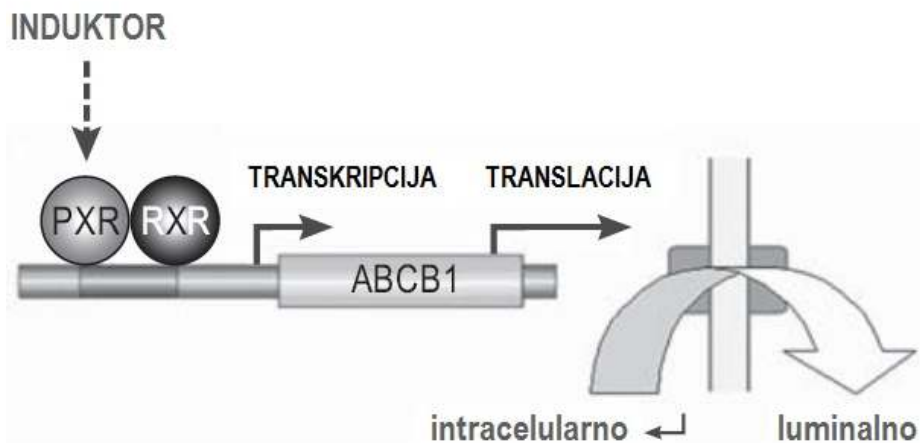
Značajni primjeri interakcija na razini intestinalne apsorpcije prikazani su u tablici 1.

TABLICA 1.3.7.4.1. Primjeri interakcija P-glikoproteina (*ABCB1/MDR1*) na razini intestinalne apsorpcije (važni supstrati, induktori i inhibitori)

SKUPINA	TVAR
<b>Supstrati</b>	
opioidi	loperamid, morfin
antihipertenzivi	aliskiren, karvedilol
antikoagulansi	dabigatran
srčani glikozidi	digoksin
imunosupresivi	ciklosporin, takrolimus, sirolimus
inhibitori proteaze	indinavir, sakvinavir
statini	atorvastatin, lovastatin, simvastatin
antineoplastici	paklitaksel, antraciklini, vinka alkaloidi, etopozid, imatinib
inhibitori protonske pumpe	omeprazol, lansoprazol, pantoprazol
antidepresivi	venlafaksin, paroksetin
<b>Induktori</b>	
antikonvulzivi	karbamazepin (manje okskarbazepin), fenitoin, fenobarbital, primidon
tuberkulostatici	rifampicin
antiretrovirusni lijekovi	efavirenz
ekstrakt <i>Gospine trave</i>	hiperforin
<b>Inhibitori</b>	

antimikotici	itrakonazol, ketokonazol
blokatori kalcijevih kanala	diltiazem, felodipin, nikardipin, nifedipin, verapamil (snažan)
makrolidni antibiotici	eritromicin, klaritromicin, azitromicin
inhibitori hiv proteaze	indinavir, nelfinavir, pogotovo ritonavir, sakvinavir
imunosupresivi	ciklosporin
antiaritmici	amiodaron, kinidin, propafenon
inhibitori protonske pumpe	omeprazol, lansoprazol, pantoprazol

Iz gore navedene tablice jasno je kako su brojni vrlo važni i vrlo često primjenjivani lijekovi supstrati, induktori i inhibitori Pgp. Među supstratima treba istaknuti često primjenjeni karvedilol i još uvijek često primijenjeni digoksin, imunosupresive ciklosporin i takrolimus, citostatike paklitaksel, antracikline, etopozid i imatinib te od antidepresiva paroksetin. Od induktora važno je istaknuti antiepileptike, a od inhibitora antiaritmik amiodaron, antimikotike, inhibitore protonske crpke i makrolidne antibiotike, lijekove koji se danas široko primjenjuju i vrlo često kombiniraju.



SLIKA 1.3.7.4. 1. Primjer indukcije P glikoproteina

P-glikoprotein, najvažniji prijenosnik za iznos/efluks može na više mjesta biti induciran lijekovima - induktorima koji su ligandi za nuklearni receptor. PXR-receptor za pregnan X, RXR –receptor za retinoid X (uz dopuštenje preuzeto iz Božina i sur. Interakcije lijekova-principi i primjeri kliničkih posljedica <sup>114</sup>).

Otkriće ksenobiotičima aktivirajućih nuklearnih hormonskih receptora uključujući receptor za pregnan X, konstitutivni androstan receptor, farnesoid X receptor i receptor za retinoid X doprinijelo je spoznajama da osim metaboličkih enzima ovi receptori reguliraju ekspresiju različitih transportera uključujući i P-glikoprotein (Pgp)<sup>115</sup>.

Već je navedeno kako je utvrđen polimorfizam u genu *ABCB1* i kako se najčešće radi o SNP. Među polimorfizmima tri su SNP u snažnoj veznoj neravnoteži („*linkage disequilibrium*“): u eksonu 12- 1236C>T (rs1128503), u eksonu 21- 2677G>T/A (rs2032582) i u eksonu 26 - 3435C>T (rs1045642). Ti su SNP vrlo učestali u većini etničkih skupina. Najviše do sada istraživani SNP se nalazi u eksonu 26, 3435C>T koji rezultira tihom mutacijom. Prva studija koja je izvjestila o utjecaju tog polimorfizma je objavljena 2000. godine. U njoj Hoffmeyer i suradnici iznose da homozigotni nositelji alela *ABCB1* 3435T u prosjeku imaju više od dva puta nižu intestinalnu ekspresiju P-glikoproteina (mjereno western blot analizom), u odnosu na homozigotne nositelje 3435C alela<sup>116</sup>. U navedenoj studiji autori su također ispitali utjecaj tog SNP na apsorpciju oralno primjenjenog digoksina koji je Pgp supstrat. Kako se digoksin nepromijenjen izlučuje bubrezima, PK analiza uglavnom govori o njegovoj apsorpciji pa time i posredno o aktivnosti Pgp. Autori su pokazali na zdravim dobrovoljcima (n=14) da su homozigotni nositelji polimorfizma 3435TT (n=7) imali značajno više koncentracije (C<sub>max</sub>) digoksina u plazmi u odnosu na nositelje genotipa 3435CC (n=7). Kasnije su se objavljivale i druge studije koje su prikazale učinak genotipa u etničkim skupinama. 2005. godine objavljena je meta - analiza koja nije potvrdila da 3435C>T polimorfizam ima utjecaj na površinu ispod krivulje (AUC, od engl. area under curve) u bjelačkoj i japanskoj populaciji<sup>117</sup>, ali su potvrdili kako je u nositelja genotipa 3435CC niža vrijednost C<sub>max</sub> digoksina pa se zaključilo kako bioraspoloživost digoksina u tih bolesnika može biti manja. Iako studija iz 2005. godine<sup>117</sup> nije potvrdila utjecaj polimorfizma 3435C>T u etničkim populacijama, kasnije se utvrdila razlika samog polimorfizma pa je u nositelja 3425TT genotipa u bjelačkoj populaciji bio viši C<sub>max</sub> dok je u japanskih dobrovoljaca bio niži<sup>118, 119</sup>.

Polimorfizam *MDR1/ABCB1* je najviše proučavan upravo na digoksinu pa su i kasnije studije pokazale kako nositelji 1236T-2677T-3435T haplotipa imaju više koncentracije digoksina. Klinička značajnost navedenih polimorfizama zahtijeva dodatna istraživanja s obzirom na primjenu drugih lijekova, posebice induktora i inhibitora jer i promijenjena aktivnost Pgp kao rezultat indukcije/inhibicije može dovesti do interakcije lijek-lijek s varijabilnom farmakokinetikom i odgovorom na terapiju. Kod digoksina npr. njegova bioraspoloživost raste uz primjenu rifampicina<sup>120</sup>.

Postoje istraživanja koja ukazuju da Pgp može modulirati i bioraspoloživost varfarina<sup>121</sup>. Kako se varfarin dobro resorbira u crijevima čini se malo vjerojatnim da Pgp utječe na apsorpciju u većoj mjeri. Nakon apsorpcije, u jetri varfarin inhibira vitamin K epoksid reduktazu. U hepatocitima je varfarin umjereni inhibitor Pgp<sup>121</sup> pa bi u teoriji snižena aktivnost mogla dovesti do povišenih razina varfarina.

Do sada je opisano više polimorfizama u genu *MDR1*, istražena njihova povezanost s ekspresijom Pgp i utjecaj na farmakokinetičke parametre klinički važnih lijekova<sup>121, 122</sup>. Najviše su asocijacijskim studijama ispitivani polimorfizmi na eksonu 26 -3396C>T A1132A i 3435C>T I1145<sup>122</sup>, eksonu 21- G2677T/A te eksonu 12.

Kao i za druge farmakogenetičke čimbenike, uočena je znatna međuetnička razlika u zastupljenosti pojedinih polimorfizama. U populaciji bijelaca najznačajniji je polimorfizam C3435T 26 povezan s polimorfizmom G2677T/A na 21. Ovaj haplotip rezultira znatno izmijenjenom funkcijom Pgp-a<sup>123</sup>.

#### 1.3.7.5. Algoritmi primjene varfarina zasnovani na farmakogenetici

Zbog jasno utemeljenog odnosa između polimorfizma *CYP2C9* i *VKORC1* pokušalo se rezultate genotipizacije uključiti u procjenu inicijalne doze varfarina kako bi se što više smanjio rizik od nuspojava lijeka, skratilo vrijeme do postizanja terapijskih vrijednosti parametara koagulacije i postigla stabilnost i doze i učinka. Do sada su predloženi i validirani brojni algoritmi koji su svoju potvrdu imali u kliničkim ispitivanjima, a jedan od prvih i najčešće citiranih je onaj Sconce i dr. iz 2005. godine<sup>45</sup>.

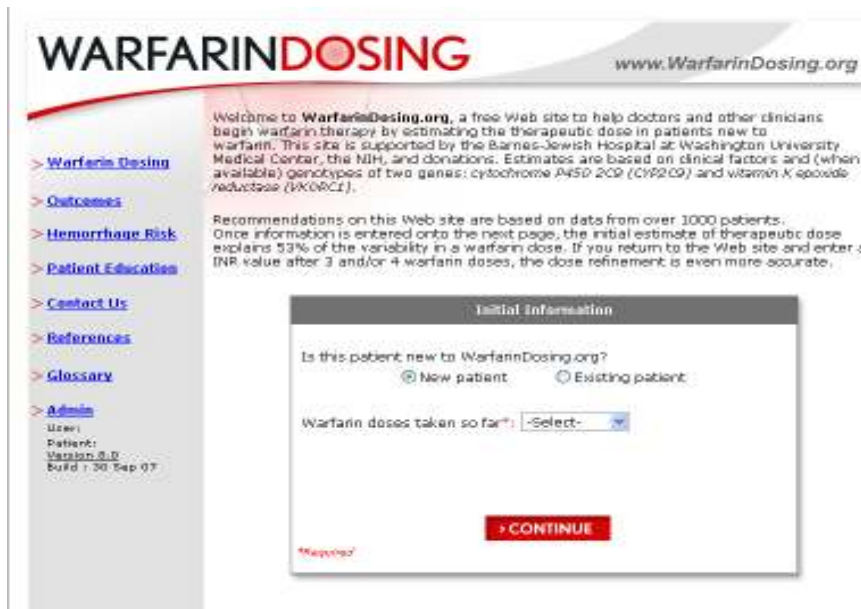
Prikaz algoritma Sconce i suradnika:

$$\text{Doza} = 0,628 - 0,0135(\text{dob}) - 0,240(\text{CYP}^*2) - 0,370 - (\text{CYP}^*3) - 0,241(\text{VKORC1}) + 0,162(\text{visina})$$

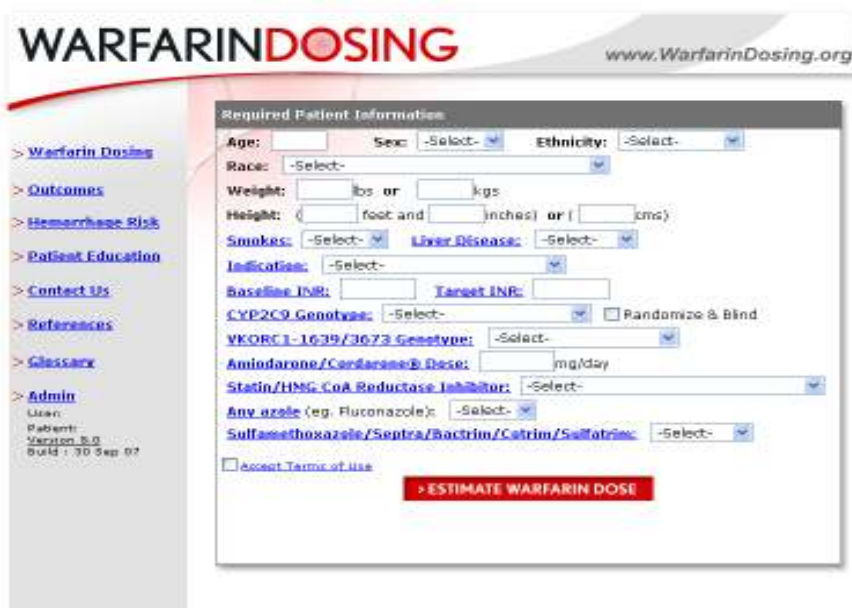
CYP2C9 0, 1 ili 2 za broj \*2 i \*3 alela; VKORC1 1 za GG, 2 GA i 3 za AA; visina u cm

Često je citiran i rad iz 2008. godine u kojem se navode klinički farmakogenetički faktori za predikciju terapijske doze varfarina<sup>124</sup>. Drugi algoritam iz iste godine u jednadžbu uključuje i podatke o etničkoj pripadnosti<sup>125</sup>. Mnogi od algoritama se još uvijek potvrđuju i predstavljaju dio mnogih kliničkih ispitivanja među čemu se ističe algoritam iz 2008. godine Gage i suradnika<sup>123</sup>. Potencijalna klinička korist svakog algoritma također se ocjenjivala. Iste godine su objavljeni i rezultati koji su podupirali genetičko testiranje prije primjene lijeka<sup>126</sup>. Danas

se najčešće rabi i čini se da je najpouzdaniji onaj dozni algoritam Međunarodnog konzorcija za farmakogenetiku varfarina iz 2009. godine koji uključuje najbolje iz objavljenih studija<sup>127</sup>. Algoritam se nalazi na mrežnim stranicama i liječnici praktičari kao i ispitivači iz kliničkih ispitivanja se mogu njime služiti ([www.WarfarinDosing.org](http://www.WarfarinDosing.org))<sup>128</sup>, a temelji se na rezultatima brojnih objavljenih radova<sup>125, 129, 130</sup>.



SLIKA 1.3.7.5.1. Prikaz početne mrežne stranice algoritma za određivanje doze varfarina



SLIKA 1.3.7.5.2. Prikaz parametara u doznom algoritmu na mrežnoj stranici

Preuzeto s [www.WarfarinDosing.org](http://www.WarfarinDosing.org)

Slike 1.3.7.5.1. i 1.3.7.5.2. prikazuju izgled mrežne stranice preko koje se vrlo lako može izračunati početna doza varfarina. Vidljivo je da se u temeljnu formulu uključuju klinički parametri i dodatni kontributivni faktori (dob, spol, rasa, težina, visina, navike-pušenje, bolest jetre, primjena statina, amiodarona, azola) te rezultati farmakogenetike (*CYP2C9* i *VKORC1*).

U sadašnje algoritme nisu uvedeni rezultati genotipiziranja *MDR1/ABCB1* jer nema dovoljno radova koji bi jasno potvrdili povezanost polimorfizma gena *MDR1* s dozom varfarina.

#### 1.3.7.6. Ostali mogući genetički utjecaji

Posljednjih godina objavljeno je niz istraživanja kojima se pokušava ukazati i utvrditi mogući utjecaj i drugih gena na varijabilnost odgovora na terapiju varfarinom i potrebnu dozu u bolesnika<sup>104, 131, 132</sup>.

Već smo navodili kako je Wadelius dokazala utjecaj polimorfizma *VKORC1* na dozu varfarina, no istim radom<sup>104</sup> je potvrdila kako je utjecaj *VKORC1* značajniji od utjecaja *CYP2C9*, a istodobno je ukazano na malen, ali statistički značajan utjecaj gena gama-glutamil karboksilaze (*GGCX*) na dozu varfarina.

Isto tako je Vecsler 2006. godine na 100 antikoaguliranih bolesnika pokušao kvantificirati učinak polimorfizma *CYP2C9*, *VKORC1*, kalumenina (*CALU*) i *GGCX* na potrebnu dozu varfarina<sup>131</sup>. Utvrđeno je kako je dnevna doza varfarina predominantno određena genotipovima *VKORC1* i *CYP2C9*. Prema rezultatima ta dva genotipa zajedno s dobi i tjelesnoj težini bolesnika objašnjavaju 63% doznih varijacija. Kombinirani genotip *CYP2C9* i *VKORC1* divlji tip zajedno s mutiranim genom *CALU* zahtijevao je značajno više doze varfarina (7,8±1,5 mg/dan) u usporedbi s mutiranim genom *CYP2C9* i *VKORC1* s divljom varijantom *CALU* (2,8±0,3 mg/dan).

Kimura i suradnici<sup>132</sup> genotipizirali su 93 antikoagulirana japanska bolesnika sa stabilnim INR (1,6-2,6). Prema rezultatima utvrđen je doprinos na inter- individualne varijacije od 5,9% za *VKORC1-1639G>A*, 5,2% za *CYP2C9 42613A>C* i 4,6% za *GGCX 8016G>A*.

Sconce je 2006. godine objavila rad u kojem je pokazala malen ali ipak dovoljan doprinos gena apolipoproteina E (gena *APOE*) na potrebnu dozu varfarina<sup>133</sup> što su potvrdili Kohnke na talijanskoj populaciji<sup>134</sup> te Kimmel u bijelaca i Afroamerikanaca<sup>135</sup>.



I najnovija istraživanja iz 2013. i 2014. godine i dalje nastoje pronaći povezanost doze i utjecaja drugih gena uključenih u farmamkodinamiku (i farmakokinetiku) varfarina.

Objavljen je rad koji doduše nije ustvrdio povezanost pojedinačnih gena *MDR1*, gena mikrosomalne epoksid hidrolaze 1 (*EPHX*) i proteina *Z* (jer nije bio izoliran), ali je kombinacija navedenih gena objasnila potrebe za značajno višim dozama varfarina u bolesnika s *MDR1 3435TT/EPHX1 RH,RR/PZ AA* u odnosu na bolesnike s polimorfizmom *MDR1 3435CC/EPHX1 RH,RR/PZ AA*<sup>136</sup>.

Prema rezultatima iz 2013. godine gen *EPHX1* je odgovoran za farmakokinetiku i farmakodinamiku varfarina<sup>137</sup>. Gen *EPHX1* kodira enzim epoksid hidrolazu 1. Mogući mehanizam kojim se objašnjava utjecaj genetičkog polimorfizma *EPHX1* je smanjenje prelaska oksidirane forme vitamina K u reduciranu formu zbog smanjene enzimске aktivnosti epoksid hidrolaze što snažno utječe na formiranje aktivnih faktora koagulacije. Dakle, moguće je da jse polimorfizam povezan s dozom i učinkom varfarina. Najčešći polimorfizmi *EPHX1* su rs4653436 A>G i rs2292566 G>A, a istraživani su i mnogi drugi (rs1051740, T337C i rs2234922, A416G). Važno je istaknuti kako su mutacije *EPHX1* povezane s preeklampsijom, hiperkolanemijom i fetalnim hidantoinским sindromom.

Mora se istaći kako se nije u svih otkrivenih polimorfizama utvrdila jasna klinička značajnost što ostaje dalnji predmet istraživanja.

## 2. HIPOTEZA

Korištenjem rezultata farmakogenetičke analize i utvrđivanjem polimorfizma gena *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1/ABCB1*, uključenih u farmakokinetiku i farmakodinamiku varfarina, prije započinjanja terapije navedenim lijekom, postići će se brža stabilizacija doze održavanja i manji broj nuspojava u ranom razdoblju od uvođenja terapije.

### 3. CILJEVI I SVRHA ISPITIVANJA

Cilj ovog istraživanja je odrediti prediktivnu vrijednost farmakogenetičkih varijacija *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1/ABCB1* za optimizaciju terapije varfarinom. Optimalna terapija se procjenjuje s obzirom na postizanje stabilnog PV (INR) tijekom cjelokupnog praćenja (od uvođenja terapije pa do otpusta iz bolnice).

Primarni cilj ovog istraživanja je:

1. utvrditi pojedinačni utjecaj gena *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1/ABCB1*,
2. utvrditi zajednički (kombinirani) utjecaj sva tri gena.

Sekundarni ciljevi su

1. utvrditi pojedinačnu učestalost polimorfizma gena *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1/ABCB1* i
2. utvrditi interakcije varfarina s drugim lijekovima koji su supstrati istih metaboličkih enzima i/ili transportnih proteina u odnosu na polimorfizme *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1/ABCB1*.

Valja još jednom istaknuti da je terapija varfarinom zbog obilježja samog varfarina (uski terapijski indeks, značajna intervarijabilnost doze i učinka između bolesnika) klasični primjer liječenja koje bi moglo polučiti posebnu korist od farmakogenetičkih testiranja (analiza) bolesnika prije započinjanja liječenja.

Na temelju rezultata takvih ispitivanja mogla bi se unaprijed odrediti optimalna doza lijeka što bi moglo smanjiti broj i učestalost komplikacija liječenja. Već je navedeno kako je utvrđen veliki broj polimorfizama gena uključenih u farmakokinetiku i farmakodinamiku varfarina. Polimorfizmi *CYP2C9* i *VKORC1*<sup>15, 124, 126</sup> identificirani su kao značajni čimbenici koji utječu na dozu i učinak primijenjenog varfarina.

S obzirom na te spoznaje, pokušano je u kliničku praksu primijeniti nekoliko različitih algoritama prema kojima bi se odredila prva doza varfarina. Nijedan do sada preporučeni algoritam nije u potpunosti zadovoljio i ne predviđa u potpunosti varijabilnost u dozi i učinku varfarina. S obzirom na to, sve više se istražuju i razmatraju utjecaji i polimorfizmi postojećih ali i drugih gena koji bi mogli imati također utjecati na dozu i učinak varfarina. Pritom se vrlo

intenzivno uz već navedene polimorfne gene *CYP2C9* i *VKORC1* intenzivno proučava *MDR1/ABCB1* kao jedan od mogućih faktora koji utječe na farmakodinamiku varfarina.

Svrha istraživanja je utvrditi ima li upravo polimorfizam gena *MDR1/ABCB1* samostalno i u kombinaciji s već dokazanim polimorfizmima (*CYP2C9*, *VKORC1*) značajniji utjecaj na farmakodinamiku varfarina. U tom slučaju bi genotipizacija prije uvođenja lijeka značajno olakšala odabir najadekvatnije doze lijeka, smanjila broj nuspojava i omogućila stabilno održavanje doze i učinka.

#### 4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje je provedeno kao prospektivna kontrolirana randomizirana studija. Da bi se postigla što veća sličnost ispitanika u ispitivanoj i kontrolnoj skupini, bolesnici su se uključivali prema unaprijed određenim kriterijima za uključivanje. Temeljna indikacija (kriterij za uključivanje) je bila potreba za uvođenjem peroralnog antikoagulansa varfarina u terapiju i to pri novootkrivenoj atrijskoj fibrilaciji (AF), plućnoj emboliji (PE) i dubinskovenskoj trombozi (DVT). Glavni isključni kriterij je bila istodobna maligna bolest.

Istraživanje je provedeno nakon što je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb (KBC Zagreb) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno u Klinici za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb u razdoblju od 28.9.2009. do 15.6.2013. godine.

Ispitanici su bili bolesnici oba spola, stariji od 18 godina koji su se u navedenom razdoblju hospitalizirali prema dogovorenim kriterijima za uključivanje.

Pripremljen je upitnik (Prilog 1) kojim su se prikupljali podaci o bolesnicima te informirani pristanak bolesnika sastavljen prema etičkim principima sa ciljem upoznavanja bolesnika sa svrhom ispitivanja i svim postupcima u istraživanju koji je pripremljen na temelju Dobre kliničke prakse i Helsinške deklaracije<sup>138</sup> (Prilog 2). Bolesnici iz ispitivane skupine su potpisali informirani pristanak, a za kontrolnu skupinu nismo predvidjeli potpisivanje informiranog pristanka jer se u njih nije radila intervencija a od osobnih podataka su se koristili samo matični brojevi bolničkih povijesti bolesti. Temeljni podaci su se prikupljali u upitnik te u cjelokupnu bolničku dokumentaciju u kojoj se nalaze temperature liste s podacima o svakodnevnoj primjeni svih lijekova, podaci o eventualnim nuspojavama s opisima nuspojava te promjene doze varfarina i drugih istodobno primijenjenih lijekova.

U obje skupine bolesnici su liječeni prema standardima kliničke prakse te se u bolesnika s venskom trombembolijom liječenje započelo s istodobnom primjenom varfarina i heparina niske molekularne težine (LMWH od engl. *low molecular weight heparin*). Doza LMWH je određena prema tjelesnoj težini i funkciji bubrega (razina kreatinina). U bolesnika s novootkrivenom atrijskom fibrilacijom liječenje je započeto samo s varfarinom (u ispitanika nakon prispeća rezultata genotipizacije). Prije uvođenja terapije u ispitivanoj skupini čekali su se rezultati genotipizacije.

Za genotipizaciju, uz standardnu laboratorijsku obradu, bolesniku se uzimala krv za farmakogenetičku analizu čiji rezultati su bili dostupni isti radni dan (najduže unutar 8 sati od prijema uzorka).

Naše ispitivanje nije uključivalo genotipizaciju u kontrolnoj skupini zbog troškova analize.

#### **4.1. Ispitanici**

U istraživanje je uključeno 205 bolesnika starijih od 18 godina koji su u promatranom razdoblju bili hospitalizirani u hitnoj službi prema uključnim dijagnozama u Klinici za unutarnje bolesti KBC Zagreb i Klinici za bolesti srca i krvnih žila KBC Zagreb.

Kriteriji za uključivanje bolesnika u obje skupine:

1. Novootkrivena fibrilacija atriya dokazana anamnestičkim podacima i simptomima bolesnika te EKG nalazom,
2. Utvrđena dubinskovenska tromboza dokazana doplerom zahvaćenog ekstremiteta,
3. Utvrđena plućna embolija dokazana scintigrafijom pluća ili CT angiografijom.

Kriteriji za isključivanje:

1. Bolesnici s istodobno prisutnom malignom bolesti,
2. Bolesnici koji su prethodno već bili na terapiji varfarinom (preboljele bolesti zbog kojih je varfarin bio indiciran),
3. Trudnice,
4. Bolesnici s kraćim očekivanim trajanjem života od 4 tjedna od prijema koliko je bilo predviđeno praćenje,
5. Bolesnici s kontraindikacijom za primjenu varfarina (preosjetljivost, nepodnošenje, nemogućnost kontrole parametara koagulacije).

Velik broj bolesnika primljenih u navedenom razdoblju u hitnoj službi nije odgovarao kriterijima za uključivanje što objašnjava mali broj uključenih bolesnika u relativno dugom vremenskom razdoblju.

Ispitanici su randomizirani u dvije skupine. Prva skupina su bili svi bolesnici hospitalizirani u navedenom razdoblju u Klinici za unutarnje bolesti prema kriterijima za

uključivanje tj. s dijagnozom novootkrivene fibrilacije atrijske, plućnom embolijom i dubinskovenskom trombozom. U njih se nakon postavljanja dijagnoze i indikacije za primjenu varfarina odmah učinila genotipizacija i prema rezultatima genotipizacije se prema dogovorenom algoritmu (ukupno 106 bolesnika) odredila doza i započela terapija ispitivanim lijekom (pokusna skupina, skupina s farmakogenetikom, FG) <sup>128</sup>.

U drugu skupinu su bili uključeni svi bolesnici prema istim uključnim kriterijima koji su u navedenom razdoblju bili hospitalizirani u Kliniku za bolesti srca i krvnih žila u kojih se nakon postavljanja dijagnoze i indikacije za varfarinom, terapija varfarinom započela bez prethodne genotipizacije (kontrolna skupina, skupina bez nalaza farmakogenetike, NFG) (ukupno 99 bolesnika). U kontrolnoj skupini primjena varfarina temeljila se na kliničkoj prosudbi (prema dobi, spolu, tjelesnoj težini i visini, popratnim bolestima koje smo dokazivali funkcijom jetre, bubrega i srca). Kliničke karakteristike za odabir doze predstavljaju uobičajeno doziranje koje je jednako u svim Klinikama KBC Zagreb. U bolesnika mlađih od 75 godina primjenila se doza od 6 mg od 1. - 3. dana, a 4. i 5. dan se doza korigirala prema uobičajenoj kliničkoj praksi, prema parametrima koagulacije. U bolesnika starijih od 75 godina, sa znatno oštećenom bubrežnom, srčanom i jetrenom funkcijom, se primijenila od doza od 3 mg od 1. - 3. dana uz uobičajenu korekciju 4. i 5. dan.

Obilježja koja su praćena u svih bolesnika su:

- Dob
- Spol
- Tjelesna težina
- Tjelesna visina
- Navike (pušenje, alkohol)
- Laboratorijski nalazi pri prijemu (jetrene transaminaze, bilirubin, ureja, kreatinin, PV/INR)
- Razlog uvođenja varfarina (dijagnoza bolesti)
- Dijagnostički postupak kojim se bolest dokazala
- Lijekovi koji se istodobno primjenjuju s varfarinom s ocjenom interakcije <sup>32</sup>.
  - Baza podataka Micromedex daje kategorizaciju interakcija kao blaga (engl. mild), umjerena (engl. moderate) i teška (engl. major) i tako su se popratni lijekovi kategorizirali.
  - No ipak, kako je najveći broj bolesnika uzimao istodobno brojne lijekove, zbog jednostavnije statističke obrade klasificirani su u one

koji smanjuju antikoagulacijski učinak varfarina (ocjena 1) i one koji pojačavaju antikoagulacijski učinak (ocjena 2).

- Praćenje INR svakodnevno tijekom prvih 5 dana i na dan otpusta te nakon 1 tjedna, 2 tjedna i 4 tjedna od otpusta.
  - „gubitak” ispitanika iz praćenja još je jedan od značajnih razloga za relativno mali broj ispitanika u navedenom razdoblju.
- Ciljni terapijski raspon INR je uključivao vrijednosti INR od 2,0-3,0 što predstavlja ciljni terapijski INR za veliku većinu tromboembolijskih bolesti <sup>43</sup>. Treba ipak istaći da su se kod analize podataka uključile vrijednosti parametara koagulacije od 2,0-4,0 jer se u najnovijim radovima navode navedene vrijednosti, a u novijim radovima se tek vrijednosti iznad 4 smatraju klinički važne te predstavljaju granicu pretjerane antikoagulacije <sup>139, 140</sup>. U raspravi se detaljno objašnjavaju posljednji rezultati iz navedenih studija s kojima se uspoređuju i naši podaci
- Praćenje nuspojava u promatranom razdoblju.

Varfarin se u Hrvatskoj nalazi odobren pod zaštićenim imenom Martefarin i dolazi u tabletama od 3 mg i taj se pripravak primjenivao.

Primjena (zaštićeno ime) heparina niske molekularne težine (LMWH od engl low molecular weight heparin) bila je u skladu s mogućnostim za nabavu KBC Zagreb tj. primjenjivao se onaj heparin koji je tada bio na raspolaganju (Clexane, Fraxiparine).

Heparin niske molekularne težine prosječno se primjenjivao u obje skupine od 3-5 dana, odnosno do postizanja terapijskih vrijednosti parametara koagulacije.

## **4.2. Indikacije za primjenu varfarina**

Kriteriji za uključivanje bolesnika su bili u obje skupine jednaki i uključili su dubinskovensku trombozu, plućnu emboliju i novonastalu atrijsku fibrilaciju. U navedenim bolestima, u većine bolesnika, u nas i u svijetu, lijek koji se još uvijek široko primjenjuje je peroralni antikoagulans varfarin.

### **4.2.1. Plućna embolija (PE)**



Plućna embolija predstavlja potencijalno ugrožavajuće kardiovaskularno stanje koje se javlja kada tromb (uobičajeno iz donjih ekstremiteta i kod razvoja dubinskovenske tromboze), cirkulacijom, pa se tada zove embolus, dolazi u plućnu cirkulaciju i okludira plućnu arteriju. Rizik za razvoj plućne embolije je povećan u bolesnika s malignom bolesti kao i u bolesnika koji su u potpunosti imobilizirani, obično nakon velikih kirurških zahvata. S okluzijom plućne cirkulacije javljaju se simptomi koji uključuju otežano disanje, kašalj uz hemoptizu, bol u prsnom košu u inspiriju te palpitacije. Klinički znaci uključuju sniženu saturaciju krvi kisikom, cijanozu, ubrzano disanje i ubrzani puls. Pri teškoj i masivnoj plućnoj emboliji može doći do kolapsa, naglog pada arterijskog krvnog tlaka i nagle smrti. Gotovo 4/5 bolesnika s plućnom embolijom ima istodobno znakove dubinskovenske tromboze <sup>141</sup>. Međutim čak 20%-30% bolesnika nema jasan razlog (uzrok ili objašnjenje) za razvoj plućne embolije <sup>142</sup>.

Manje obimne PE u perifernim plućnim aretrijama koje su bez kolateralne cirkulacije vjerojatnije dovode do infarkta pluća i manjih efuzija (oboje je bolno) ali bez hipoksije, dispneje i hemodinamske nestabilnosti kao što je tahikardija. Masivne PE koje se razvijaju centralno tipično uzrokuju dispneju, hipoksiju, hipotenziju, tahikardiju i sinkopu, ali su obično bez bolova jer se zbog kolateralne cirkulacije ne razvije infarkt. Klasična prezentacija PE s pleuritičnom boli, dispnejom i tahikardijom uzrokovana je obično velikim embolusima.

PE se i opisuju kao masivne, submasivne i nemasivne ovisno o kliničkim znacima i simptomima. Iako definicija nije posve jasna, generalno je prihvaćeno da se masivna PE definira kao ona u kojoj je izražena hemodinamska nestabilnost koja uključuje trajnu hipotenziju, bradikardiju i gubitak pulsa. Može se općenito reći da je najuobičajeniji simptom dispneja praćena pleuritičnom boli i kašljem. Međutim, ističemo, i bolesnici s masivnom plućnom embolijom mogu imati blage i nespecifične simptome ili mogu biti i asimptomatski. Stoga je važno da se svaka utemeljena sumnja razmotri i provede detaljni dijagnostički postupak.

Plućna embolija se dugovremeno dijagnosticirala samo kombinacijom ventilacijske i perfuzijske scintigrafije kojom se utvrđuje vjerojatnost za plućnu emboliju. Visoka vjerojatnost dijagnoze je dovoljna za početak terapije. Niska vjerojatnost dijagnoze ne isključuje plućnu emboliju. Danas je CT angiografija metoda izbora za dokaz plućne embolije jer je senzitivna i specifična za dijagnozu. Neinvazivna je, a s njom se mogu dokazati i drugi poremećaji i bolesti pluća u slučaju isključenja plućne embolije.

Ukoliko se CT angiografija ne može učiniti, dijagnoza se temelji na ventilacijskoj i perfuzijskoj scintigrafiji. U KBC Zagreb, plućna embolija se u najvećeg broja bolesnika dokazuje scintigrafijom pluća.

Laboratorijske pretrage uključuju pretragu D-dimera koja je osjetljiva, ali nedovoljno specifična. Korisna je ukoliko se “uklapa” u kliničku sliku ili sumnju na PE te usmjerava daljnji dijagnostički postupak.

#### 4.2.2. Dubinskovenska tromboza (DVT)

Dubinskovenska tromboza predstavlja formaciju tromba u dubokim venama donjih ekstremiteta, znatno rjeđe u gornjim ekstremitetima. Dijele se na proksimalne i distalne dubinskovenske tromboze što je važno s obzirom na duljinu primjene oralnih antikoagulanasa i procjenu rizika za komplikacije. Kod proksimalnih se terapija provodi kroz dulje vrijeme, a kod distalnih uglavnom 3-4 mjeseca. DVT može nastati spontano bez nekog predležućeg uzroka (idiopatska tromboza), ali češće, nakon provocirajućeg događaja (trauma, operacija, bolest). Treba istaći da svi rizični faktori za razvoj DVT predstavljaju i rizične faktore za plućnu emboliju. Faktori koji povećavaju rizik za razvoj DVT su maligna bolest, trauma, operacije, imobilizacija (pa i dugotrajna putovanja), primjena oralnih kontraceptiva, primjena hormonske nadomjesne terapije, trudnoća. Dvije trećine prvih epizoda DVT javljaju se uz navedene rizične faktore <sup>143</sup>.

DVT koje se javljaju u poslijeoperacijskom razdoblju ovise o tipu kirurškog zahvata kao i drugim rizičnim faktorima. Od kirurških zahvata najviši je rizik kod ortopedskih operacija, zatim velikih vaskularnih operacija i u neurokirurgiji. Također često se opisuje kod velikih abdominalnih operacija, osobito malignih tumora. Starija životna dob, debljina, prethodne tromboze, maligna bolest sama po sebi, povećavaju vjerojatnost poslijeoperacijskih tromboza. Rizik za tromboze povećan je i postoji i nekoliko mjeseci nakon operacije.

Trauma predstavlja rizik za DVT u 50% slučajeva. Visoki rizik je kod spinalnih ozljeda (62%), prijeloma zdjelice (61%) i prijeloma donjih ekstremiteta (80%).

Kao rijeđi, ali vrlo značajni ili umjereno značajni rizični faktori se navode manjak antitrombina, proteina C te proteina S. Te tri trombofilije 10 x povećavaju rizik za DVT <sup>144</sup>. Faktor V Leiden koji čini faktor V rezistentnim na inaktivaciju preko aktiviranog proteina C i genetički promijenjen protrombin G20210A koji dovodi do povišenih vrijednosti razine protrombina česti su u bijele populacije <sup>145</sup>. Prevalencija faktora V Leiden npr. u Sjevernoj Americi i Europi iznosi 4-8%. Faktor V Leiden se utvrdi u 12-30% svih spontanih DVT a povisuje rizik za DVT 3-8 puta u heterozigota, ali i do 80 puta u homozigota, no nije rizični faktor za rekurentne tromboze. Mutacija protrombina G20210A utvrđena je u 7-18%

bolesnika sa spontanom DVT, a sama mutacija povisuje rizik za DVT 2-3 puta. U heterozigota je neznajno povišen rizik za rekurentne DVT <sup>144</sup>.

Učestalost DVT dramatično raste s dobi. U odrasloj dobi javlja se u 1 osobe na 1.000 godišnje dok je u dječjoj dobi izuzetno rijetka i javlja se u 1 bolesnika na 100.000 osoba. Tijekom trudnoće i nakon porođaja, DVT se javlja otprilike jednom na 1.000 porođaja. Nakon operacija unatoč prevenciji, DVT se javlja u 10 od 1.000 osoba u kojih je ugrađena totalna endoproteza koljena i u 5 od 1.000 osoba s totalnom ili parcijalnom endoprotezom kuka. Postoje podaci kako otprilike 300.000-600.000 Amerikanaca godišnje doživi DVT svake godine, a otprilike 60.000-100.000 bolesnika umre zbog PE. Također u Velikoj Britaniji procjenjuje se da 25.000 bolesnika godišnje umre zbog komplikacija uzrokovanih s DVT.

Što se tiče spola, rizik za prvu pojavu DVT je nešto veći u muškaraca nego u žena.

Nespecifični znaci dubinskovenske tromboze uključuju bol, otok zahvaćenog ekstremiteta, crvenilo, toplinu i moguće povećane (proširene) superficijalne vene.

Iako su klinički simptomi jasni, dijagnoza se postavlja laboratorijski krvnim testovima (D-dimeri) ali se može jasno utvrditi samo radiološkim metodama kao što je kompresijska ultrasonografija (ultrazvuk, UZ) zahvaćenog ekstremiteta <sup>146</sup>. U KBC Zagreb je ultrazvuk uobičajena metoda dokazivanja dijagnoze dubinskovenske tromboze ekstremiteta.

#### 4.2.3. Atrijska fibrilacija (AF)

Atrijska fibrilacija je najčešći poremećaj srčanog ritma koji se uglavnom prezentira brzim i neregularnim srčanim pulsom. Iako može biti bez simptoma, obično je praćen palpitacijama, blažom zaduhom, netolerancijom napora, bolovima u prsnoj koži (ukoliko prebrzi ritam uzrokuje ishemiju miokarda), nesvjesticom ili zatajivanjem srčane funkcije <sup>147</sup>. Aritmija se može utvrditi i slučajno obično kod pojave moždanog udara ili tranzitorog ishemijskog napadaja (TIA). Nije neuobičajeno da se AF utvrdi na rutinskom pregledu i analizom EKG-a jer vrlo često izostaju simptomi.

Atrijska fibrilacija je najčešći poremećaj srčanog ritma, a u Europi i Sjevernoj Americi se javlja u 2-3% populacije. Posljednji podaci navode da preko 6 milijuna ljudi u Europi ima trajnu fibrilaciju atrijske <sup>148</sup>. Postotak učestalosti fibrilacije atrijske raste s dobi. Svega 0,14% bolesnika mlađih od 50 godina ima FA, javlja se u 4% bolesnika u dobi od 60-70 godina i u 14% onih starijih od 80 godina. Prema podacima AF je bila odgovorna za 112.000 smrtnih ishoda u 2013. godini <sup>149</sup>. AF predstavlja trećinu uzroka hospitalizacija bolesnika s tendencijom rasta posljednjih godina <sup>150</sup>.

AF je najčešće sekundarno uzrokovana, a prisutnost bolova u prsima ili anginoznih bolova, zatim znaci hipertiroidizma kao gubitak na tjelesnoj težini i proljev, te bolest pluća mogu upućivati i na mogući primarni uzrok. Istodobno prisutne druge bolesti (dijabetes melitus, povišeni krvni tlak, srčano zatajivanje, anamneza moždanog udara ili TIA) mogu predstavljati dodatni rizik za moždani udar u bolesnika s AF. Rizik za nastanak tromboembolijskih događaja ocjenjuje se primjenom CHADS<sub>2</sub> ocjenskom ljestvicom odnosno danasu kliničkoj praksi češće primjenjenom CHADS<sub>2</sub>-VAS ocjenskom ljestvicom<sup>151, 152</sup>.

TABLICA 4.2.3.1. CHADS<sub>2</sub> ocjenska ljestvica

	Stanje (bolest)	Broj bodova
<b>C</b>	Kongestivno zatajenje srca	1
<b>H</b>	Hipertenzija (trajno povišen krvni tlak iznad 140/90 mmHg ili pod terapijom)	1
<b>A</b>	Dob (stariji od 75 godina)	1
<b>D</b>	Dijabetes melitus	1
<b>S<sub>2</sub></b>	Prethodni moždani udar ili TIA ili tromboembolijski događaj	2

C- congestive heart failure (kongestivno zatajenje srca); H-hypertension (hipertenzija); A-age (dob); D-diabetes mellitus (dijabetes melitus); S-stroke (moždani udar) ili tranzitorni ishemijski napadaj - TIA (od engl. *transient ishaemic attack*)

TABLICA 4.2.3.2. CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VAS ocjenska ljestvica

	Stanje (bolest)	Broj bodova
<b>C</b>	Kongestivno zatajenje srca	1
<b>H</b>	Hipertenzija (trajno povišen krvni tlak iznad 140/90 mmHg ili pod terapijom)	1
<b>A<sub>2</sub></b>	Dob (stariji od 75 godina)	2
<b>D</b>	Dijabetes melitus	1

<b>S<sub>2</sub></b>	Prethodni moždani udar ili TIA ili tromboembolijski događaj	2
<b>V</b>	Vaskularna bolest (bolest perifernih arterija, IM, aortalni plak)	1
<b>A</b>	Dob od 65-74 godine	1
<b>S</b>	Ženski spol	1

C- congestive heart failure (kongestivno zatajenje srca); H-hypertension (hipertenzija); A-age (dob); D-diabetes mellitus (dijabetes melitus); S<sub>2</sub>-stroke (moždani udar) ili TIA; V-vascular disease (vaskularna bolest); S-sex (spol)

AF je često udružena sa srčanim bolestima. Poznata je udruženost s hipertenzijom, koronarnom bolesti srca, mitralnom stenozom (kao posljedicom reumatske bolesti ili kod prolapsa mitralne valvule), mitralnom regurgitacijom, hipertrofijskom kardiomiopatijom, kongenitalnim bolestima srca, bolestima pluća koja uključuju tumore pluća, PE i sarkoidozu.

AF se može javiti i kod ekscesivnih unosa alkohola <sup>147</sup>.

Najveća opasnost u bolesnika s tim poremećajem srčanoga ritma, je već navedeni povišeni rizik od moždanog udara zbog čega se u prevenciji primjenjuju antikoagulantni lijekovi. Danas je još uvijek, najčešće primjenjivani varfarin.

Dijagnoza AF se temelji na nalazu EKG-a.

### 4.3. Genotipizacija

Farmakogenetičko ispitivanje se za bolesnike u kojih je predviđeno uvođenje terapije po prispjeću farmakogenetičkog nalaza izvodilo u Kliničkoj jedinici za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.

Za genotipizaciju se venepunkcijom posebno uzimalo 5 ml pune krvi s EDTA.

Izdvajanje DNA se provodila metodom isoljavanja prema Milleru <sup>153</sup>.

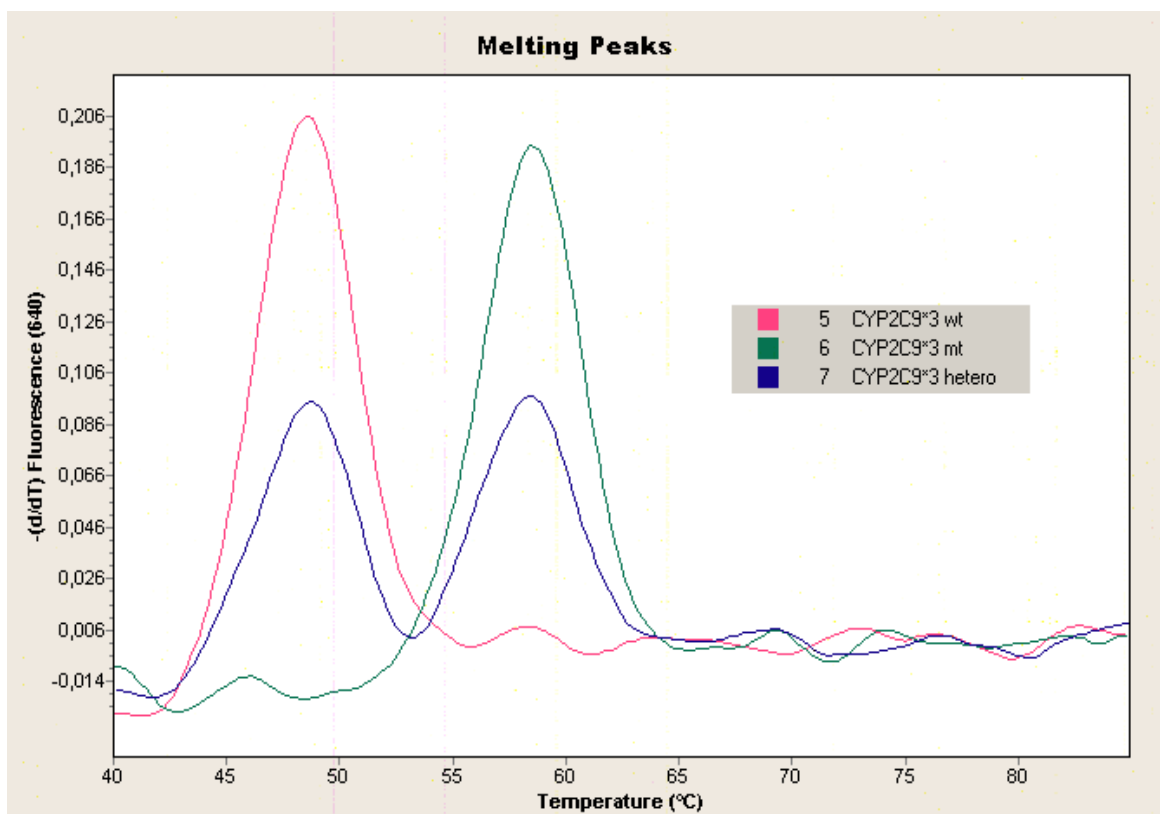
Nalaz je uobičajeno bio gotov unutar radnog vremena, svakako prije započinjanja terapije varfarinom što je poseban uspjeh.

#### 4.3.1. Genotipizacija *CYP2C9*

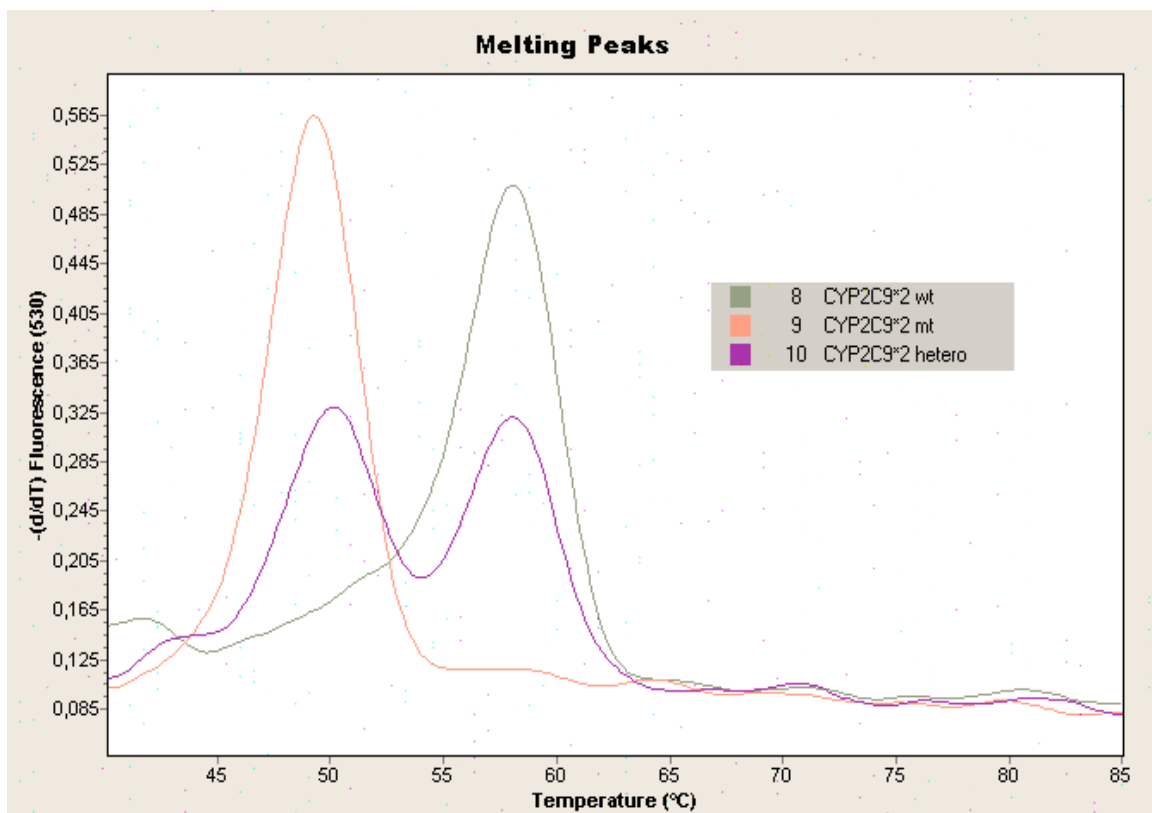
Genotipizacija *CYP2C9*\*2 (*rs1799853*) i *CYP2C9*\*3 (*rs1057910*) se provodila metodom polimerazne lančane reakcije - PCR (od engl. *polymerase chain reaction*) u stvarnom vremenu uz korištenje reagensa TIB MOLBIOL *LightMix*® na uređaju Roche *LightCycler*® prema metodi koju su opisali Toriello i suradnici <sup>154</sup>.

Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu, u volumenu od 20µL sadržava: *LightMix*® *CYP2C9*\*2 \*3 2µl, *Fast Start DNA Master HybProbe master mix* 2µl, MgCl<sub>2</sub> (25mM) 1,2µl, H<sub>2</sub>O sterilna destilirana 9,8 µl, 5 µl DNA (500 ng DNA).

Uvjeti PCR: denaturacija na 95°C 10 min; amplifikacija u 45 ciklusa na 95°C 5 s, 60°C 10 s i 72°C 15 s; analiza temperature taljenja na 95°C 20 s, 40°C 20 s, 85°C; hlađenje 40°C 30 s.



SLIKA 4.3.1.1. Analiza *CYP2C9*\*3: \*1/\*1 50,5° C  
\*1/\*3 50,5° C, 58,3° C  
\*3/\*3 58,3° C



SLIKA 4.3.1.2. Analiza *CYP2C9\*2*:  
 \*1/\*1 58,5° C  
 \*1/\*2 58,5° C, 48,3° C  
 \*2/\*2 48,3° C

#### 4.3.2. Genotipizacija *MDR1/ABCB1*

Za analizu polimorfizma *ABCB1* 2677G>T/A (*rs2032582*) primijenjena je metoda opisana u literaturi<sup>155</sup>.

Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu, u volumenu od 10 µL sadržava:

*Fast Start DNA Master HybProbe master mix* 1x; 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 µM svake početnice; 0,1 µM *anchor probe*; 0,05 µM *sensor probe*; 0,5 µL PBS; 0,5 µL DMSO; 500 ng DNA.

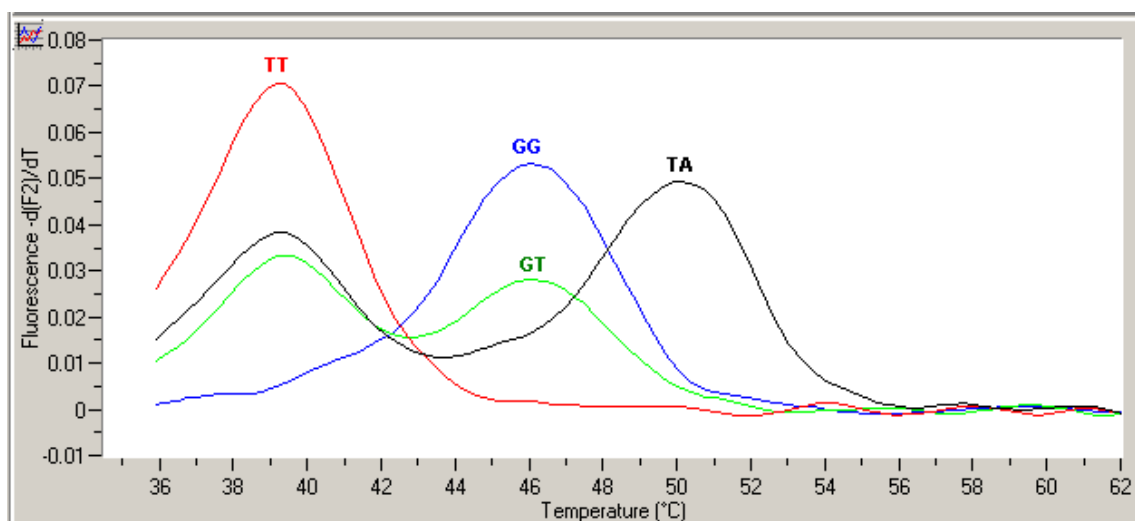
Uvjeti PCR: denaturacija na 94°C 10 min; amplifikacija u 45 ciklusa na 94°C, 58°C 10 s i 72°C 15 s; analiza temperature taljenja na 94°C 20 s, 32°C 20 s, 70°C; hlađenje 40°C 30 s.

Za analizu polimorfizma *ABCB1* 3435C>T (*rs1045642*) primijenjena je metoda PCR u stvarnom vremenu prema opisu von Ahsen i suradnika iz 2001. godine<sup>156</sup>.

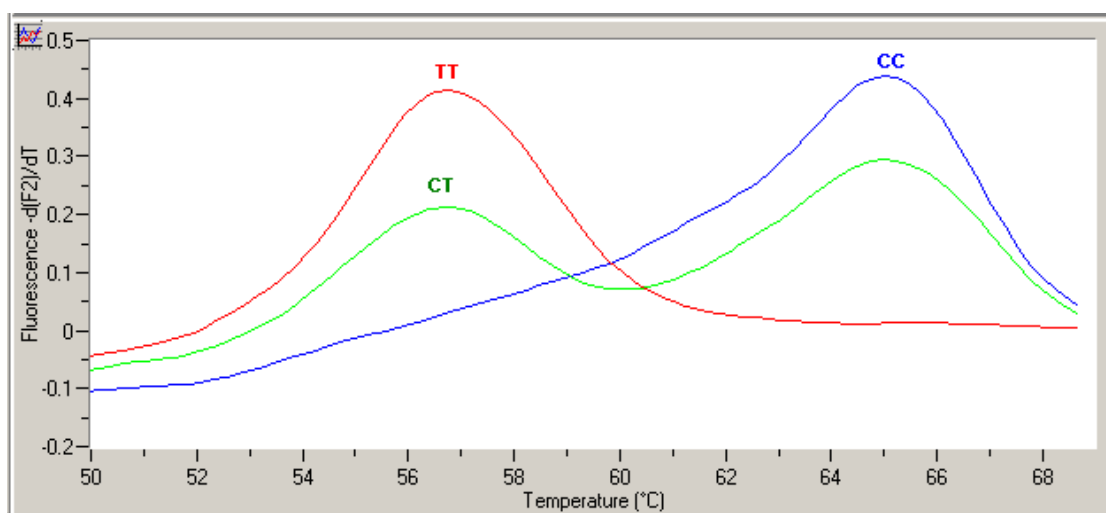
Reakcijska smjesa za PCR u stvarnom vremenu, u volumenu od 10 µL sadržava:

*Fast Start DNA Master HybProbe master mix* 1x; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 μM svake početnice; 0,3 μM *sensor probe*; 0,1 μM *anchor probe*; 100 ng DNA.

Uvjeti PCR: denaturacija na 95°C 10 min; amplifikacija u 45 ciklusa na 95°C, 55°C 5 s i 72°C 10 s; analiza temperature taljenja na 95°C, 45°C 5 s, 75°C; hlađenje 40°C 30 s.



SLIKA 4.3.2. 1. Analiza *ABCB1 G2677T/A* - TT 39° C  
 GT 39° C, 46° C  
 GG 46° C  
 TA 39° C, 51° C

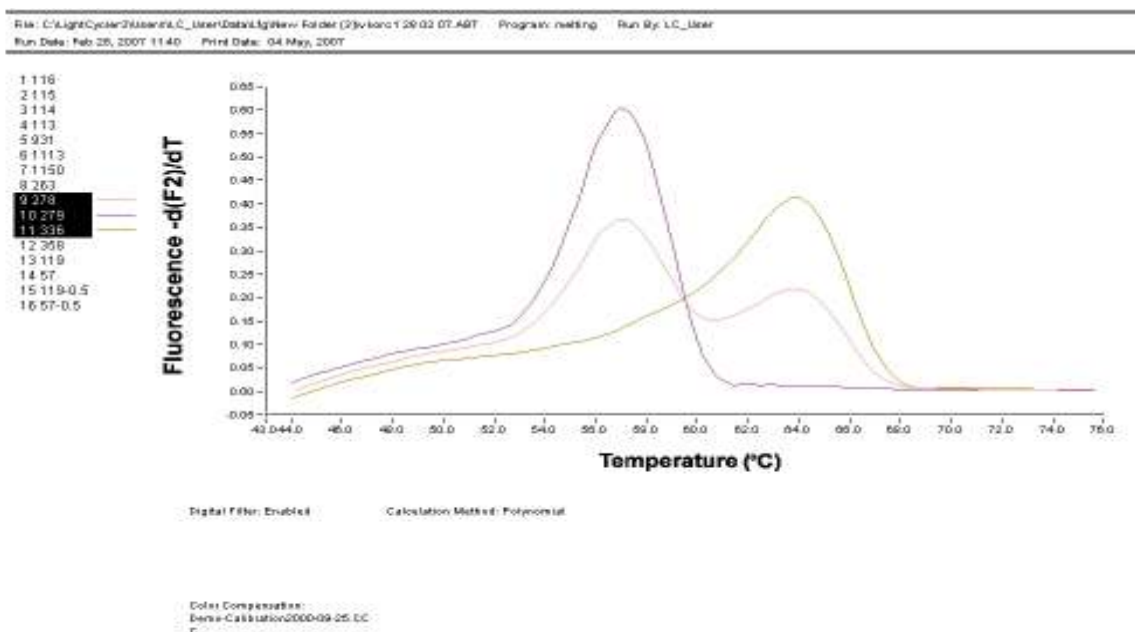


SLIKA 4.3.2.2. Analiza *ABCB1 C3435T*: - .CC 65° C  
 -CT 55° C, 65° C  
 -TT 55° C



### 4.3.3. Genotipizacija *VKORCI*

Genotipizacija *VKORCI* se provodila metodom PCR u stvarnom vremenu („Real time PCR“), koristeći TIB MOLBIOL LightMix® u aparatu Roche LightCycler.



SLIKA 4.3.3.1. Analiza *VKORCI 1173C>T*: CC 65° C  
CT 55° C 65° C  
TT 55° C

## 4.4. Statistička obrada

Razina statističke značajnosti određena je na  $p < 0.05$ , i svi intervali pouzdanosti dani su na razini od 95%. U svim slučajevima upotrebljavani su dvokračni (engl. two-tail) testovi statističke značajnosti. Normalnost raspodjela provjeravana je Kolmogorov Smirnov testom u slučaju uzoraka većih od 30, ili Shapiro – Wilk testom u slučaju uzoraka manjih od 30. Kao mjere centralne tendencije i raspršenja korišteni su medijan i interkvartilni raspon, odnosno aritmetička sredina i standardna devijacija u slučajevima u kojima je bila potrebna veća preciznost prikaza rezultata. Statistički značajna povezanost dvije nominalne varijable

(primjerice razlika u postizanju ciljnih vrijednosti INR između pokusne i kontrolne skupine), provjeravana je hi-kvadrat testom, pri čemu je uz statistički značajne rezultate, kao standardna mjera veličine učinka dan phi koeficijent u slučaju dihotomnih varijabli, ili koeficijent kontingencije u slučaju varijabli s više od dvije kategorije.

U analizi razlika srednjih vrijednosti neovisnih grupa na kontinuiranoj, numeričkoj varijabli (primjerice razlika u prosječnim dozama varfarina između pokusne i kontrolne skupine u pojedinim točkama mjerenja) upotrijebljen je Mann - Whitney test, pri čemu je, uz statistički značajne rezultate kao standardna mjera veličine učinka dan AUC. Interakcija vremena mjerenja i skupine analizirana je mješovitom analizom varijance, pri čemu je kao standardna mjera veličine učinka dan  $\eta^2$ . Homogenost varijanci kod mješovite analize varijance testirana je Mauchlyjevim testom za procjenu sferičnosti. U slučaju u kojemu homogenost varijanci, kao preduvjet analize varijance, nije bila zadovoljena, korištena je Greenhouse - Geiserova korekcija stupnjeva slobode koja prilagođava stupnjeve slobode u ANOVA modelima, kako bi se proizvela što točnija razina statističke značajnosti.

Jednosmjerna predviđanja postizanja stabilnosti antikoagulacijskog učinka provedena su pomoću logističke regresijske analize i korišten je omjer izgleda (eng. odds ratio) uz 95% interval pouzdanosti (eng. confidence interval) za svaku varijablu. Povezanost binarne zavisne varijable s više prediktora, nezavisnih varijabli mjerenih na različitim ljestvicama provjeravana je multivarijatnom, binarnom logističkom regresijom. Sve statističke obrade obavljene su u paketu SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. REZULTATI

### 5.1. Ispitanici

#### 5.1.1. Demografske osobine

Tablica 5.1.1.1. donosi demografske podatke ispitivane skupine (skupine ispitanika s farmakogenetičkim podacima – FG) i kontrolne skupine (bez farmakogenetičkih podataka – NFG).

Tablica 5.1.1.2. donosi razlike između pokusne i kontrolne skupine u demografskim osobinama.

TABLICA 5.1.1.1. Demografske osobine bolesnika (ispitanika) obje skupine

	FG skupina (n=106)		NFG skupina (n=99)	
Dob	70	(53-77)	73	(59-81)
Spol, n (%)				
muškarci	55	(51.9)	43	(43.4)
žene	51	(48.1)	56	(56.6)
Indeks tjelesne mase (BMI)*	27	(24-30)	26	(23-29)
Pušenje, n (%)	16	(15.1)	11	(11.1)
Unos alkohola, n (%)	14	(13.2)	9	(9.1)
Indikacija za varfarin, n (%)				
atrijska fibrilacija	30	(28.3)	32	(32.3)
dubinskovenska tromboza	62	(58.5)	61	(61.6)
plućna embolija	16	(15.1)	24	(24.2)
Vrijednost AST	23	(18-29)	24	(19-34)
Vrijednost ALT	25	(17-36)	22	(14-34)
Vrijednost GGT	30	(18-51)	31	(19-64)
Vrijednost bilirubin	13	(9-20)	11	(8-16)
Vrijednost ureje	6	(4-8)	5	(4-7)
Vrijednost kreatinina	97	(85-118)	102	(90-124)

Vrijednosti su predstavljene kao median (interkvartilni raspon) ako nije drugačije navedeno.

BMI je izračunat prema formuli  $\text{kg/m}^2$

BMI (od engl- Body Mass Indeks)-Indeks tjelesne mase

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

TABLICA 5.1.1.2. Razlika u demografskim osobinama između pokusne i kontrolne skupine

	<b>FG skupina N (%)</b>	<b>NFG skupina N (%)</b>	<b>P</b>
<b>DOB</b> (medijan; IQR)	70 (53-77)	73 (59-81)	0.086
<b>SPOL</b>			
Muški	54 (51.9)	43 (43.4)	0.112
Ženski	52 (48.1)	56 (56.6)	
Ukupno	106 (100.0)	99 (100.0)	
<b>BMI</b> (median; IQR)	26.9 (24.2-30.5)	26.2 (23.4-29.1)	0.264
<b>BMI (N; %)</b>			
<25.00	34 (31.8)	33 (34.7)	0.540
25.00-29.99	43 (40.9)	43 (45.3)	
>30.00	29 (27.3)	19 (20.0)	
Ukupno	88 (100.0)	95 (100.0)	
<b>PUŠENJE</b>			
Ne	88 (83.7)	88 (88.9)	0.399
Da	18 (16.3)	11 (11.1)	
Ukupno	106 (100.0)	99 (100.0)	
<b>ALKOHOL</b>			
Ne	91 (85.9)	90 (90.9)	0.365
Da	15 (14.1)	9 (9.1)	
Ukupno	106 (100.0)	99 (100.0)	

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon; P =  $\chi^2$  test za nominalne varijable, Mann - Whitney za numeričke, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

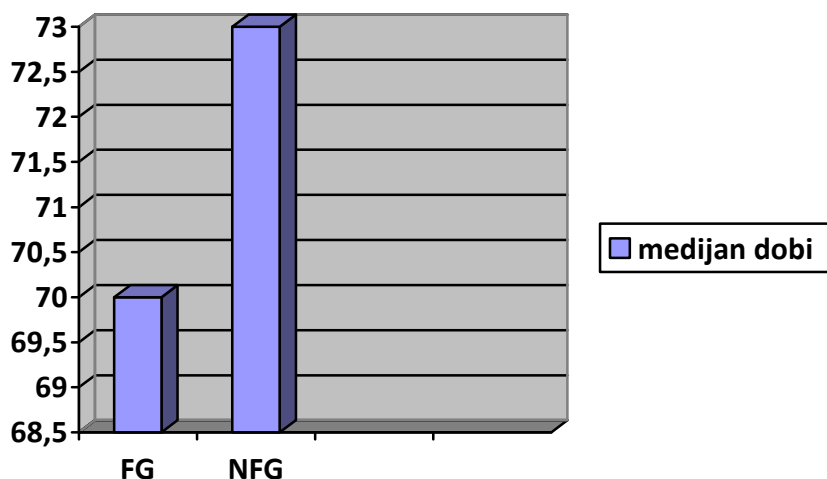
BMI (od engl- Body Mass Indeks)-Indeks tjelesne mase

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

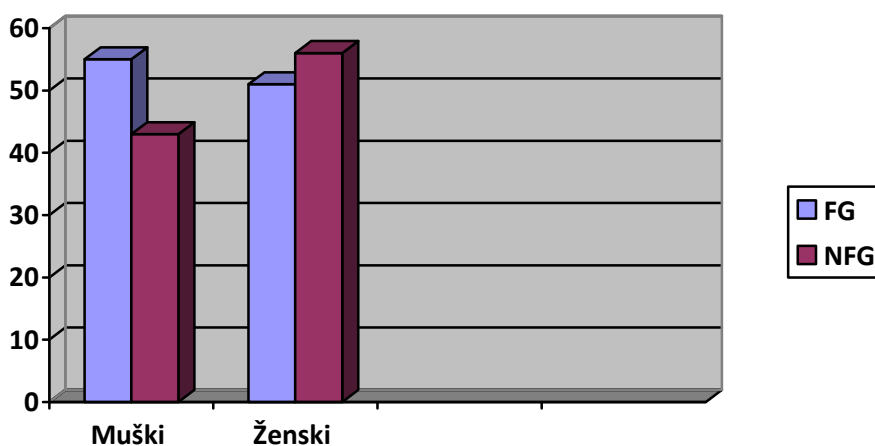
U ovo prospektivno kontrolirano istraživanje je bilo uključeno 205 bolesnika oba spola starijih od 18 godina. Prema dobi bolesnici su bili prosječne dobi (medijan; interkvartilni raspon) od 71 godine (raspon 53 godina - 81 godina). Najmlađi bolesnik je imao

19 godina, a najstariji 90 godina. Unutar pokusne skupine medijan dobi bio je 70 godina (53-77 godina), dok je unutar kontrolne skupine medijan bio 73 godine (59-81 godina). Prema dobi su dakle pokusna i kontrolna skupina bile slične ( $P=0,086$ ).



SLIKA 5.1.1.1. Medijan dobi ispitanika u FG i NFG skupini  
 FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
 NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Muških ispitanika je bilo 55 (51,9 %) u pokusnoj skupini i 43 (43,4 %) u kontrolnoj skupini, dok je ispitanica bilo 51 (48,1%) u pokusnoj i 56 (56,6 %) u kontrolnoj skupini. Nije bilo statističke razlike ni u raspodjeli po spolu između dviju skupina.



SLIKA 5.1.1.2. Raspodjela ispitanika prema spolu u FG i NFG skupini  
FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

### 5.1.2. Bolesnici i tjelesna težina

U svih ispitanika bilježila se tjelesna težina koja prema brojnim radovima ima značajnu prediktivnu vrijednost u odnosu na dozu varfarina i bolesnici s povećanom tjelesnom težinom uobičajeno zahtijevaju veće doze varfarina pa se u njih i započinje terapija s višim dozama. U našem ispitivanju se istodobno bilježila i tjelesna visina kako bi se računao indeks tjelesne mase (BMI).

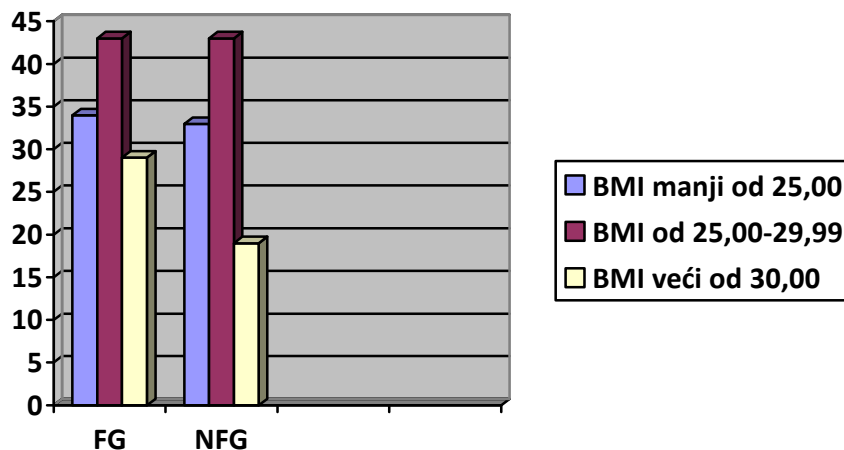
Formula izračuna BMI je dobro poznata i rabi se u svim ispitivanjima u kojima se tjelesna težina korelira s traženim parametrima.

Formula za  $BMI = \text{kg/m}^2$ <sup>157</sup>. Tjelesna težina se dijeli s kvadratom tjelesne visine.

Bolesnici su prema BMI podijeljeni u tri skupine:

1. BMI do 25,00  $\text{kg/m}^2$
2. BMI od 25 do 29,99  $\text{kg/m}^2$
3. BMI preko 30,00  $\text{kg/m}^2$ .

U ispitivanim skupinama najviše je bilo bolesnika u skupini s BMI od 25,00-29,99 što već predstavlja pretila bolesnike i to 43 bolesnika u pokusnoj skupini (40,9%) i 43 u kontrolnoj (45,3%) skupini. Manji je broj bolesnika bio u skupini s BMI <25,00. U pokusnoj skupini 34 bolesnika (31,80%) i 33 (34,7%) bolesnika u kontrolnoj skupini. Najmanji broj je bio izraženo pretilih bolesnika (skupina s BMI >30,00) u obje skupine. U pokusnoj skupini bilo ih 29 (27,3%) a u kontrolnoj 19 (20,0%). Medijan BMI je u FG skupini iznosio 27 (24-30), dok je u NFG skupini iznosio 26 (23-29).



SLIKA 5.1.2.1. Raspodjela bolesnika prema BMI podskupinama u FG i NFG skupini  
 BMI (od engl- Body Mass Indeks)-Indeks tjelesne mase  
 FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
 NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

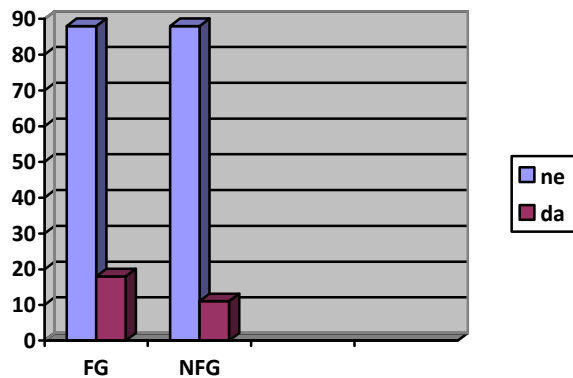
Dakle nije bilo razlike u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prema tjelesnoj težini, odnosno prema BMI.

### 5.1.3. Bolesnici i navike pušenja i uzimanja alkohola

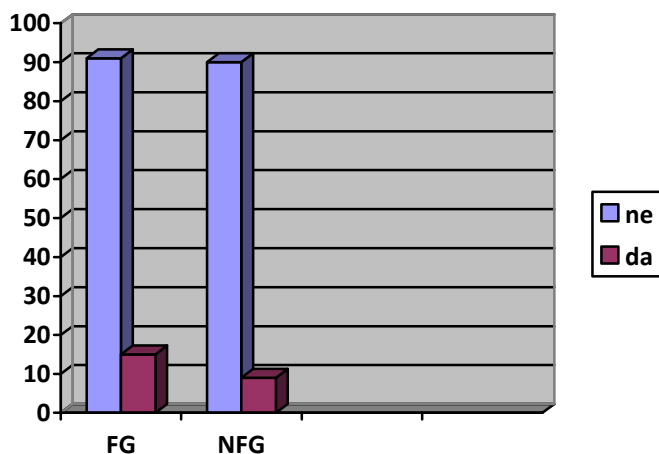
Kako pušenje predstavlja mogući utjecaj na postizanje terapijskih vrijednosti INR zbog indukcije jetrenih enzima, bolesnike smo stratificirali i prema pušenju te u upitniku bilježili podatke o pušenju. U FG skupini bilo je 18 pušača (15,1%) dok ih je u NFG skupini bilo 11 (11,1%).

Alkohol također inducira jetrene enzime te bi na taj način i konzumiranje alkohola moglo imati utjecaja na doziranje varfarina i postizanje terapijskih vrijednosti parametara koagulacije. Prema anamnestičkim podacima i podacima iz povijesti bolesti, alkohol je konzumiralo u FG skupini svega 15 bolesnika (13,2%), a u NFG skupini 9 (9,1%) bolesnika.

Razlika u obje skupine iznosila za pušenje  $P=0,399$  i za konzumiranje alkohola  $P=0,365$ .



SLIKA 5.1.3.1. Broj pušača i nepušača u FG i NFG skupini  
 FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
 NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima



SLIKA 5.1.3.2. Broj bolesnika u FG i NFG skupini u odnosu na konzumaciju alkohola  
 FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
 NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Nije utvrđena niti jedna statistički značajna razlika u demografskim obilježjima, BMI, pušenju i konzumiranju alkohola između pokusne i kontrolne skupine.

#### 5.1.4. Laboratorijski nalazi na početku ispitivanja



Bolesnike se također stratificiralo prema laboratorijskim nalazima kod prijema (engl. *baseline data*). Bilježili su se AST, ALT, GGT, ureja, kreatinin kao procjena srčane funkcije na temelju UZV pregleda i kliničke procjene. Navedeni podaci dali su osnovne pokazatelje konkomitantnih bolesti.

Medijan AST u FG skupini bio je 23 U/L, a 24 U/L u NFG skupini. Medijan ALT u FG skupini je iznosio 25 U/L i 22 U/L u NFG skupini. Medijan bilirubina iznosio je 13 U/L u FG skupini i 11 U/L u NFG skupini. Medijan ureje u FG skupini iznosio je na prijemu 6 U/L i 5 U/L u NFG skupini te medijan kreatinina u FG skupini je iznosio 97 U/L i 102 U/L u NFG skupini (tablica 2) i prema medijanu laboratorijskih podataka kod prijema bolesnici su bili jednaki.

TABLICA 5.1.4.1. Razlika u laboratorijskim nalazima između pokusne i kontrolne skupine

	<b>FG skupina N (%)</b>	<b>NFG skupina N (%)</b>	<b>P</b>
<b>RAZINA AST</b>			
Normalna <sup>1</sup>	87 (82,1)	76 (76,8)	0,599
Povišena <sup>1</sup>	19 (17,1)	23 (23,2)	
<b>RAZINA ALT</b>			
Normalna <sup>2</sup>	86 (81,1)	84 (84,4)	0,566
Povišena <sup>2</sup>	20 (18,9)	15 (15,2)	
<b>RAZINA GGT</b>			
Normalna <sup>3</sup>	76 (71,1)	63 (63,6)	0,444
Povišena <sup>3</sup>	30 (28,3)	36 (36,4)	
<b>RAZINA BILIRUBINA</b>			
Normalna <sup>4</sup>	82 (78,1)	85 (85,9)	0,555
Povišena <sup>4</sup>	23 (21,9)	14 (14,1)	
<b>RAZINA UREJE</b>			
Normalna <sup>5</sup>	79 (74,5)	82 (82,8)	0,067
Povišena <sup>5</sup>	27 (25,5)	17 (17,2)	
<b>RAZINA KREATININA</b>			

Normalna <sup>6</sup>	84 (79,2)	70 (70,7)	0,401
Povišena <sup>6</sup>	22 (20,7)	29 (29,3)	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); učinak = standardizirana mjera veličine učinka dana uz statistički značajne rezultate; phi koeficijent uz  $\chi^2$

<sup>1</sup>normalna: muškarci <38 U/L; žene <30 U/L; povišena: muškarci 39+ U/L; žene 31+ U/L

<sup>2</sup>normalna: muškarci <49 U/L; žene <36 U/L; povišena: muškarci 50+ U/L; žene 37+ U/L

<sup>3</sup>normalna: muškarci <55 U/L; žene <35 U/L; povišena: muškarci 56+ U/L; žene 36+ U/L

<sup>4</sup>normalna: 3-20 mmol/L; povišena: >20 mmol/l

<sup>5</sup>normalna: ≤8,3 mmol/l; povišena: >8,3 mmol/l

<sup>6</sup>normalna : muškarci: ≤125 mmol/l; žene ≤107 mmol/l; povišena: muškarci >125; žene >107 mmol/l

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Najveći broj bolesnika imao je uredne vrijednosti AST (82,1% u pokusnoj i 76,8% u kontrolnoj skupini), ALT (81,1% u pokusnoj skupini i 84,8% u kontrolnoj skupini), GGT (71,7% u pokusnoj i 63,6% u kontrolnoj skupini), bilirubina (78,1% u pokusnoj i 85,9% u kontrolnoj skupini), ureje (74,5% u pokusnoj i 82,8% u kontrolnoj skupini) i kreatinina (79,2% u pokusnoj i 70,7% u kontrolnoj skupini). Povišene vrijednosti AST u pokusnoj skupini imalo je 19 (17,1%) bolesnika, a u kontrolnoj 23 (23,2%). Povišene vrijednosti ALT u FG skupini imalo je 20 (16,8%) bolesnika, a u NFG skupini 15 (15,2%). Slično je i razina bilirubina bila u FG skupini povišena u 23 (21,9%) bolesnika, a u 14 (14,1%) u NFG bolesnika. Povišena razina kreatinina bila je u 22 (20,7%) FG bolesnika i 29 (29,3%) NFG bolesnika. Ureja je bila povišena u 27 (25,5%) FG bolesnika, a u 17 (17,2%) NFG bolesnika.

Može se zaključiti kako nisu utvrđene statistički značajne razlike u razini laboratorijskih parametara između pokusne i kontrolne skupine na početku ispitivanja.

Posebno ističemo bolesnike sa zatajenjem srca koji prikazujemo tablično.

TABLICA 5.1.4.2. Podjela bolesnika prema srčanoj funkciji

NYHA stupanj	
bez zatajenja	120 (58,5)
I stupanj	16 (7,7)
II stupanj	34 (16,9)
III stupanj	28 (13,6)
IV stupanj	7 (3,3)
<b>ukupno</b>	<b>205 (100)</b>

NYHA klasifikacija je klasifikacija srčanog zatajenja poznatog društva za kardiologiju (New York Heart Association) prema kojem je I stupanj – prisutna bolest srca, ali bez simptoma i bez ograničenja u fizičkoj aktivnosti; II stupanj - blagi simptomi (blaži nedostatak zraka i/ili angina) i

blaže ograničenje tijekom uobičajenih aktivnosti; III stupanj – značajnije ograničenje čak i manje zahtjevnih aktivnosti; IV stupanj – ozbiljna ograničenja, simptomi i tijekom mirovanja, bolesnici uglavnom u krevetu.

TABLICA 5.1.4.3. Razlika ispitanika prema srčanom zatajivanju u obje skupine

	FG skupina	NFG skupina	P; učinak
	n (%)	n (%)	
NYHA klasifikacija zatajenja srca			
bez zatajenja srca	57 (57,6)	63 (63,6)	<b>0,178</b>
zatajenje srca	49 (42,4)	36 (35,4)	
ukupno	106 (100,0)	99 (100,0)	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); učinak = standardizirana mjera veličine učinka dana uz statistički značajan rezultat;  $\phi$  koeficijent za nominalne varijable s dvije kategorije, uz  $\chi^2$  test

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Vidljivo je da 120 bolesnika nije imalo oštećenu srčanu funkciju kod prijama (58,5%), a neki od stupnjeva srčanog zatajivanja 85 bolesnika (41,5%).

Budući da u pojedinim kategorijama težine simptoma zatajenja srca nije bilo dovoljno sudionika za valjanu obradu, u daljnjoj obradi se ta varijabla kodirala kao 0=bez zatajenja srca i 1=zatajenje srca, pri čemu su u kategoriju 1 ušli sudionici bez obzira na težinu simptoma.

Iz tablice 5.1.4.3. može se jasno vidjeti kako nije bilo razlike u broju bolesnika prema srčanom zatajivanju u obje skupine.

## 5.2. Primjena varfarina i drugih lijekova

### 5.2.1. Indikacije za primjenu varfarina

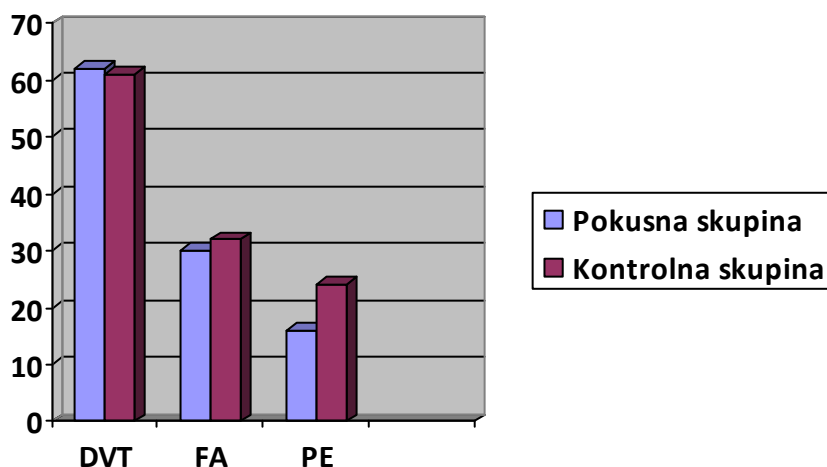
Indikacija za primjenu varfarina ocjenjivala se odmah po prijemu i potvrđivanju dijagnoze koja je bila uzrok hospitalizacije u obje skupine bolesnika.

U obje skupine bila je jednaka učestalost indikacija za primjenu varfarina (vidi tablicu 5.1.1.1.) kod prijama u bolnicu. Najčešći razlog za hospitalizaciju u obje skupine je bila dubinskovenska tromboza (DVT). U FG skupini bilo je 62 bolesnika (58,5%) s DVT dok je u NFG skupini bio 61 bolesnik s DVT (61,6%). Atrijska fibrilacija je bila drugi uzrok po učestalosti prijama i primjenu varfarina u ispitivanim skupinama. Broj bolesnika s AF iznosio je u FG skupini 30 (28,3%), a u NFG skupini 32 (32,3%). Najmanji broj bolesnika imao je na

prijamu plućnu emboliju kao razlog primjene varfarina. U FG skupini bilo je 16 bolesnika s PE (15,1%) a u NFG skupini 24 (24,2%).

Donosimo ispod samo dio tablice 5.1.1.1. (tablica na str 50.) za lakšu orijentaciju broja ispitanika u obje skupine prema dijagnozi kod prijama (indikacija za primjenu varfarina), a ispod toga slikovni prikaz.

Indikacija za varfarin, n (%)				
atrijska fibrilacija	30	(28.3)	32	(32.3)
dubinskovenska tromboza	62	(58.5)	61	(61.6)
plućna embolija	16	(15.1)	24	(24.2)



SLIKA 5.2.1.1. Prikaz bolesnika prema indikaciji za primjenu varfarina  
DVT-dubinskovenska tromboza, FA –fibrilacija atrijska, PE-plućna embolija

### 5.2.2. Istodobna primjena drugih lijekova

Bolesnici su se pratili i s obzirom na istodobno primijenjene lijekove koji, poznato je mogu utjecati na dozu varfarina i na postizanje terapijskih vrijednosti INR zbog interakcija različitih mehanizama. Velika većina bolesnika u obje skupine uz varfarin je tijekom hospitalizacije uzimala barem jedan lijek. Iz tablice 5.2.2.1. vidljivo je da je ukupno u obje skupine 137 ispitanika (66,5%) dobivalo uz varfarin i druge lijekove. Medijan broja

istodobno primijenjenih lijekova bio je 1. Od ukupnog broja bolesnika (205 ili 100%) koji su uzimali dodatni lijek(ove) uz varfarin, 105 bolesnika (50,8% ) je uzimalo još samo 1 ili 2 dodatna lijeka, a 32 bolesnika (15,7%) je uzimalo tri ili više lijekova.

TABLICA 5.2.2.1. Istodobno primijenjeni lijekovi tijekom hospitalizacije

	N (%)
<b>DRUGI LIJEKOVI U TERAPIJI</b>	
Ne	68 (33,7)
Da	137 (66,3)
BROJ DRUGIH LIJEKOVA (medijan, IQR)	1 (0-2)
<b>BROJ DRUGIH LIJEKOVA (N; %)</b>	
Bez lijeka	68 (33,7)
Jedan ili dva	105 (50,6)
Tri ili više	32 (15,7)

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon

Podjela prema broju lijekova u pokusnoj i kontrolnoj skupini pokazala je da nije bilo razlike u uzimanju istodobnih lijekova. U pokusnoj skupini 75 bolesnika (70,7%) je uzimalo uz varfarin i druge lijekove, a u kontrolnoj 62 (62,6%) bolesnika. Pritom je 53 bolesnika (50%) FG ispitanika uzimalo 1 ili 2 lijeka, a 22 ispitanika (20,7%) tri ili više lijekova. U NFG skupini slično, 51 bolesnik (51,5%) je dobivao uz varfarin 1 ili 2 lijeka, a njih 11 (11,1%) tri ili više lijekova.

Lijekovi koje su bolesnici uzimali istodobno s varfarinom su se klasificirali u one koji djeluju inhibitorno na metabolizam varfarina i na one koji su bili značajni induktori metabolizma varfarina.

TABLICA 5.2.2.2. Razlika u korištenju lijekova između pokusne i kontrolne skupine

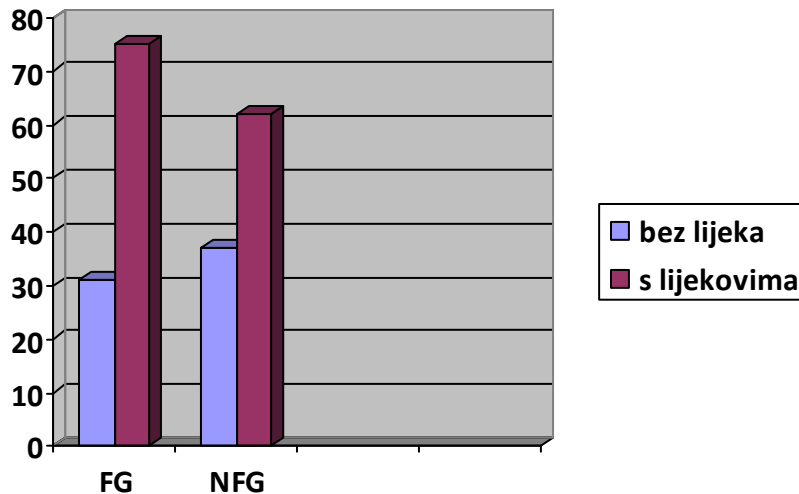
	FG skupina N (%)	NFG skupina N (%)	P
<b>DRUGI LIJEKOVI U TERAPIJI</b>			
Ne	31 (29,3)	37 (37,4)	0,240

Da	75 (70,7)	62 (62,6)	
Ukupno	106 (100,0)	99 (100,0)	
<b>BROJ DRUGIH LIJEKOVA U TERAPIJI</b>			
Bez lijeka	31 (29,3)	37 (37,4)	0,168
Jedan ili dva	53 (50,0)	51 (51,5)	
Tri ili više	22 (20,7)	11 (11,1)	
Ukupno	106 (100,0)	99 (100,0)	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)  
 FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji  
 NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Iz tablice 5.2.2.2. je vidljivo da nije utvrđena statistički značajna razlika u uzimanju drugih lijekova kao i u broju istodobno primijenjenih drugih lijekova između pokusne i kontrolne skupine.

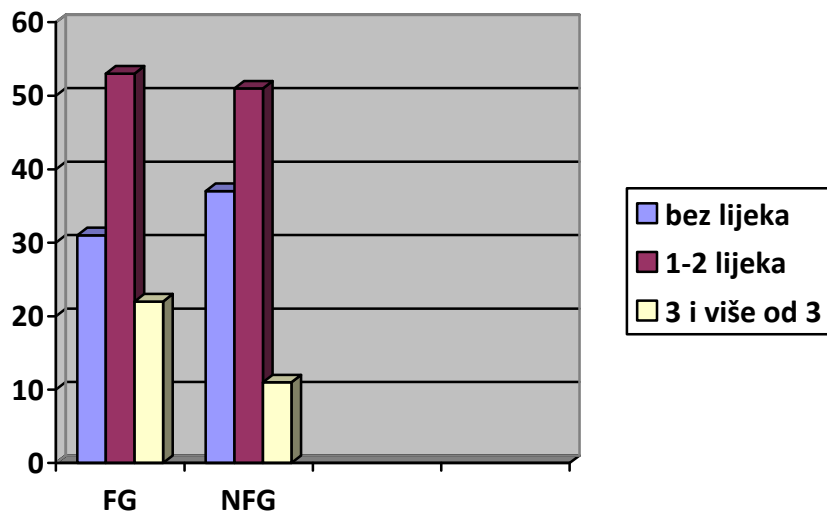
Grafički prikazi istodobno primijenjenih lijekova u obje skupine slika 5.2.2.1. i slika 5.2.2.2.



SLIKA 5.2.2.1. Primjena lijekova u FG i NFG skupini

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima



SLIKA 5.2.2.2. Raspodjela bolesnika u odnosu na broj primijenjenih lijekova u FG i NFG skupini

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Kako je već objašnjeno konkomitantne lijekove smo podijelili u dvije velike skupine inhibitore i induktore metabolizma varfarina, tj. na one koji pojačavaju antikoagulantni učinak i na one lijekove koji smanjuju antikoagulantni učinak.

TABLICA 5.2.2.3. Interakcija s drugim lijekovima (samo sudionici koji su uzimali neke druge lijekove; n=137)

	n	(%)
<b>Inhibitor u terapiji</b>		
ne	122	(89,8)
da	15	(10,2)
ukupno	137	(100,0)
<b>Broj inhibitora u terapiji</b>		
niti jedan	122	(89,8)
jedan	14	(9,4)
dva	1	(0,8)
ukupno	137	(100,0)
<b>Induktor u terapiji</b>		
ne	5	(3,1)
da	132	(96,9)
ukupno	137	(100,0)

Broj induktora u terapiji		
niti jedan	5	(3,1)
jedan	63	(46,5)
dva	40	(29,1)
tri ili više	29	(21,3)
ukupno	137	(100,0)

Od ukupnog broja bolesnika koji su imali neki drugi lijek u terapiji (n=137 bolesnika) u pokusnoj skupini njih je bilo 70, a u kontrolnoj 67. Promatrajući razliku u primjeni lijekova inhibitora i induktora metabolizma CYP enzima (pa tako i varfarina) uočeno je da je daleko veći broj bolesnika u popratnoj terapiji imao induktor CYP enzima nego inhibitor. Inhibitor je u terapiji imalo svega 15 bolesnika, dok je induktor imalo 132 bolesnika.

Razlika između broja lijekova u obje skupine prikazana je u tablici 5.2.2.4.

TABLICA 5.2.2.4. Razlika u broju lijekova inhibitora i induktora u između pokusne i kontrolne skupine (n=137)

	Skupina				P
	FG		NFG		
	n	(%)	n	(%)	
<b>Inhibitor u terapiji</b>					
ne	63	(90,8)	59	(88,7)	0,775
da	7	(9,2)	8	(11,3)	
ukupno	70	(100,0)	67	(100,0)	
<b>Induktor u terapiji</b>					
ne	3	(3,1)	2	(3,2)	>0,999
da	67	(96,9)	65	(96,8)	
ukupno	70	(100,0)	67	(100,0)	
<b>Broj induktora u terapiji</b>					
niti jedan	3	(3,1)	2	(3,2)	0,311
jedan	28	(40,0)	36	(53,2)	
dva	20	(29,2)	19	(29,0)	
tri ili više	19	(27,7)	10	(14,5)	
ukupno	70	(100,0)	67	(100,0)	

KRATICE: P =  $\chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima



Najveći broj bolesnika je imao u obje skupine jedan inductor u terapiji (u FG skupini 28 bolesnika ili 40,0% i u NFG skupini 36 bolesnika ili 53,2%).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti inhibitora i induktora u terapiji, između pokusne i kontrolne skupine.

### 5.2.3. Doza varfarina

Doza varfarina u obje skupine ispitanika bilježila se u više točaka tijekom hospitalizacije. Kako se nije uspjelo u većine bolesnika doći do podataka o dozi i parametrima koagulacije 1, 2 i 4 tjedna nakon otpusta, u analizu je ušlo samo 6 točaka i to prvi, drugi, treći, četvrti, peti dan terapije te na otpustu. U iste dane su se bilježili i postignuti parametri koagulacije.

TABLICA 5.2.3.1. Razlike u dozama varfarina između pokusne i kontrolne skupine u pojedinim točkama mjerenja

DAN	FG N	FG M (SD)	NFG N	NFG M (SD)	P; učinak
<b>1. dan</b>	88	5,4 (1,48)	94	5,6 (1,28)	0,352
<b>2. dan</b>	88	5,1 (1,71)	93	5,3 (1,57)	0,514
<b>3. dan</b>	88	5,1 (2,55)	92	5,1 (2,53)	0,973
<b>4. dan</b>	86	5,0 (2,86)	90	4,1 (2,53)	<b>0,026:0,41</b>
<b>5. dan</b>	87	4,8 (3,05)	89	4,0 (2,21)	0,170
<b>Otpust</b>	82	4,5 (3,13)	81	4,2 (2,07)	0,840

KRATICE: M = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija; P = Mann - Whitney U test; razina statističke značajnosti, odnosno, vjerojatnost pogreške tipa I (alpha); učinak = standardizirana mjera veličine učinka dana uz statistički značajne rezultate; AUC uz Mann - Whitney U test

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

Jedina statistički značajna razlika u prosječnoj dozi varfarina između pokusne i kontrolne skupine utvrđena je u 4. danu terapije varfarinom (Mann - Whitney U = 3142,5; Z = -2,189; P = 0,026; AUC = 0,41), pri čemu su sudionici pokusne skupine primali veće doze varfarina.

Iako zbog odstupanja od pretpostavke o normalnoj distribuciji rezultata nije opravdano koristiti aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju kao mjere centralne tendencije i raspršenja, već medijan i interkvartilni raspon, u ovom su slučaju korišteni aritmetička sredina i standardna devijacija zbog malog raspona mogućih rezultata (doza), te stoga, zbog veće preciznosti prikaza rezultata.

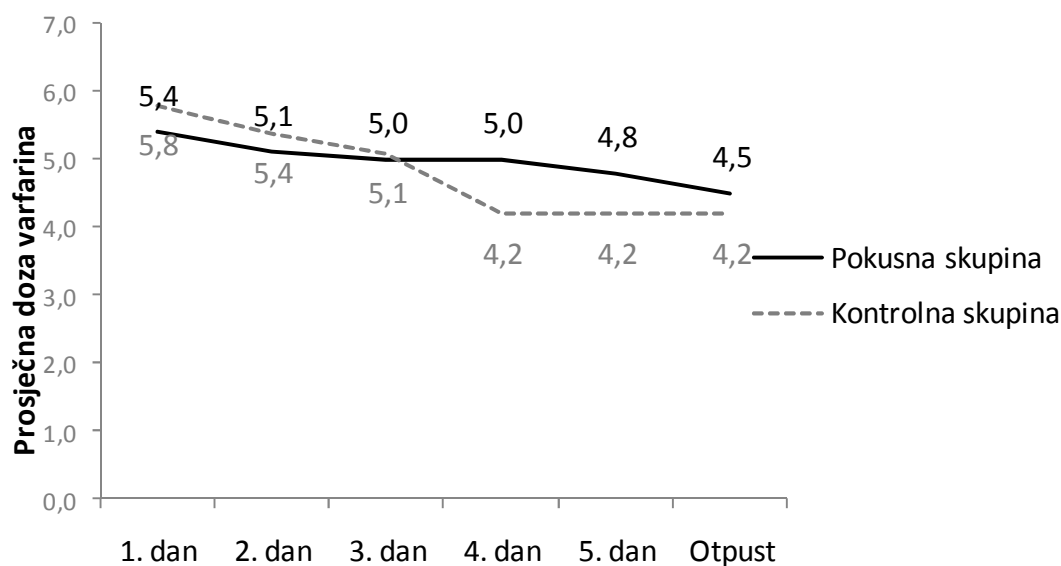
TABLICA 5.2.3.2. Razlike u dozi varfarina između šest točaka mjerenja u pokusnoj i kontrolnoj skupini

Izvor varijance	F	ss	P	$\eta^2$
Vremenska točka mjerenja	12,783	3,371	<0,001	0,074
Vremenska točka mjerenja*skupina	2,827	3,371	0,032	0,017

KRATICE: F = F-omjer; P = ANOVA za ponovljena mjerenja, vjerojatnost pogreške tipa I (alpha);  $\eta^2$  = mjera učinka dana uz F-omjer

Budući da je Mauchlyjev test za procjenu sferičnosti ukazao kako pretpostavka o homogenosti kovarijanci nije zadovoljena (Mauchlyjev W = 0,297;  $\chi^2=190,820$ ; P<0,000), korištena je Greenhouse – Geisserova korekcija stupnjeva slobode. Nakon što su u obzir uzete doze varfarina tijekom 1. dana, 2. dana, 3. dana, 4. dana, 5. dana terapije i otpusta, utvrđena je statistički značajna razlika u dozi varfarina između šest točaka mjerenja (F=12,783; ss = 3,371; P<0,001;  $\eta^2 = 0,074$ ), pri čemu se, na ukupnom uzorku prosječna doza varfarina smanjuje tijekom šest točaka mjerenja. Bonferronijevim post-hoc testom utvrđeno je kako se doza varfarina dana prvi dan statistički značajno razlikuje od doze varfarina četvrtog, petog i šestog dana (P<0,001 za sve tri usporedbe), te se doza varfarina dana drugi dan razlikuje od doze petog dana (P=0,008) i doze šestog dana (P=0,001), i doza varfarina trećeg dana razlikuje se od doze varfarina šestog dana (P=0,015).

Utvrđena je i statistički značajna interakcija vremenske točke mjerenja i pripadnosti pokusnoj ili kontrolnoj skupini na dozu varfarina, odnosno, doza varfarina razlikovala se statistički značajno kroz šest točaka mjerenja između pokusne i kontrolne skupine (mješovita ANOVA; F=12,503; ss= 3,371; P = 0,032;  $\eta^2 = 0,017$ ). Sudionici pokusne skupine primali su manju dozu varfarina od sudionika kontrolne skupine do 3. dana terapije varfarinom, a nakon 3. dana terapije prosječna doza varfarina smanjuje se kod kontrolne skupine, a povećava kod pokusne.



SLIKA 5.2.3.1. Prosječna doza varfarina kroz šest točaka mjerenja s obzirom na skupinu

Iz slike 5.2.3.1. je vidljivo kako je razlika u dozi varfarina između pokusne i kontrolne skupine najveća 4. dan terapije. Kod kontrolne skupine nakon 3. dana terapije dolazi do naglog pada prosječne doze, dok je kod pokusne skupine razina doze stabilna.

#### 5.2.4. Postizanje ciljnog INR

Ciljni INR je bio od 2,0-3,0 (2,0-4,0) i pratio se zajedno s dozom varfarina kroz najmanje 6 točaka, 5 dana za redom te na dan otpusta (koji je bio različit u pojedinim bolesnika). Nije se posebno bilježilo koji je dan od početka primjene varfarina bio dan otpusta zbog velikog rasapa podataka. Također u ispitivanju su se bilježile još vrijednosti parametara koagulacije kao i doza varfarina 1. tjedan, 2. tjedan i 4. tjedan nakon otpusta no zbog otežanog praćenja i shodno tomu, premalo podataka, te su se točke praćenja isključile iz analize.

TABLICA 5.2.4.1. Prosječne vrijednosti INR kroz šest točaka mjerenja

	n	medija n	(IQR)
1. dan	179	1,0	(1-1,1)
2. dan	176	1,1	(1-1,3)
3. dan	187	1,3	(1,1-1,7)
4. dan	185	1,5	(1,2-2,1)
5. dan	179	1,8	(1,4-2,2)
otpust	161	2,0	(1,6-2,5)
Prosjek svih točaka mjerenja	188	1,5	(1,3-1,8)

KRATICE: IQR = interkvartilni raspon

Terapijska vrijednost INR postigla se na otpustu, iako se i 5. dan mjerenja bilježe klinički zadovoljavajuće vrijednosti INR.

TABLICA 5.2.4.2. Postizanje stabilnog antikoagulacijskog učinka (INR 2,0-4,0 u najmanje dvije točke mjerenja) do otpusta s obzirom na dijagnozu kod prijema i prateće bolesti (samo pokusna skupina; n=106)

	DA /N(%)	NE/N(%)	Ukupno/N(%)	ORuv 95%CI
<b>AF</b>				
ne	16 (23,2)	53 (76,8)	69 (100,0)	1
da	12 (54,5)	10 (45,5)	22 (100,0)	<b>4,0 (1,45-10,90)</b>
<b>DVT</b>				
ne	16 (44,4)	20 (55,6)	36 (100,0)	1
da	12 (21,8)	43 (78,2)	55 (100,0)	<b>0,4 (0,14-0,87)</b>
<b>Zatajenje srca</b>				
Bez zatajenja	10	43	53	1
zatajenje	18	20	38	<b>3,9 (1,52-9,88)</b>
<b>PE</b>				
ne	23 (29,5)	54 (70,1)	77 (100,0)	1
da	5 (38,5)	9 (64,3)	14 (100,0)	1,3 (0,39-4,32)

KRATICE: OR = omjer izgleda (od engl. odds ratio); 95% CI = 95% interval pouzdanosti za omjere izgleda (od engl. confidence interval), uv = univarijatna logistička regresija  
 AF -atrijska fibrilacija; DVT-dubinskovenska tromboza; PE-plućna embolija

Sudionici koji su imali atrijsku fibrilaciju imali su 4 puta veće izgleda za postizanjem stabilnosti antikoagulacijskog učinka, u odnosu na sudionike koji nisu imali atrijsku fibrilaciju (OR = 4,0; 95% CI = 1,45-10,90), dok su sudionici s dubinskovenskom trombozom imali 0,6 puta manje izgleda za postizanjem stabilnosti INR, u odnosu na sudionike koji nisu imali duboku vensku trombozu (OR = 0,4; 95% CI = 0,14-0,87). Sudionici sa zatajenjem srca imali su 3,9 puta veće izgleda za postizanjem stabilnog antikoagulacijskog učinka, u odnosu na sudionike bez zatajenja srca (OR = 3,9; 95% CI = 1,52-9,88).

TABLICA 5.2.4.3. Najvažniji ishodi prvih 5 dana od uvođenja varfarina

	FG skupina (n=106)	NFG skupina (n=99)	P	Učinak	95% CI
<b>Ukupni uzorak</b>					
Postotak vremena unutar INR (2-4)	14 (19,2)	16 (19,0)	0,513	MD-2	(-7-4)
Postignute stabilne doze*, n (%)	22 (20,8)	22 (22,2)	0,798	OR 0,92	(0.45-1.88)
Nuspojave	8 (7,5)	5 (5,1)	0,464	OR 1,54	(0.44-5.63)
<b>Atrijska fibrilacija†</b>					
Postotak vremena unutar INR (2-4)	26 (25,0)	14 (18,6)	<b>0,04</b>	MD 12	(0-23)
Postignute stabilne doze, n (%)	14 (46,7)	7 (21,9)	<b>0.039</b>	OR 3,13	(0.92-10.98)
Nuspojave, n (%)	3 (10,0)	2 (6,3)	0.588	OR 1,67	(0.2-15.67)
<b>DVT ‡</b>					
Postotak vremena unutar INR (2-4)	11 (16,1)	16 (20,2)	0,083	MD -6	(-12-1)
Postignute stabilne doze*, n (%)	8 (12,9)	14 (23,0)	0,146	OR 0,5	(0.17-1.41)
Nuspojave, n (%)	4 (6,5)	2 (3,3)	0,414	OR	(0.3-16.73)
<b>PE §</b>					
Postotak vremena unutar INR (2-4)	18 (25,0)	21 (19,0)	0,637	MD -3	(-18-11)
Postignute stabilne doze, n (%)	4 (25,0)	7 (29,2)	0,772	OR 0,81	(0.15-4.15)
Nuspojave, n (%)	1 (6,3)	2 (8,3)	0,806	OR 0,73	(0.02-11.96)

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost (standardna devijacija) ako nije drukčije navedeno

MD = srednja vrijednost između FG i NFG skupine; OR = omjer rizika za postizanje stabilne doze ili nuspojava u FG skupini

FG-pokusna skupina /skupina u koje se doza računala prema genotipizaciji

NFG-kontrolna skupina /skupina u koje se doza računala prema kliničkim obilježjima

\* stabilna doza se smatra onom kod koje je u 2 mjerenja za redom INR u terapijskom rasponu (2-4)

† broj bolesnika s AF, 30 u FG skupini i 32 u NFG skupini

‡ broj bolesnika s DVT, 62 u FG skupini i 61 u NFG skupini

§ broj bolesnika s PE, 16 u FG skupini i 24 u NFG skupini

Uspoređivanjem ključnih antikoagulacijskih učinaka tj. udjela vremena unutar INR 2-4, postotak postignute stabilne doze varfarina te učestalost nuspojava u dvije ispitivane skupine **nije ustanovljena statistički značajna** razlika između skupine u kojoj je doza varfarina uvedena uz kliničke parametre i prema nalazu genotipizacije *VKORC1* i *CYP2C9* (FG) u odnosu na skupinu u kojoj je doza određena samo na temelju kliničkih parametara (NFG). Međutim kada su testirane podskupine ispitanika u odnosu na dijagnozu kao indikaciju za primjenu varfarina, **statistički značajnu korist od doziranja varfarina prema algoritmu koji je uključivao rezultate genotipizacije je ustanovljena u skupini ispitanika s dijagnozom atrijske fibrilacije (AF)** koji su provodili statistički značajno dulje vrijeme u terapijskom intervalu INR 2-4 ( $p=0,04$ , MD=12, 95% CI 0-23). Ti su ispitanici također u značajno većem postotku postizali stabilnu terapijsku dozu varfarina ( $p=0,039$ , OR=3,13, 95% CI 0,92-10,98) u odnosu na ispitanike u NFG. Opisana korist od genotipizacije nije dokazana u skupini ispitanika s dubokom venskom trombozom (DVT) i plućnom embolijom (PE). Incidencija nuspojava nije se razlikovala u skupinama za bilo koju indikaciju.

### 5.3. Genetika

#### 5.3.1. Učestalost genotipova

U tablici 5.3.1.1. navedena je zastupljenost pojedinih genotipova u ispitivanoj populaciji.

Najveći broj bolesnika imao je genotip *CYP2C9* \*1/\*1 (wt). Njih je bilo 59 (55,7%), nositelja \*1/\*2 bilo je 25 (23,6%), nositelja \*1/\*3 16 (15,1%), onih s \*2/\*2 svega 2 (1,9%) i nositelja \*2/\*3 4 bolesnika (3,8%). Nadalje vidljivo je da je učestalost genotipova *VKORC1* *1173C>T* iznosila: CT 44 (41,5%), CC 44 (41,5%), TT 18 (17%). Za gen *MDR1/ABCB1* *2677G>T/A* je utvrđena učestalost od 52 bolesnika ili 49,5% za GT genotip, 23 ili 21,9% za genotip TT, a 30 bolesnika imalo je genotip GG (28,6%). Genotip *MDR13456C>T* bio je zastupljen u 48 bolesnika (45,3%), genotip TT u 31 bolesnika (29,2%) i genotip CC u 27 bolesnika (25,5%).

TABLICA 5.3.1.1. Genetičke varijacije u FG skupini (n=106)

Genotip	Broj	(%)
<b>CYP2C9</b>		
*1*1	59	(55.7)
*1*2	25	(23.6)
*1*3	16	(15.1)
*2*2	2	(1.9)
*2*3	4	(3.8)
<b>VKORC1 1173C&gt;T</b>		
CT	44	(41.5)
CC	44	(41.5)
TT	18	(17.0)
<b>MDR1 2677G&gt;T/A*</b>		
GT	52	(49.5)
TT	23	(21.9)
GG	30	(28.6)
<b>MDR1 3456C&gt;T</b>		
CT	48	(45.3)
TT	31	(29.2)
CC	27	(25.5)

Kako su fenotipski nositelji genotipova 1\*/3\*, 2\*/2\* i 2\*/3\* slični, u kasnijim analizama su bili grupirani i testirani u odnosu na nositelje genotipa 1\*1\*.

### 5.3.2. Postizanje stabilnog antikoagulacijskog učinka

Stabilni antikoagulacijski učinak mjerio se terapijskim vrijednostima INR u najmanje dvije točke mjerenja. S obzirom da se genotipizacija radila samo u pokusnoj skupini, donosimo pregled postizanja učinka s obzirom na utvrđene genotipove u toj skupini.

TABLICA 5.3.2.1. Postizanje stabilnog antikoagulacijskog učinka (INR 2,0-4,0 u najmanje dvije točke mjerenja) do otpusta s obzirom na genotipove

	Postignut stabilan INR						OR <sub>uv</sub>	95% CI
	da		ne		ukupno			
	n	(%)	n	(%)	n	(%)		
<b>CYP2C9</b>								
1*1	17	(30,4)	39	(69,6)	56	(100,0)	1	
1*2	5	(26,3)	14	(73,7)	19	(100,0)	0,8	(0,25-2,64)
1*3	4	(36,4)	7	(63,6)	11	(100,0)	1,3	(0,34-5,08)

VKORC1							
CC	8	(22,9)	27	(77,1)	35	(100,0)	1
CT	11	(28,9)	27	(71,1)	38	(100,0)	1,4 (0,48-3,95)
TT	9	(50,0)	9	(50,0)	18	(100,0)	<b>3,4 (1,00-11,37)</b>
MDR1							
GG	10	(37,0)	17	(63,0)	27	(100,0)	1
GT	9	(20,0)	36	(80,0)	45	(100,0)	0,4 (0,15-1,24)
TT	9	(50,0)	9	(50,0)	18	(100,0)	1,7 (0,51-5,70)
MDR1 x26							
CC	8	(33,3)	16	(66,7)	24	(100,0)	1
TT	8	(33,3)	16	(66,7)	24	(100,0)	1,0 (0,30-3,32)
CT	12	(27,9)	31	(72,1)	43	(100,0)	0,8 (0,26-2,28)

KRATICE: OR = omjer izgleda (od engl. odds ratio); 95% CI = 95% interval pouzdanosti za omjere izgleda (od engl. confidence interval), uv = univarijatna logistička regresija

Sudionici s TT genotipom VKORC1 gena imali su 3,4 puta veće izgleda za postizanjem stabilnosti INR u odnosu na sudionike s CC genotipom (OR = 3,4; 95% CI = 1,01-11,37).

U daljnjoj univarijatnoj analizi (Tablica 5.3.2.2.) pokazalo se da su sudionici s TT genotipom VKORC1 gena imali 3,4 puta veće izgleda za održavanjem INR 2,0-3,5 u najmanje dvije točke mjerenja do otpusta, u odnosu na sudionike s CC genotipom (OR = 3,38; 95% CI = 1,00-11,37). Također, sudionici s TT genotipom MDR1 gena imali su 4 puta veće izgleda za održavanjem INR 2,0-3,5 u najmanje dvije točke mjerenja do otpusta, u odnosu na sudionike s GT genotipom MDR1 gena (OR = 4,00; 95% CI = 1,23-12,99).

TABLICA 5.3.2.2. Postizanje stabilnog antikoagulacijskog učinka (INR 2,0-4,0 u najmanje dvije točke mjerenja) do otpusta s obzirom na genotipove

	Postignut stabilan INR					OR <sub>uv</sub>	95% CI	
	da		ne		ukupno			
	n	(%)	n	(%)	n			(%)
CYP2C9								
1*2	5	(26,3)	14	(73,7)	19	(100,0)	1	
1*1	17	(30,4)	39	(69,6)	56	(100,0)	1,22 (0,38-3,93)	
1*3	4	(36,4)	7	(63,6)	11	(100,0)	1,60 (0,32-7,91)	
VKORC1								
CC	8	(22,9)	27	(77,1)	35	(100,0)	1	



CT	11	(28,9)	27	(71,1)	38	(100,0)	1,38	(0,48-3,95)
TT	9	(50,0)	9	(50,0)	18	(100,0)	<b>3,38</b>	<b>(1,00-11,37)</b>
MDR1								
GT	9	(20,0)	36	(80,0)	45	(100,0)	1	
GG	10	(37,0)	17	(63,0)	27	(100,0)	2,35	(0,81-6,86)
TT	9	(50,0)	9	(50,0)	18	(100,0)	<b>4,00</b>	<b>(1,23-12,99)</b>
MDR1 x26								
CC	8	(33,3)	16	(66,7)	24	(100,0)	1	
TT	8	(33,3)	16	(66,7)	24	(100,0)	1,0	(0,30-3,32)
CT	12	(27,9)	31	(72,1)	43	(100,0)	0,8	(0,26-2,28)

KRATICE: OR = omjer izgleda (od engl. odds ratio); 95% CI = 95% interval pouzdanosti za omjere izgleda (od engl. confidence interval), uv = univarijatna logistička regresija

Tablica se odnosi na univarijatnu analizu pojedinih gena i u odnosu na tablicu 5.3.2.1. promijenjene su referentne skupine kod gena CYP2C9 i MDR1.

### 5.3.3. Genetičke varijante u odnosu na promatrane parametre

Kako su se u radu svi bolesnici pratili u odnosu na demografska obilježja, kliničke i laboratorijske nalaze, željelo se utvrditi ima li povezanosti tih karakteristika s genotipom u FG skupini.

Najvažniji rezultati koji ukazuju na udruženost genetičkih varijanti sa svim obilježjima koje smo pratili prikazani su u tablici 5.3.3.1. I opet se odnose samo na pokusnu skupinu, FG skupinu (n=106).

TABLICA 5.3.3.1. Udruženost genotipova, demografskih obilježja, navika, kliničkih i laboratorijskih nalaza s postizanjem ciljnog INR (2,0-4,0) tijekom prvih 5 dana terapije (n=106)

	INR (2-4)			Univariatno		Prilagođeno	
	Postignuto	Nije postignuto	Ukupno	OR	(95% CI)	OR	(95% CI)
<b>Genotip</b>							
<i>CYP2C9</i> *							
*1*1	23 (39.0)	36 (61.0)	59 (100.0)	1		1	
*1*2	9 (36.0)	16 (64.0)	25 (100.0)	0.78	(0.33-2.32)	1.89	(0.36-9.95)
*1*3	9 (56.3)	7 (43.8)	16 (100.0)	2.01	(0.66-6.15)	2.70	(0.57-12.88)
<i>VKORCI</i>							
CT	17 (38.6)	27 (61.4)	44 (100.0)	1		1	
CC	16 (36.4)	28 (63.6)	44 (100.0)	0.91	(0.38-2.15)	0.89	(0.22-3.68)
TT	12 (66.7)	6 (33.3)	18 (100.0)	<b>3.18</b>	<b>(1.00-10.06)</b>	<b>20.07</b>	<b>(2.51-160.61)</b>
<i>MDR1</i> †							

GT	20 (38.5)	32 (61.5)	52 (100.0)	1		1
TT	13 (56.5)	10 (43.5)	23 (100.0)	2.08	(0.77-5.63)	<b>34.61 (2.29-522.65)</b>
GG	12 (40.0)	18 (60.0)	30 (100.0)	1.07	(0.43-2.68)	3.12 (0.42-23.42)
<i>MDR1 ex26</i>						
CT	22 (45.8)	26 (54.2)	48 (100.0)	1		1
TT	14 (45.2)	17 (54.8)	31 (100.0)	0.97	(0.39-2.41)	<b>0.08 (0.01-0.97)</b>
CC	9 (33.3)	18 (66.7)	27 (100.0)	0.59	(0.22-1.58)	0.28 (0.04-2.05)
<b>Demografija i navike</b>						
Dob u god†	74 (60-78)	66 (49-75)			<b>1.02 (1.00-1.05)</b>	0.99 (0.95-1.04)
Spol						
muškarci	19 (34.5)	36 (65.5)	55 (100.0)	1		1
žene	26 (51.0)	25 (49.0)	51 (100.0)	1.97	(0.90-4.30)	3.37 (0.91-12.49)
Indeks tjelesne mase §	27 (24-29)	27 (24-31)		0.98	(0.90-1.06)	0.92 (0.80-1.05)
Pušenje						
ne	41 (45.6)	49 (54.4)	90 (100.0)	1		1
da	4 (25.0)	12 (75.0)	16 (100.0)	0.40	(0.12-1.30)	0.15 (0.02-1.24)
Alkohol konzumacija						
ne	40 (43.5)	52 (56.5)	91 (100.0)	1		1
da	5 (35.7)	9 (64.3)	14 (100.0)	0.72	(0.23-2.32)	2.47 (0.44-14.01)
<b>Indikacija za varfarin</b>						
AF						
ne	27 (35.5)	49 (64.5)	76 (100.0)	1		1
da	18 (60.0)	12 (40.0)	30 (100.0)	<b>2.72 (1.14-6.49)</b>		1.02 (0.08-13.85)
DVT						
ne	22 (50.0)	22 (55.0)	44 (100.0)	1		1
da	23 (37.1)	39 (62.9)	62 (100.0)	0.59	(0.27-1.29)	1.11 (0.12-9.89)
PE						
ne	38 (42.2)	52 (57.8)	90 (100.0)	1		1
da	7 (43.8)	9 (56.3)	16 (100.0)	1.06	(0.36-3.11)	0.48 (0.03-7.02)
<b>Klinički i laboratorijski</b>						
AST‡	22 (18-28)	23 (18-32)		1.00	(0.99-1.01)	0.27 (0.04-1.83)
ALT‡	22 (16-36)	25 (17-39)		0.99	(0.99-1.01)	9.23 (1.23-67.88)
GGT‡	27 (16-47)	34 (22-57)		0.99	(0.99-1.00)	0.24 (0.05-1.07)
Bilirubin‡	13 (10-21)	14 (9-19)		1.02	(0.99-1.06)	2.05 (0.34-12.49)
Urea‡	6 (5-10)	5 (4-7)		1.03	(0.96-1.12)	0.95 (0.24-3.71)
kreatinin‡	92 (85-118)	99 (87-119)		1.00	(0.99-1.01)	0.94 (0.21-4.21)
KZS u anamnezi						
ne	22 (34.4)	42 (65.6)	64 (100.0)	1		1
da	23 (54.8)	19 (45.2)	42 (100.0)	<b>2.31 (1.04-5.13)</b>		<b>6.32 (1.15-34.56)</b>

Podaci prikazani kao broj (%) bolesnika ukoliko nije drukčije navedeno

INR = International normalized ratio (2-4); OR = mjera izgleda (odds ratio); 95% CI = mjera izgleda uz 95% interval pouzdanosti (odds ratio 95% confidence interval), \* CYP2C9 genotip \*2\*2 (n=2), i \*2\*3 (n=4) su isključeni iz analize zbog nedovoljno malog broja bolesnika

† MDR1 nije se mogao utvrditi u jednog bolesnika

‡ podaci prikazani kao medijan (interkvartilni raspon)

§BMI računat: tjelesna težina u kg/(tjelesna visina u m)<sup>2</sup> i prikazan kao medijan (interkvartilni raspon) KZS-kronično srčano zatajivanje

Doza varfarina je bila titrirana kroz pet dana. U tom vremenskom intervalu 45 (42.5%; 95% CI 33.3%-51.5%) ispitanika je postiglo terapijski raspon INR 2-4, a 61 ispitanik (57.5%; 95% CI 48.5%-66.7%) nije.

Univarijatna analiza je pokazala statistički značajnu povezanost genotipa *VKORC1 TT* s postizanjem terapijskog raspona INR 2,0-4,0 (Tablica 5.3.3.1.).

Važno je da je osim gena, univarijatna analiza također potvrdila statistički značajnu povezanost postizanja terapijskog raspona INR s nižom starosnom dobi, atrijskom fibrilacijom i zatajenjem srca u anamnezi.

U finalnom, multivarijatnom modelu, nakon prilagodbe za sve demografske, kliničke i laboratorijske parametre, statistički značajna povezanost s postizanjem terapijskog raspona INR 2-4 je ustanovljena za genotipove *VKORC1 1173TT*, *MDR1 2677TT* i *MDR1 3435 TT* (Tablica 5.3.2.1). Završni model dobro je odgovarao podacima (Hosmarov i Lemeshovljevi test  $X^2=7,36$ ; ss (kratica za stupnjeve slobode na engleskom je df-engl. *degrees of freedom*, na hrvatskom ss) =9; P=0,499) uz Nagelkerkov pseudo  $R^2=0,48$ . Postotak ukupno pravilno klasificiranih na temelju završnog modela iznosio je 77,9%.

Post-hoc analiza napravljena s Bonferronijevom korekcijom ukazuje, nakon prilagodbe za druge gene, demografske, kliničke i laboratorijske parametre, statistički značajnu povezanost zatajenja srca u anamnezi s genotipom *CYP2C9 \*1/\*2* (OR=0.002; 95% CI 0.00-0.06; p<0.001). Prevalencija srčanog zatajenja je bila 27/50 (45.8%) u bolesnika s genotipom *CYP2C9 \*1/\*1*, a u bolesnika s genotipom *CYP2C9 \*1/\*2* iznosila je 6/25 (24.0%).

Genotip *CYP2C9 \*1/\*2* je također bio statistički značajno povezan s atrijskom fibrilacijom. Uz kontroliranje svih drugih varijabli pomoću prilagođene binarne logističke regresije, bolesnici s genotipom *CYP2C9 \*1/\*2* imaju veći rizik, OR=84.5 (98% CI 2.17-3280; p=0.018) da razviju atrijsku fibrilaciju nego bolesnici s genotipom *CYP2C9 \*1/\*1*. Fibrilacija atrijska je dijagnosticirana u 11/59 (18.6%) bolesnika s genotipom *CYP2C9 \*1/\*1* i u 9/25 (36.0%) bolesnika s genotipom *CYP2C9 \*1/\*2*. Fibrilacija atrijska je bila statistički značajno manje učestala u bolesnika s genotipom *MDR1 2677 TT* (OR=0.01; 95% CI 0.00-0.41; P=0.014) u usporedbi s bolesnicima nositeljima genotipa *MDR1 2677GT*. Konačno, bolesnici s genotipom *MDR1 3435TT* imali su veće izgleda, OR=45.0 (95% CI 1.47-1376; P=0.029) za razvoj atrijske fibrilacije u usporedbi s bolesnicima nositeljima genotipa *MDR1 3435CT*. Druge varijable povezane s atrijskom fibrilacijom su: niži AST, povećani ALT, bilirubin i kreatinin te srčano zatajenje u anamnezi.

#### 5.3.4. Interakcije gena *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1*

Sve interakcije su izračunate u multivarijantnom modelu u kojem su kontrolirani utjecaji svih demografskih, kliničkih i laboratorijskih varijabli.

- 1) U predikciji ostvarivanja terapijskog raspona INR statistički je značajna i interakcija *MDR1*2677TT i *CYP2C9* \*1/\*2, koja smanjuje izgleda za postizanje terapijskog raspona INR (OR=0.01; 95% CI 0.00-0.22; P=0.01). Interakcija *MDR1* 2677GG i *CYP2C9* \*1/\*3 nije bila statistički značajna (P=0,062), a na razini ovog konkretnog uzorka smanjivala je izgleda za terapijski INR.
- 2) Kad se ta interakcija uključi u model i *CYP2C9* \*1/\*3 postaje statistički značajan i to tako da radikalno povećava izgleda za terapijski INR (OR=99.76; 95% CI 3.44-2891; P=0.007). *VKORC1* 173TT ostaje statistički značajan (OR=48.61; 95% CI 3.91-603; P=0.003), kao i *MDR1* 2677 TT (OR=28.52; 95% CI 1.13-722; P=0.003), ali *MDR1* 3435TT više nije statistički značajan. Drugim riječima, možemo pretpostaviti da interakcija *MDR1* 2677TT i *CYP2C9* \*1/\*2 objašnjava postizanje terapijskog INR upravo u onom dijelu varijance u kojem je - kada ova interakcija nije bila uključena - to činio *MDR1* C3435T.
- 3) Uz to, kad je ta interakcija uključena u model, statistički su i dalje značajni prediktori terapijskog raspona INR: povišeni ALT i zatajivanje srca.
- 4) I interakcija *VKORC* 1173CC i *MDR1* 2677TT je statistički značajna. Na žalost, ona se na ovom uzorku ne da pouzdano izračunati. Zanimljiv je nalaz kad se ova interakcija kontrolira, *CYP2C9* \*1/\*1 ponovo postane statistički značajan prediktor terapijskog raspona INR (OR=10.55; 95% CI 1.23-90.79).

#### 5.3.5. Interakcija genotipova *MDR1* i *CYP2C9* u predikciji postizanja terapijskog raspona INR

Kad je u multivarijantnu binarnu regresijsku analizu nakon prilagodbe za sve genetičke, demografske, kliničke i laboratorijske parametre dodana interakcija genotipova *MDR1* i *CYP2C9* ona se pokazala statistički značajnim prediktorom postizanja terapijskog raspona INR (2,0-4,0).

Multivarijatna analiza s uključenim svim varijablama, ali bez uključene interakcije statistički je značajno poboljšavala predikciju postizanja terapijskog INR ( $X^2=39,02$ ;  $ss=23$ ;  $P=0,02$ ). Hosmerov i Lemeshovljev test ukazivao je na dobru usklađenost modela s podacima ( $X^2=5,64$ ;  $ss=8$ ;  $P=0,688$ ), a Nagelkerkeov pseudo koeficijent determinacije iznosio je  $R^2=0.43$ , s 73,3% pravilno klasificiranih bolesnika.

Nakon uključivanja interakcije genotipova *MDR1* i *CYP2C9* povećana je prediktivna vrijednost modela s uključenim svim varijablama ( $X^2=56,13$ ;  $ss=27$ ;  $P=0,001$ ). Hosmerov i Lemeshovljev test ukazivao je na jaš bolju usklađenost modela s podacima ( $X^2=3,59$ ;  $ss=8$ ;  $P=0,892$ ), a Nagelkerkeov pseudo koeficijent determinacije povećao se na  $R^2=0.57$ , s 81,2% pravilno klasificiranih bolesnika.

Nakon prilagodbe za učinke genotipova *MDR1 2677G<T/A*, *CYP2C9*, *MDR1 3435C<T*, *VKORC1* te za sve praćene sociodemografske, kliničke i laboratorijske parametre, izgledi za postizavanje terapijskog raspona INR (2,0-4,0) tijekom prvih pet dana od uvođenja varfarina iznosili su za *MDR1 2677TT/CP2C9 \*1\*2* OR=103 (95% CI 0,61-17645;  $P=0,077$ ), za *MDR1 TT/CYP2C9 \*1\*3*, *\*2\*2*, *\*2\*3* OR=0,02 (95% CI 0,0-0,69;  $P=0,032$ ), za *MDR1 2677GG/CP2C9 \*1\*2* OR=1,47 (95% CI 0,05-43,7;  $P=0,825$ ) te za *MDR1 2677GG/CYP2C9 \*1\*3*, *\*2\*2*, *\*2\*3* OR=0,00 (95% CI 0,0-0,40;  $P=0,004$ ) u odnosu na *MDR1 2677GT* i *CYP2C9 \*1\*1* genotipove.

TABLICA 5.3.5.1. Univarijatna povezanost genotipova *MDR1 2677G<T/A* i *CYP2C9\*2\*3* s postizanjem terapijskog raspona INR (2,0-4,0) tijekom prvih pet dana od uvođenja varfarina (n=106)

		INR (2,0-4,0)						
		Postignut		Nije postignut		Ukupno		P
<b>MDR1</b>	<b>CYP2C9</b>							
GT	*1*1	9	(30,0)	21	(70,0)	30	(100,0)	<b>0,003</b>
	*1*2	2	(18,2)	9	(81,8)	11	(100,0)	
	*1*3, *2*2, *2*3	9	(81,8)	2	(18,2)	11	(100,0)	
TT	*1*1	6	(54,5)	5	(45,5)	11	(100,0)	0,434

	*1*2	4	(80,0)	1	(20,0)	5	(100,0)	
	*1*3, *2*2, *2*3	3	(42,9)	4	(57,1)	7	(100,0)	
GG	*1*1	8	(44,4)	10	(55,6)	18	(100,0)	0,762
	*1*2	3	(37,5)	5	(62,5)	8	(100,0)	
	*1*3, *2*2, *2*3	1	(25,0)	3	(75,0)	4	(100,0)	

Podatci su prikazani kao broj (postotak) sudionika s INR unutar terapijskog rapona (2-4); OR = omjer izgleda; 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti omjera izgleda

#### 5.4. Nuspojave

Ukupnih nuspojava u promatranom razdoblju u obje skupine ispitanika je bilo vrlo malo, ukupno 19. Najčešće su bile krvarenje, u 6 bolesnika (2,6%) i to hematurija u 3 bolesnika (1,6%), mikrohematurija u 2 bolesnika (1%), epistaksa u 1 bolesnika (0,5%). Hipersaturacija se također zabilježila u 3 bolesnika (1,6%). Ostale nuspojave - hiperkoagulabilnost u 2 bolesnika, proljev i retromboza u 1 bolesnika.

TABLICA 5.4.1. Ukupna prisutnost nuspojava

	n	(%)
<b>Nuspojave ukupno</b>		
ne	186	91,1
da	19	8,9
ukupno	205	100,0
<b>Krvarenje</b>		
ne	199	97,4
da	6	2,6
ukupno	205	100,0
<b>Proljev</b>		
ne	204	99,5
da	1	0,5
ukupno	205	100,0
<b>Hematurija</b>		
ne	202	98,4
da	3	1,6
ukupno	205	100,0

<b>Mikrohematurija</b>		
ne	203	99,0
da	2	1,0
ukupno	205	100,0
<b>Epistaksa</b>		
ne	204	99,5
da	1	0,5
ukupno	205	100,0
<b>Hipersaturacija</b>		
ne	188	98,4
da	3	1,6
ukupno	205	100,0
<b>Hiperkoagulabilnost</b>		
ne	204	99,0
da	2	1,0
ukupno	205	100,0
<b>Retromboza</b>		
ne	204	99,5
da	1	0,5
ukupno	205	100,0

U usporedbi bolesnika u FG i NFG skupini iz tablice 18 vidljivo je da se svega u 11 bolesnika utvrdila nuspojava (9,8%) u FG skupini i u 8 bolesnika (8,1%) u NFG skupini. Krvarenje je bilo podjednako u obje skupine.

TABLICA 5.4.2. Razlika u prisutnosti pojedinih nuspojava između pokusne i kontrolne skupine

	Skupina				P
	pokusna		kontrolna		
	n	%	n	%	
<b>Nuspojave ukupno</b>					
ne	96	90,2	91	91,9	0,801
da	11	9,8	8	8,1	
ukupno	106	100,0	99	100,0	
<b>Krvarenje</b>					
ne	102	96,7	97	98,0	0,673
da	4	3,3	2	2,0	
ukupno	106	100,0	99	100,0	

KRATICE:  $P = \chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti nuspojava ukupno ( $\chi^2 = 0,170$ ;  $ss=1$ ;  $P=0,801$ ), kao niti u prisutnosti krvarenja ( $\chi^2 = 0,288$ ;  $ss=1$ ;  $P=0,673$ ) između pokusne i kontrolne skupine.

Kako je broj nuspojava (srećom) bio mali, nije bilo moguće izvesti multivarijatnu analizu. Stoga donosimo samo pregled nuspojava u pokusnoj skupini prema genotipovima.

TABLICA 5.4.3. Pojava nuspojava s obzirom na gene *CYP2C9*, *MDR1* i *MDR x26 VKORC1* (samo pokusna skupina)

	Prisutnost nuspojava						P
	da		ne		ukupno		
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	
<b>CYP2C9</b>							
1*1	6	(10,5)	51	(89,5)	57	(100,0)	0,057
1*2	0	(0,0)	19	(100,0)	19	(100,0)	
1*3	3	(27,3)	8	(72,7)	11	(100,0)	
<b>VKORC1</b>							
CC	1	(2,9)	34	(97,1)	35	(100,0)	0,224
CT	6	(15,4)	33	(84,6)	39	(100,0)	
TT	2	(11,1)	16	(88,9)	18	(100,0)	
<b>MDR1</b>							
GG	4	(14,8)	23	(85,2)	27	(100,0)	0,658
GT	4	(8,7)	42	(91,3)	46	(100,0)	
TT	1	(5,6)	17	(94,4)	18	(100,0)	
<b>MDR1 x26</b>							
CC	3	(12,5)	21	(87,5)	24	(100,0)	0,667
TT	1	(4,2)	23	(95,8)	24	(100,0)	
CT	5	(11,4)	39	(88,6)	44	(100,0)	

KRATICE:  $P = \chi^2$  test, razina statističke značajnosti, ili vjerojatnost pogreške tipa I (alpha)

Nije utvrđena statistički značajna razlika u prisutnosti nuspojava s obzirom na pojedine genotipove.



## RASPRAVA

Varfarin je danas još uvijek važan i najčešće primjenjivani peroralni antikoagulans koji ima jasno dokazani učinak u terapiji tromboembolijskih događaja. Unatoč razvoju novih peroralnih antikoagulansa (izravni inhibitori faktora II i faktora X), varfarin je zbog cijene, relativno jednostavne primjene i dobre podnošljivosti prvi lijek koji se primjenjuje u profilaksi i terapiji tromboembolijskih događaja. Ipak, zbog svog uskog terapijskog indeksa, velike raznolikosti između bolesnika u potrebama za dnevnom dozom, brojnim interakcijama s drugim lijekovima, njegova je primjena opterećena čestim kontrolama parametara koagulacije, a moguće su i relativno su česte nuspojave. Nuspojave se najčešće javljaju na početku primjene lijeka, u fazi titracije doze kada se preporučuje pažljivije praćenje parametara koagulacije čime se ocjenjuje učinak lijeka. Zbog nestabilnosti doze moguća je pretjerana ili manjkava antikoagulacija <sup>46</sup>. Pretjerana antikoagulacija dovesti će do krvarenja koje je najpoznatija i najopasnija nuspojava primjene varfarina, a manjkava antikoagulacija može dovesti do ponovne tromboze.

Dobro je poznato da su genetički polimorfizmi *CYP2C9* i *VKORC1* zajedno s drugim kliničkim parametrima posebno značajni za varijabilnost potrebne dnevne doze (računa se i do 50%) <sup>129</sup>.

Zbog važnosti navedenih podataka Američka Agencija za hranu i lijekove, u uputu koja se prilaže lijeku varfarinu, je uvela preporuku da se, kad god je moguće, u odluku o početnoj dozi uključe podaci genotipizacije <sup>158, 159</sup>. Genotipizacija, međutim još uvijek nije uvedena u svjetske i europske smjernice terapije tromboembolijskih događaja <sup>160</sup> jer nema za sada dovoljno objavljenih randomiziranih kliničkih studija koje bi jasno dokazale prednost genotipizacije u odnosu na dosadašnju kliničku praksu, pa se genotipizacija rutinski ne provodi prije započinjanja terapije.

Zanimljivo je da je genotipizacija u dosadašnjim radovima pokazala prediktivnu vrijednost u prvim danima primjene varfarina, no kasnije se vrijednost gubi u odnosu na titraciju doze prema postignutim vrijednostima INR. Ferder i suradnici 2010. godine ispitivali su 223 bolesnika s DVT u kojih je primijenjen standardni protokol za doziranje varfarina <sup>161</sup>. Za oblikovanje farmakogenetičkog modela, kvantificirani su genotipovi, klinički faktori, prethodna doza varfarina i INR kod terapijskih doza. Uspjeli su dokazati da su *CYP2C9* i *VKORC1* značajni nezavisni prediktori terapijskih doza, no značajnost predikcije opada s

vremenom. Nakon tjedan dana primjene, INR ipak značajnije ovisi o prethodnoj primijenjenoj dozi varfarina, a ne o genotipu.

Različiti su podaci u literaturi o vrijednosti genotipizacije. Ona, kod uvođenja varfarina i određivanja njegove doze, do sada nije potvrđena u ortopedskih bolesnika <sup>162</sup>, ali jest u bolesnika s umjetnim aortalnim valvulama <sup>163</sup> i u različitim etničkih skupina <sup>164,165</sup>. Tako su autori japanske studije utvrdili u japanskih bolesnika povezanost genotipova *VKORC1 -1639G>A* (p=0.004) i *3730G>A* (p=0.006), genotipa *8016G>A GGCX* (p=0.022), i *42613A>C* genotipa i *CYP2C9* (p=0.015). Pojedinačni doprinos inter-individualnim varijacijama doze varfarina iznosio je 5.9% za *VKORC1 -1639G>A*, 5.2% za *CYP2C9 42613A>C*, i 4.6% za *GGCX 8016G>A*. Druga studija potvrdila je u kineskih bolesnika da bi doziranje temeljeno na farmakogenetici moglo skratiti vrijeme do postizanja stabilnih vrijednosti parametara koagulacije i smanjiti broj nuspojava

No unatoč tomu što je genotipizacija jasno dokazala povezanost s dozom varfarina, brojne prospektivne studije, ali i randomizirani kontrolirani pokusi nisu uspjeli pokazati da genotipizacija prije započinjanja terapije poboljšava samu antikoagulacijsku kontrolu <sup>166, 167</sup>. Sve studije su uglavnom bile ograničene vrijednosti zbog premalog broja ispitanika, nevalidiranog algoritma za doziranje varfarina kojeg su rabile ili samog postupka genotipizacije.

Jedna novija studija iz 2012. godine objavljena u časopisu *Circulation* uspjela je pokazati da skupina bolesnika u kojih se prije uvođenja varfarina učinila genotipizacija ima bolju kontrolu antikoagulacije od skupine u kojoj se lijek propisao na uobičajeni način prema opće prihvaćenoj kliničkoj praksi <sup>168</sup>.

Ipak, najnoviji podaci iz znanstvene literature i dalje donose oprečne stavove te rasprava o vrijednosti genotipizacije ne jenjava.

Krajem 2013. godine objavljene su dvije u potpunosti oprečne studije u istaknutom medicinskom časopisu *New England Journal of Medicine* <sup>139,140</sup>. Oba autora predstavljaju dvije velike svjetske grupacije (engleska i američka) koje se bave ovom problematikom. U daljnjoj raspravi šire ćemo se osvrnuti na oprečnost rezultata tih dviju najvažnijih skupina koje proučavaju genetički utjecaj na primjenu varfarina jer je važno zbog toga što se i naši rezultati uklapaju u posljednja istraživanja.

Naše je ispitivanje bilo prospektivna randomizirana kontrolirana studija u kojoj je primarni cilj bio pokazati da se poznavanjem genotipa za *CYP2C9*, *VKORC1* i *MDR1* može predvidjeti doza varfarina koja bi brže dovela do zadovoljavajućeg učinka, da se brže postigne stabilna doza i stabilni INR uz manji broj nuspojava. U studiji smo u prvoj skupini u koju je

bilo uključeno 106 bolesnika (FG-ispitivana skupina), za određivanje početne doze varfarina primjenili algoritam koji se u ispitivanjima učinka genotipizacije već široko primjenjuje, a koji uključuje i rezultate genotipizacije za *VKORC1* i *CYP2C9*<sup>127</sup>. U drugoj skupini u koju je bilo uključeno 99 bolesnika (NFG-kontrolna skupina) dozu varfarina smo određivali prema kliničkim parametrima što je uobičajeno još uvijek u širokoj kliničkoj praksi ne samo u Hrvatskoj nego i u svijetu. Tako se u svakodnevnoj primjeni započinje s manjom dozom u bolesnika s bolestima jetre, smanjenom bubrežnom funkcijom i starijom životnom dobi. S druge strane bolesnici s većom tjelesnom težinom zahtijevaju više doze varfarina<sup>85</sup>.

Bolesnici su prema demografskim osobinama u našem ispitivanju bili vrlo slični u obje skupine što je u skladu s Dobrom kliničkom praksom. Bolesnici su bili prosječne dobi od 70 godina a nisu se razlikovali niti u raspodjeli po spolu u obje skupine. Kako navike pušenja i konzumacije alkohola mogu imati učinak na doziranje i učinak varfarina (stabilnost doze i parametara koagulacije) bolesnike smo pratili i prema navedenim parametrima.

Dokazi o utjecaju pušenja na dozu varfarina su dugo bili inkonzistentni, a predpostavljeni mehanizam je indukcija citokroma P4501A2<sup>169</sup>, iako se zna da metabolizam S - enantiomera varfarina ide preko CYP2C9. U literaturi su se povremeno objavljivali samo pojedinačni opisi slučajeva bolesnika u kojih je došlo do povišenja INR nakon prestanka pušenja<sup>170, 171</sup>. No, sistemski pregled objavljen u časopisu CHEST 2011. godine pokazao je kako pušenje može potencijalno stupiti u ozbiljnu interakciju s varfarinom te povećati njegov klirens, što dovodi do smanjenog učinka<sup>172</sup>. Preporučuje se stoga u tih bolesnika pažljivo praćenje ukoliko tijekom primjene dođe do promjene pušačkog statusa. Što se tiče alkohola, povećano konzumiranje alkohola predstavlja prvotno problem zbog moguće neadekvatne suradljivosti bolesnika kod uzimanja varfarina s jedne strane, ali i interakciji alkohola i varfarina s druge strane. Interakcija varfarina i alkohola najsnažnija je kod kronične konzumacije i to velikih količina alkohola dok u onih s manjim i povremenim unosom nije izražena<sup>173</sup>. Naši su bolesnici bili prema raspodjeli pušača i nepušača, te onih koji konzumiraju i ne konzumiraju alkohol također slični pa se utjecaj na dozu varfarina nije razlikovao.

Nadalje bolesnike smo stratificirali prema tjelesnoj masi jer se ustanovilo kako bolesnici s prekomjernom tjelesnom težinom zahtijevaju više doze varfarina i sporije dostižu zadovoljavajuće terapijske vrijednosti INR. U literaturi već dulje vrijeme o tome postoje brojni radovi<sup>83,174</sup> no jedan od recentnijih je onaj objavljen 2013. godine koji je, u usporedbi incijalnog odgovora na varfarin u pretilih bolesnika i onih s normalnom tjelesnom težinom, to i dokazao<sup>175</sup>. Studija je bila retrospektivna i uspoređivala je bolesnike s normalnom tjelesnom

težinom, pretile bolesnike i morbidno debele bolesnike. Utvrđen je smanjeni inicijalni učinak varfarina u dvije podskupine debelih bolesnika, s manjom vjerojatnošću postizanja terapijskih vrijednosti INR prije otpusta iz bolnice. U našoj studiji raspodjela bolesnika prema BMI u obje skupine je bila jednaka, a najveći dio njih, opet u obje skupine, bio je u skupinu pretilih (BMI od 25,00-29,99). Kako je sveukupna raspodjela prema BMI bila slična u obje skupine, nije se očekivala razlika u postizanju stabilnih vrijednosti INR što je i vidljivo iz tablice 10. U našem istraživanju nije nađena niti razlika u postizanju INR između različitih podskupina prema BMI.

Za adekvatnu primjenu varfarina vrlo je važna funkcija bubrega i jetre. Pridružena bolest bubrega sa zatajenjem funkcije bubrega dokazano utječe na postizanje terapijskog učinka lijeka. Važni podaci o utjecaju funkcije bubrega dobiveni su iz studije u trajanju 2 godine koja je primarno ispitala utjecaj polimorfizma *CYP2C9* i *VKORC1* u američkoj populaciji (POAT studija, od engl *Pharmacogenetic Optimization of Anticoagulation Therapy*), objavljenoj 2008. godine<sup>176</sup>. Već sljedeće godine ista skupina autora prikazala je rezultate kohortne studija sa 653 bolesnika kategoriziranih u tri skupine prema stupnju zatajenja funkcije bubrega (blago, umjereno i teško zatajenje prema vrijednostima glomerulane filtracije)<sup>177</sup> i uspjela dokazati kako bolesnici sa zatajenjem bubrega postižu terapijsku antikoagulaciju s manjom dozom varfarina neovisno o utjecaju genotipa *VKORC1* i *CYP2C9*. To upućuje da se u takvih bolesnika započne terapija s početnom nižom dozom osobito u bolesnika s umjerenim i teškim zatajenjem funkcije bubrega u odnosu na one s relativno urednom funkcijom. Smanjena renalna funkcija bila je udružena i s višom učestalošću pretjerane antikoagulacije (INR>4). Stoga stoji preporuka da bi tu podskupinu bolesnika trebalo češće pratiti kako bi se održala stabilna terapijska antikoagulacija.

Jednako tako se očekuje da i smanjena funkcija jetre ima utjecaj na dozu i učinak varfarina. Varfarin se metabolizira u jetri. U bolesnika s oštećenjem funkcije jetre dolazi do višestruko snažnijeg učinka lijeka nego u bolesnika s urednom funkcijom jetre<sup>178</sup>. Pojačani učinak se bilježi zbog smanjenog klirensa lijekova, smanjene sinteze faktora koagulacije u jetri, a zbog smanjene sinteze albumina dolazi i do promjena u vezanju lijekova, pa tako i varfarina na albumine. Sve to doprinosi povećanom riziku od krvarenja. Početna doza varfarina u bolesnika s umjereno ili teško oštećenom funkcijom jetre treba biti niža, a cjelokupna primjena vrlo oprezna i postupna uz pažljivo povećavanje doze i pažljivu kontrolu INR<sup>179</sup>.

Zbog svih navedenih razloga i naši su bolesnici bili stratificirani u podskupine prema rezultatima koji određuju jetrenu i bubrežnu funkciju. Nije bilo razlike u ulaznim vrijednostima AST, ALT, GGT, ureje i kreatinina između obje skupine pa se može zaključiti

kako su naši ispitanici bili u najvažnijim karakteristikama u odnosu na doziranje varfarina slični. U našem istraživanju posebno se određivala i funkcija srca s obzirom na mogući učinak na primjenu varfarina te smo bolesnike podijelili prema NYHA klasifikaciji u obje skupine.

Naime, još sredinom prošlog stoljeća utvrdilo se da bolesnici sa srčanim zatajivanjem imaju pojačani odgovor na primjenu oralnih antikoagulansa. Studija koja je to dokazala uspoređivala je 23 bolesnika s desnostranom srčanom dekompenzacijom u odnosu na 48 kontrolnih bolesnika<sup>180</sup>. Uočeno je značajno produljenje PV u bolesnika s umjerenom i teškom srčanom dekompenzacijom u usporedbi s kontrolnim bolesnicima ili onima koji su imali blago zatajenje srčane funkcije. Predpostavljeni mehanizam je kongestija jetre, a slični su rezultati objavljeni desetak godina kasnije kod tumačenje učinka srčane funkcije na funkciju jetre<sup>181</sup>. Kako je u našoj studiji bila raspodjela bolesnika sa stupnjem srčane bolesti jednaka u obje skupine, za pretpostaviti je da se taj učinak nije razlikovao.

U našem ispitivanju se uspoređivalo genotipom vođeno doziranje varfarina u odnosu na kliničko doziranje u tri važne skupine bolesnika koje su bile određene dijagnozom na prijemu, odnosno indikacijom za primjenom varfarin. Tako smo pratili bolesnike s novootkrivenom atrijskom fibrilacijom, dubinskovenskom trombozom i bolesnike s plućnom embolijom. Dakle radilo se o tri dijagnoze u kojima je još uvijek varfarin najčešći prvi izbor lijeka širom svijeta.

I najnovije veliko istraživanje Pirmohameda<sup>139</sup> (EU-PAC pokus - od engl. *European pharmacogenetics of anticoagulant therapy*) ispitivalo je 2 dva algoritma primjene varfarina, no za razliku od našeg ispitivanja, u samo 2 skupine bolesnika, onih s AF i onih s DVT. Treba istaći kako je u studiji, genotipizacija izvođena preko aparata „point-of-care“ čime se rezultat mogao dobiti za najdulje 1,5 sat. Takav se aparat u svijetu rabi u bolničkoj primjeni, ali i kod samostalne kontrole parametara koagulacije u vanbolničkih bolesnika. U našoj sredini „point-of-care“ nije u široj kliničkoj primjeni (u bolničkih i u ambulantnih bolesnika), a mi smo rezultate genotipizacije dobili unutar radnog dana tj. unutar 8 sati od uzimanja krvi obradom u Kliničkoj jedinici za farmakogenomiku i individualizaciju terapije. Ističemo kako se primjena varfarina u ispitivanoj skupini temeljila i na nalazu farmakogenetike.

I ispitanici s DVT u studiji Pirmohameda su na početku terapije dobili heparin niske molekularne težine zajedno s peroralnim antikoagulansom, a LMWH je isključen prema standardnoj kliničkoj praksi u skladu s postignutim terapijskim vrijednostima parametara koagulacije i u skladu s kliničkom slikom kako je bio slučaj i u našoj studiji. U bolesnika s novootkrivenom atrijskom fibrilacijom liječenje je odmah započeto s peroralnim antikoagulansom. Algoritam doziranja varfarina bio je općeprihvaćeni<sup>128</sup>. I u ovoj studiji se

doza varfarina u kontrolnoj skupini određivala u odnosu na dob kao i našoj studiji. Bolesnici su praćeni tijekom 3 mjeseca što je značajno duže nego u našem praćenju no u analizu su bili uključeni samo bolesnici koji su ostali u studiji iza 13. dana praćenja. Ukupno je bilo uključeno 427 bolesnika koji su randomizirani u dvije skupine, 211 ispitanika s prethodnom genotipizacijom i 216 bolesnika u kontrolnoj skupini. Preko 61% bolesnika su bili muškarci, preko 98% bijela populacija, prosječna dob je bila 67 godina. Najveći dio bolesnika imao je atrijsku fibrilaciju zbog koje su primali varfarin. Rezultati analize su jasno pokazali da je postotak vremena s adekvatnim INR u ispitivanoj skupini 67,4%, a 60,3% u kontrolnoj skupini. Razlika u prosječnom INR između dvije skupine bila je najveća na početku, a postajala je sve manja prema kraju praćenja. Razlika u postotku vremena adekvatnog INR najveća je bila između 5. i 10. dana praćenja. Od sekundarnih ciljeva važno je istaknuti da su bolesnici vođeni genotipizacijom u manje slučajeva imali INR 4,0 i viši u odnosu na kontrolnu skupinu. Isto je tako i vrijeme do postizanja terapijskog INR bilo kraće u ispitivanoj skupini. Naime, 82% genotipiziranih bolesnika je postiglo stabilnu dozu varfarina u odnosu na 70,4% bolesnika u kontrolnoj skupini s time da je ona i brže postignuta u ispitivanoj skupini. Zaključci su jasni, genotipizacija prije uvođenja terapije oralnim antikoagulansima skraćuje vrijeme do postizanja adekvatnog INR i vrijeme do postizanja stabilne doze varfarina kao i broj potrebnih prilagodbi doze, produljuje vrijeme INR u terapijskim granicama te smanjuje učestalost pretjerane antikoagulacije. Rezultati Pirmohamedove studije su važni i stoga što ukazuju da je upravo na početku terapije najjači učinak genotipizacije jer je najveća razlika u postizanju INR bila na samom početku praćenja.

S tim su u suglasju i naši rezultati koji su pokazali da je razlika u dozi varfarina najveća između ispitivane i kontrolne skupine upravo u prvih 4 dana od uvođenja terapije. Kako je i u prethodnim studijama utvrđeno da genotipiziranjem vođeno doziranje ima najjasniji učinak upravo na početku primjene varfarina (već i nakon 1. tjedna terapije se učinak gubi!) <sup>182</sup>, može se zaključiti da naše kraće praćenje bolesnika nije isključiva manjkavost studije i nije bilo odlučujuće za ishod i rezultate studije. Također ističemo još jednom da je INR tek iznad 4,0 smatran prekomjernom antikoagulacijom.

Naša je studija u odnosu na gore opisanu vrijedna i zbog dodatnih kliničkih parametara koje smo pratili u svih bolesnika, a to je odnos praćenih parametara koagulacije i funkcije jetre (vrijednosti jetrenih transaminaza na početku ispitivanja), srca (klinička procjena i UZV srca na početku ispitivanja) i bubrega (vrijednosti kreatinina na početku ispitivanja). U opisanoj studiji dakle funkcija organa kao drugih čimbenika koji utječu na doziranje varfarina nije

uzeta u obzir. To se pokazalo u našem slučaju posebno vrijedno jer smo ustvrdili kako se u bolesnika sa zatajivanjem srčane funkcije brže postigla terapijska vrijednost parametara koagulacije. Takvi su rezultati također u skladu s dosadašnjim istraživanjima i općim stavom kako se u bolesnika sa zatajivanjem srčane funkcije mogu brže postići parametri koagulacije uglavnom zbog kongestije jetre izazvanoj samom osnovnom bolesti o čemu su prve pretpostavke bile iz davne 1949. godine<sup>180</sup>. I nadalje su objavljivani podaci koji su to potkrijepljivali pa tako postoje rezultati u literaturi unazad 20 i više godina<sup>183</sup>, ali i recentniji radovi<sup>184</sup> koji tumače kako se čak i u pogoršanjima srčane funkcije povećava učinak, odnosno pojačava odgovor na primjenu varfarina. Tako se u bolesnika u kojih dolazi do akutnog pogoršanja funkcije srca zahtijeva značajno češće praćenje INR i vrlo pažljiva primjena s vjerojatno smanjenjem doze. Preporuka je da se INR u ambulantnih bolesnika kontrolira svakih 1-2 tjedna, a u hospitaliziranih bolesnika svakodnevno.

Druga velika studija koja donosi potpuno oprečne stavove i zaključke u primjeni farmakogenetike, odnosno algoritma koji uključuje genotipizaciju prije započinjanja terapije je COAG (Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics) pokus Kimmela i suradnika<sup>140</sup> objavljena u istom časopisu iste godine kao i prethodna Pirmohameda i suradnika. Velika randomizirana studija uključila je 1.015 bolesnika koje je pratila tijekom 4 tjedna što je prema praćenju bilo slično i našem ispitivanju.

Za razliku od studije Pirmohameda i suradnika, ova studija je bila dvostruko slijepa. Intervencija se provodila tijekom prvih 5 dana od započinjanja varfarinske terapije. U tom razdoblju koristili su se prethodno utvrđeni algoritmi kojima se određivala doza varfarina. Koristio se algoritam temeljen na genotipizaciji pa su uključene varijable za *CYP2C9* \*2 i \*3 te *VKORCI*, a klinički orijentirani algoritam je koristio samo kliničke varijable.

Zanimljivo je da cijelo vrijeme praćenja bolesnika, kliničari nisu znali aktualnu dozu varfarina zbog sljepoće pokusa, a korekciju doze radili su educirani medicinski pratitelji (monitori). Primarni ishod je bio postotak vremena unutar adekvatnih vrijednosti INR (2,0-3,0) od završetka intervencije pa do kraja 4. tjedna. Sekundarni ishodi su bili slični onima iz studije Pirmohameda i suradnika: bilo koji INR 4 i više, veliko krvarenje, tromboembolizam unutar 4 tjedna od početka terapije, vrijeme do prvog terapijskog INR, vrijeme do postizanja doze održavanja (ili stabilne doze varfarina). U razdoblju od 4 tjedna prosječno je bilo izvedeno 6 mjerenja INR što je sukladno i našim mjerenjima. Zanimljivo je da u podacima iznose kako je za samo 44% bolesnika prije prve doze varfarina bio poznat nalaz genotipizacije. **Zato je**

**važno istaći da su u našoj pokusnoj skupini svi uključeni bolesnici imali nalaz genotipizacije prije uvođenja terapije što je svakako značajno postignuće!!**

Što se tiče primarnog ishoda, studija Kimmela i suradnika jasno je utvrdila da u promatranom razdoblju nije bilo razlike u duljini trajanja prosječnog vremena terapijskog INR u obje skupine. Čak štoviše, kada se promatrano razdoblje podijelilo u dva separata razdoblja (prva 2 tjedna i druga 2 tjedna) također nije utvrđena nikakva razlika. To je u suprotnosti s nalazima drugih studija koje su pak utvrdile da je učinak genotipizacije najjasniji upravo na samom početku od primjene varfarina i da on slabi daljnjim provođenjem terapije.

Ipak Kimmel i suradnici su utvrdili signifikantnu interakciju između rasne pripadnosti i postupka doziranja. Naime utvrđeno je da je značajno manji udio genotipom vođenih Afroamerikanaca koji su postigli terapijski INR nego onih u kojih je doziranje vođeno kliničkim parametrima. Iako su rezultati cjelokupne studije utvrdili da nema razlike između genotipizacijom vođenog doziranja i klinički vođenog doziranja varfarina, ipak je bjelačkoj (genotipiziranoj) populaciji bio nešto veći postotak onih koji su bili u ciljnim terapijskim vrijednostima INR.

Razlike u rezultatima studija se mogu objasniti značajnim međurasnim razlikama u učestalosti pojedinih genotipova tako je u crnačkoj populaciji učestalost polimorfizama \*2 i \*3 (spori metabolizatori) zastupljane u svega 1% populacije<sup>95</sup> u odnosu na 3.5% u bjelačkoj populaciji. S obzirom da je četvrtina ispitanika u studiji Kimmela i suradnika bila afroameričkog podrijetla u kojih je učestalost varijantnog alela manja i uloga genotipa u moduliranju parametara koagulacije je mogla biti manja, što je moglo doprinijeti negativnom ukupnom rezultatu studije koji su i teško usporedivi s rezultatima u bjelačkoj populaciji.

I sami autori su također zaključili da algoritam koji uključuje genotipizaciju bolje predviđa dozu održavanja varfarina u bijelačkoj populaciji nego u ostalim rasama.

Još nema jasnih stavova o korištenju farmakogenetike u svrhu prevencije značajnih komplikacija, prvenstveno krvarenja te poboljšanja kliničkog ishoda<sup>185</sup>. Postoje sasvim oprečna mišljenja dokumentirana podacima iz različitih studija. Međutim nužno je uspoređivati važne parametre pojedinih studija na temelju kojih su izvedeni određeni zaključci.

Prikazane studije<sup>139, 140</sup> nisu usporedive jer se razlikuju u više parametara koji su mogli značajno utjecati na ukupan rezultat studija:

- Različit pristup u doziranju varfarina:



U EU-PACT studiji primjenjena je fiksna doza, dok je klinički algoritam doziranja bio primjenjen u studiji COAG.

- Razlika u sastavu ispitivane populacije s obzirom na rasu je također značajna jer je u studiji COAG udio afroameričke populacije bio oko 25%, što je zbog varijanti gena koje su mogle imati utjecaj na doziranje varfarina a koje su specifične za tu rasu moglo doprinijeti ukupnom drukčijem ishodu studije<sup>186, 187</sup>.

Dodatna snaga naše studije je u tome što je provedena u bolničkim uvjetima s boljom kontrolom suradljivosti, dok su velike navedene studije uključivale hospitalizirane, ali i ambulantne bolesnike. Ta razlika može utjecati na kvalitetu kliničkih podataka ali i ishoda, jer prema nekim studijama do 50% bolesnika samostalno mijenja dozu varfarina, što može značiti značajnu razliku između nehospitaliziranih i hospitaliziranih bolesnika čija je suradljivost bolja. Naši su bolesnici dobili upravo dozu koju smo mi odlučili primijeniti!

Naši su rezultati u suglasju s rezultatima i opservacijama koje su također nedavno objavljene u *N Engl J Med*<sup>188</sup>. Autori potvrđuju da je doziranje temeljeno na genotipu *CYP2C9* i *VKORC1* bilo superiorno u bolesnika s atrijskom fibrilacijom u odnosu na bolesnike u kojih je dijagnosticiran venski tromboembolizam, uz jasnu korist **farmakogenetičkog pristupa za one bolesnike koji su bili nositelji dva ili više polimorfnih alela. To je slučaj i u našoj studiji jer su dobiveni rezultati bili značajni za bolesnike s fibrilacijom atrijske**. Također je i homozigotnost za varijantni alel *VKORC1 1173T* doprinosila boljem/ranijem postizanju ciljnih vrijednosti INR u odnosu na nositelje dominantnog alela. Ovaj nalaz se može barem djelomično objasniti spoznajom da nositelji divljeg tipa alela *VKORC1* mogu biti i nositelji rijetkih mutacija i stoga su im potrebne značajno više doze varfarina ili mogu čak razviti rezistenciju na varfarin<sup>189</sup>. Međutim ove se mutacije ne analiziraju u rutinskoj kliničkoj praksi pri genotipizaciji *VKORC1*.

Studije koje su se fokusirale na istraživanje međuetničkih razlika u osjetljivosti/odgovoru bolesnika na terapiju varfarinom potvrdile su da varijante *VKORC1* imaju značajno veći utjecaj na varijabilnost doze u bjelačkoj i azijskoj populaciji nego u afroameričkoj populaciji, a što je također rezultat raso-specifičnih razlika u učestalosti polimorfizama *VKORC1*<sup>98, 130, 190, 191</sup>.

Premda se varijabilnost doze varfarina ovisne o *VKORC1*, razlikuje po rasnim skupinama na populacijskoj razini, posjedovanje minornog alela (-1639A ili 1173T) na individualnoj razini

je povezano sa sličnim smanjenjem potrebnih doza varfarina bez obzira na rasu. Učestalost alela *CYP2C9* također značajno varira među rasnim skupinama. Minorni alel *CYP2C9\*2* se pojavljuje s učestalosti od 0.13 u bijelaca, 0.03 u crnačkoj populaciji, dok nije zabilježen u azijata. Učestalost *CYP2C9\*3* je 0.07 u bijelaca, 0,02 u crnačkoj populaciji i 0.04 u azijata, prema Međunarodnom farmakogenetičkom konzorciju za varfarin (IWPC, od engl. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium).

Znači, ukupan je raspon zastupljenosti minornih/varijantnih alela *CYP2C9* od 4% u azijata i 5% u crnačkoj populaciji do 30% u bjelačkoj populaciji. Te razlike mogu biti odgovorne za razlike na populacijskoj razini u korištenju algoritama za doziranje varfarina u rasnim skupinama. Manji raspon učestalosti alela *CYP2C9* u odnosu na alele *VKORC1* među rasnim skupinama objašnjava zašto je relativni doprinos *VKORC1* rasnim razlikama u doziranju veći od doprinosa *CYP2C9*. U hrvatskoj populaciji učestalost alela *CYP2C9\*2* i *\*3* je procijenjena na 35%<sup>98</sup>, što je slično vrijednostima objavljenima u drugim studijama u bjelačkim populacijama<sup>191</sup>. Učestalost *VKORC1 1173C>T* i *VKORC1 -1639G>A* u hrvatskoj populaciji iznosi za genotip *1173CC* i *-1639GG* 0,36, heterozigoti *CT* i *GA* su zastupljeni s 0,47 dok je učestalost genotipova *TT* i *AA* iznosila 0,17. Učestalost varijantnih alela je 0,4<sup>192</sup>.

Naši se rezultati također razlikuju od rezultata već spomenute studije koja je provedena među ortopedskim bolesnicima u kojoj autori nisu našli razlike u kontroli antikoagulantnih učinaka ili u incidenciji komplikacija između *PG* and *NPG* ispitanika<sup>162</sup>. U njihovoj studiji je učestalost varijantnih alela bila značajno različita u odnosu na našu studiju, jer je 13% ispitanika imalo samo varijantni alel *CYP2C9*, 44% je imalo polimorfizam *VKORC1*, dok je 19% ispitanika imalo plimorfizam na oba gena, za razliku od naše *FG* skupine u kojoj su 32% ispitanika bili nositelji varijantnog gena *CYP2C9*, 24.5% ispitanika je imalo samo polimorfizam *VKORC1*, a 28.3% su bili nositelji polimorfizama za oba gena. Navedene razlike u učestalosti varijantnih alela su mogle doprinijeti i razlikama ukupnih rezultata studija.

U hrvatskoj populaciji na specifičnom uzorku bolesnika (bolesnici s razvijenim ishemijskim moždanim udarom) također je provedeno ispitivanje svrsishodnosti i koristi primjene genotipizacije *CYP2C9* i *VKORC1* u doziranju varfarina<sup>193</sup>. Rezultati te studije su pokazali značajnu ulogu genotipova *VKORC1* i *CYP2C9* u moduliranju parametara koagulacije pri primjeni varfarina. I u toj studiji je kao i u ovdje prezentiranoj ustanovljeno da su nositelji genotipa *VKORC1 1173 TT* u najvećem postotku postizali terapijski *INR* 2-4 unutar prvih pet

dana uvođenja terapije varfarinom u odnosu na nositelje genotipa *VKORC1 1173 TC i CC*. Studija na bolesnicima s ishemijskim moždanim udarom je također pokazala da su nositelji i barem jednog varijantnog alela *CYP2C9* (\*2 i/ili\*3) brže postizali i najdulje imali vrijednosti INR unutar terapijskog raspona. Nakon ovog ispitivanja provedena je i najrecentnije objavljena analiza isplativosti provedbe ovih farmakogenetičkih analiza na temelju koje je zaključeno da postoji pozitivan omjer troška i koristi (engl. *cost/benefit*) za provedbu analiza genotipizacije *CYP2C9* i *VKORC1* u bolesnika s ishemijskim moždanim udarom, u kojih je nužno provesti antikoagulaciju s varfarinom u svrhu prevencije novih događaja i u kojih je postizanje ranog stabilnog antikoagulacijskog učinka iznimno važno<sup>194</sup>.

Naša studija nije pokazala tu povezanost terapijskog raspona INR s polimorfizmima *CYP2C9*. Izostanak povezanosti bi se mogao objasniti sastavom našeg uzorka (bolesnika). No ipak, post-hoc analiza napravljena s Bonferronijevom korekcijom pokazala je, nakon prilagodbe za druge gene, demografske, kliničke i laboratorijske parametre, statistički značajnu povezanost zatajenja srca u anamnezi s genotipom *CYP2C9* \*1/\*2. Genotip *CYP2C9* \*1/\*2 je također bio statistički značajno povezan s atrijskom fibrilacijom. Uz kontroliranje svih drugih varijabli, bolesnici s genotipom *CYP2C9* \*1/\*2 imaju veći rizik da razviju atrijsku fibrilaciju nego bolesnici s genotipom *CYP2C9* \*1/\*1.

Zaključno, u našoj studiji atrijska fibrilacija i zatajenje srca su jaki prediktori postizanja terapijskog raspona INR, a istovremeno negativno povezani s genotipom *CYP2C9* \*1\*2 koji je (samo na razini uzorka, ne i statistički značajno) pozitivno povezan s ostvarivanjem terapijskog raspona INR. Drugim riječima, atrijska fibrilacija i zatajivanje srca mogli su „ugušiti“ učinak *CYP2C9* i prikriti ga.

Osim polimorfizma *CYP2C9*\*2 i za obje varijante gena *MDR1 2367G>T/A* i *3435C>T* je pokazano da su statistički značajno povezane s nalazom atrijske fibrilacije. **To je podatak koje se nije do sada mogao naći u dostupnoj literaturi.** Varijantni oblici gena metaboličkog enzima *CYP2C9* i transportnog P-glikoproteina znače sporiji metabolizam i transport, a time i produljenu bioraspoloživost ne samo njihovih lijekova - supstrata već i različitih endogenih spojeva koji su u konačnici mogli doprinijeti patogenezi atrijske fibrilacije a u slučaju *CYP2C9* i razvoju srčanog zatajenja.

Mogući patomehanizam i objašnjenje zašto bi određeni genotip bio povezan a moguće i odgovoran za razvoj bolesti leži u tome da je *CYP2C9* uz *CYP2C8* i *CYP2J2* uključen u metabolizam arahidonske kiseline, generirajući epoksieikosatrienoičnu kiselinu (EEK) koja ima protektivne vaskularne učinke jer posreduje u dilataciji koronarnih arterija pospješujući

postishemičnu kardijalnu kontraktilnost, reducira vaskularnu inflamaciju i povećava intravaskularnu fibrinolizu. Genetičke varijante ovih enzima mogu rezultirati značajnim razlikama u vaskularnom odgovoru i mogu povećati rizik za razvoj infarkta miokarda (IM) i poremećenu kardiovaskularnu homeostazu što bi mogla biti patogenetska podloga za razvoj i same bolesti – atrijske fibrilacije. Također je dokumentirano da je CYP2C9 glavna citokrom P450 epoksigenaza u aorti i koronarnim arterijama<sup>195,196</sup>.

Zbog važne uloge u kardiovaskularnoj homeostazi daljnja istraživanja ekspresije ovog enzima mogu polučiti korisne spoznaje o etiologiji i liječenju kardiovaskularnih bolesti.

### **Uloga P-glikoproteina u moduliranju kardiovaskularne homeostaze**

Naši rezultati su nadalje ukazali na jednu također vrlo zanimljivu povezanost polimorfizama gena *MDR1/ABCB1* s atrijskom fibrilacijom. Fibrilacija atrijske je bila značajno rjeđa u bolesnika s genotipom *MDR1 2677TT*, u usporedbi s bolesnicima nositeljima genotipa *MDR1 2677GT*. Nasuprot tome, bolesnici s genotipom *MDR1 3435TT* imali su veće izgleda za razvoj atrijske fibrilacije u usporedbi s bolesnicima nositeljima genotipa *3435CT*.

Kako možemo objasniti ovaj nalaz?

P-glikoprotein kodiran genom *MDR1/ABCB1* ima važnu ulogu u bioraspoloživosti i ograničavanju toksičnog učinka velikog broja lijekova i drugih ksenobiotika. Nalazi se na membrani mnogih stanica, između ostalih i kardiomiocitima gdje ima aktivnu funkciju efluksne pumpe, tj. ima protektivnu ulogu i izbacuje sve potencijalno toksične ksenobiotike iz kardiomiocita<sup>197</sup>. Istraživanja su pokazala da je varijabilna ekspresija Pgp u ljudskom srcu potencijalni modulator učinkovitosti lijekova u srcu, ali isto tako i lijekovima i drugim ksenobiotičima ili endogenim supstratima inducirane kardiotoksičnosti. Na ekspresiju utječu različiti polimorfizmi u genu *MDR1*, pa je tako genska varijabilnost također potencijalni modulator aktivnosti lijekova u srcu<sup>198</sup>.

Nadalje, rezultati istraživanja također ukazuju da povišene razine perifernih proupalnih medijatora mogu doprinijeti razvoju bolesti koronarnih arterija. Faktor aktivacije trombocita (PAF, od engl. *platelet activating factor*) je važan proinflatorni medijator a razine PAF u plazmi koreliraju s Pgp ekspresijom i funkcijom. Dokazana je povezanost polimorfizama *MDR1* s ekspresijom i aktivnosti Pgp i razinom PAF u plazmi<sup>199</sup>.

Također nalazimo podatke o smanjenoj ekspresiji transkripata *ABCB1/Pgp*, koja može rezultirati višim, toksičnim koncentracijam ksenobiotika u kardiomiocitima. Nadalje i

inhibicija Pgp može rezultirati sličnim učincima. *In vitro* studije su potvrdile kako inhibicija Pgp verapamilom u kardiomiocitima štakora povećava osjetljivost na toksične učinke<sup>200</sup>. Studije na eksperimentalnim životinjskim modelima također izvještavaju o ulozi ABCB1 u snižavanju intrakardijalnih koncentracija lijekova koji mogu izazvati prolongaciju intervala QT i kardiotoksičnost. U zaključku se navodi da i česti polimorfizmi *ABCB1/Pgp* mogu poslužiti kao biljezi prolongacije intervala QT nakon primjene lijekova supstrata Pgp<sup>201</sup>. Sve su to teorijski eksperimentalni patomehanizmi koji ukazuju na moguću povezanost genetičkog polimorfizma i s određenim bolestima, odnosno razvojem određenih bolesti. Daljnja istraživanja, eksperimentalna i klinička donijeti će nova saznanja.

### **Interakcija *CYP2C9* i P glikoproteina**

Naše je ispitivanje ukazalo na značajnu ulogu polimorfizama *MDR1/ABCB1* u moduliranju antikoagulacijskog učinka varfarina. U znanstvenoj literaturi dostupne su tek dvije studije koje su ispitivale ulogu polimorfizama gena za Pgp/*MDR1* u reguliranju učinaka varfarina. To je studija DeOliviera i suradnika koja je ispitivala povezanost polimorfizma *MDR1 C3435T* s terapijskom dozom varfarina u bolesnika s trombofilijom<sup>202</sup>. Autori ističu da su nositelji genotipa *MDR1 3435TT* trebali značajno više tjedne doze varfarina. U ispitivanju opisanom u disertaciji Macolić-Šarinić u kojoj je ispitivana učestalost nuspojava varfarina u odnosu na polimorfizme *MDR1*, ispitanici bez nuspojava na terapiju varfarinom bili su češće nositelji genotipa *MDR1 3435TT*<sup>203</sup>. Rezultati su također ukazali na povezanost genotipa *MDR1 2677GG* s većom učestalošću ozbiljnih nuspojava na terapiju varfarinom dok su ispitanici bez nuspojava bili češće nositelji genotipa *2677TT*.

Općenito, treba istaći da je identificirano više polimorfizama (SNP) u genu *MDR1/ABCB1*, od kojih neki utječu na Pgp ekspresiju i/ili funkciju. Polimorfizmi testirani u ovoj studiji *2677G>T/A* i *3435C>T* su u snažnoj neravnotežnoj vezi (engl. *linkage disequilibrium*). Polimorfizam *2677G>T/A* rezultira supstitucijom aminokiselina (Ala893Ser/Thr), dok je *3435C>T* sinonimni SNP. Najviše do sada istraživani SNP je upravo *3435C>T* i rezultira tihom mutacijom. Premda je Pgp vrlo važan u bioraspoloživosti velikog broja lijekova-supstrata, u mnogim se studijama ističe kompleksnost procjene ukupnog učinka ispitivanih varijanti gena *MDR1* koje na različite načine zbog specifičnosti vezanja za supstrat mogu modulirati ekspresiju i funkciju P-glikoproteina a time i konačan učinak na farmakokinetičke parametre. I drugi autori ističu da je teško procijeniti ukupan učinak transportnih proteina

kako na farmakokinetiku tako i na učinkovitost/nuspojave lijeka upravo zbog složenosti odnosa lijekova supstrata i različitih bioloških barijera<sup>204</sup>. Novije studije također naglašavaju i na značaj interakcija lijekova na razini Pgp.

U našoj smo studiji ipak ustanovili vrlo važne interakcije gena *CYP2C9* i *MDR1/ABCB1*. Nakon uključivanja interakcije genotipova *MDR1* i *CYP2C9* povećana je prediktivna vrijednost za INR 2-4 .

Osim toga s obzirom da je u ovom istraživanju uočena razlika u distribuciji alela i genotipova *MDR1/ABCB1* u odnosu na koagulacijske parametre smatramo da bi bilo vrijedno i znanstveno opravdano ispitivanje proširiti na dobro definirane homogene skupine ispitanika, u kojih je indicirana terapija varfarinom.

### 5.5. Osvrt na novije antikoagulantne lijekove

Posljednjih nekoliko godina na tržištu su se pojavili novi peroralni antikoagulantni lijekovi. Spadaju u skupinu antitrombotičkih lijekova i dijele se na izravne inhibitore trombina (dabigatran, argotraban) i izravne inhibitore faktora Xa (rivaroksaban, apiksaban).

ATC klasifikacija	Skupina	Lijekovi
B01 AE	Direktni inhibitori trombina	bivalirudin, argotraban, <b>dabigatran</b>
B01 AF	Direktni inhibitori Fxa	<b>rivaroksaban, apiksaban</b>

SLIKA 5.5.1. Pregled novijih peroralnih antikoagulansa na našem tržištu

Nakon pojave na tržištu provedene su brojne studije u kojima se učinak novih lijekova uspoređivao s varfarinom u brojnim indikacijama.

Dabigatran je izravni inhibitor trombina koji je još 2008. godine Europska medicinska agencija (EMA) odobrila za prevenciju tromboembolijskih događaja u bolesnika nakon ugradnje umjetnog kuka i koljena i za nevalvularnu atrijsku fibrilaciju<sup>205</sup>. Vrlo brzo na temelju novih objavljenih studija<sup>206, 207</sup>, FDA odobrava lijek za prevenciju moždanih udara u bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atrijske<sup>208</sup>. Lijek je naime pokazao značajno smanjenje učestalosti moždanih udara s također značajno manjim brojem krvarenja u bolesnika s

nevalvularnom AF. Doza od 110 mg pokazala je slični učinak kao i varfarin, uz manji broj krvarenja, ali je doza od 150 mg pokazala bolji učinak uz isti broj krvarenja kao i varfarin.

Lijek ima značajnih prednosti pred varfarinom: ima kraći poluvijek života pa ima brži nastup djelovanja, ne zahtijeva praćenje parametara koagulacije, ne stupa u interakcije s lijekovima (osim Pgp inhibitorima i induktorima). No lijek ima i nedostataka koji u posljednje vrijeme počinju pokazivati sve veći razmjor. Dabigatran nema antidota i kod pojave krvarenja koje je također jedno od najvažnijih i najčešćih njegovih nuspojava, osim simptomatske terapije, nema mogućnosti “obrata” učinka. Kako se lijek eliminira bubregom, ne preporučuje se primjenjivati ga u osoba s oštećenjem funkcije bubrega. Poznate su kontraindikacije: nedavno akutno krvarenje i mehanička prostetička srčana valvula. Zbog nepovoljnog učinka dabigatrana na bolesnike s mehaničkom prostetičkom valvulom u kojih se uočio povećani broj tromboemboličkih događaja ali i broj krvarenja, u suporedbi s varfarinom, pokus REALIGN (od engl.) prekinut je prijevremno. Zanimljivo je da je najveći broj tromboembolijskih događaja javio se u subpopulaciji bolesnika u kojih je dabigatran propisan unutar 7 dana od operacije<sup>209</sup>.

Isto tako se u posljednje vrijeme sve više u literaturi javljaju rezultati praćenja bolesnika u kojih se primjenjuje dabigatran tako da su dostupnija i nova saznanja. Analiza primjene dabigatrana u velikog broja bolesnika pokazala je da lijek smanjuje rizik za moždani udar i smrtni ishod u usporedbi s varfarinom no ima povišeni rizik za gastrointestinalno krvarenje<sup>210</sup>.

U časopisu British Medical Journal u nekoliko navrata tijekom 2014. godine objavljeni su napisi koji navode kako su istraživači dabigatrana zatajili regulatornim tijelima, vrlo važne podatke koje su prikupili tijekom ispitivanja o potrebi pažljivog motrenja bolesnika kako bi ih se zaštitilo od GI krvarenja. Osobito se potrebno upozorenje odnosi na starije bolesnike. Čini se naime da postoji vrlo izražena interindividualna varijacija serumskih koncentracija dabigatrana što može biti uzrok povišenom riziku za krvarenje. Autori članka ističu kako su zatajeni podaci konfliktni s reklamom u kojoj se navodi kako se radi o lijeku u kojeg ne treba pratiti antikoagulantni učinak<sup>211, 212!</sup>

Nove studije su pokazale da dabigatran u svakodnevnoj kliničkoj praksi ne dovodi do povećanog rizika za krvarenje u odnosu na varfarin<sup>213</sup>, no zanimljivo je da isti autori već sljedeće godine upozoravaju da promjena varfarina u dabigatran u bolesnika s preboljelim

moždanim udarom ili TIA donosi povećani rizik za ishemijski moždani udar nego nastavak primjene varfarina <sup>214</sup>.

Najvažnija kontraindikacija za primjenu dabigatrana je primjena u bolesnika s mehaničkom valvulom što se dokazalo u kliničkom pokusu koji je prekinut prije vremena upravo zbog povećane učestalosti krvarenja (4%) ali i tromboembolijskih događaja (5%) u skupini bolesnika na dabigatranu u odnosu na varfarinsku skupinu (bez krvarenja i 2% tromboembolijskih događaja). Svi bolesnici s krvarenjem imali su velika perikardijalna krvarenja. Zaključno je da dabigatran u tih bolesnika ne pokazuje korist, a ima značajno povišeni rizik <sup>215</sup>.

I najnoviji članak objavljen ove 2015. godine u časopisu CHEST ukazuje kako je primjena izravnih inhibitora trombina povezana s razvojem kardijalne tromboze <sup>216</sup>.

Također su važna zapažanja da bi interakcije dabigatrana s ostalim lijekovima u konkomitantnoj terapiji, a koje se dešavaju na razini P-glikoproteina mogle biti važne za neočekivane nuspojave/krvarenja. Kako smo u našem radu dokazali značajnu ulogu polimorfizama gena koji kodira P-glikoprotein (*ABCB1/MDR1*) u moduliranju terapije varfarinom, nameće se sugestija da se slična istraživanja provedu i za dabigatran.

Rivaroksaban je za razliku od dabigatrana, izravni inhibitor faktora Xa koji je indiciran u istim stanjima kao i dabigatran, ali je za razliku od njega odobren i za liječenje DVT i PE kao i u sekundarnoj profilaksi. I on je svoj učinak dokazao u brojnim studijama te se počeo šire primjenjivati od kada je ušao i u svjetske smjernice za liječenje tromboembolijskih događaja (CHEST)<sup>148</sup>. I primjena rivaroksabana je opterećena s nepostojanjem antidota što može završiti fatalno kod velikih krvarenja, a primjena se ne preporučuje u bolesnika s prostetičkim valvulama kao i u bolesnika s teškim poremećajem bubrežne funkcije.

Na kraju treba istaći kako je već 2013. godine sustavni pregled literature utvrdio je kako se čini da novi antikoagulantni lijekovi (obje skupine) nemaju bolji učinak pred varfarinom u prevenciji nehemoragijskih moždanih udara i sustavnih embolijskih događajau bolesnika s nevalvularnom AF <sup>217</sup>. Međutim oni su ipak općenito udruženi s manjim rizikom za intrakranijska krvarenja.

Primjena novijih antikoagulansa svakako zahtijeva i dalje vrlo pažljivo individualno određivanje indikacije za primjenu te pomno praćenje bolesnika.



Iz svega se može zaključiti kako će varfarin vjerojatno još neko vrijeme biti prvi lijek u liječenju i prevenciji traumembolijskih događaja u velikog broja bolesnika. Noviji antikoagulantni lijekovi se za sada, u našoj sredini, primjenjuju uglavnom samo ukoliko bolesnik ne podnosi varfarin ili nema mogućnosti adekvatne kontrole parametara koagulacije. Cijena novijih peroralnih antikoagulansa također bitno utječe na primjenu novijih lijekova.

## ZAKLJUČCI

1. Utvrđena je povezanost polimorfizma, *VKORC1*, *MDR1* i *CYP2C9* s boljim predviđanjem doze varfarina te bržim postizanjem ciljnih vrijednosti parametara koagulacije u bolesnika u kojih je doziranje varfarina bilo određeno na temelju algoritama s uključenim nalazima genotipizacije.
2. U finalnom, multivarijatnom modelu, nakon prilagodbe za sve demografske, kliničke i laboratorijske parametre, statistički značajna povezanost s postizanjem terapijskog raspona INR 2-4 je ustanovljena za genotipove *VKORC1* 1173TT, *MDR1* 2677TT i *MDR1* 3435TT.
3. Uspoređivanjem ključnih antikoagulacijskih učinaka tj. udjela vremena unutar INR 2-4 i postotka postignute stabilne doze varfarina, statistički značajna korist od doziranja varfarina prema algoritmu koji je uključivao rezultate genotipizacije je ustanovljena u podskupini ispitanika s dijagnozom atrijske fibrilacije (AF) koji su provodili statistički značajno dulje vrijeme u terapijskom intervalu INR, te su u većem postotku postizali stabilnu terapijsku dozu varfarina u odnosu na ispitanike u kojih je varfarin doziran samo prema kliničkim parametrima.
4. Interakcija genotipova *MDR1* 2677G<T/A i *CYP2C9*\*2\*3 se pokazala statistički značajnim prediktorom postizanja terapijskog raspona INR (2-4) koja je povećala prediktivnu vrijednost modela doziranja varfarina.
5. U bolesnika s atrijskom fibrilacijom i zatajenjem srčane funkcije ustanovljena je češća zastupljenost polimorfizma *CPY2C9*. S obzirom da je enzim *CYP2C9* uključen u metabolizam arahidonske kiseline, njegove genske varijante s posljedičnom slabijom funkcijom enzima mogu služiti kao biomarkeri/prediktori navedenih stanja.
6. Varijante gena *MDR1/ABCB1* 2367>T/A i 3435 C>T su također češće zastupljene u bolesnika s atrijskom fibrilacijom.

## SAŽETAK

### Utjecaj kombinacije polimorfizma gena CYP2C9, VKORC1 i MDR1 na individualizaciju terapije varfarinom

Varfarin, iako lijek koji se jako dobro poznaje još uvijek zahtijeva vrlo pažljivu primjenu zbog svojih posebnosti - uskog terapijskog indeksa i velike varijabilnosti odnosa doze i učinka. Uvođenje varfarina do sada se temeljilo uglavnom na kliničkim parametrima svakog bolesnika: dobi, spolu, popratnim bolestima, tjelesnoj težini, a doza i učinak značajno ovise i o istodobnoj primjeni lijekova. Ipak u velikog dijela bolesnika stabilizacija parametara koagulacije i stabilizacija doze se ne postiže brzo. Opasnost od krvarenja kao i opasnost od ponovne tromboze je i dalje velika. Polimorfizam gena uključenih u farmakodinamiku (VKORC1) i farmakokinetiku (CYP2C9) varfarina mogu velikim dijelom objasniti individualne zahtjeve za dozom. Novija istraživanja ukazuju da bi i polimorfizam MDR1 gena mogao utjecati na individualizaciju doze jer P-glikoprotein kao transportni protein moguće ima važnu ulogu u raspoloživosti varfarina. Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti učinak kombinacije polimorfizama sva tri gena na dozu primijenjenog varfarina. Nije utvrđena statistička značajnost genotipiziranog vođenja doziranja u bolesnika s dubinskovenskom trombozom i plućnom embolijom no ona je potvrđena u bolesnika s atrijskom fibrilacijom. Stabilna doza postignuta je u velikog broja bolesnika s genotipizacijom u odnosu na one s kliničkim vođenjem terapije.

Ključne riječi: varfarin, farmakogenetičko testiranje, individualizacija terapije

## ABSTRACT

### Influence of combination of *CYP2C9*, *VKORC1* and *MDR1* gene polymorphisms on individualization of warfarine therapy

Despite that warfarine has been used as an anticoagulant for many years its dosing presents a challenging task owing to its narrow therapeutic range and large variability in dose-response relationship. Warfarine therapy usually started after assessment of clinical characteristics (age, body size, race), vitamin K intake and use of concomitant medications. Inappropriate dosing continues to contribute to significant morbidity and mortality due to thrombotic disease and bleeding complications.

Genetic variations in the cytochrome P450 polypeptide 9 (*CYP2C9*) and vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) have been identified as the most important enzymes in the warfarin pharmacological pathway. Observational studies have indicated *CYP2C9*, *VKORC1* and *MDR1* potential effect but randomized clinical trials resulted in contradictory findings.

The aim of this study is to evaluate the influence of combination of *CYP2C9*, *VKORC1* and *MDR1* gene polymorphisms on individualization of warfarine therapy. We have not found statistically significant benefits from genotype guided dosing in deep-vein thrombosis and pulmonary embolism, but in atrial fibrillation percentage of time with INR therapeutic range was statistically significantly longer in this, than in clinically guided dosing group. Stable dose was achieved by statistically significantly larger number of patients whose dose had been determined by genotype and clinical characteristics than in clinically-only-guided dosing group.

Key words: warfarine therapy, pharmacogenetic testing, individualised therapy

Ksenija Makar-Aušperger

Godina obrane disertacije 2015

## Literatura:

---

- <sup>1</sup> Harmening DM. Clinical Hematology and Fundamentals of Hemostasis. 3. izd. Philadelphia: F.D. Davis; 1997, str. 481-508.
- <sup>2</sup> Stiene-Martin EA, Lotspeich-Steininger CA, Koepke JA. Clinical Hematology. Principles, Procedures, Correlations. 2. izd. Philadelphia: Lippincott; 1998, str.599-611.
- <sup>3</sup> Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991;30:10363-10370.
- <sup>4</sup> Brody T. Nutritional Biochemistry. 2. izd. San Diego:Academic Press; 1999.
- <sup>5</sup> Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost* 2004;2:2118-2132
- <sup>6</sup> Saupe J, Shearer MJ, Kohlmeier M. Phyloquinone transport and its influence on gamma-carboxyglutamate residues od osteocalcin in patients on maintenence hemodialysis. *Am J Clin Nutr.* 1993;58:204-208.
- <sup>7</sup> Booth SI, Centurelli MA. Vitamin K: a practical guide to the dietary management of patients on warfarin. *Nutri Rev* 1999;57:288-296.
- <sup>8</sup> Olson RE. Vitamin K. U: Shillsm, Olson JA, Shike M, Ross AC, ur. *Nutrition in Health and Disease.* 9. izd. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999, str. 363-380.
- <sup>9</sup> Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid. *Blood.* 1999;93:1798-1808.
- <sup>10</sup> Choonara IA, Malia RG, Haynes BP i sur. The relationship between inhibition of vitamin K 1,2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin *Br J Clin Pharmacol* 1988, str. 251-7.
- <sup>11</sup> Shearer MJ. Gamma-glutamyl Carboxylation: Squaring the Vitamin K Cycle. *Blood* 2006;108:1795-1796.
- <sup>12</sup> O'Reilly R, Rytand D. Resistance to warfarin due to unrecognized vitamin K supplementation. *N Engl J Med* 1980;303:160-161.
- <sup>13</sup> Suttie JW, Muhah-Schendel LL, Shah DV i sur. Vitamin K deficiency from dietary vitamin K restriction in humans. *Am J Clin Nutr* 1988;47:475-480.
- <sup>14</sup> Booth SL, Charnley JM, Sadowski JA i sur. Dietary vitamin K<sub>1</sub>, and stability of oral anticoagulation: proposal of a diet with a constant vitamin K<sub>1</sub> content. *Thromb Haemost* 1997;77:504-509.
- <sup>15</sup> Daly AK, King BP. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics* 2003;13:247-252.

- 
- <sup>16</sup> Oldenburg J, V\*Bevans CG, Fregin A i sur. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: The influence of variant VKORC1 and CYP2C) alleles. *Thromb Haemost* 2007;98:570-578.
- <sup>17</sup> Wysowski DK, Nourjah P, Swartz L. Bleeding complications with warfarin use: prevalent adverse effect resulting in regulatory action. *Arch Intern Med* 2007;167:1414-9.
- <sup>18</sup> Kearon C, Ginsberg JS, Kovacs MJ i sur. Comparison of low-intensity warfarin therapy with conventional-intensity warfarin therapy for long-term prevention of recurrent venous thromboembolism. *N Engl J Med* 2003;349:631-9.
- <sup>19</sup> Levine MN, Raskob G, Landefeld S i sur. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest* 2001;119Suppl 1:108S-121S.
- <sup>20</sup> Takahashi H, Wiklkinson GR, Caraco Y i sur. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacology and Therap* 2001;70:159-164.
- <sup>21</sup> Loebstein R, Yonath H, Peleg D i sur. Interindividual variability in sensitivity to warfarin-nature or nurture. *Clin Pharmacology and Therap* 2003;73:253-263.
- <sup>22</sup> Fihn SD, McDonell M, Martin D i sur. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study group. A multicentre study. *Ann Intern Med* 1993;118:511-520.
- <sup>23</sup> Landefeld CS, Byeth RJ. Anticoagulant – related bleeding: clinical epidemiology, prediction, and prevention. *Am J Med* 1993;95:315-328.
- <sup>24</sup> Douketis JD, Foster GA, Crowther MA i sur. Clinical risk factors and timing of recurrent venous thromboembolism during the initial 3 months of anticoagulant therapy. *Arch Intern Med* 2000; 160:3431-3436.
- <sup>25</sup> Linkins LA, Choi PT, Douketis JD. Clinical impact of bleeding in patients taking oral anticoagulant therapy for venous thromboembolism: a meta-analysis. *Ann Intern Med* 2003;139:893-900.
- <sup>26</sup> Hylek EM, Evans-Molina C, Shea C i sur. Major hemorrhage and tolerability of warfarin in the first year of therapy among elderly patients with atrial fibrillation. *Circulation* 2007;115:2689-2696.
- <sup>27</sup> Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL i sur. Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-459: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin drug interactions. *Chem res Toxicol* 1992;5:54-59.
- <sup>28</sup> Hirsh J, Dalen JE, Anderson DR i sur. Oral anticoagulants: mechanism of action clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest* 1998; 114:445S-469S.
- <sup>29</sup> Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2001;40:587-603.

- 
- <sup>30</sup> Gage BF, Lesko LJ. Pharmacogenetics of warfarin: regulatory, scientific, and clinical issues. *J Thromb Thrombolysis*. DOI 10.1007/s11239-007-0104-y.
- <sup>31</sup> Loebstein R, Dvoskin I, Halkin H i sur. A coding VKORC-1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood* 2007;109:2477-80.
- <sup>32</sup> Micromedex(R) Healthcare Series, Thompson MICROMEDEX, vol 163 expires 3/2015.
- <sup>33</sup> Lehman ME, Kolb KW, Barnhart GR i sur. Warfarin absorption in a patient with short-bowel syndrome. *Clin Pharm* 1985;4:325-326.
- <sup>34</sup> Lutomski DM, La France RJ, Bower RH i sur. Warfarin absorption after massive small bowel resection. *Am J Gastroenterol* 1985;80:99.
- <sup>35</sup> Harder S, Thurman P. Clinically Important Drug Interactions with Anticoagulants. *Clin Pharmacokinet* 1996;6:416-444.
- <sup>36</sup> Kelly JG, O'Malley K. Clinical pharmacokinetics of oral anticoagulants. *Clin Pharmacokinet* 1979;4:1-15.
- <sup>37</sup> Urien S, Albengres E, Pinquier JL i sur. Role of alpha-1 acid glycoprotein, albumin, and nonesterified fatty acids in serum binding of apazone and warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 1986;39:683-689.
- <sup>38</sup> Swan S & Bennett WM. Drug dosing guidelines in patients with renal failure. *West J Med* 1992;156:633-638.
- <sup>39</sup> Redman AR. Implications of cytochrome P4502C9 polymorphism on warfarin metabolism and dosing. *Pharmacotherapy* 2001;21:235-242.
- <sup>40</sup> Lewis RJ, Trager WF. The metabolic fate of warfarin studies in the metabolites in plasma. *Ann NY Acad Sci* 1971;179:205.
- <sup>41</sup> Shikata E, Ieiri I, Ishiguro S i sur. Association of pharmacokinetic (CYP2C9) and pharmacodynamic (factors II, VII, IX, and X; proteins S and C; and  $\gamma$ -glutamyl carboxylase) gene variants with warfarin sensitivity. *Blood* 2004;103:2630-2635.
- <sup>42</sup> Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM i sur. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P4502C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. *Clin Pharmacol Ther* 2006;79: 291-302.
- <sup>43</sup> Anonymous (1983). "33: Expert Committee on Biological Standardization. Requirements for thromboplastins and plasma used to control oral anticoagulant therapy". *World Health Organ Tech Rep Ser*. pp. 81-10.
- <sup>44</sup> Johnston M, Harrison L, Moffat K i sur. Realibility of the international normalized ratio for monitoring the induction phase of warfarin: comparison with the prothrombin time ratio. *J Lab Clin Med* 1996;128:214-217.

- 
- <sup>45</sup> Sconce EA, Khan TI, Wynne HA i sur. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329-2333.
- <sup>46</sup> Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. *The Pharmacogenomics Journal* 2007;7:99-111.
- <sup>47</sup> Petersen P, Boysen G, Godtfredsen J i sur. Placebo-controlled, randomized trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. *Lancet* 1989;1:175-179.
- <sup>48</sup> Petersen P, Kastrup J, Heliveg-Larsen S i sur. Risk factors for thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. The Copenhagen AFASAK study. *Arch Intern Med* 1990;150:819-821.
- <sup>49</sup> Guyatt GH, Akl EA, Crowter M, Gutterman DD, Schunemann HJ and for the American College of Chest Physicians Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis Panel. *Chest* 2012;141:7S-47S. DOI 10.1378/chest.1412S3.
- <sup>50</sup> Powers PJ, Gent M, Jay RM i sur. A randomized trial of less intense postoperative warfarin or aspirin therapy in the prevention of venous thromboembolism after surgery for fractured hip. *Arch Intern Med* 1989;149: 771-774.
- <sup>51</sup> Poller L, McKernan A, Thompson JM i sur. Fixed minidose warfarin: a new approach to prophylaxis against venous thrombosis after major surgery. *BMJ* 1987;295:1309-1312.
- <sup>52</sup> Mok CK, Boey J, Wang R i sur. Warfarin versus dipyridamole-aspirin and pentoxifylline-aspirin for the prevention of prosthetic heart valve thromboembolism: a prospective clinical trial. *Circulation* 1985;72:1059-1063.
- <sup>53</sup> European Atrial Fibrillation Trial Study Group. Secondary prevention in non rheumatic atrial fibrillation after transient ischemic attack or minor stroke. *Lancet* 1993;342:1255-1262.
- <sup>54</sup> Anand SS, Yusuf S. Oral anticoagulant therapy in patients with coronary artery disease: a meta analysis. *JAMA* 1999;282:2058-2067.
- <sup>55</sup> Atrial Fibrillation Investigators: Risk factors for stroke and efficacy of antithrombotic therapy in atrial fibrillation. Analysis of pooled data from five randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 1994;154:1449-1457.
- <sup>56</sup> Singer DE, Hughes RA, Gress DR i sur: The effect of aspirin on the risk of stroke in patients with nonrheumatic atrial fibrillation: the BAATAF study. *Am Heart J* 1992;124:1567-1573.
- <sup>57</sup> Hart RG, Benavente O, McBride R i sur. Antithrombotic therapy to prevent stroke in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis. *Ann J Intern Med* 1999;131:492-501.



- 
- <sup>58</sup> Wolf PA, Abbot RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: Framingham Study. *Stroke* 1991;22:983-8.
- <sup>59</sup> Stroke Prevention in Atrial Fibrillation Investigators. Stroke Prevention in Atrial Fibrillation (SPAF) Study: final Results. *Circulation* 1991;84:527-539.
- <sup>60</sup> Gage BF, Boechler M, Doggette AL i sur. Adverse outcomes and predictors of underuse of antithrombotic therapy in medicare beneficiaries with chronic atrial fibrillation. *Stroke* 2000;31:822-7.
- <sup>61</sup> Go AS, Hylek EM, Chang A i sur. Anticoagulation Therapy for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. How Well Do Randomized Trials Translate Into Clinical Practice? *JAMA* 2003;290:2685-2692.
- <sup>62</sup> Bungard TJ, Ghali WA, Teo KK i sur. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 2004;91:87-94.
- <sup>63</sup> Coumadin.pdf; Accessed January 25, 2010. Coumadin [package insert]. <http://packageinserts.bms.com/pi/pi>
- <sup>64</sup> Al-Jundi W, Rubin N. Cardiac tamponade secondary to haemopericardium in a patient on warfarin. *BMJ Case Rep* 2010.
- <sup>65</sup> Kuijjer PM, Hutten BA, Prins MH i sur. Prediction of the risk of bleeding during anticoagulant treatment for venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 1999;159:457-460.
- <sup>66</sup> Bejth RJ, Milligan PE, Gage BF. Risk factors for bleeding in patients taking coumarins. *Curr Hematol Rep* 2002;1:41-49.
- <sup>67</sup> Umlas J, Harken DE. Warfarin-induced alopecia. *Cutis* 1988;42(1):63-4.
- <sup>68</sup> Nazarian RM, Van Cott EM, Zembowicz A, Duncan LM. Warfarin-induced skin necrosis. *J Am Acad Dermatol* 2009 Aug;61(2):325-32.
- <sup>69</sup> Parrish RH, Pazdur DE, O'Donnell PJ. Effect of carbamazepine initiation and discontinuation on antithrombotic control in a patient receiving warfarin: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 2006 Nov;26(11):1650-3.
- <sup>70</sup> Heimark LD, Gibaldi M, Trager WH i sur. The mechanism of the warfarin-rifampin drug interaction in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:388-94.
- <sup>71</sup> Lu Y, Won KA, Nelson BJ i sur. Characteristics of the amiodarone-warfarin interaction during long-term follow-up. *Am J Health Syst Pharm* 2008;65(10):947-952.
- <sup>72</sup> Frazee LA & Reed MD. Warfarin and nonsteroidal antiinflammatory drugs: why not? *Ann Pharmacother* 1995;29:1289-1291
- <sup>73</sup> Howard-Thompson A, Hurdle AC, Arnold LB i sur. Intracerebral hemorrhage secondary to a warfarin-metronidazole interaction. *Am J Geriatr Pharmacother* 2008;6(1):33-36.

- 
- <sup>74</sup> Elbe DH, Chang SW. Moxifloxacin-warfarin interaction: a series of five case reports. *Ann Pharmacother* 2005;39(2):361-364.
- <sup>75</sup> Baillargeon J, Holmes HM, Lin YL i sur. Concurrent use of warfarin and antibiotics and the risk of bleeding in older adults. *Am J Med* 2012;125(2):183-189.
- <sup>76</sup> O'Reilly RA. Stereoselective interaction of trimethoprim-sulfamethoxazole with the separated enantiomorphs of racemic warfarin in man. *N Engl J Med* 1980;302:33-35.
- <sup>77</sup> Glasheen JJ, Fugit RV, Prochazka AV. The risk of Overanticoagulation with Antibiotic Use in Outpatients on Stable Warfarin Regimens. *J Gen Intern Med* 2005;20:653-656.
- <sup>78</sup> Westergren T, Johansson P, Molden E. Probable Warfarin-Simvastatin Interaction (July/August). *Ann Pharmacother* 2007;41:1292-1295.
- <sup>79</sup> Gladman JRF, Dolan G. Effect of age upon the induction and maintenance of anticoagulation with warfarin. *Postgrad Med J* 1995;71:153-5.
- <sup>80</sup> Wynne H, Kamali F, Edwards C i sur. Effect of age upon warfarin dosage requirements: a longitudinal study. *Age Ageing* 1996;25:429-431.
- <sup>81</sup> Kamali F, Khan TI, King BP i sur. Contribution of age, body size and CYP2C9 genotype to anticoagulant response to warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2004;75:204-212.
- <sup>82</sup> Garcia D, Regan S, Crowther M i sur. Warfarin maintenance dosing patterns in clinical practice: implications for safer anticoagulation in the elderly population. *Chest* 2005 Jun;127(6):2049-56.
- <sup>83</sup> Eichenger S, Hron G, Bialonczyk C i sur. Overweight, obesity and the risk of recurrent venous thromboembolism. *Arch Intern Med* 2008;168:1678-1683.
- <sup>84</sup> Kabagambe EK, Beasley TM, Limdi NA. Vitamin k intake, body mass index and warfarin maintenance dose. *Cardiology* 2013;126(4):214-8.
- <sup>85</sup> Wallace JL, Reaves AB, Tolley EA i sur. Comparison of initial warfarin response in obese patients versus non-obese patients. *J Thromb Thrombolysis* 2013 Jul;36(1):96-101.
- <sup>86</sup> Penning- van Beest FJA, van Meegen E, Rosendaal FR. Characteristics of Anticoagulation Therapy and Comorbidity Related to Overanticoagulation, *Thromb Haemost* 2001;86:569-74.
- <sup>87</sup> Fihn SD, McDonnell M, Martin M i sur. Risk factors for complications of chronic anticoagulations: A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-Up Study Group. *Ann Intern Med* 1993;118:511-20.
- <sup>88</sup> Franco V, Polanczyk CA, Clausell N i sur. Role of dietary vitamin K intake in chronic oral anticoagulation: prospective evidence from observational and randomized protocols. *Am J Med* 2004;116:651-656.

- 
- <sup>89</sup> Sconce E, Khan T, Mason J i sur. Patients with unstable control have a poorer dietary intake of vitamin K compared to patients with stable control of anticoagulation. *Thromb Haemost* 2005;93:872-5.
- <sup>90</sup> Sconce E, Avery P, Wynne H i sur. Vitamin K supplementation can improve stability of anticoagulation for patients with unexplained variability in response to warfarin. *Blood* 2007; 109:2419-2423.
- <sup>91</sup> Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 2006;57:119-137
- <sup>92</sup> Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 2005;352:2211–21.
- <sup>93</sup> Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487–91.
- <sup>94</sup> Ishikawa T, Hirano H, Onishi Y i sur. Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004;19:1-14.
- <sup>95</sup> Allabi AC, Gala JL, Desager JP, Heusterspreute M, Horsmans Y. CYP2C9, CYP2C19, ABCB1 (MDR1) genetic polymorphisms and phenytoin metabolism in a Black Beninese population. *Br J Clin Pharmacol* 2003 Dec;56(6): 653–657.
- <sup>96</sup> Stubbins MJ, Harries LW, Smith G i sur. Genetic analysis of the human cytochrome P450 CYP2C9 locus. *Pharmacogenetics* 1996;6:429–39.
- <sup>97</sup> Lee CR, J. A. Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 Polymorphisms: A Comprehensive Review of the in-vitro and Human Data. *Pharmacogenetics*. 2002;12:251-263.
- <sup>98</sup> Božina N, Granić P, Lalić Z, Tramišak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J* 2003;44:425-8.
- <sup>99</sup> Rettie AE, Wienkers LC, Gonzalez FJ i sur. Impaired (S)warfarin metabolism catalysed by the R1 44C allelic variant of CYP2C9. *Pharmacogenetics* 1994;4:39-42.
- <sup>100</sup> Crespi CL, Miller VP. R1 44C change in CYP2C9\*2 allele alters interaction of the cytochrome P450 with NADPH: cytochrome oxidoreductase. *Pharmacogenetics* 1997;7:203-210.
- <sup>101</sup> Li T, Chang CY, Jin DY i sur. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 2004;427:541-544.
- <sup>102</sup> Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V i sur. Mutations in VKORC1 cause warfarin and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;427:537-541.

- 
- <sup>103</sup> Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF i sur. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005;352:2285-2293.
- <sup>104</sup> Wadelius M, Chen LY, Downes K i sur. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005;5:262-270.
- <sup>105</sup> Veenstra DL, You JH, Rieder MJ i sur. Association of vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) variants with warfarin dose in a Hong Kong Chinese patient population. *Pharmacogenet Genomics* 2005;15:687-691.
- <sup>106</sup> Osman A, Enstrom C, Arbring K. Main haplotypes and multinational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. *J Thromb Haemost* 2006;4:1723-1729.
- <sup>107</sup> Lesko LJ. The Critical Path of Warfarin Dosing: Finding an Optimal Dosing Strategy Using Pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:301-305.
- <sup>108</sup> Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y i sur. Genetic Determinants of Response to Warfarin during Initial Anticoagulation *N Engl J Med* 2008;358:999-1008.
- <sup>109</sup> Higashi MK i sur. Association between CYP genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002;287:1690-1698.
- <sup>110</sup> Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 2002;71:537-92.
- <sup>111</sup> Franke RM, Gardner ER, Sparreboom A. Pharmacogenetics of drug transporters. *Curr Pharm Des* 2010;16(2):220-30.
- <sup>112</sup> Dietrich CG, Geier A, Oude Elferink RP. ABC of oral bioavailability: transporters as gatekeepers in the gut. *Gut* 2003;52(12):1788-95.
- <sup>113</sup> Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance - associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1295-302.
- <sup>114</sup> Božina N, Šimić I, Bradamante V. Interakcije lijekova-načela i primjeri kliničkih posljedica. U: Božina N, Macolić-Šarinić V, ur. *Farmakogenomika i farmakovigilancija – upute i smjernice*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013:113-126.
- <sup>115</sup> Pascussi JM, Gerbal-Chaloin S, Duret C, Daujat-Chavanieu M, Vilarem MJ, Maurel P. The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: crosstalk and consequences. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2008;48:1-32.
- <sup>116</sup> Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O i sur. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473-8.

- 
- <sup>117</sup> Chowbay B., Li H., David M., Cheung Y. B., Lee E. J. Metaanalysis of the influence of MDR1 C3435T polymorphism on digoxin pharmacokinetics and MDR1 gene expression. *Br J Clin Pharmacol* 2005;60:159-171.
- <sup>118</sup> Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M i sur. MDR1 genotype related pharmacokinetics of digoxin after oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;18(10):1400-1404.
- <sup>119</sup> Morita Y, Sakaeda T, Horinouchi M, Nakamura T, Kuroda K, Miki I i sur. MDR1 genotype-related duodenal absorption rate of digoxin in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2003;20:552-556.
- <sup>120</sup> Weiss M, Hung DY, Poenicke K, Roberts MS. Kinetic analysis of saturable hepatic uptake of digoxin and its inhibition by rifampicin. *Eur J Pharm Sci* 2008;34(4-5):345-50.
- <sup>121</sup> Johne A, Kopke K, Gerloff T i sur. Modulation of ready-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72(5):584-593.
- <sup>122</sup> Brinkmann U, Eichelbaum M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. *Pharmacogenomics J* 2001;1:59-64.
- <sup>123</sup> Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM i sur. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol* 2003;17:463-9.
- <sup>124</sup> Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E i sur. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84(3):326-31.
- <sup>125</sup> Wu AH, Wang P, Smith A, Haller C, Drake K, Linder M, Valdes R Jr. Dosing algorithm for warfarin using CYP2C9 and VKORC1 genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. *Pharmacogenomics* 2008 Feb;9(2):169-78.
- <sup>126</sup> Wadelius M, Chen LY, Lindh JD i sur. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009 Jan 22;113(4):784-92.
- <sup>127</sup> Klein TE, Altman RB, Eriksson N i sur. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009 Feb 19;360(8):753-64.
- <sup>128</sup> <http://www.WarfarinDosing.org>
- <sup>129</sup> Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *J Am Coll Cardiol* 2011;57:612-8.
- <sup>130</sup> Johnson JA, Gong L, Whirl-Carillo M i sur. Clinical Pharmacogenetic Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC-1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:625-9.

- 
- <sup>131</sup> Vecsler M, Loebstein R, Almog S i sur. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K–dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost* 2006;95:205-11.
- <sup>132</sup> Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K i sur. Polymorphisms in vitamin K dependent gamma-carboxylation-related genes influence interindividual variability in plasma protein C and protein S activities in the general population. *Int J Hematol* 2006;84:387-97.
- <sup>133</sup> Sconce EA, Daly AK, Khan TI, Wynne HA, Kamali F. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. *Pharmacogenet Genomics* 2006;16:609-611.
- <sup>134</sup> Kohnke H, Scordo MG, Pengo V, Padrini R, Wadelius M. Apolipoprotein E (APOE) and warfarin dosing in an Italian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2005;61:781-783.
- <sup>135</sup> Kimmel SE, Christie J, Kealey C i sur. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. *Pharmacogenomics J* 2008;8:53-60.
- <sup>136</sup> Isacc MSM, El Nahid MS, Wissa MY. Is There a Role for *MDR1*, *EPHX1* and *Protein Z* Gene Variants in Modulation of Warfarin Dosage? A Study on a Cohort of the Egyptian Population. *Molecular Diagnosis & Therapy* 2014;18:73-83.
- <sup>137</sup> Pautas, C. Moreau, I. Gouin-Thibault i sur. Genetic factors (VKORC1, CYP2C9, EPHX1, and CYP4F2) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2010. vol. 87, no. 1, str. 57-64,
- <sup>138</sup> Association WM. World Medical Association Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 2013;310(20):2191-2194.
- <sup>139</sup> Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N i sur. A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Warfarin. *N Engl J Med* 2013;369:2294-2303.
- <sup>140</sup> Kimmel SE, French B, Kasner SE i sur. A Pharmacogenetic versus a Clinical Algorithm for Warfarin Dosing. *N Engl J Med* 2013;369(24):2283-2293.
- <sup>141</sup> Tapson VF. Acute pulmonary embolism. *N Engl J Med* 2008;358(10):1037-1052.
- <sup>142</sup> Torbicki A, Perrier A, Konstantinides S i sur. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism: the Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2008;29:2276-2315.
- <sup>143</sup> Kyrle PA, Eichinger S. Deep vein thrombosis. *Lancet* 2005;365:1163-74.
- <sup>144</sup> Varga EA, Kujovich JL. Management of inherited thrombophilia: Guide for genetics professionals. *Clin Genet* 2012;81:7-17.
- <sup>145</sup> Martinelli I, Bucciarelli P, Mannucci PM. Thrombotic risk factors: Basic pathophysiology. *Crit Care Med* 2010;38Suppl 2:3-9.
- <sup>146</sup> Blann AD, Lip GYH. Venous thromboembolism. *BMJ* 2006;332:215-219.

- 
- <sup>147</sup> Go AS, Hylek EM, Phillips KA i sur. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the AnTicoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation (ATRIA) Study. *JAMA* 2001;285(18):2370.
- <sup>148</sup> You JJ, Singer DE, Howard PA i sur. Antithrombotic therapy for atrial fibrillation: antithrombotic therapy and prevention of thrombosis, 9. izd. American college of chest physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2012;141(2):e531S-e575S.
- <sup>149</sup> GBD 2013 Mortality and Causes of Death, Collaborators (17 December 2014). Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death. 1999-2013: a systemic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 2013;385:117-171.
- <sup>150</sup> Fuster V. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology/Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 201 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006;114: 257-354.
- <sup>151</sup> Karthikeyan G, Eikelboom JW. The CHADS2 score for stroke risk stratification in atrial fibrillation--friend or foe? *Thromb Haemost* 2010 Jul 5;104(1):45-8.
- <sup>152</sup> Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest* 2010 Feb;137(2):263-72.
- <sup>153</sup> Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucl Acid Res* 1988;16:1215.
- <sup>154</sup> Toriello M, Meccariello P, Mazzaccara C i sur. Comparison of the TaqMan and LightCycler systems in pharmacogenetic testing: evaluation of CYP2C9\*2/\*3 polymorphisms. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(3):285-7.
- <sup>155</sup> Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O i sur. Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Analytical Biochemistry* 2004;334:201-3.
- <sup>156</sup> von Ahsen N, Richter M, Grupp C i sur. No influence of the MDR-1 C3435T polymorphism or a CYP3A4 promoter polymorphism (CYP3A4-V allele) on dose-adjusted cyclosporin A trough concentrations or rejection incidence in stable renal transplant recipients. *Clin Chem* 2001;47:1048-52.
- <sup>157</sup> WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. WHO Technical Report Series 894. Geneva: World Health Organization, 2000.
- <sup>158</sup> <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108967.htm>

- 
- <sup>159</sup> Bristol-Myers Squibb. Coumadin (warfain sodium) package insert. October, 2011. [http://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_coumadin.pdf](http://packageinserts.bms.com/pi/pi_coumadin.pdf)
- <sup>160</sup> Ageno W, Gallus AS, Witkovsky A i sur. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9. izd. American College of Chest Physician Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012;141:Suppl:e44S-e88S.
- <sup>161</sup> Ferder NS, Eby CS, Deych E i sur. Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during initial weeks of therapy. *J Thromb Haemost* 2010;8(1):95-100.
- <sup>162</sup> Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE i sur. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007;110:1511-15.
- <sup>163</sup> Kim HS, Lee SS, Oh M, Jang YJ, Kim EY, Han IY i sur. Effect of CYP2C9 and VKORC1 genotypes on early-phase and steady-state warfarin dosing in Korean patients with mechanical heart valve replacement. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:103–112.
- <sup>164</sup> Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y i sur. 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.
- <sup>165</sup> Wen MS, Lee M, Chen JJ i sur. Prospective study of warfarin dosage requirements based on CYP2C9 and VKORC1 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 2008 Jul;84(1):83-9.
- <sup>166</sup> Daly AK. Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms. *Arch Toxicol* 2013;87:407-20.
- <sup>167</sup> Anderson JL, Horne BD, Stevens SM i sur. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007;116:2563-70.
- <sup>168</sup> Anderson JL, Horne, BD, Stevens SM i sur. A randomized and Clinical Effectiveness Trial Comparing Two Pharmacogenetic Algorithms and Standard Care for Individualizing Warfarin Dosing (CoumaGen-II). *Circulation* 2012;125:1997-2005.
- <sup>169</sup> Kroon LA. Drug interactions with smoking. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:1917-1921.
- <sup>170</sup> Evans M, Lewis GM. Increase in international normalized ratio after smoking cessation in a patient receiving warfarin. *Pharmacotherapy* 2005;25:1656-165.
- <sup>171</sup> Colucci VJ. Increase in international normalized ratio associated with smoking cessation. *Ann Pharmacother* 2001;35:385-386.
- <sup>172</sup> Nathisuwan S, Dilokthornsakul P, Chaiyakunapruk N, Morarai T, Yodting T, Piriyanachanusorn N. Assessing evidence of interaction between smoking and warfarin: a systematic review and meta-analysis. *Chest* 2011 May;139(5):1130-9.



- 
- <sup>173</sup> Cropp JS, Bussey HI. A review of enzyme induction of warfarin metabolism with recommendations for patient management. *Pharmacotherapy* 1997;17:917-28.
- <sup>174</sup> Zu Schwabedissen Cm, Schmitz VMF, Woodruff S i sur. Obesity is associated with a slower response to initial phenprocoumon therapy whereas CYP2C9 genotypes are not. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62:713-720.
- <sup>175</sup> Wallace JI, Reaves Ab, Tolley EA i sur. Comparison of initial warfarin response in obese patients versus non-obese patients. *J Thromb Thrombolysis* 2013;36:96-101.
- <sup>176</sup> Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA i sur. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphisms on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European American and African Americans. *Pharmacogenomics* 2008;9:511-526.
- <sup>177</sup> Limdi NA, Beasley TM, Baird MF i sur. Kidney Function Influences Warfarin Responsiveness and Hemorrhagic Complications. *JANS* 2009;20:912-920.
- <sup>178</sup> Demirkan K, Stephens M, Newman KP, Self TH. Response to warfarin and other oral anticoagulants: effects of disease states. *South Med J* 2000;93:448-455.
- <sup>179</sup> Landefeld CS, Cook EF, Flatley M i sur. Identification and preliminary validation of predictors of major bleeding in hospitalized patients starting anticoagulant therapy. *Am J Med* 1987;82:703-713.
- <sup>180</sup> Stats D, Davidson S. The increased hypoprothrombinemic effect of a small dose of dicumarol in congestive heart failure. *Am J Med Sci* 1949; 218:318-323.
- <sup>181</sup> Killip T, Payne MA: High serum transaminase activity in heart disease. *Circulation* 1960; 21:646-660.
- <sup>182</sup> Horne BD, Lenzini PA, Wadelius M i sur. Pharmacogenetic warfarin dose refinements remain significantly influenced by genetic factors after one week of therapy. *Thromb Haemost* 2012;107:232-40.
- <sup>183</sup> Oates A, Jackson PR, Austin CA, Channer K.S. A new regimen for starting warfarin anticoagulation in out-patients. *Br J of Clin Pharmacol* 1998; 46: 157-61.
- <sup>184</sup> Self TH, Reaves AB, Oliphant CS, Sands C. Does heart failure exacerbation increase response to warfarin? A critical review of the literature. *Curr Med Res Opin* 2006; 22: 2089-94.
- <sup>185</sup> Kangelaris KN, Bent S, Nussbaum RL i sur. Genetic testing before anticoagulation? A systematic review of pharmacogenetic dosing of warfarin. *J Gen Intern Med* 2009;24:656-64.
- <sup>186</sup> Perera MA, Cavallari LH, Limdi NA i sur. Genetic variants associated with warfarin dose in African-American individuals: a genome-wide association study. *Lancet* 2013;382(9894):790-6.

- 
- <sup>187</sup> Cavallari LH, Langaee TY, Momary KM i sur. Genetic and clinical predictors of warfarin dose requirements in African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2010;87(4):459-64.
- <sup>188</sup> Schwarz UI, Kim RB, Tirona RG. Genotype-guided dosing of vitamin K antagonists. *N Engl J Med* 2014;370(18):1761-2.
- <sup>189</sup> Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V i sur. Mutations in VKORC1 cause warfarin and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;427:537-41.
- <sup>190</sup> Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT i sur. International warfarin pharmacogenetics consortium. Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. *Blood* 2010;115:3827-34.
- <sup>191</sup> Schelleman H, Chen J, Chen Z, Christie J, Newcomb CW, Brensinger CM i sur. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:332-9.
- <sup>192</sup> Mandić D, Mandić S, Horvat V, Samardžija M, Samardžija M. Vitamin K epoxide reductase complex 1 (VKORC1) gene polymorphisms in population of Eastern Croatia. *Coll Antropol* 2013;37(4):1321-6.
- <sup>193</sup> Šupe S, Božina N, Matijević V i sur. Prevalence of genetic polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 -implications for warfarin management and outcome in Croatian patients with acute stroke. *J Neurol Sci* 2014;343(1-2):30-5.
- <sup>194</sup> Mitropoulou C, Fragoulakis V, Božina N i sur. Economic evaluation of pharmacogenomic-guided warfarin treatment for elderly Croatian atrial fibrillation patients with ischemic stroke. *Pharmacogenomics* 2015;16(2):137-48.
- <sup>195</sup> Visser LE, van Schaik RH, Jan Danser AH i sur. The risk of myocardial infarction in patients with reduced activity of cytochrome P450 2C9. *Pharmacogenet Genomics* 2007 Jul;17(7):473-9.
- <sup>196</sup> Delozier TC, Kissling GE, Coulter SJ i sur. Detection of human CYP2C8, CYP2C9, and CYP2J2 in cardiovascular tissues. *Drug Metab Dispos* 2007 Apr;35(4):682-8.
- <sup>197</sup> Krishnamurthy K, Vedam K, Kanagasabai R, Druhan LJ, Ilangovan G. Heat shock factor-1 knockout induces multidrug resistance gene, MDR1b, and enhances P-glycoprotein (ABCB1)-based drug extrusion in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(23):9023-8.
- <sup>198</sup> Meissner K, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H i sur. Modulation of multidrug resistance P-glycoprotein 1 (ABCB1) expression in human heart by hereditary polymorphisms. *Pharmacogenetics* 2004 Jun;14(6):381-5.
- <sup>199</sup> Ayaz G, Batar B, Kanigur G i sur. The association of MDR1 C3435T and G2677T/A polymorphisms with plasma platelet-activating factor levels and coronary artery disease risk in Turkish population. *Gene* 2013;527(1):301-5.

- 
- <sup>200</sup> McCaffrey TA, Tziros C, Lewis J i sur. Genomic profiling reveals the potential role of TCL1A and MDR1 deficiency in chemotherapy-induced cardiotoxicity. *Int J Biol Sci* 2013;9(4):350-60.
- <sup>201</sup> Sissung TM, Gardner ER, Piekarz RL i sur. Impact of ABCB1 allelic variants on QTc interval prolongation. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 15;17(4):937-46.
- <sup>202</sup> De Oliveira Almeida VC, De Souza Ferreira AC, Ribeiro DD, Gomes Borges KB, Salles Moura Fernandes AP, Brunialti Godard AL. Association of the C3435T polymorphism of the MDR1 gene and therapeutic doses of warfarin in thrombophilic patients. *J Thromb Haemost*. 2011;9(10):2120-2.
- <sup>203</sup> Macolić Šarinić V. Nuspojave lijekova supstrata metaboličkog enzima citokroma P450 CYP2C9 i transportnog P-glikoproteina (disertacija). Zagreb: Medicinskih fakultet Sveučilišta u Zagrebu;2012.
- <sup>204</sup> Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol* 2011;(201):261-83.
- <sup>205</sup> [Pradaxa EPAR](#)". [European Medicines Agency](#). Retrieved 2011-01-30.
- <sup>206</sup> Connolly SJ, Ezekowitz MD, Yusuf S i sur. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2009;361(12):1139–51.
- <sup>207</sup> Turpie AG. New oral anticoagulants in atrial fibrillation. *Eur Heart J* 2008;29(2):155–65.
- <sup>208</sup> The U.S. Food and Drug Administration (FDA) approved Pradaxa on October 19, 2010, for prevention of stroke in patients with non-valvular atrial fibrillation.
- <sup>209</sup> Eikelboom JW, Connolly SJ, Bruechmann M, Granger CB, Kappetein Ap, Mack MJ, Blatchford J i sur. Dabigatran versus Warfarin in Patients with Mechanical Heart, 2013; 369: 1206-1214.
- <sup>210</sup> ["FDA Drug Safety Communication: FDA study of Medicare patients finds risks lower for stroke and death but higher for gastrointestinal bleeding with Pradaxa \(dabigatran\) compared to warfarin"](#)
- <sup>211</sup> Cohen, D. Dabigatran: how the drug company withheld important analyses. *BMJ* 2014 Jul;349:4670.
- <sup>212</sup> Moore TJ, Cohen MR, Mattison DR; Cohen; Mattison. Dabigatran, bleeding, and the regulators. *BMJ* 2014 Jul;349:4517.
- <sup>213</sup> Larsen TB, Rasmussen LH, Skjoth F, Due KM, Callreus T, Lip GYH. Efficacy and Safety of Dabigatran Etexilate and Warfarin in “Real-World” Patients With Atrial Fibrillation: A Prospective Nationwide Cohort Study. *Journal of the American College of Cardiology* 2013;61:2264–2273.

---

<sup>214</sup> Larsen TB, Rasmussen LH, Rasmussen AG, Skjoth F, Lande DA, Lip GYH. Dabigatran and Warfarin for Secondary Prevention of Stroke in Atrial Fibrillation Patients: A Nationwide Cohort Study. *The American Journal of Medicine* 2014;127:1172-1178.

<sup>215</sup> Eikelboom JW, Connolly SJ, Brueckmann M i sur. Dabigatran versus Warfarin in Patients with Mechanical Heart Valves. *N Engl J Med* 2013 Sep;369:1206-1214.

<sup>216</sup> Davidson BL. The Association of Direct Thrombin Inhibitor Anticoagulants With Cardiac Thromboses. *Chest* 2015;147(1):21-24.

<sup>217</sup> Gomez-Outes A, Terleira-Fernandez AI, Calvo-Rojas G, Suarez-Gea ML, Vargas – Castrillon EV. Dabigatran, Rivaroxaban, or Apixaban versus Warfarin in Patients with Nonvalvular Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-Analysis of Subgroups. *Thrombosis* 2013:2013:640723. Published online 2013 December 22.

---

## BIOGRAFIJA

Ksenija Makar-Aušperger rođena je 1958. godine u Zagrebu gdje je završila srednju školu i diplomirala na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 1986.godine . Stručni ispit položila je 1987. godine i do 1995. godine, radila je kao liječnik u ambulantom obiteljske medicine, pedijatrije i medicine rada u Domu zdravlja Črnomerac. Iste godine počela je raditi u Zavodu za kliničku farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti KBC Zagreb. Radila je na poslovima Biltena o lijekovima i kao tajnica Povjerenstva za lijekove KBC Zagreb. 1999. završila je stručni poslijediplomski studij iz kliničke farmakologije. Specijalizaciju iz kliničke farmakologije s toksikologijom započela 2000. godine i završila 2004. godine. Od tada radi kao klinički farmakolog u Zavodu za kliničku farmakologiju KBC Zagreb. 2004. godine postaje glavna urednica časopisa Biltena o lijekovima KBC Zagreb, a 2008. godine i glavna urednica časopisa Pharmaca. Autor je brojnih poglavlja u udžbenicima iz Interne medicine i Kliničke farmakologije, kao i korednik na nekoliko izdanja Farmakoterapijskog priručnika. Predaje kliničku farmakologiju na dodiplomskom studiju na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te na brojnim poslijediplomskim stručnim i znanstvenim studijima na istom fakultetu i Farmaceutsko biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, kao i na brojnim tečajevima trajne edukacije. Godine 2014. priznat joj je status primarijusa.

---

PRILOG 1.

**KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR ZAGREB  
KLINIK ZA UNUTARNJE BOLESTI REBRO**

ZAGREB-Kišpatićeva 12  
Zavod za kliničku farmakologiju  
Tel 2388 275

**Pročelnik Zavoda: prof. dr. Igor Francetić**

**INFORMACIJA i INFORMIRANI PRISTANKA BOLESNIKA  
ZA  
SUDJELOVANJE U ISPITIVANJU PROCJENE UTJECAJA GENA NA POTREBNU DOZU  
LIJEKA MARTEFARINA**

Poštovana gospođo \_\_\_\_\_

Poštovani gospodine \_\_\_\_\_

Bolujete od bolesti zbog koje se kroz određeno vrijeme zahtijeva primjenu lijeka, na našem tržištu odobrenog pod imenom **MARTEFARIN**. Vama će lijek propisivati Vaš odabrani liječnik na recept.

Kako se radi o lijeku kod kojeg je posebno važno pratiti dozu i učinak zbog mogućih komplikacija (najopasnije krvarenje), organizirali smo ispitivanje koje bi moglo utvrditi koja je za Vas najbolja početna doza kako bi se smanjile komplikacije primjene.

Lijek se primjenjuje kako bi se spriječilo daljnje zgrušavanje krvi pa se njegovo djelovanje i prati učinkom na samo zgrušavanje krvi. To se može utvrditi krvnim pretragama što zahtijeva redovno vađenje krvi.

Učinak lijeka na zgrušavanje krvi se utvrđuje prema vrijednostima protrombinskog vremena. Protrombinsko vrijeme (skraćenica je PV) je vrijeme koje je potrebno da se u Vašoj izvađenoj krvi dodavanjem posebnih tvari (reagens) stvori ugrušak. Kako je vrijednost PV ovisna o dodanoj tvari, a ta tvar nije svuda ista, danas se u gotovo svim laboratorijima dodaje standardni reagens kako bi izmjerene vrijednosti bile točnije. Stoga se PV međunarodno izražava kao INR (skraćenica od engleskog International Normalized Ratio) što znači da se koristi standardni reagens.

Prihvatljive, terapijske, referentne vrijednosti INR su između 2,0-3,0.

Djelovanje lijeka MARTEFARINA ovisi djelomično i o **značajkama samog bolesnika** koji uzima lijek. U ljudskom organizmu postoje enzimi (bjelančevine) koji su važni za razgradnju (metabolizam) lijeka, a postoje u različitim oblicima (oblici se nazivaju izoenzimi) Posljedično, različiti oblici tih enzima razgrađuju različitom brzinom lijekove. Enzimi i njihova funkcija se genetski nasljeđuju, što se danas može ispitati određenom krvnom pretragom. Pretraga se zove farmakogenetičko istraživanje.

Razgradnja MART EFARINA se odvija preko enzima CYP2C9, a za djelovanje lijeka je važan i enzim VKORC1. Istraživanja u svijetu pokazuju kako je moguće da je još jedan gen (MDR1) važan za djelovanje lijeka. Iako su do sada poznati pojedinačni utjecaji CYP2C9 i VKORC1 na djelovanje MARTEFARINA, zajednički, kao i s MDR1 još nije nigdje ispitan. Cilj ovog istraživanja je istražiti zajednički utjecaj sva tri gena na učinak lijeka. Ukoliko je neki od gena promijenjen, bolesnik će imati i promijenjen enzim a time i djelovanje lijeka može biti jače ili slabije.

---

Farmakogenetičko ispitivanje koje ćemo kod Vas provesti, omogućit će da se prije započinjanja terapije (tj. prije prve primjene MARTEFARINA) preciznije odredi Vaša doza kako bi se smanjile komplikacije rane primjene ovog lijeka

Na samom početku ispitivanja uzet ćemo Vam 1 epruvetu krvi (5 mL) za potrebe farmakogenetičkog ispitivanja. Nakon što ćemo dobiti rezultate, odredit ćemo Vam prvu dozu, te i dalje svakodnevno vaditi po 1 epruvetu krvi. Tako ćemo pratiti vrijednosti Vašeg PV (INR) i usklađivati dozu lijeka sve dok se ne postigne stabilizacija i doze lijeka i vrijednosti PV (INR)

Nakon što dva puta za redom vrijednost PV (INR) bude stabilna, vađenje krvi i laboratorijske kontrole postaju rjeđe, tj. jednom tjedno kroz 2 tjedna, a zatim jednom mjesečno. Ovim ispitivanjem predviđeno je praćenje do mjesec dana nakon otpusta iz bolnice. Tijekom razdoblja praćenja bit ćete u telefonskom kontaktu s voditeljem ovog istraživanja u one dane kada ćete ambulantno u svom Domu zdravlja (nije potreban dolazak u bolnicu) kontrolirati vrijednost PV (INR), na temelju koje će Vas se savjetovati o daljnjem uzimanju lijeka.

Nakon perioda praćenja vrijednost Vašeg PV (INR) kontrolirat će se u standardiziranim vremenskim razmacima.

Napominjemo, da će se ukoliko pristanete sudjelovati u ovom istraživanju, višak Vašeg neiskorištenog uzorka krvi pohraniti i ponovno koristiti samo u istraživanju Vaše bolesti. Uzorak se neće koristiti u drugim znanstvenim istraživanjima.

**U svakom trenutku Vi možete prekinuti praćenje bez ikakvih posljedica za Vaše zdravlje i daljnju skrb.**

Ja \_\_\_\_\_ potvrđujem da sam pročitao/la i razumio/jela obavijest te pristajem sudjelovati u istraživanju pod nazivom

**„Utjecaj farmakogenetičkih polimorfizama gena CYP2C9, VKORC1 i MDR1 na individualizaciju terapije varfarinom»**

koja se provodi u Zavodu za kliničku farmakologiju (odgovorna osoba dr Ksenija Makar-Aušperger) te pristajem da mi se na početku primjene lijeka učini farmakogenetičko ispitivanje.

Datum

Potpis

---

---

PRILOG 2.

Klinika/Zavod \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Prezime i ime bolesnika \_\_\_\_\_ Matični broj \_\_\_\_\_

**Demografski podaci**

Datum rođenja/broj godina \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ Spol M / Ž

Težina (kg) \_\_\_\_\_ Visina (cm) \_\_\_\_\_ BMI \_\_\_\_\_

Pušenje da ne

Alkohol da ne

**Dijagnoza kod prijema (razlog za primjenu varfarina)**

Atrijska fibrilacija \_\_\_\_\_

EKG da ne

Duboka venska tromboza \_\_\_\_\_

Doppler ekstremiteta da ne

Plućna embolija \_\_\_\_\_

scintigrafija da ne

**Istovremene bolesti**

Srčana funkcija (znaci popuštanja) UZV srca da ne NYHA \_\_\_\_\_

Jetrena funkcija AST \_\_\_\_\_ ALT \_\_\_\_\_ GGT \_\_\_\_\_ bil \_\_\_\_\_ PV \_\_\_\_\_

Bubrežna funkcija ureja \_\_\_\_\_ kreatinin \_\_\_\_\_ klirens \_\_\_\_\_

**Istovremeno primijenjeni lijekovi**

Lijek /doza	Ocjena značajnosti interakcija	Lijek /doza	Ocjena značajnosti interakcija

**Farmakogenetika**

CYP2C9					
VKORC1					



<b>MDRI</b>					

<b>Praćenje učinka</b>									
Doza varfarina	1. d.	2.d.	3. d.	4.d.	5.d.	otput	1.tjedan	2.tjedan	4.tjedan
PV									
INR									

<b>Praćenje nuspojava</b>									
	1. dan	2.dan	3. dan	4.dan	5.dan	otput	1.tjedan	2.tjedan	4.tjedan

<b>Praćenje prehrane</b>									
							1.tjedan	2.tjedan	4.tjedan

**Prijevremeni prekid studije**

Povučen informirani pristanak da ne

Prestanak primjene varfarina da ne