Uloga genskog polimorfizma CYP2C9 i VKORC1 u individualizaciji terapije varfarinom kod pacijenata sa akutnim moždanim udarom

Šupe, Svjetlana

Doctoral thesis / Disertacija

2011

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:739535

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository







Središnja medicinska knjižnica

Šupe, Svjetlana (2011) ***Uloga genskog polimorfizma CYP2C9 i VKORC1 u individualizaciji terapije varfarinom kod pacijenata sa akutnim moždanim udarom [The role of genetic polymorphism of CYP2C9 and VKORC1 in the individualization of warfarin therapy in patients with acute stroke].*** **Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

http://medlib.mef.hr/1355

University of Zagreb Medical School Repository
http://medlib.mef.hr/

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Svjetlana Šupe

Uloga genskog polimorfizma CYP2C9 i VKORC1 u individualizaciji terapije varfarinom kod pacijenata sa akutnim moždanim udarom

DISERTACIJA

Zagreb, 2011.

Istraživanje na kojem se temelji ova disertacija izrađeno je na Klinici za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Mentor: Doc.dr.sc. Zdravka Poljaković, dr.med
Referentni centar Ministarstva zdravstva za intenzivnu neurologiju
Klinika za neurologiju
Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i
Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Ovaj rad posvećujem mojim roditeljima i mojoj Saši sa zahvalnošću na bezuvjetnoj ljubavi i podršci koju mi pružaju.

Zahvalnost izražavam mojoj mentorici doc.dr.sc. Zdravki Poljaković na poticaju, iznimnoj podršci i konstruktivnim savjetima kojima me pratila u mojem istraživnju.
Veliko hvala dugujem prof.dr.sc.Sanji Hajnšek, Predstojnici Klinike za neurologiju KBC Zagreb na razumijevanju, kolegijalnim i prijateljskim savjetima te poticajnoj i akademskoj atmosferi koju je unijela na Kliniku.
Osobito zahvaljujem doc.dr.sc. 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 na stručnim savjetima, podršci i entuzijazmu kojim mi je pomagala u usvajanju i primjeni znanja iz farmakogenomike i laboratorijske dijagnostike.
Posebnu zahvalnost i poštovanje iskazujem pok.prof.dr.sc. Zdravku Poljakoviću koji je pridonio izboru mog profesionalnog puta u područje neurologije i neurovaskularnih bolesti.
Mojim neprocjenjivim prijateljicama: Sanji, Stanki, mojim Ljiljanama, Jadranki, Eleonori, Leonidi, Gordani, Marini veliko hvala na sugestijama u stručnom radu, prijateljskom razumijevanju i bodrenju koje ste mi pružale.
M.L. hvala ti na podršci u teškim i neinspirativnim trenucima.
Svim kolegama i ljudima koji su izravno ili neizravno sudjelovali i doprinosili u istraživanju na kojem se temelji ova disertacija, iskreno zahvaljujem na trudu koji su uložili i vremenu koje su mi posvetili.

Sadržaj

Popis uporabljenih kratica 6

1. UVOD 8

1.1. Moždani udar – definicija 8

1.1.1. Klasifikacija moždanog udara 9

1.1.1.1. Hemoragijski moždani udar 9

1.1.1.2. Ishemijski moždani udar 10

1.1.2. Patofiziologija ishemijskog moždanog udara i neuralna ishemička kaskada 12

1.1.3. Epidemiologija moždanog udara 17

1.1.3.1. Epidemiologija moždanog udara u svijetu 17

1.1.3.2. Epidemiologija moždanog udara u Republici Hrvatskoj 21

1.1.3.3. Rizik ponovljenog moždanog udara 22

1.1.4. Rizični čimbenici za nastanak moždanog udara 23

1.1.4.1. Rizični čimbenici na koje se ne može utjecati 23

1.1.4.2. Rizični čimbenici na koje se može utjecati 24

1.1.5. Embolijski i kardioembolijski moždani udar 24

1.1.5.1. Epidemiologija kardioembolijskog MU 25

1.1.5.2. Patofiziologija kardioembolijskog MU 26

1.1.5.3. Uzroci kardioembolijskog moždanog udara 26

1.1.5.3.1. Fibrilacija atrija (FA) 27

1.1.5.3.2. Oštećenja mitralnih i aortalnih zalistaka i implantirani zalisci 30

1.1.5.3.3. Foramen ovale apertum (FOA) 30

1.1.5.4. Embolijski moždani udar kod disekcije arterijske stijenke 31

1.1.5.5. Moždani udar uzrokovan trombozom cerebralnih venskih sinusa 33

1.2. Varfarin 34

1.2.1. Opće karakteristike, indikacije i kontraindikacije za primjenu varfarina 34

1.2.2. Farmakokinetika varfarina 36

1.2.3. Farmakodinamika varfarina 37
1.2.4. Nuspojave terapije varfarinom 38
1.2.5. Interakcije varfarina sa drugim lijekovima 40
1.2.6. Razlozi nedostatne primjene varfarina u indiciranih pacijenata 41

1.3. Farmakogenetika 44
1.3.1. Farmakogenetika varfarina 45
1.3.1.1. Enzimi citokromi P450 (CYP) 46
1.3.1.1.1. Sustav enzima CYP2C9 46
1.3.1.1.1.1. Uloga CYPC2C9 u metabolizmu varfarina 48
1.3.1.2. Vitamin K ovisna epoksid reduktaza podjedinica 1(VKORC1) 49
1.3.1.2.1. Polimorfizam VKORCl i utjecaj na terapiju varfarinom 50
1.3.1.3. Studije zajedničkog utjecaja polimorfizma gena CYP2C9 i VKORC1 na interindividualnu varijabilnost pri terapiji varfarinom 51
1.3.1.4. Algoritmi primjene varfarina zasnovani na farmakogenetici 54

2. HIPOTEZA 56

3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA 57

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 58

4.1. Ispitanici 58

4.2. Genotipizacija alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 62

4.3. Statistička obrada 63

4.4. Rezultati 64
4.4.1. Osobine ispitanika 64
4.4.1.1. Raspodjela ispitanika obzirom na dob i spol u FG i NF skupini 66
4.4.1.2. Raspodjela ispitanika obzirom na razlog primjene varfarina 67
4.4.1.3. Raspodjela ispitanika obzirom na dob i razlog primjene varfarina 68
4.4.1.4. Raspodjela učestalosti alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 među ispitanicima u FG skupini 69

4.4.1.5. Raspodjela alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 u podskupinama ovisno o razlogu primjene varfarina u prethodno antikoaguliranih ispitanika u FG skupini 71

4.4.1.6. Usporedba vremena do postizanja ciljnog INR i iznad terapijskog INR između FG i NF skupine 72

4.4.1.7. Raspodjela prosječnog vremena do postizanja ciljnog INR ovisno o genotipu u FG skupini 77

4.4.1.8. Distribucija prosječnog vremena u iznadterapijskom INR ovisno o genotipu 79

4.4.1.9. Distribucija vremena unutar terapijskog INR ovisno o skupini genotipa 81

4.4.1.10. Usporedba vremena potrebnog do postizanja stabilne terapijske doze između FG i NF skupine 82

4.4.1.11. Raspodjela prosječno procijenjene doze uvođenja, prosječne doze uvođenja i doze održavanja ovisno o genotipu u FG skupini i usporedba sa NF skupinom 83

4.4.1.12. Raspodjela korektno procijenjene doze između FG skupine i NF skupine 89

4.4.1.13. Raspodjela učestalosti komplikacija između FG i NF skupine 90

4.4.1.14. Raspodjela ispitanika prema težini neurološkog deficita pri prijemu i pri otpustu između FG i NF skupine 95

5. **RASPRAVA** 99

5.1. Zaključci 110

6. SAŽETAK 112

7. ABSTRACT 114

8. LITERATURA 116

9. ŽIVOTOPIS 127

10. BIBLIOGRAFIJA 129

Popis uporabljenih kratica:

1. ACM (lat.*arteria cerebri media*)- srednja moždana arterija
2. AHA/ASA (engl. *American Heart Association/American Stroke Association*)- Američa udruga kardiologa /Američka udruga za moždani udar
3. ATP(engl.*adenosin three phosphat*)-adenozin trifosfat
4. CADASIL (engl. *Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarct and leukoencephalopathy*)-Autosomno dominantna moždana arteriopatija sa subkortikalnim infarktima i leukoencefalopatijom
5. CBF(engl.*cerebral blood flow*)- moždani protok
6. CE (engl. *cardioembolism*)-kardioembolijski
7. CE MU- kardioembolijski moždani udar
8. CHADS2 (engl. *C-congestive heart failure 1, H-hypertension 1, A-Age >75 1, D-diabetes mellitus 1 melitus, S-stroke 2*) –kongestivna bolest srca 1, hipertenzija 1, dob 1,diabetes mellitus 1, moždani udar 2
9. CYP2C9- citokrom P450 podjedinica 2C9
10. DA- disekcija arterija
11. DVT-duboka venska tromboza
12. DWI (engl.*diffusion weight imaging*) –difuzijske sekvence slikovnog prikaza
13. EU-Europska unija
14. FA- fibrilacija atrija
15. FG grupa- grupa sa farmakogenetičkom predikcijom doze varfarina
16. FOA (lat.foramen ovale apertum)-Otvoreni forame ovale
17. GGCX -vitamin K-ovisni gama-karboksilacijski gen
18. HEB-hematoencefalna barijera
19. ICD (engl.*International Classification of Diseases*)-međunarodna klasifikacija bolesti
20. ICH (engl. *Intracerebral hemorrhage*)- intracerebralno krvarenje
21. IMU-ishemički moždani udar
22. INR (engl.*International Normalized Ratio*)-Međunarodni normalizirani omjer
23. LAA(engl. large artery atherosclerosis)-ateroskleroza velikih krvnih žila
24. MELAS- (engl. *Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, Strokelike Episodes*) Mitohondijska encefalomiopaija sa laktičkom acidozom i MU

25. MDRl (engl. *multidrug resistence protein 1)*-protein rezistentan na lijekove
26. MR- magnetna rezonanca
27. mRS - modificirana Rankinova skala za procjenu neurološkog deficita i kliničkog ishoda nakon moždanog udara
28. MSCT(engl. *Multislice computorised tomography*) –višeslojni CT
29. MU- moždani udar
30. NF grupa- kontrolna grupa sa fiksnom dozom uvođenja varfarina
31. NIHSS (engl.*National Institute of Health Score Scale*)- Skala Nacionalnog intituta za zdravlje za procjenu težine neurološkog deficita u akutnom moždnom udaru
32. NMDA (engl. *N-Methyl-D-aspartate receptor*) NMDA receptor
33. NMH- niskomolekularni heparin
34. OAK-oralni antikoagulansi
35. OC (engl.*stroke of other determined cause*)-moždani udar drugog uzroka
36. OSCP (engl.*Oxford Community Stroke Project Clasificcation*)-Oksfordska klasifikacija moždnog udara
37. PaC02-parcijalni tlak ugljičnog dioksida
38. PE-plućna embolija
39. PV- protrombinsko vrijeme
40. RČ- rizični čimbenici
41. SAD-Sjedinjene američke države
42. SAH (engl.*subarachnoidal hemorrhage*)-subarahnoidalno krvarenje
43. SAO (engl. *small artery occlusion*)-bolest malih arterija
44. SNP (engl.*single nucleotid polymorfismus*)-jednonukleotidni polimorfizm
45. TE-tromboembolizam
46. TIA (engl. *Transitory ischemic attack*)-Tranzitorna ishemička ataka
47. TOAST (engl.*Trial of Org 10172 Acute Stroke Treatment*)-TOAST Klasifikacija moždanog udara
48. UND (engl.*stroke of undetermined cause*)-moždani udar nepoznatog uzroka
49. VKORC1- vitamin K epoksid reduktaza podjedinica 1
50. Wt (engl. *wild type*)-divlji tip

Poglavlje 1.

1. UVOD

1.1. Moždani udar – definicija

Prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) akutni moždani udar se definira kao nagli razvoj kliničkih znakova žarišnog (ili globalnog) poremećaja moždanih funkcija sa simptomima koji traju 24 sata i duže ili vode letalnom ishodu, bez jasnog drugog uzroka izuzev oštećenja krvnih žila (1).

Svakih šest sekundi bez obzira na spol, dob ili etničku pripadnost, netko oboli od moždanog udara, a svaku minutu jedna osoba na našoj planeti umire od posljedica moždanog udara (2). To je zastrašujuća činjenica koja ukazuje da od druge polovine dvadesetog stoljeća, a posebno u dvadesetprvom stoljeću udio kroničih nezaraznih bolesti značajno raste u svim zemljama suvremenog svijeta. Znakovit je i porast stope smrtnosti od bolesti krvožilnog sustava, poglavito od moždanog udara i njegovih posljedica (1). Ograničenje od dvadeset i četiri sata u trajanju kliničkih znakova postavljeno je zbog razdvajanja moždanog udara (MU) od tranzitorne ishemičke atake (TIA) čiji se simptomi u potpunosti povlače unutar 24 sata. Arbitrarna priroda 24-satnog ograničenja u razdvajanju MU od TIA mijenja se zadnjih godina doprinosom primjene sve suvremenijih tehnika slikovnog prikaza (engl.*neuroimaging*), posebno difuzijski mjernim neuroimagingom (DWI u MSCT ili MR sekvencama) koje omogućuju ranu detekciju ishemijskog oštećenja mozga. Stoga se zadnjih godina redefiniraju kriteriji prema kojima bi TIA obuhvaćala neurološke simptome koji traju kraće od jednog sata bez slikovnih dokaza o oštećenju moždanog parenhima. Ishemijski MU bi predstavljao stanje u kojem neurološki simptomi traju dulje od jednog sata i/ili postoje slikovni dokazi o oštećenju moždanog tkiva uzrokovani nedostatnom moždanom opskrbom krvlju (3). Učinci primjene suvremene trombolitičke terapije koja, ukoliko se aplicira dovoljno rano, može doprinijeti smanjenju težine kliničke slike i redukciji oštećenja moždanog parenhima, dovode do novih alternativnih koncepata o MU. Tako se danas govori o „moždanom napadu ili udaru“ (engl.„*brain atack“)* i akutnom ishemijskom

cerebrovaskularnom sindromu (AICS) nalik na srčani udar i akutni koronarni sindrom, reflektirajući na taj način brzinu razvoja simptoma i potrebu za hitnom terapijskom intervencijom (4).

1.1.1. Klasifikacija moždanog udara

Klasična podjela moždani udar razvrstava u dvije vodeće kategorije: ishemijski i hemoragijski MU, uzimajući u obzir njihove patoanatomske i patofiziološke parametre (5). Svaki se od ovih glavnih tipova može podijeliti na podtipove koji imaju različite uzroke, različitu kliničku sliku, tijek i ishod, a time i različite strategije dijagnostičkog, terapijskog i preventivnog pristupa. Ishemijski MU je posljedičan prekidu opskrbe krvlju (a time i energenata) moždanom tkivu dok je krvarenje posljedično rupturi stijenke krvne žile ili abnormalne vaskularne strukture (perforantnih arterija, aneurizme, arteriovenske malformacije). Ishemijski moždani udar (IMU) čini gotovo 85-87% svih moždanih udara, dok je kod hemoragijskog moždanog udara sa 10-17% zastupljeno parenhimsko intracerebralno krvarenje (ICH) i 5% subarahnoidalno krvarenje (SAH). Neka su krvarenja posljedična „hemoraškoj tranziciji“ unutar ishemijske zone i zapravo se ne zna točno koliko ICH aktualno započne kao ishemijski moždani udar (6).

1.1.1.1 Hemoragijski moždani udar

Intrakranijsko krvarenje predstavlja akumulaciju krvi ekstraaksijalno (izvan mozga, unutar koštanog okvira) ili intraaksijalno (unutar moždanog parenhima i/ili unutar ventrikularnog sustava). Glavni predstavnici ekstraaksijalnog krvarenja su epiduralni i subduralni hematom, koji se ne ubrajaju u podgrupe moždanog udara te SAH (6,7). Kod hemoragijskog moždanog udara lokaliziranog intraaksijalno, oštećenje parenhima je pretežno posljedica kompresije ekspandirajućeg inicijalnog krvarenja i direktnog toksičnog učinka raspadnih produkata krvi na tkivo i krvožilje mozga (uzrok vazospazma kod SAH-a). Uz navedeno, kompresivni učinak hematoma dovodi do oštećenja protoka krvi i razvoja ishemije, što značajno doprinosi progresijii neurološkog deficita i riziku od letalnog ishoda. Primarno intracerebralno krvarenje (ICH) je jedan

od najugrožavajućih oblika moždanog udara sa relativno visokom incidencijom i predstavlja 10-17% svih moždanih udara. Prevalencija ICH raste sa dobi tako da u bolesnika mlađih od 40 godina iznosi 2/100000/god., a u bolesnika iznad 80 godina života iznosi čak 350/100000/godinu. Ima visoku stopa mortaliteta te 35-52% pacijenata umire unutar mjesec dana od krvarenja, a gotovo polovina smrtnih ishoda se dešava unutar 48 sati od početka krvarenja (6).

Glavni etiopatogenetski čimbenici u nastanku ICH su arterijska hipertenzija, cerebralna amiloidna angiopatija, ruptura arteriovenskih malformacija ili aneurizmi, cerebralna venska tromboza, leukoaraioza, disekcija intrakranijskih arterija, zlouporaba simpatomimetika i sličnih tvari (kokain, heroin, alkohol), koagulopatije i hematološke bolesti, vaskulitisi, eklampsija sa postpartalnom vaskulopatijom. ICH može biti i jatrogeno uzrokovan primjenom antikoagulantne terapije (varfarin). Prediktori lošijeg kliničkog ishoda i rane smrtnosti kod ICH su nizak Glasgow Coma Score, intraventrikularni prodor krvarenja, volumen krvarenja koji se smatra kritičnom determinantom mortaliteta i funkcionalnog deficita uz čimbenike nezavisne o krvarenju: dob, spol, ishemijska bolest srca, fibrilacija atrija, dijabetes, tromboembolijske komplikacije sa razvojem duboke venske tromboze (DVT) i plućne embolije (PE) (8). Pacijenti sa ICH bilo spontanim ili uzrokovanih varfarinskom terapijom, viskorizična su skupina bolesnika bez za sada postojećih odgovarajućih preporuka ili algoritama u primjeni antiagregacijske ili antikoagulantne terapije u indiciranih bolesnika temeljene na rezultatima većih randomiziranih kliničkih studija (6,8).

1.1.1.2. Ishemijski moždani udar

Postoji nekoliko klasifikacija akutnog ishemijskog moždanog udara. Prema Međunarodnoj klasifikaciji bolesti i problema vezanih uz zdravlje (deseta revizija ICD 10) Svjetske zdravstvene organizacije, tipovi moždanog udara su razvrstani po šiframa od I 60 do I 69. U podskupine su razvrstani: subarahnoidalno krvarenje, intracerebralno krvarenje, ostala netraumatska krvarenja, cerebralni infarkt uzrokovan intracerebralnom ili ekstracerebralnom okluzijom te nespecificirani moždani udar (9). OSCP klasifikacija (Oxford Community Stroke Project Classificiation) poznata kao Bamfordova ili Oxfordska klasifikacija IMU oslanja se prvenstveno na početne simptome, lokaliziciju, teritorijalnu zahvaćenost i prognozu. Tako klasificira ukupni prednji cirkulacijski infarkt

(engl.TACI – *total anterior circulation infarct*), parcijalni prednji cirkulacijski infarkt (engl.PACI –*partial anterior circulation infarct*), lakunarni infarkt (engl.LACI- *lacunar infarct*) i stražnji cirkulacijski infarkt (engl.POCI- *posterior circulation infarct*) (10). Danas je sve šire prihvaćena jednostavnija TOAST klasifikacija (Trial of Org 10172 Acute Stroke Treatment) koja klasificira IMU u pet osnovnih kategorija vođenih kliničkim simptomima i uzrokom MU. Ti subtipovi su :

1) Infarkti zbog aterotromboze ili embolije velikih krvnih žila (engl.*LAA- large artery atherosclerosis)*
2) kardioembolijski moždani udari (engl.*CE- cardioembolism*)
3) lakunarni infarkti (engl.*SAO- small artery occlusion*)
4) infarkti kao poslijedica drugih uzroka (engl.*OC- stroke of other determined cause)*
5) infarkti nepoznatog uzroka – kriptogeni MU (engl.*UND- stroke of undetermined cause)*

Za definiranje moždanog udara nepoznatog porijekla (*UND*) su neophodna dva objašnjenja: a) nije pronađen uzrok usprkos ekstenzivnoj evaluaciji i b) ne može se sa jasnoćom odrediti uzrok budući je izdvojeno dva ili više uzroka ili je dijagnostička obrada bila nepotpuna (11). Definicija subtipova je temeljena na prisutnosti rizičnih čimbenika, kliničkom nalazu i rezultatima dijagnostičke obrade koja uključuje CT (kompjutorizirnu tomografiju) i/ili MR (magnentnu rezonancu) mozga, cirkulatorni slikovni prikaz (CT ili MR angiografiju, cerebralnu panangiografiju, Dopplersku dijagnostiku karotidnog i vertebrobazilarnog sliva), EEG, EKG, Holter EKG, ultrazvuk srca (transtorakalni ili transezofagealni), laboratorijsku obradu, posebno dijagnostiku protrombotičkih stanja te eventualno postmortalne obdukcijske nalaze (11,12).
Kao što je navedeno, u ishemijskom moždanom udaru dolazi do prekida ili otežane opskrbe krvlju dijela mozga što dovodi do disfunkcije moždanog tkiva u toj regiji. Četiri su temeljna uzroka zbog kojih se to može dogoditi :
a) Tromboza - okluzija krvne žile trombom koji se stvorio lokalno, najčešće oko aterosklerotskih plakova. Taj mehanizam je prisutan kod aterotrombotskih MU (*LAA*) i kod MU uzrokovanog bolešću malih krvnih žila procesima lipohijalinoze i fibrinoidne degeneracije te mikroateromatoze (*SAO*). Uzroci koji dovode do oblikovanja tromba i posljedičnog MU su najčešće ateroskleroza, vazokonstrikcija kao kod vazospazma,

razne upalne bolesti krvožilnog sustava, disekcije intra i ekstrakranijskih krvnih žila te vaskulopatije.
b) Sistemska hipoperfuzija u kojoj dolazi do redukcije krvnog protoka u cijelom organizmu što je najčešće posljedica oštećenja srčane pumpe u kardijalnom arestu i malignim aritmijama ili pri smanjenom kardijalnom „outputu“ kod infarkta miokarda, plućne embolije ili opsežnih krvarenja. U takvim stanjima zbog sistemske redukcije krvnog optoka mogu biti zahvaćane sve moždane regije uz nastanak tzv. infarkta „zadnjih livada“ (engl.„*watershed areas*“).
c) Tromboza cerebralnih venskih sinusa dovodi do MU uslijed lokalnog porasta venskog tlaka koji nadilazi arterijski tlak. Nakon infarkta često slijedi hemoraška transformacija infarcirane zone. Uzroci su najčešće prirođene i stečene koagulopatije i prokoagulabilna stanja ili lokalne infekcije, a češće se javlja u žena u poodmakloj trudnoći te tijekom puerperijuma. Terapija izbora je primjena antikoagulansa (u trudnica niskomolekularni heparin, a nakon poroda i u ostalih bolesnika varfarin).
e) Embolijski MU je posljedičan „blokadi“ arterijskog protoka arterijskim embolusom različitog porijekla. Najčešće su to komadi otkinutog tromba nastali pri rupturi aterosklerotskog plaka ili tromba druge etiologije, ali mogu biti i druge supstancije poput masti ili zraka pri prijelomu kosti te sastavljeni od karcinomskih stanica ili bakterija u infekcijskom endokarditisu. Ponekad nastaju pri disekciji arterijske stijenke emboliziranjem iz nastalog tromba ili pri paradoksalnom embolizmu tijekom duboke venske tromboze u slučajevima postojanja atrijskog ili ventrikularnog septalnog defekta. Najčešći su ipak kardijalni uzroci embolijskog MU odnosno kardioembolijski MU po TOAST kriterijima (10,12).

1.1.2. Patofiziologija ishemijskog moždanog udara i neuralna ishemička kaskada

Funkcionalne aktivnosti moždanih struktura (neurona sa njihovim nastavcima neuritima i dendritima te glija stanice) zahtijevaju adekvatan i konstantan protok krvi, čime se omogućava potreban dotok metabolita primarno glukoze i kisika neophodnih za odvijanje kompleksnih procesa u središnjem živčanom sustavu kao i za održavanje njegovog funkcionalnog i morfološkog integriteta. Mozak je krvlju opskrbljen putem dva sliva: karotidnog i vertebrobazilarnog, koji u funkcionalnom

smislu predstavljaju jedan sustav i osiguravaju ravnomjernu raspodjelu i snabdijevanje mozga krvlju. Unatoč postojećim komunikantnim atrerijama na bazi mozga u sklopu Willisijevog kruga (lat. *Circulus arteriorus Willisi)* - dvije prednje komunikantne arterije i dvije stražnje komunikantne arterije, u normalnim se uvjetima krv u ova dva sustava ne miješa zbog podjednakih tlakova u oba sliva (zona hemodinamske ravnoteže). U situacijama smanjenog dotoka krvi u jednom slivu preko komunikantnih arterija Willisova kruga krv se preusmjerava u područja sa smanjenom opskrbom. Od ovog sustava potječu i leptomeningealne arterije koje pokrivaju cijelu površinu mozga penetrirajući u parenhim. Iako su sve krvne žile ekstraparenhimskog porijekla, velika je razlika u promjeru krvnih žila na površini mozga (nekoliko mm) naspram parenhimskih žila (50-70 mikrona). Gustoća kapilarne mreže dva puta je veća u sivoj u odnosu na bijelu tvar mozga, te se smatra da gustoća kapilarne mreže u nekoj regiji korelira sa brojem sinapsi, odnosno sa funkcionalnom aktivnošću neurona.

Specifična je morfološka građa endotelnih stanica moždanih kapilara koje su tijesno spojene (engl.„ *tight junctions"*) bez fenestracija uz usku priljubljenost astroglijalnih nastavaka koji pokrivaju 60-80% površine kapilara (13). Tako astroglija dovodi u uski kontakt neurone sa kapilarama formirajući svojevrsni „informacijski kanal" koji u ovisnosti o energetskim potrebama stanice određene moždane regije kontrolira lumen kapilara. Istraživanja su ukazala na prisutnost centralnih sinapsi u kapilarama mozga, što implicira postojanje receptora za neurotransmitere i neuromodulatore te njihovu ulogu u regulaciji cerebralnog protoka. Ono što razlikuje mozak od drugih organa je upravo postojanje te krvnomoždane barijere (HEB), sofisticirane i selektivno propusne barijere koja je najvažniji regulator moždanog volumena (14).

Prosječna vrijednost cerebralnog protoka (engl.*CBF –cerebral blood flow*) u zdravih osoba je određena metaboličkom potrebom mozga za kisikom i iznosi prosječno 50-60/ml/100 mg tkiva u minuti (prosječno 700 ml/min). Regulacija CBF se postiže nizom različitih i međusobno neovisnih mehanizama, predstavjajući težnju mozga za održavanjem konstantnog i adekvatnog snabdijevanja tkiva glukozom i kisikom, te eliminacijom C02 i drugih kiselih produkata. Fiziološka kontrola brzine i volumena moždane cirkulacije uključuje kompleksne mehanizme:

a) <u>metabolička kontrola</u> – protok krvi u intraparenhimskim žilama je reguliran metaboličkom neuronskom aktivnošću. Pri regionalnom porastu metaboličkih

aktivnosti raste produkcija C02, pada ekstracelularni pH što vodi vazodilataciji i regionalnom povećanju protoka krvi. Pri smanjenju neuronalne aktivnosti raste ekstracelularni pH, sužava se lumen krvne žile i dolazi do pada protoka. Začajnu ulogu u ovoj sprezi metabolizma i regionalnog protoka igraju ioni vodika te ekstracelularna koncentracija iona kalcija

b) kemoregulatorni mehanizam (C02 reaktivnost) je nezavisan od promjena srednjeg arterijskog tlaka, a temelji se na promptnoj promjeni vaskularnog tonusa moždanih arteriola uslijed promjene PaC02. U kemoregulaciji značajnu ulogu igra i dušikov monoksid (NO) promjena kojeg može značajno reducirati učinak hiper ili hipokapnije. U patološkim stanjima kada raste PaC02 poput ishemije, samo u početnim fazama dolazi do vazodilatacije u žilama izvan područja ishemije (zona „*penumbre*“) koja ubrzo nestaje i žile više ne reagiraju na povećanu koncentraciju C02 ili druge vazodilatatore jer su već maksimalno dilatirane i vazoparalitične. Tako se javlja paradoksalna situacija u kojoj je porast PaC02 praćen smanjenjem protoka dok se u samoj ishemičkoj regiji javlja vazospazam dodatno doprinoseći redukciji protoka.

c) neurogena kontrola – autonomni živčani sustav u produženoj moždini i diencefalonu učestvuje u održavanju vazomotornog tonusa (baroreceptori i vazomotorni refleksi) uz prisutnost nervi vasorum koji inerviraju same krvne žile.

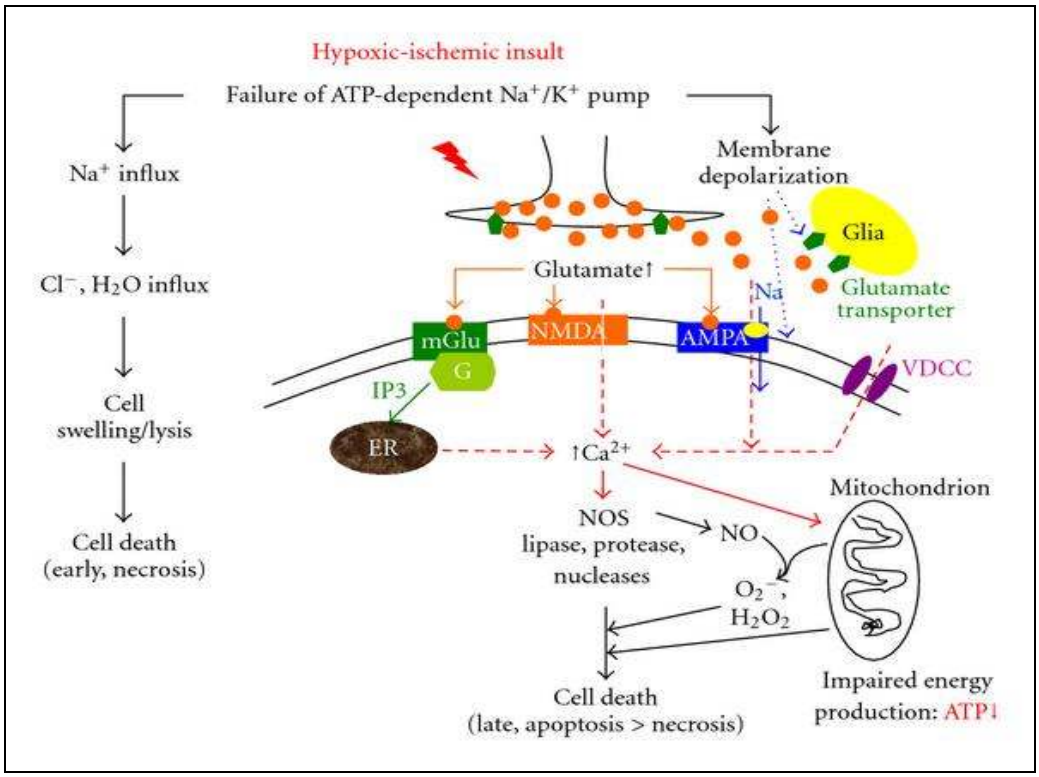
d) autoregulacija- predstavlja aktivni vaskularni odgovor na promjenu perfuzijskog tlaka neovisno o oscilacijama sistemskog arterijskog tlaka. Postiže se promjenom moždane vaskularne rezistencije uslijed promjena u promjeru prekapilarnih arteriola. Mehanizam autoregulacije nije neiscrpan, tako da se CBF smanjuje pri padu sistemskog arterijskog tlaka ispod 40-60 mmHg, dok pri arterijskoj hipertenziji sa sistoličkim tlakom iznad 200 mmHg i dijastolom iznad 120 mmHg moždana autoregulacija otkazuje (14).

Ishemijom se naziva svaka redukcija cerebralnog protoka koja je praćena morfološkim oštećenjima tkiva i funkcionalnim ispadima. Ateroskleroza dovodi do oštećenja protoka uslijed suženja lumena krvne žile što pogoduje razvoju tromba unutar žile ili dolazi do mikroembolizacije iz rupturiranog aterosklerotskog plaka. Embolijska infarkcija nastaje najčešće pri fibrilaciji atrija te drugim kardijalnim uzrocima, mikroembolusima iz same stijenke krvne žile ili može biti posljedična upalnim procesima, povećanju viskoziteta krvi u protrombotičkim i sličnim stanjima,

promjenama kvalitete krvi, traumatskim oštećenjima ili stanjima koja dovode do porasta intrakranijskog tlaka (15). Kako je navedeno, prosječni CBF iznosi 60ml/100g tkiva u minuti. Danas je uobičajen način definiranja cerebralne ishemije putem pojma „praga cerebralne ishemije“. Prag CBF-a je različit za različite neuralne funkcije te se prema tome prag ishemije za električnu funkciju razlikuje od praga ishemije za membransku pumpu. Prvi iznosi 18 ml /100gr/ minuti (gornji protočni prag za ishemiju), dok vrijednost drugog (donji protočni prag za ishemiju) iznosi 10 ml /100 gr/ minuti. Donji protočni prag je praćen oštećenjem funkcije Na-K-ATP-aze i drugih enzimskih sustava, dolazi do anaerobne respiracije, smanjene produkcije ATP-a sa posljedičnom pojavom permanentne anoksične depolarizacije. Posljedice tih promjena predstavljaju centralnu zonu ishemije (engl.„ *ischemic core“)* u kojoj su krvne žile izgubile sposobnost autoregulacije i nalaze se u stanju vazoparalize i staze krvi sa nastankom morfoloških oštećenja stanice procesima lipolize, proteolize i disagregacije tubula sa razvojem nekroze (16).

Pojam „*ishemička penumbra*“ se odnosi na zonu mozga zahvaćenog ishemijom u kojoj je CBF ispod praga za električnu funkciju, te istovremeno iznad praga za membransku funkciju. Neuroni tog područja mozga ostaju vitalni, ali su nefunkcionalni (17). Mehanizmi održavanja ionske homeostaze su još očuvani sa reverzibilnom inhibicijom K-Na-ATP-aze uz funkcioniranje na nižim energetskim zahtjevima u kojima se održava samo bazalni metabolizam. Ako se uspostavi adekvatan CBF u prikladnom vremenskom intervalu funkcionalnost ovih neurona se vraća, na čemu se temelji suvremena terapija moždanog udara (17,18).

Tijekom vremena i bez terapije zona „*penumbre*“ progredira ka infarkciji kroz procese ekscitotoksičnosti, periinfarktne depolarizacije, postishemijske inflamacije i apoptoze. Infarkt mozga je ustvari posljedica intenziteta i trajanja ishemije, a protočni prag cerebralnog infarkta iznosi 10-12 ml /100 gr/ minuti tijekom dva sata i duže (14). Smatra se da je glavni uzročnik neuralnog oštećenja u zoni ishemije oslobađanje ekscitatornog neurotransmitera glutamata koji djelujući na NMDA receptore neurona dovodi do ulaska iona kalcija. Istovremeno se otvaraju ionski AMPA- receptorski kanali za ione natrija i klora koji ulaze u neurone. Porast ekstracelularnog glutamata i kalija dovodi do stanične depolarizacije uz dodatni utrošak energije ATP-a. To se naziva procesom periinfarktne depolarizacije i



Slika 1.1.2.1: Patogenetski mehanizmi u hipoksično-ishemičkom oštećenju mozga (preuzeto sa web hindawi.com)

što je ona više izražena, veći broj neurona u području penumbre odumire. Ekscesivni ulazak iona kalcija dovodi do mitohondrijskog oštećenja te niza citoplazmatskih i nuklearnih promjena sa aktivacijom proteolitičkih enzima uz trigeriranje procesa stanične smrti ili apoptoze. Ishemija također dovodi do oslobađanja slobodnih radikala koji procesom lipidne peroksidacije oštećuju stanične membrane, te izravno potiču pojedine dijelove apoptotičke kaskade. Taj proces je identičan u svakom ishemijskom oštećenju tkiva i naziva se „ishemijska kaskada“ (19). Moždano tkivo je osobito vulnerabilno na ishemiju zbog male respiratorne rezerve i potpune ovisnosti o aerobnom metabolizmu. Ishemija i infarkcija u moždanom tkivu rezultiraju gubitkom strukturalnog integriteta neurona i krvnih žila sa posljedičnim oštećenjem protektivne hematoencefalne barijere što sve zajedno doprinosi razvoju moždanog edema, a time i sekundarnoj progresiji moždanog oštećenja. Nakon hipoksično - ishemičnog neuralnog zbivanja najprije

dolazi do promjena u ionskoj homeostazi čemu slijedi nekroza i brza smrt stanica. Tek će nakon toga slijediti ekspresija pro i anti-apoptotičkih gena koji determiniraju daljnju sudbinu neurona i njihovu podložnost fenomenu „odgođene smrti“ ili apoptoze (19,20).

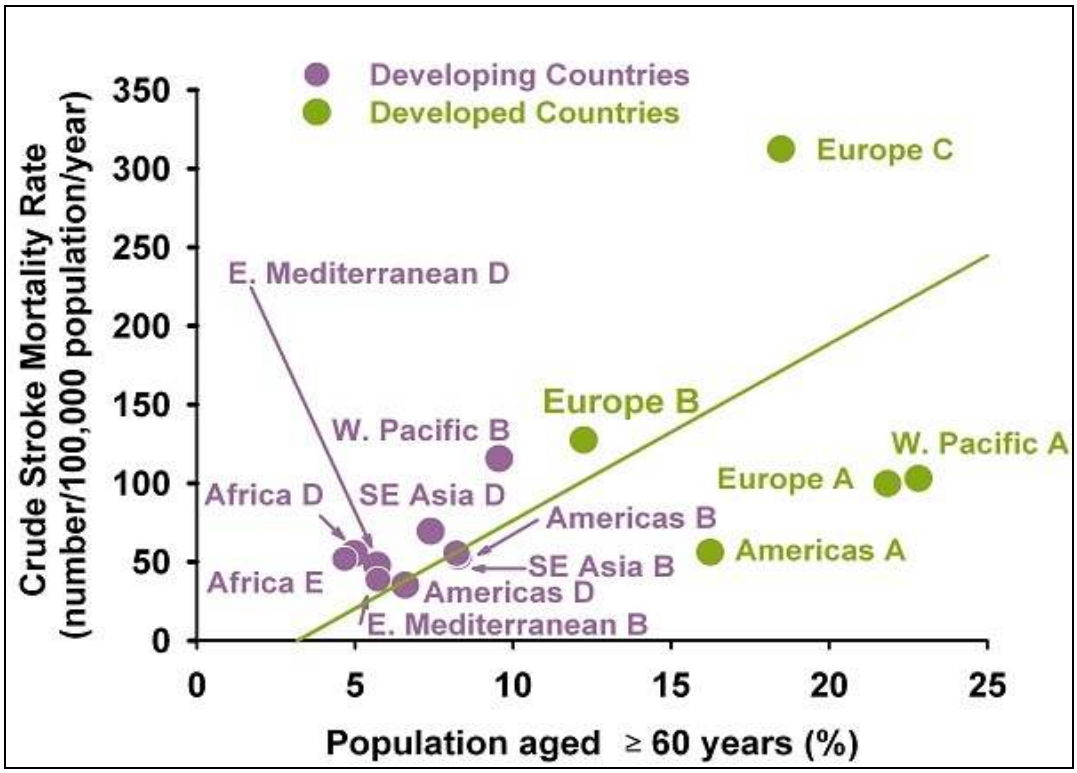
Klinička zapažanja regresije funkcionalnog neurološkog deficita uz istovremeni rast volumena ishemičke lezije govore međutim u prilog tome, da su rani znakovi neurološkog deficita rezultanta oštećene funkcije, a ne samo strukturalne lezije, odnosno da je klinički iskaz posljedica istovremeno i ishemičkog središta i penumbre (16). Navedeno potvrđuje postojanje niza odgođenih mehanizama u ishemičkom procesu i neuralnoj ishemijskoj kaskadi na koje se može terapijski djelovati i time smanjiti neuronalno oštećenje i posljedičan neurološki deficit. Suvremeno trombolitičko liječenje IMU primjenom rekombiniranog tkivnog plazminogena te primjena neuroprotektivne terapije govore tome u prilog i otvaraju mogućnosti za nova istraživanja i terapijske puteve (21).

1.1.3. Epidemiologija moždanog udara

1.1.3.1. Epidemiologija možanog udara u svijetu

Najnovije epidemiološke studije ukazuju na tzv.„ *ageing*“ populacije suvremenog svijeta, odnosno produženje životnog vijeka i porast udjela populacije starije od 65 godina, posebno u razvijenim zemljama poput Sjedinjenih Američkih Država (SAD) ili zemljama Zapadne Europe (22). Pitanje koje se danas slijedom tih studija postavlja pred stručnjake je: da li je moguće postići da produženje životnog vijeka bude praćeno i odgodom funkcionalnog ograničenja i invaliditeta ili će to produženje životnog vijeka, čiji se porast dodatno očekuje u XXI stoljeću, dovesti do povećane funkcionalne nesposobnosti i invaliditeta, poglavito od posljedica moždanog udara? Poznata je Freisova paradigma učinka morbiditeta koja navodi da „ukoliko se odgodi vrijeme do prve pojave funkcionalnog ograničenja i ovisnosti te ukoliko je taj odmak veći od porasta očekivanog trajanja života, tada će prosječno kumulativno vrijeme pobola biti skraćeno, oscilirajući između kasnijeg početka invaliditeta i vremena smrti“ (23).

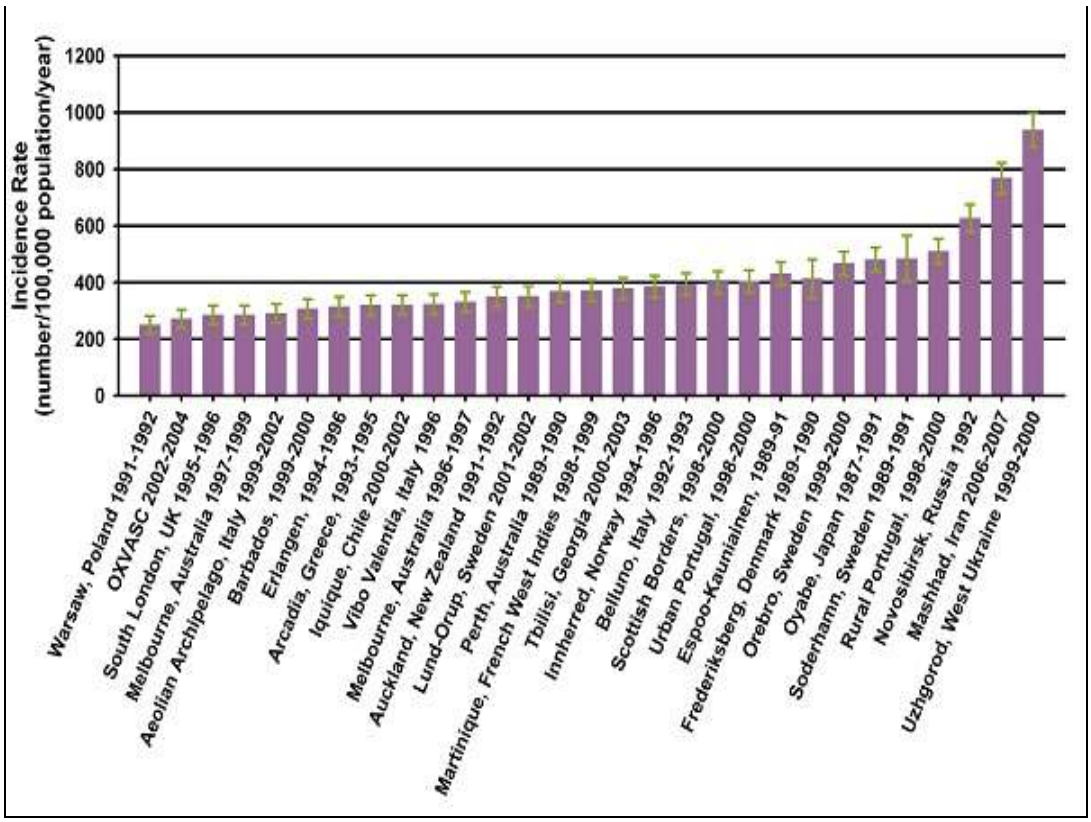
Svjetske statistike ukazuju na to da je moždani udar treći vodeći uzrok pobola, drugi uzrok smrtnosti i vodeći uzrok invaliditeta populacije suvremenog svijeta. Novije američke studije navode smanjenje mortaliteta od moždanog udara u SAD u zadnjoj dekadi prošlog te u prvim godinama ovog stoljeća. Tako je u SAD moždani udar na trećem mjestu kao uzrok smrtnosti kao i u Velikoj Britaniji temeljem rezultata studija Rothwela, što se povezuje sa padom stope incidencije MU u zadnjih 10-tak godina. Rothwel navodi pad stope incidencije za 40% u razdoblju od 1980 g. do 2004 god. u Oxfordshirdskoj regiji, a na sličan trend pada incidencije zadnjih 50 godina ukazuje i Framinghamska studija (24). Pad stope mortaliteta i incidencije MU dovode u vezu sa uspješnijim mjerama prevencije, posebno primarne prevencije MU i redukcijom rizičnih čimbenika (25). Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije (WHO) godišnje u svijetu od MU umre oko 5 550 000 ljudi, u Europi oko 1 280 000, odnosno svaka šesta žena (18%) i svaki deseti muškarac (28%). Ovisno o razvijenosti pojedinih zemalja Europe te se stope značajno razlikuju. Tako je za muškarce u dobi od 35-74 god. u Ruskoj federaciji koncem prošlog tisućljeća dobno standardizirana stopa mortaliteta od MU iznosila 429/100 000, što je čak 15 puta više od Švicarske sa stopom mortaliteta od 28/100 000. Za žensku populaciju Ruske federacije ta je stopa bila l4 puta veći iznoseći 253/100 000 u odnosu na Švicarsku sa stopom od 18/100 000 osoba. Mortalitet od MU kao što je razvidno iz navedenih podataka varira u ovisnosti o spolu i etničkoj pripadnosti (26). Tako je dobno standardizirana stopa mortaliteta u SAD 1998 god. među crnačkom populacijom muškaraca iznosila 84/100 000 dok je među bijelcima muškog spola iznosila 56/100 000. Slična se razlika našla između crnačkih žena i bjelkinja, dok je za Hispanijsku populaciju stopa mortaliteta bila između stopa mortaliteta za bjelačku i crnačku populaciju (27). Podaci za SAD iz 2001 god. ukazuju na stopu mortaliteta od 58/100 000 od čega je 61% smrtnih ishoda bilo među ženama (28).
Podaci za populaciju Engleske govore o padu stope smrtnosti za 25% u dobnoj skupini mlađoj od 65 godina sa porastom udjela smrtnosti žena u odnosu na muškarce (11: 8,4). Dobno standardizirane stope incidencije (eng. *age-standardized incidence rates*) dobar su pokazatelj za incidenciju moždanog udara, rastu eksponencijalno sa dobi iznoseći prosječno oko 2,5/100 000 stanovnika (0,3 promila između 30-40 god. života do čak 30 promila u osmom i devetom desetljeću života). Već je navedena Rothwelova studija koja nalazi pad stope incidencije za 40% u



Slika 1.1.3.1.1. Stope mortaliteta za populaciju =/>60 god u razvijenim i nerazvijenim zemljama svijeta za 2002 g,(iz Paul *et al. Curr Drug Targets*. 2007;8:786-793)

razdoblju od 1980 g. do 2004 godine (25) u Oxfordshirdskoj regiji, kao i podaci sa trendom pada incidencije zadnjih 50 god. na koje ukazuje Framinghamska studija. Rasna razlika razvidna je u stopama incidencije za prvi moždani udar po rezultatima velike GCNKSS studije (*Greather Cincinnati/ Northern Kentucky Stroke Study*). Ona je ukazala na pad incidencije moždanog udara među bjelačkom populacijom sa 206 na 179/100 000 usporedbom podataka iz 1993 godine sa 2005 godinom. Istovremeno, taj pad nije bio zamjetan među crnačkom populacijom u kojoj je godišnja incidencija 1993 god. iznosila 303, a u 2005 god. 294/100000. Rasna različitost je bila najizraženija među mlađom populacijom, tako da su u dobnoj skupini između 45 i 54 godine crnci imali 2,5 puta veću stopu incidencije MU u odnosu na bijelce (29). To se objašnjava stilom života crnačke populacije među kojom se ranije pojavljuju rizični čimbenici poput ovisničkog ponašanja, povišenog tlaka, pušenja, alkoholizma, hiperholesterolemije, dijabetesa uz njihovu neredovitu

kontrolu. Tridesetodnevna stopa mortaliteta od moždanog udara nije se pri tome bitno mijenjala tijekom godina, niti je iskazivala značajniju razliku među crnačkom ili bjelačkom populacijom (13,8% u 1993 god, 15% u 2005 godini) sa istovremeno dvostruko većom stopom incidencije MU među crnačkom populacijom. Ekstrapolacija incidencije MU za SAD za 2005 godinu ukazuje na 600 000 slučajeva MU udara godišnje (od čega 500 000 prvih, a 100 000 ponovljenih), odnosno 50 000 mjesečno,1 643 dnevno, 68 svakog sata i jedan u minuti. Prevalencija moždanog udara u SAD iznosi 1 na 59 stanovnika, odnosno 1,69%. Dakle, više od jednog na deset stanovnika, odnosno ukupno oko 4 600 000 stanovnika SAD je preboljelo MU, od čega su preko 2 miliona bile žene. Tridesetodnevna stopa smrtnosti nakon preboljelog IMU iznosi oko 8-10%, nakon subarahnoidalnog ili intracerebralnog krvarenja preko 30%, s tim da je preko l/5 preživjelih nakon MU nesposobna za samozbrinjavanje (29).



Slika 1.1.3.1.2. Incidencija moždanog udara u svijetu za pojedine zemlje standardizirana za dob od 45-84 god. (preuzeto iz web:e-learning; e-stroke Australia)

Financijski pokazatelji ukazuju da uz prosječnu cijenu koštanja bolničkog liječenja od 6000 dolara po oboljelom od MU, ukupni troškovi bolničkog liječenja iznose oko 6 milijadi dolara/godinu. U 2001 godini su ukupni troškovi nastali zbog moždanog udara i njegovih posljedica iznosili 45 milijardi dolara, od čega se l7 milijardi dolara odnosilo na gubitak produktivnosti (29). Podaci Svjetske zdravstvene organizacije o prevalenciji MU navode da godišnje 15 miliona ljudi diljem svijeta doživi MU među kojima 5 000 000 bolesnika ostaje trajno invalidno, što uz zdravstvene, socijalne ima i značajne financijske implikacije poput onih iskazanih za američku populaciju (30).

1.1.3.2. Epidemiologija moždanog udara u Republici Hrvatskoj

Podaci za Republiku Hrvatsku pokazuju konstantan porast morbiditeta i mortaliteta od moždanog udara tako da moždani udar zauzima treće mjesto u morbiditetu, a drugo mjesto u ukupnom mortalitetu populacije, mada najnovija istraživanja ipak ukazuju na blaži trend pada mortaliteta od neurovaskularnih bolesti u mlađim dobnim skupinama. Opća stopa smrtnosti od kardiovaskularnih bolesti za Hrvatsku je 2001. godine iznosila 598,1/100 000, a za neurovaskularne bolesti 187,9/100 000 stanovnika, dok je u 2007. godine stopa za kardiovaskularne bolesti iznosila 597,3, a za neurovaskularne bolesti 187,6/100 000 stanovnika. Od moždanog udara u Hrvatskoj je 2008. godine umrlo 5031 osoba, što predstavlja 9,6% svih smrtnih ishoda. Od toga je bilo 40,3% muškaraca i 59,7% žena. Opća stopa smrtnosti iznosila je 113,4/100 000 stanovnika i viša je u žena (130,4) u odnosu na muškarce (95,0), što je sukladno podacima iz svjetske literature o povećanoj smrtnosti među ženama. Dobno specifične stope mortaliteta rastu sa dobi i za sve dobne skupine su više u muškaraca nego u žena, a u dobi iznad 70 godina se izjednačuju zbog veće zastupljenosti ženske populacije u toj dobi (31).
Uvidom u kretanje dobno standardiziranih stopa mortaliteta od neurovaskularnih bolesti u Hrvatskoj je od 1990. godine (171,6/100 000) razvidan blaži porast stope u 2000. godini (176,4), nakon čega postoji trend pada stope mortaliteta na 118,8/100 000 u 2008.godini (32). Dobno standardizirana stopa mortaliteta od neurovaskularnih bolesti 2008. god. za Europsku regiju je bila niža iznoseći 112,3/100 000. Međutim stopa mortaliteta razvijenih zemalja članica EU iznosi 65,0/100 000, a novih članica EU

124,4/100 000 stanovnika, dok „tranzicijske“ zemlje Istočne Europe poput Bugarske i Rumunjske imaju uglavnom više stope od Hrvatske (33,34).
Tragična je činjenica da čak oko 46% slučajeva moždanog udara nastaje u produktivnoj dobi populacije između 45. i 60. godine života, mada se ipak zamjećuje pozitivan trend opadanja stope smrtnosti od 44,8% u toj dobnoj skupini (1990. godine 34,6/100 000, a 2008.godine 19,1/100 000). Na razini primarne zdravstvene zaštite kardiovaskularne su se bolesti (uključivši i neurovaskularne bolesti) u 2007. godini po učestalosti nalazile na drugom mjestu s udjelom od 11,2% u ukupnom morbiditetu. Zbog neurovaskularnih bolesti 2000 god. na razini primarne zdravstvene zaštite liječeno je 42 111 osoba, a 2007 god. taj se broj popeo na 51.429 bolesnika sa udjelom od 5,1% u ukupnom morbiditetu populacije (35).

1.1.3.3. Rizik ponovljenog moždanog udara

Ponovljeni moždani udar se definira kao novi neurološki deficit koji zadovoljava kriterije za ishemički MU, a javlja se nakon 24 sata od inicijalnog MU i nije posljedičan edemu, kompresivnom „mass“ efektu ili hemoraškoj transformaciji infarktne zone prethodnog moždanog udara (6,7).
Rizik recidiva IMU je iznimno visok u prvom tjednu nakon pretrpljenog MU i iznosi 2-7%, nakon mjesec dana 8-18%, a nakon prve godine l7-30%, rastući svake slijedeće godine za 5 %. Podaci iz 2005 god. za SAD upućuju na to da se od svih slučajeva MU udara pretrpljenih tijekom godine dana 1/6 odnosila na ponovljeni MU (36).
Podaci također navode da će svaka četvrta osoba nakon preboljelog MU udara doživjeti bar još jedan tijekom života, odnosno nakon 5 godina od inicijalnog MU najmanje 25% žena i 42% muškaraca će doživjeti ponovljeni moždani udar (37).
U svojoj studiji provedenoj okviru Ročersterskog epidemiološkog projekta (eng. *Rochester epidemiology project*) iz 2000. godine, Petty navodi stopu recidiva unutar mjesec dana od IMU od čak 18,5%. Sacco sa suradnicima je u Manhattan Stroke Study našao stopu recidiva MU od 14,5% nakon mjesec dana, dok je stopa recidiva nakon godinu dana iznosila 26,5% (38). Po TOAST kriterijima najveći broj recidiva je bio u CE skupini, a najmanji u LAA (moždani udar zbog aterotromboze velikih krvnih žila). To su pokazale i dobno-standardizirane stope incidencije za europsku populaciju po

kojima rizik recidiva od kardioembolijskog (CE) MU nakon godinu dana iznosi 30,2% (25,6- 35,7%), za lakunarne infarkte (SAO) 25,8% (21,5- 31%), a za aterotrombozu velikih krvnih žila iznosi l5,3% (12-19,3%). Rizik recidiva aterotrombotski uzrokovanih moždanih udara je više od dva puta veći među muškarcima u odnosu na žene (11,39). Podaci govore o iznimno visokoj stopi smrtnosti od recidiva moždanog udara koja nakon mjesec dana iznosi 14,6-30,3% te 25-53% nakon godinu dana, a najviša je opet od kardioembolijskog MU. Bolesnici koji su preboljeli moždani udar lakunarnog tipa imaju tri puta veću šansu preživljavanja unutar tri godine u odnosu na one koji su pretrpili moždani udar kardioembolijskog tipa, što govori u prilog neophodnosti provođenja mjera detekcije, te primarne i sekundarne prevencije i liječenja posebno u toj skupini bolesnika (40,41).

1.1.4. Rizični čimbenici za nastanak moždanog udara

Rizični čimbenici su zbir bioloških, patoloških te socio-higijenskih pojava koje pospješuju nastanak patofizioloških mehanizama te doprinose razvoju promjena na krvnim žilama, pospješujući rizik od nastanka moždanog udara. Poznati su rizični čimbenici na koje se ne može utjecati te promjenjivi rizični čimbenici (RČ) vezani uz stil života, navike, bolesti i patološke promjene (42,43).

1.1.4.1. Rizični čimbenici na koje se ne može utjecati

a) Dob je jedan od naznačajnijih nepromjenjivih RČ tako da se nakon 60-te godine života sa svakim slijedećim desetljećem starosti za 10% povećava rizik nastanka MU.

b) Spol- U muškaraca je veća incidencija MU kao i veća stopa smrtnosti u odnosu na žene u generativnoj dobi. Međutim rizik od MU za žene raste nakon menopauze, a zbog veće stope zastupljenosti žena u populaciji starijoj od 70 godina, u apsolutnom broju žene u toj dobi više obolijevaju od MU.

c) Rasa- Incidencija moždanog udara 2,5 puta je veća među populacijom crnaca u odnosu na bijelce, a veća stopa incidencije zadnjih godina je zabilježena i u populaciji Japana u odnosu na zemlje Zapadne Europe

d) Anamneza o prethodnom MU ili TIA- podaci o moždanom udaru unutar obitelji ili anamnestički podaci o preboljeloj TIA ili MU značajno povećavaju rizik od nastanka MU kako prvog tako i ponovljenog. Prethodna TIA ili MU su vodeči RČ za nastanak recidiva moždanog udara.

1.1.4.2. Rizični čimbenici na koje se može utjecati

Rizični čimbenici na koje se može utjecati su povezani sa stilom života, navikama, bolestima i bolesnim stanjima.

a) *RČ vezani uz navike i stil života:*

pušenje, smanjena tjelesna aktivnost, pretilost, alkoholizam, zlouporaba droga, nezdrava prehrana sa pretegom zasićenih masnih kiselina i ugljikohidrata, stres, uporaba oralnih kontraceptiva ili nadomjesne hormonske terapije u menopauzi

b) *RČ vezani uz bolesna stanja i bolesti*:

-arterijska hipertenzija je vodeći RČ za MU (relativni rizik /RR/3-5 puta). Učestalost MU raste za 46% za svakih 7,5mmHg porasta dijastoličkog tlaka i smatra se da se adekvatnim liječenjem povišenog krvnog tlaka može prepoloviti rizik nastanka MU.

-Šećerna bolest (Diabetes mellitus) značajan je RČ sa RR 3-4 puta za razvoj MU, potom slijedi povišen kolesterol (RR 1,8-2,6 puta), značajna stenoza karotidnih arterija (stenoza >75% - RR 2 puta), TIA, metabolički sindrom, hiperkoagulabilitet krvi i prokoagulabilna stanja, stanja hiperviskoznosti krvi i povećanog hematokrita, hiperhomocisteinemija, vaskulopatije i disekcija arterijske stijenke, vaskulitisi i druga upalna stanja, genetički poremećaji (CADASIL, Moya-Moya, MELAS, Fabry-eva bolest), hormonalni poremećaji kao hipertireoza, migrena.

-Srčane bolesti i poremećaji srčanog ritma u podlozi su nastanka kardioembolijskog MU: fibrilacija atrija i ostale srčane aritmije, reumatske bolesti aortalnih i mitralnih zalistaka, prolaps mitralnog zalistka, mehaničke srčane valvule, kardiomipatija, opsežni

infarkt miokarda, tromb lijeve klijetke, endokarditis, atrijska aneurizma, otvoren formen ovale ili septalni defekt, hipertrofija lijeve klijetke, tumori srca (44,45).

1.1.5. Embolijski i kardioembolijski moždani udar

Embolijski MU je posljedičan prekidu dotoka krvi u moždano tkivo komadićima „detritusa“, najčešće arterijskim embolusima kardiogenog porijekla. Oni mogu nastati i emboliziranjem materijala iz rupturiranog aterosklerotskog plaka, otkidanjem od muralnog tromba pri disekciji arterijske stijenke ili pak pri paradoksalnom embolizmu tijekom duboke venske tromboze u slučajevima postojanja atrijskog ili ventrikularnog septalnog defekta. Embolus može biti sastavljen od masti ili zraka nastalih pri prijelomu kosti, može sadržavati karcinomske stanice, kalcij ili bakterije u infekcijskom endokarditisu.

1.1.5.1. Epidemiologija kardioembolijskog MU

Kardiogeni embolizam uzrokom je više od petine moždanih udara (godišnje 20-33%). Rizik kardioembolijskog moždanog udara (CE MU) raste sa godinama zbog visoke prevalencije FA u starijoj populaciji. Zanimljiv je bimodalni tip dobnog udjela CE MU koji je visok za dobnu skupinu < 50 godina te ponovo izrazito raste u dobnoj skupini iznad 75 godina života zbog navedenog porasta FA među starijom populacijom, poglavito među ženama. Nešto je rjeđa učestalost CE MU među crnačkom populacijom u odnosu na bijelce (29). Visoka je stopa recidiva koja se na godišnjoj razini kreće i do 30%, s tim da neke studije navode rizik recidiva od 1% dnevno nakon preboljelog CE MU, dok novije studije navode rizik recidiva od 5-7% unutar 7-12 dana od CE MU u pacijenata sa FA. Stopa smrtnosti se kreće do 33% , a kod recidivnog CE MU stopa smrtnosti raste čak do 70% (39).
Specifičnost kliničkog iskaza CE MU je u iznimno naglom nastanku neuroloških simptoma, često uz alteraciju svijesti, lošije su prognoze i dovode do težeg neurološkog deficita u odnosu na druge tipove MU. No u nekim slučajevima dolazi i do brzog

oporavka neuroloških simptoma posljedičnog reperfuziji okolnog tkiva uslijed distalnije propagacije ili lize embolusa (39,46).

1.1.5.2. Patofiziologija kardioembolijskog moždanog udara

Temeljni patofiziološki mehanizam kardioembolijskog MU je okluzija krvne žile embolusom kardijalnog porijekla. Embolusi su najčešće sastavljeni od agregata trombocita no mogu biti sastavljeni od tromba, masti (kolesterolski), kalcija, bakterija, malignih stanica. Embolusi koji su posljedični fibrilaciji atrija ili miokardijalnom infarktu rezultanta su staze krvi, dok su embolusi posljedični promjenama srčanih zalistaka rezultanta endotelijalnih abnormaliteta sa naslagama patološkog materijala na njihovim stijenkama.Više od 80% embolusa kardioembolijskog porijekla zalazi u krvožilje mozga od čega preko 80% zalazi u prednju karotidnu cirkulaciju, a 20% u vertebrobazilarni sliv proporcionalno distribuciji moždanog krvnog optoka (46). Embolusi, za razliku od tromba, često migriraju distalno nakon mjesta inicijalne okluzije žile. To objašnjava brzu reperfuziju oštećenih kapilara i arteriola i dozvoljava prodor krvi u okolno infarcirano tkivo, rezultirajući hemoraškom tranzicijom infarktne zone koja je češća u CE MU u odnosu na druge uzroke MU.
Postoje dva tipa hemoraške tranzicije: multifokalna koja se zbiva pretežno u već nekrotičnom infarciranom tkivu te je načešće asimptomatska. Drugi oblik je nastanak sekundarnog hematoma koji kompresivnim „*mass*“ efektom dovodi do kliničkog pogoršanja (47). Krvarenja su češća u pacijenata sa leukoaraiozom ili u starijih bolesnika sa cerebralnom amiloidnom angiopatijom. Pogoršanje stanja svijesti, teški neurološki deficit sa NIHSS (eng. *National Institute of Health Score Scale*) veći od 14, proksimalna okluzija, nalaz hipodenziteta u CT mozga u više od l/3 teritorija srednje moždane arterije (eng.ACM-*middle cerebry artery*) i odgođena rekanalizacija su prediktori hemoraške transformacije infarktne zone u akutnom CE MU (48,49).

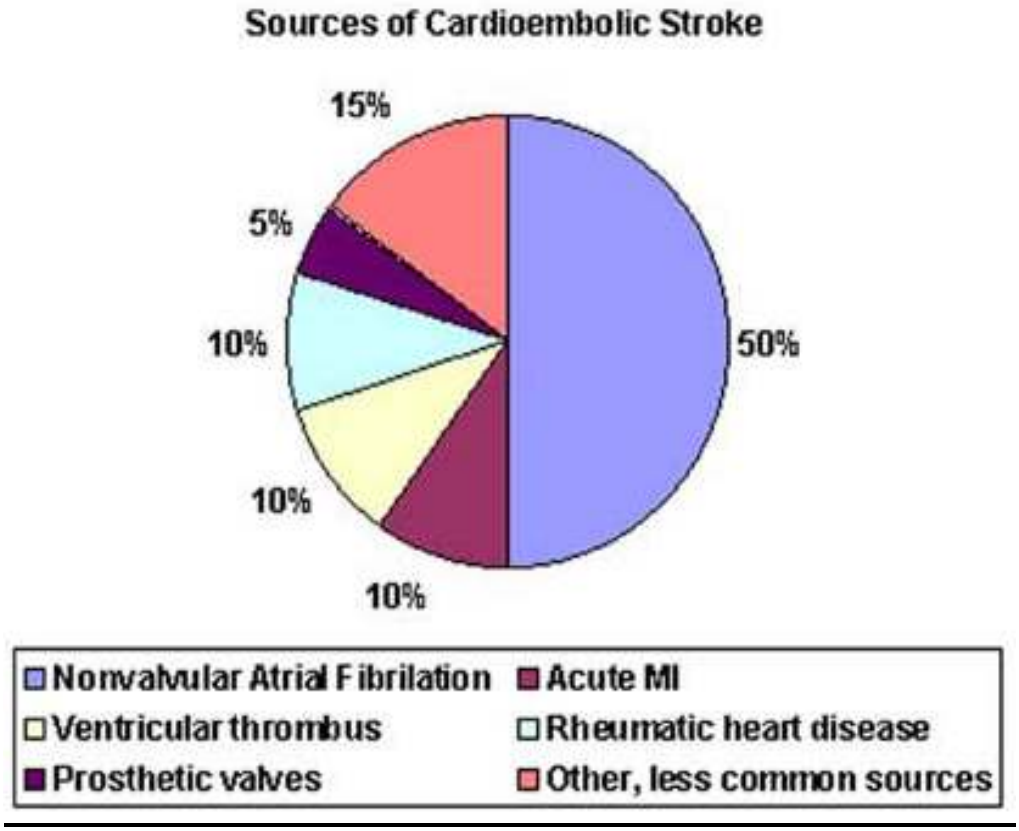
1.1.5.3. Uzroci kardioembolijskog moždanog udara

Uzroci kardioembolijskog MU se mogu podijeliti u tri glavne skupine :

a) promjene srčane stijenke i srčanih komora te povezani abnormaliteti – kardiomiopatija, hipokinetičke/akinetičke promjene ventrikularne regije posljedične opsežnom miokardijalnom infarktu, aneurizma atrijskog septuma, ventrikularne aneurizme, tromb u atriju ili ventriklu, tumori poput miksoma ili fibroelastoma, septalni atrijski defekti i otvoren foramen ovale

b) bolesti valvula: reumatska bolest mitralnih i aortalnih zalistaka, umjetni srčani zalisci (mehanički i bioprotetski), bakterijski endokarditis, fibrozne endokardijalne lezije, prolaps mitralne valvule, kalcifikacija mitralnog anulusa

c) aritmije, najčešće fibrilacija atrija, „sick sinus“ sindrom



Slika 1.1.5.3.1. Uzroci kardioembolijskog MU po učestalosti (iz SchneckMJ: Cardioembolic sroke, 2010)

1.1.5.3.1. Fibrilacija atrija (FA)

Fibrilacija atrija (FA) je najčešći poremećaj srčanog ritma, a posljedica je kaotičnog odašiljanja impulsa iz ektopičnih izvora u srčanoj pretkljetki što dovodi do nekoordinirane atrijske aktivacije i poremećene mehaničke funkcije sa smanjenom djelotvornošću srčane pumpe. Javlja se najčešće u bolesnika sa ishemijskom i koronarnom bolešću srca, kardiomiopatijom, bolešću mitralne valvule, oštećenjima perikarda, u hipertireozi. Opisuje se i nasljedna sklonost za FA među mlađim osobama (46). Prevalencija raste sa dobi te se procjenjuje da u Europi danas preko 4,5 milijuna bolesnika ima taj poremećaj (50).

FA je istovremeno neovisni RČ sa relativnim rizikom 5-7 puta za nastanak MU od čega je 18-20 puta povećan rizik za nastanak moždanog udara među bolesnicima sa FA i mehaničkim mitralnim valvulama (51). Odgovorna je za oko 20% neurovaskularnih ishemijskih incidenata, odnosno preko 50%-68% CE MU je posljedično je fibrilaciji atrija. Rizik MU zbog prisutne FA raste sa oko 1,5% u dobi od 50 godina na 25% u dobi od 80 godina. Rizik recidiva MU u neliječenih pacijenata sa FA je također značajno veći u odnosu na ostalu populaciju i iznosi preko 30% unutar godinu dana.

Povećana je stopa smrtnosti nakon recidivnog CE MU koja je u okviru trogodišnjeg preživljavanja tri puta veća u odnosu na pacijente koji su preboljeli lakunarni MU (52).

Terapija FA ima tri cilja: kontrolu frekvencije, korekciju ritma i prevenciju TE incidenata. Lijek izbora za primarnu i sekundarnu prevenciju TE incidenata je varfarin.

Čimbenici rizika koji povećavaju rizik TE incidenata i nastanak CE MU u bolesnika sa fibrilacijom atrija su:

a) *veliki rizik:* veliki prethodni MU,TIA, PE, mitralna stenoza, umjetni zalisci

b) *srednji rizik:* dob > 75 godina, hipertenzija, zatajenje srca, LV EF </=35%

c) *slabi rizik*: žene, dob 65-74 god, tireotoksikoza.

U prisutnosti bilo kojeg velikog rizičnog čimbenika ili u slučajevima postojanja više od jednog srednjeg RČ indicirana je preventivna primjena varfarina, u slučajevima prisutnosti jednog srednjeg RČ preporučuje se primjena aspirina ili varfarina, a ukoliko nema RČ preporučuje se antiagergacijska terapija aspirinom u pacijenata sa FA.

Koristan je CHADS2 zbroj pri procjeni indikacije za primjenu varfarina u bolesnika sa

Tablica 1.1.5.3.1.1. CHADS2 Score :
Rizik nastanka moždanog udara/ godini dana u pacijenata sa FA
C-congestive heart failure 1 (kongestivno zatajenje srca), H-hypertension 1 (arterijska hipertenzija) , A-Age >75 1(Dob), D-diabetes mellitus 1(dijabetes melitus) , S-stroke l (moždani udar)

CHADS2 Skor	rizik	% rizika MU/god.
0	**Nizak**	**1.9%**
1	**Nizak**	**2.8%**
2	**Srednji**	**4%**
3	**Visok**	**5.9%**
>3	**Vrlo visok**	**>8.5%**

FA bez srčane greške uz procjenu rizika nastanka MU na godišnoj razini koja se kreće od 0,5-12%, što je prikazano na tablici 1.1.5.3.1.1. Ukoliko je ukupni zbroj CHADS2 veći od 2, indicirana je primjena varfarina (52). Dakle u okviru prevencije nastanka MU, poglavito u osoba sa visokim i srednjim rizikom za MU, indicirana je i u primarnoj i u sekundarnoj prevenciji moždanog udara primjena varfarina. Njegova primjena za tri puta reducira rizik od nastanka MU, a u sekundarnoj prevenciji se za 70% smanjuje rizik recidiva MU, dovodeći do 33% redukcije rizika od smrtnog ishoda.
Unatoč očitoj učinkovitosti terapije, podaci govore da gotovo polovini indiciranih pacijenata sa FA i prisutnim rizičnim čimbenicima liječnici ne propisuju terapiju varfarinom (53,54).
Podaci SAFE studije koja je istraživala pacijente sa MU i prisutnom FA su potvrdili da većina pacijenata sa FA nije liječena antikoagulantnom terapijom prije pretrpljenog MU iako za nju nije postojalo kontraindikacija (44,45). Čak je i u visokorazvijenim zemljama poput Švedske samo 11% bolesnika sa FA hospitaliziranih zbog akutnog MU prethodno primalo oralnu antikoagulantnu terapiju varfarinom, dok je u sekundarnoj prevenciji primijenjen u svega 33,5% indiciranih bolesnika. Niz je studija koje su istraživale učinkovitost primjene varfarina u prevenciji MU u pacijenata sa FA poput

ACTIVE W studije provedene među 6706 viskorizičnih bolesnika sa FA u kojih se uspoređivala učinkovitost primjene dualne antiagregacijske terapije klopidogrela i aspirina naspram varfarina. Rezultati su ukazali da je primjena antikoagulantne terapije u dugotrajnoj prevenciji velikih ishemijskih incidenata bila bolja u odnosu na dualnu antiagregacijsku terapiju (3,9% godišnje varfarin i 5,6% godišnje klopidogrel uz aspirin) bez značajnijeg porasta rizika većih krvarenja (55).
Rezultati SPORTIF III (*Stroke Prevention Using an Oral Direct Thrombin Inhibitor in Patients with Atrial Fibrillation*) studije uporedbe učinka novog oralnog antikoagulansa ximelagatrana u dvokratnoj dnevnoj dozi u pacijenata sa FA iskazalo je podjednaku učinkovitost kao i varfarin u prevenciji MU sa podjednakim rizikom krvarenja, uz jednostavniju primjenu koja ne iziskuje monitoriranje i česte kontrole INR (eng. *Internalisated normal ratio*). No, zbog njegove hepatotoksičnosti, američka FDA (eng. *Food and Drug Administration*) nije izdala odobrenje za širu primjenu ximelagatrana, tako da se danas ispituje učinkovitost novog lijeka dabigatrana u prevenciji TE incidenata u bolesnika sa FA (56,76).

1.1.5.3.2. Oštećenja mitralnih i aortalnih zalistaka i implantirani mehanički zalisci

Reumatska bolest je najčešći uzrok oštećenja srčanih zalistaka koje vremenom iziskuje implantaciju bilo mehaničkih bilo bioprotetičkih zalistaka. Bolesnici sa implantiranim zaliscima izrazito su povišenog rizika za MU, a među onima sa implantiranim mehaničkim mitralnim valvulama rizik od CE MU je povećan čak za 15-18 puta. Ukoliko bolesnici uz to imaju i fibrilaciju atrija rizik CE MU se povećava i do 20 puta. Rizik recidiva CE MU u toj skupini bolesnika na godišnjoj razini iznosi 60-65%, a većina se recidiva dešava unutar prvih 6 mjeseci. Primjena varfarina u primarnoj i sekundarnoj prevenciji u takvih pacijenata može pridonijeti 70% redukciji rizika nastanka CE MU (57,58).
Asimptomatski prolaps mitralne valvule nađe se u oko 6% osoba, najčešće mlađih žena. Pridružena miksomatozna degeneracija, redundancija zaliska ili supraventrikularna aritmija povećava rizik za nastanak CE MU, tako da će 1/3 bolesnika razviti cerebralnu ishemiju sa stopom recidiva koja se na godišnjoj razini kreće oko 16% (59). Promjena je lako detektibilna transtorakalnim i transezofagealnim UZ srca te ga se preporučuje

učiniti u mlađih bolesnika sa preboljelim moždanim udarom nejasnog uzroka. Terapija izbora i u takvih pacijenata je primjena varfarina sa ciljem redukcije rizika TE incidenata i recidiva MU (60).

1.1.5.3.3. Foramen ovale apertum (FOA) i moždani udar

Otvoreni foramen ovale (lat. *FOA-foramen ovale apertum*) je kongenitalni defekt zatvaranja septalne stijenke koji ima relativno visoku prevalenciju od 20% među općom populacijom. Nađe ga se u gotovo 40% pacijenata sa MU mlađih od 55 godina, a među njima oko 4% ima pridruženu atrijsku septalnu aneurizmu (61).
Rizik MU povezanog sa prisutnim FOA se zapravo ne zna, no poznat je mehanizam nastanka MU u takvih pacijenata koji je povezan sa paradoksalnim embolizmom, supraventrikularnom aritmijom te trombom iz koegzistentne aneurizme atrijskog septuma. Česti su migrenski napadi u takvih pacijenata osobito uz prisutnost septalne aneurizme. Rizik recidiva MU u pacijenata koji imaju samo FOA je relativno malen i iznosi 1-3%, a povećava se na 2-15% godišnje u situacijama prisutne FOA i septalne aneurizme. U situacijama prisutnog samo FOA preporučuje se primjena antiagregacijske terapije, a ukoliko je pridružena atrijska septalna aneurizma se preporučuje primjena varfarina, mada ne postoje velike randomizirane studije koje bi potkrijepile tu preporuku (62). Jednako tako, rezultati CLOSURE I studije koja je uključivala istraživanje redukcije rizika od recidiva MU primjenom antitrombotičke terapije naspram endovaskularnog zatvaranja FOA, nisu iskazali bitne razlike među skupinama. Preporuke American Academy of Neurology uključuju medikamentoznu antitrombotičku prevenciju u pacijenata sa FOA, koja u slučaju pridružene septalne aneurizme uključuje terapiju varfarinom, osim u slučajevima učestalih klinički evidentnih ishemijskih incidenata, kada se savjetuje operativno ili endovaskularno zatvaranje FOA (63).

1.1.5.4. Embolijski moždani udar kod disekcije arterijske stijenke

Disekcija ekstrakranijskih karotidnih i vertebralnih arterija (DA) te njihovog intrakranijskog segmenta, relativno je čest uzrok moždanog udara među mlađom populacijom sa godišnjom incidencijom od 2,5 - 3/100 000. Uzrok DA je najčešće trauma i/ili postojeća arteriopatija kao u Ehlers-Danlosovu ili Marfanovu sindromu i sličnim abnormalnostima stijenke krvnih žila. U slučajevima teže traume incidencija DA se povećava na 1-3% i češća je u ekstrakranijskom nego intrakranijskom segmentu. Oko 70% disekcija se dešava u dobi od 35.do 50. godine života (64).
Subintimalna disekcija uzrokuje kompromitaciju hemodinamike zbog suženja ili okluzije krvne žile muralnim hematomom/trombom. Uz to može doći i do posljedične mikroembolizacije iz tromba unutar same disekcije sa rizikom nastanka ishemičkog moždanog udara ili TIA. Kompromitacija hemodinamike češći je uzrok ishemijskih incidenata kod intrakranijske lokalizacije DA, dok je mikroembolizacija češći uzrok MU ili TIA kod ekstrakranijske lokalizacije, mada su embolusi u cerebralnim arterijama ponekad detektirani i kod intrakranijske disekcije (65). Ukoliko se disekcija dogodi na nivou medija/adventicija ili se intramuralno krvarenje proširi do adventicije, dolazi do formiranja disekcijske aneurizme uz porast rizika od subarahnoidalnog krvarenja pri njenoj rupturi (66,67). Svi mogući ishodi arterijske disekcije imaju značajan upliv u izboru adekvatng terapijskog pristupa (68,69).
Dileme pred kojima se nalaze kliničari kod disekcija intra ili ekstrakranijskih arterija su:
1) Ne činiti ništa ?! (spontana, potpuna ili djelomična rekanalizacija je česta kod DA)
2) Provoditi primarnu i/ili sekundarnu prevenciju MU primjenom antitrombotičke terapije – pri čemu nastupa i dilema primjene antikoagulantne ili antiagregacijske terapije ?!
Cilj medikamentozne terapije disekcije arterijske stijenke primjenom antitrombotika usmjeren je prevenciji nastanka i progresije MU te prevenciji recidiva uzrokovanog mikroembolusima i/ili kompromitacijom hemodinamike nastalim krvarenjem ili trombom u disekantu sa posljedičnom stenozom lumena krvne žile (65,69). U akutnoj fazi opsežne ekstrakranijske disekcije sa kliničkom prezentacijom MU ili TIA, savjetuje se primjena antikoagulantne terapije, bilo frakcioniranim heparinom ili NMK (niskomolekularnim heparinom) u trajanju 7-14 dana uz nastavak terapije varfarinom kroz 3-6 mjeseci (klasa IIa,nivo B po AHA/ASA kriterijima iz 2010 god) (70).

Relativna učinkovitost primjene antiagregancija naspram antikoagulantne terapije još je uvijek nepoznanica kod intrakranijske disekcije karotidnih i vertebralnih arterija i prisutnog MU ili TIA, što je navedeno i u najnovijim smjernicama ASA/AHA (klasa IIb, nivo B) te u najnovijim preporukama Karolinska Stroke Update Consensus Statement and Recommentations to the European Stroke Organisation Guidelines Committee iz studenog 2010 godine (71). U subkroničnoj fazi DA, posebno u situacijama intrakranijske lokalizacije disekanta za koju se smatra da je povezana sa povećanim rizikom nastanka subarahnoidalnog krvarenja ili ukoliko je kontraindicirana primjena antikoagulansa, savjetuje se primjena antiagregacijske terapije. Za pacijente sa MU ili TIA i nalazom ekstrakranijske disekcije u kojih dolazi do opetovanih ishemičkih incidenata unatoč optimalnoj terapiji ili pri jatrogeno uzrokovanoj disekciji tijekom intravaskularnih procedura, preporučuje se endovaskularna ugradnja stenta uz antiagregacijsku zaštitu (nivo IIb, klasa C), a ukoliko to nije moguće, savjetuje se operativno liječenje (70,71).

1.1.5.5. Moždani udar uzrokovan trombozom cerebralnih venskih sinusa

Tromboza cerebralnih vena i venskih duralnih sinusa neurološki je poremećaj koji se nažalost često previdi u dijagnostici i liječenju zbog šarolike kliničke slike kojom se manifestira od simptoma nalik na pseudotumor cerebri, infarkta mozga, intracerebralnog krvarenja do subarahnoidalnog krvarenja. Nešto je veća prevalencija među ženama, omjer je 1,3:1 u odnosu na muškarce, češća je u mlađih žena između 25. i 30. godine života (61%). Stopa mortaliteta iznosi od 13,8 do 48% ovisno o težini kliničke slike, a 25-30% bolesnika imaju potpun oporavak.
Uzroci nastanka cerebralne venske tromboze su raznoliki: infekcija, trauma, hematološki poremećaji, uključivši paroksizmalnu nokturnu hemoglobinuriju ili trombotičku trombocitopeničku purpuru, hiperkoagulabilna stanja sa antifosfolipidnim sindromom, protein C i S deficitom, mutacijom Leiden V faktora, autoimune bolesti, nefrotski sindrom, ciroza jetre, trudnoća i puerperij, nakon lumbalne punkcije ili primjena nekih lijekova poput kortikosteroida, tamoxifena, eritropoetina (72).
Studije Einhaupla l991 g. i de Bruijin i Stama iz 1999 god. ukazuju na sigurnu primjenu antikoagulantne terapije u bolesnika sa intrakranijskom venskom trombozom i

prisutnim intracerebralnim krvarenjem, što je uključeno i u terapijske smjernice AHA/ASA kod akutne cerebralne venske tromboze, mada se navodi da ne postoje rezultati većih randomiziranih studija sa definiranjem optimalnog vremena trajanja primjene antikoagulantne terapije (73,74). Savjetuje se primjena nefrakcioniranog heparina ili niskomolekularnog heparina (NMH) u akutnoj fazi. Ukoliko se primjenjuje nefrakcionirani heparin daje se inicijalna doza bolusa heparina od 5000 IU sa nastavkom 20 000 do 100 000 IU/24 sata ili 40-80 IU/kg u bolusu sa povećanjem za 2-4 IU/kg/h kroz 5 do 7 dana sa naknadnim uvođenjem varfarina tijekom slijedećih 3 do 6 mjeseci ili nakon tromjesečne primjene varfarina daljnja primjena antiagregacijske terapije. Slične smjernice se preporučuju i pri inicijalnoj dvokratnoj dnevnoj primjeni NMH sa nastavkom terapije varfarinom (75). U pacijenata sa spontanom venskom trombozom i anamnezom o opetovanim trombotičkim incidentima ili prirođenom trombofilijom, savjetuje se dugotrajna primjena antikoagulantne terapije (klasa IIb, nivo B). U rizičnih trudnica među kojima relativno često dolazi do tromboze intracerebralnih venskih sinusa sa ili bez intracerebralnog krvarenja, preporučuje se primjena niskomolekularnog heparina do kraja trudnoće u slučajevima visokog rizika od TE incidenata (mehaničke srčane valvule, hiperkoagulabilna stanja) budući da varfarin prolazi placentu i može imati teratogeni učinak na plod. U trudnica sa nižim rizikom, nakon prvog trimestra može se u terapiju uvesti aspirin (klasa IIb, nivo C). Ukoliko je potrebno, nastavak terapije varfarinom nije kontraindiciran u dojilja (71,74).

1.2. Varfarin

1.2.1. Opće karakteristike, indikacije i kontraindikacije za primjenu varfarina

Oralni antikoagulansi su antagonisti vitamina K, a među njima je varfarin najpropisivaniji oralni antikoagulans u prevenciji i liječenju tromboembolijskih bolesti u svijetu, osobito u prevenciji nastanka ishemijskog moždanog udara. Preko 50 godina se nalazi na tržištu i za sada ne postoji adekvatna farmakološka zamjena koja bi svojim svojstvima odgovarala njegovoj učinkovitosti te odnosu učinkovitosti i cijene, mada su u tijeku studije učinka dabigatrana u prevenciju TE i CE MU (76).
Varfarin blokira regeneraciju reducirane forme vitamina K koji je bitan koenzim u karboksilaciji glutamatskih ostataka u prokoagulantne oblike faktora II,VI,IX i X u koagulacijskoj kaskadi. To u konačnici dovodi do smanjene produkcije trombina i fibrina te inhibicije koagulacije.
Poznat je uzak terapijski raspon varfarina sa velikom interindividualnom osjetljivošću na lijek (razlike i do 20 puta u potrebnoj dozi). Razlika u potrebnoj dnevnoj dozi ovisna je o nizu čimbenika: dobi, spolu, tjelesnoj težini, konkomitatnim bolestima, istovremenoj primjeni lijekova koji utječu na njegov metabolizam i potencijalno stupaju u interakcije, prehrambenim navikama (77). Njegov antikoagulantni učinak mjeri se praćenjem protrombinskog vremena (PV) čije produljenje ovisi o redukciji jednog od tri o vitamnu K ovisna čimbenika koagulacije: faktora II,VII i IX. Reagens koji se pri tome koristi je tromboplastin. Zbog različite osjetljivosti tromboplastina koji se koristi u različitim laboratorijima, svi tromboplastini trebaju biti označeni internacionalnim indeksom osjetljivosti u odnosu na referentni pripravak WHO čija je vrijednost 1. To se dogovorno izražava postignutim međunarodnim normaliziranim omjerom za protrombin upotrebom kratice INR (engl. *International Normalized Ratio*), sa optimumom održavanja terapijskog INR između 2 i 3 (INR< 2 povećava rizik tromboemboličkih incidenata, a INR > 4 povećava rizik od krvarenja) (78). Primjenjuje se peroralnim putem najčešće inicijalno fiksnom dozom od 5 ili 6 mg ili tzv. „*loading*“ dozom koja je oko 1,5 puta veća od procijenjene dnevne doze. „Loading“ doza se procjenjuje prema kliničkim parametrima, a primjenjuje u trajanju 2 dana radi bržeg postizanja antikoagulantnog učinka. Kasnije se doza modificira ovisno o vrijednostima

postignutog INR. U početku uvođenja terapije potrebne su česte kontrole INR radi postizanja i održavanja optimalnog antikoagulanog učinka i adekvatne terapijske doze, imajući u vidu i kliničke karakteristike bolesnika te moguće interakcije sa drugim lijekovima. Kada se postigne optimalni antikoagulacijski učinak, kontrola INR se vrši najmanje jednom mjesečno (78).

Varfarin je danas najkorišteniji oralni antikoagulans u prevenciji i liječenju tromboembolijskih bolesti. Učinkovit je u primarnoj i sekundarnoj prevenciji duboke venske tromboze i plućne embolije, postoperativnih TE komplikacija nakon većih ortopedskih ili ginekoloških operacija, sistemskog embolizma u rizičnih kardiovaskularnih bolesnika sa FA, bolestima mitralnog zalistka i stanjima po implantaciji mehaničkih srčanih zalistaka, u prevenciji akutnog infarkta miokarda ili embolijskog i kardioembolijskog moždanog udara, te recidiva infarkta miokarda ili kardioembolijskog moždanog udara (57,70).

Kontraindikacije za njegovu primjenu su brojne, mada često više relativne nego apsolutne te je potrebna individualna procjena rizika za svakog pojedinca. Krvarenje je apsolutna kontraindikacija za primjenu varfarina, ali je npr. u bolesnika sa pretrpljenim ICH uz postojeće implantirane mitralne valvule ili kroničnu FA i CHADS2 zbrojem iznad 2, kontraindikacija relativna te je potrebno procijeniti rizik od progresije krvarenja, konsekutivnog TE i adekvatnog vremena za ponovno uvođenje varfarina, kako to navodi Wijdicks u svojim razmatranjima (82). Dodatne kontraindikacije su maligna i slabo regulirana hipertenzija, teška oštećenja jetre i bubrega, heparinom inducirana trombocitopenija, aktivna ulkusna bolest sa anamnezom o krvarenju, perikarditis, bakterijski endokarditis, aktivna tuberkuloza, teška demencija i alkoholizam sa sklonošću padovima te trudnoća zbog visokog rizika od teratogenog učinka varfarina (79).

1.2.2. Farmakokinetika varfarina

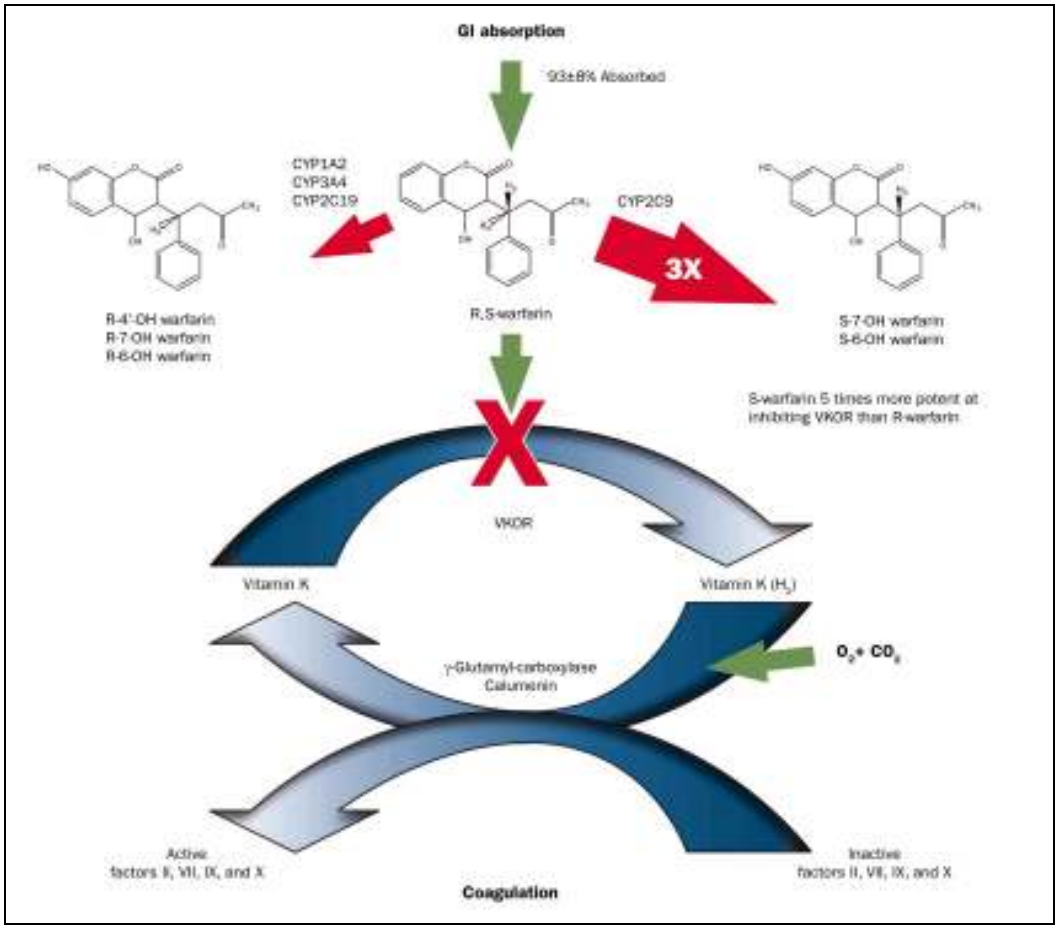
Farmakokinetika je grana farmakoloških znanosti koja pruža uvid o kretanju lijekova unutar biološkog sustava, a ovisi o apsorpciji, vezanju, biotransformaciji, distribuciji i klirensu lijeka.

Varfarin je racemična smjesa dva optički aktivna izomera, S i R-enantiomera od čega je udio potentnijeg, S-enantiomera u oko 70%, a R- enantiomera u 30% antikoagulantnog učinka. Farmakokinetički podaci govore o njegovoj brzoj apsorpciji iz želuca i proksimalnog dijela gastrointestinalnog trakta, a uzimanje hrane općenito ne utječe na njegovu apsorpciju. Oko 99% lijeka cirkulira vezano za plazmatske proteine (albumin), nakuplja se i metabolizira u mikrosomima jetre putem enzima citokroma P450 (CYP). Inaktivni metaboliti se izlučuju putem žuči, potom ponovo apsorbiraju i izlučuju urinom. Aktivniji S-varfarin se metabolizira brže putem enzima CYP2C9, uz značajne interindividualne razlike zbog genskih varijacija enzima (polimorfizam CYP) te utjecaja vanjskih čimbenika. R-enantiomer se metabolizira pomoću CYP1A2 i CYP3A4 i izlučuje urinom. Maksimalnu koncentraciju u plazmi postiže za otprilike 90 do 360 minuta nakon oralne primjene sa poluvremenom života od 36-42 sata. Početak djelovanja ovisi o t 1/2 čimbenika zgrušavanja: najkraće t l/2 od 4-6 sati ima FVII, za F II iznosi tri dana, za F IX 18-30 sati, a za F X dva dana. Stoga je za početak potpunog antikoagulantnog učinka varfarina potrebno 48-72 sata, sa maksimalnim farmakološkim učinkom nakon 48-60 sati, te trajanjem učinka od 3 do 5 dana, a po nekim podacima 5-7 dana (80).

1.2.3. Farmakodinamika varfarina

Farmakodinamika je grana farmakološke znanosti koja pruža spoznaje o fiziološkom odgovoru organizma ovisne o ciljnom mjestu djelovanja lijeka.
Antikoagulantni učinak varfarin postiže posredno kao antagonist vitamina K koji je esencijalan za sintezu koagulacijskih faktora II,VI,IX i X u jetri. Karboksilacija faktora zgrušavanja ovisnih o vitaminu K, katalizirana je jetrenim enzimom karboksilazom, a pod utjecajem reduciranog oblika vitamina K (vitamin KH2), kisika i ugljičnog dioksida. Vitamin KH2 se u toj reakciji oksidira u vitamin K epoksid koji se reciklira u vitamin K pomoću vitamin K epoksid reduktaze, zatim se ponovo reducira u vitamin KH2 pomoću vitamin K reduktaze (80). Inhibicijom vitamin K epoksid reduktaze i vjerojatno vitamin K reduktaze sprječava se redukcija nastalog oksidiranog oblika vitamina KH2 natrag u vitamin K. Rezultanta je nagomilavanje epoksida i manjak vitamina K. Dakle,varfarin blokira regeneraciju reducirane forme vitamina K koji je

bitan koenzim u karboksilaciji glutamatskih ostataka u prokoagulantne oblike faktora II,VI,IX i X u koagulacijskoj kaskadi. To u konačnici dovodi do smanjene produkcije aktivnih čimbenika koagulacije, trombina i fibrina te ihibicije koagulacije, što je i temeljni učinak varfarina, prikazan na slici 1.2.3.1. (81).



Slika 1.2.3.1. Mehanizam djelovanja varfarina (iz Moyer TP et al. Mayo Clin Proc. 2009;84:1079-94)

1.2.4. Nuspojave terapije varfarinom

Nuspojava (engl. *adverse reaction*) je svaka neželjena štetna reakcija organizma na lijek koji je primijenjen u terapijskoj dozi za pravu indikaciju, za razliku od štetnog događaja (engl.*adverse event*) koji predstavlja medicinski događaj što se javio tijekom primjene lijeka, ali ne mora biti s njim u uzročnoj vezi. Nuspojave mogu biti posljedične

farmakološkom učinku primijenjenog lijeka (predvidive) ili pak neovisne o osnovnom farmakološkom učinku (neočekivane). Nuspojave vezane uz primjenu varfarina su brojne, po nekim studijama učestalost iznosi 10-20%, dok učestalost hospitalizacije zbog ozbiljnosti nuspojava iznosi 2,5-8,5% sa smrtnim ishodom u 0,01-0,1% slučaja. U literaturi se opisuje niz nuspojava od relativno blažih poput urtikarije, makulopapuloznog osipa, mučnine, povraćanja, mialgija, abdominalne bolnosti, retikularnog liveda, sindroma purpurnih prstiju, alopecije do ozbiljnijih i ponekad vitalno ugrožavajućih komplikacija među kojima je najozbiljnija krvarenje. Potencijalno fatalna nekroza kože, kojoj može prethoditi sindrom purpurnih prstiju, nastaje između 2-10 dana od primjene varfarina uslijed toksičnog učinka na kapilare, rezultirajući dubokim defektima kože te posljedičnim mutilirajućim zahvatima. Predisponirajući čimbenici su deficit proteina C i S, antitrombina III te prisustvo faktora V Leiden i lupus antikoagulansa. Uslijed kompromitacije cirkulacije zbog mikroembolusa može nastati niz nuspojava poput bolnih ulkusa stopala, bubrežno zatajenje, infarkt leđne moždine, oštećenja jetre, slezene, gušterače (79).

Krvarenja su najčešća i najopasnija komplikacija posljedična pretjeranom antikoagulantnom učinku, posebno u situacijama kada je INR>4. Učestalost krvarenja kreće se od 2%-48%, a uzroci leže u karakteristikama samog bolesnika, odnosno mogućoj hipersaturaciji varfarinom ili istovremenoj primjeni lijekova sa kojima stupa u interakciju. Rizik krvarenja je i do 10 puta veći u prvim tjednima uvođenja terapije u odnosu na rizik nakon godinu dana kada je već postignut stabilan antikoagulntni učinak i optimalna doza. Tako u prvih 1- 4 tjedna od uvođenja varfarina rizik krvarenja iznosi 7%-10% uključivši i 2%-5% masivnih krvarenja. Krvarenja mogu biti blaža tipa epistakse, subkutanog, gingivalnog i konjuktivalnog krvarenja, mikrohematurije, vaginalnog krvarenja do opsežnijih poput makrohematurije, hemoptize, hematoperikarda, retroperitonealnog te intracerebralnog krvarenja. Intracerebralno krvarenje (ICH) najopasnija je komplikacija primjene varfarina (82). Procjenjuje se da je oko 18-25% svih ICH posljedično terapiji varfarinom sa stopom incidencije od 2-3% godišnje. Rizik nastanka ICH najveći je unutar prvih tjedana od uvođenja terapije dok se ne postigne stabilna terapijska doza i ciljni INR. Rizik smrtnog ishoda u pacijenata sa varfarinom uzrokovanim ICH je dva puta veći u odnosu na druge uzroke ICH i iznosi 52-73% (83).

1.2.5. Interakcije varfarina sa drugim lijekovima

Interakcija predstavlja promjenu bilo u pojačanju ili smanjenju očekivnog učinka nekog lijeka zbog uzajamnog djelovanja dva ili više lijekova, odnosno terapijskih agensa. One mogu biti farmakodinamske i farmakokinetičke. Farmakokinetičke interakcije se javljaju u situacijama kada jedan lijek mijenja aktivnost drugog utječući na njegovu apsorpciju, metabolizam, distribuciju ili eliminaciju. Farmakodinamske interakcije javljaju se pri primjeni lijekova koji imaju isti ili antagonistički učinak ili kompetiraju za ista receptorska mjesta, a u slučaju varfarina takve interakcije utječu na rizik od krvarenja ili stvaranja tromba učinkom na katabolizam vitamina K (81).
Poznat je čitav niz interakcija varfarina i drugih lijekova te se spominje čak 384 lijeka sa kojima može stupiti u interakciju. Stoga je pri primjeni takvih lijekova iznimno važno pažljivo kliničko praćenje, kontrole INR i prilagođavanje doze varfarina. To je osobito važno za populaciju stariju od 65 godina koja ima povećani rizik od interakcije zbog istovremene primjene više lijekova poput kardiotonika, hipolipemika, analgoreumatika uz, u toj životnoj dobi, prisutnog fiziološkog smanjenja renalnog klirensa do 35%.
Značajna interakcija je zamijećena sa induktorima mikrosomalnih enzima jetre koji ubrzavaju metabolizam varfarina i smanjuju antikoagulantni učinak.Tako je pri primjeni antiepileptika karbamazepina, difetoina, barbiturata ili antibiotika rimfapicina potrebno povisiti dozu varfarina na početku uvođenja do stabiliziranja doze, što iziskuje 4-6 tjedana te ju smanjiti po isključenju navedenih lijekova iz terapije. Rimfapicin povećava potrebnu dozu varfarina i do dva puta. Antikoagulantni učinak smanjuje kloksacilin, neki antimikotici (griseofulvin), oralni kontraceptivi te je potrebno praćenje INR i prilagodba doze.
Lijekovi koji stupanjem u interakciju sa varfarinom usporavaju metabolizam i mogu dovesti do klinički značajnih krvarenja. U toj kategoriji je antiaritmik amiodaron (Cordarone) te istovremena primjena iziskuje oko 35- 65% nižu dozu varfarina, s tim da učinak traje čak l do 3 mjeseca nakon obustave lijeka. Klinički je značajna interakcija sa antibiotikom metronidazolom koji dovodi do inhibicije metabolizma varfarina, kao i makrolidi (azitromicin, eritromicin, klaritromicin) pojačavajući rizik od krvarenja. Za kinolone poput ciprofloksacina i norfloksacina interakcije su umjerene, a za moksifloksacin mogu biti ozbiljne i povezane sa izrazitim rizikom krvarenja. Točan

mehanizam interakcije nije poznat, a pretpostavlja se da promjene u crijevnoj flori i sintezi vitamina K utječu na metabolizam varfarina (84). Kombinacija sulfametoksozola i trimetroprima dovodi do inhibicije metabolizma varfarina, ali i do zamjene varfarina s veznih mjesta na albuminu. Nesteroidni antireumatici i analgetici (diklofenak, ibuprofen, piroksikam) oštećenjem sluznice probavnog sustava stvaraju erozije, a inhibicijom adhezije i agregacije trombocita smanjuju formiranje ugruška, povećavajući time opasnost od krvarenja. Acetilsalicilna kiselina u višim dozama ima izravni hipoprotrombinemički učinak i povećava rizik krvarenja kao i primjena klopidogrela. Sličan učinak ima i dugotrajna primjena većih doza paracetamola i tramadola koji inhibicijom metabolizma varfarina pojačavaju hipoprotrombinemički učinak. Disulfiram (antabus) koji se primjenjuje u liječenju alkoholne ovisnosti također povećava antikoagulantni učinak te je potrebno posebno u tih pacijenata češće kontrolirati INR, a poglavito ukoliko nastavljaju konzumaciju alkohola koji također pospješuje antikoagulantni učinak varfarina.

Hipolipemici, danas široko propisivani u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih i neurovaskularnih bolesti koji su inhibitori HMG-CoA reduktaze (simvastatin, lovastatin) istodobno primjenjeni s varfarinom povećavaju rizik od krvarenja. Fenofibrat stupanjem u interakciju zahtijeva i do 30% smanjenja doze varfarina zbog učinka na porast INR (84).

Do promjena u antikoagulantnom učinku mogu dovesti i dijetetski proizvodi te primjena vitamina i minerala. Često korišteni pripravci ginka mogu doprinijeti pojačanju antikoagulantnog učinka i riziku od krvarenja. Uz to namirnice koje sadrže vitamin K (jetra, zeleno lisnato povrće, brokula, cvjetača, brusnica) mogu stupiti u interakcije s varfarinom i smanjiti antikoagulantni učinak. U psihijatriji kao fitoterapijski antidepresiv sve se češće propisuje pripravak od gospine trave (Activin H) koji smanjuje antikoagulantni učinak varfarina. Jednak učinak imaju i preparati soje na što je potrebno upozoriti bolesnike i sukladno tome pratiti INR i prilagoditi dnevnu dozu varfarina (85).

1.2.6. Razlozi nedostatne primjene varfarina u indiciranih pacijenata

Unatoč jasnim preporukama vodećih europskih i američkih društava (ESO, AHA/ASA) i očitim prednostima primjene varfarina u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardioembolijskog MU te terapiji akutnog MU u slučajevima tromboze cerebralnih venskih sinusa, postoji izniman nesrazmjer između postojećih preporuka za primjenu varfarina i kliničke prakse, tako da svega 15-55% indiciranih pacijenata prima varfarin (86,87). Čak je i u visokorazvijenim zemljama poput Švedske samo 11% bolesnika sa FA hospitaliziranih zbog akutnog IMU prethodno primalo varfarin, dok je u sekundarnoj prevenciji primijenjen u samo 33,5% bolesnika (88).
U studiji provedenoj na području Sjeverozapadne Hrvatske, Budinčević i suradnici su ukazali na slične rezultate po kojima je svega 16,8 % indiciranih pacijenata primalo varfarin pri prijamu zbog CE MU, a u sekundarnoj prevenciji je bio propisan u samo 36,5% bolesnika (89).
Poznata je učinkovitost varfarina u redukciji rizika CE MU u pacijenata sa FA koja se na godišnjoj razini kreće i do 68%, a u bolesnika sa implantiranim mehaničkim mitralnim zaliscima redukcija rizika je još i veća. Primjenom varfarina se za tri puta reducira rizik od nastanka MU, a u sekundarnoj prevenciji smanjuje rizik recidiva MU za 70%, te se postiže 33% redukcija rizika smrtnog ishoda.
Razlozi nepropisivanja varfarina za navedene indikacije su raznoliki i povezani sa stavom liječnika, pacijenta te društvenim okolnostima. Najčešći razlozi neprimjene su vezani uz karakteristike samog lijeka, čijom primjenom se povećava rizik nastanka nuspojava, osobito krvarenja, potom nedostatna informiranost i liječnika i bolesnika o učinkovitosti terapije u specifičnim indikacijama, konformizam bolesnika kojima uzimanje varfarina sa češćim kontrolama INR narušava kvalitetu života, negativistički stav obitelji teže pokretnih i slabije kontaktibilnih bolesnika, otežana mogućnost kontrole INR (nepokretnost bolesnika, udaljenost laboratorija, slaba organizacija patronažne službe i nadzora u kućnim uvjetima) (86). Propisivanje nedostatne terapijske doze zbog straha od mogućeg krvarenja, posebno među starijom populacijom ili rjeđe kontrole INR sa usklađivanjem terapijske doze, potom značajne farmakokinetske i farmakodinamske varijabilnosti varfarina, interakcije sa drugim lijekovima ili hranom te prekidanje varfarina prije većih kirurških ili stomatoloških

zahvata bez adekvatne antikoagulantne zaštite primjenom tzv „eng.*bridging*“ terapije NMH, pokazalo se čestim uzrokom nastanka TE incidenata i akutnog CE MU (90-92). Intracerebralno krvarenje (ICH) najopasnija je komplikacija primjene oralne antikoagulantne terapije te se procjenjuje da je čak 18-25% svih ICH uzrokovano primjenom varfarina sa visokom stopom incidencije od 2-3 /100 pacijenata godišnje. Rizik smrtnog ishoda u pacijenata sa varfarinom uzrokovanim ICH je dva puta veći u odnosu na druge uzroke ICH, iznoseći 52-73%. Rizik nastanka ICH najveći je unutar prvih tjedana od uvođenja terapije dok se ne postigne stabilna terapijska doza i ciljni INR (83). Rizik varfarinom uzrokovanog krvarenja dodatno povećava visoka životna dob, visok INR (iznad terapijskog raspona od 3), cerebralna amiloidna angiopatija, leukoaraioza, komorbiditet, preboljeli moždani udar te primjena konkomitantnih lijekova koji utječu na porast INR (cordarone, neki antiepileptici, nesteroidni antireumatici, statini, neki antibiotici).

Prethodno antikoagulirani pacijenti sa ICH imaju preegzistirajuće povećan rizik od tromboembolizma zbog čega im je i uvedena antikoagulantna terapija te su i povećanijeg rizika pri njenom ukidanju za TE incidente. Uz to, sama prisutnost intrakranijskog krvarenja sa posljedičnim neurološkim deficitom povećava rizik za klinički evidentan arterijski i venski tromboembolizam. Rizik TE iznosi oko 7% tijekom faze inicijalne hospitalizacije i povećava na 10-15 % unutar 3 mjeseca. Istovremeno je rizik progresije intracerebralnog hematoma najveći unutar prvih 24-48 sati od inicijalnog krvarenja i smanjuje se tijekom vremena, dok rizik nastanka TE komplikacija s vremenom raste. Rezultati nekih studija u pacijenata sa umjetnim srčanim valvulama ili nevalvularnom fibrilacijom atrija su ukazali na relativno mali rizik od tromboembolijskih incidenata unutar dva tjedna od ukidanja varfarina koji se značajno povećava sa vremenom. Tako za neliječene pacijente sa mehaničkim mitralnim ili aortalnim valvulama rizik razvoja TE moždanog udara iznosi 22% unutar godinu dana, dok je za neliječene pacijenata sa FA rizik od TE moždanog udara 4,5-7% godišnje. Stoga se odluka o ponovnom uvođenju antikoagulantne terapije nakon varfarinom uzrokovanog ICH treba temeljiti na: procjeni rizika nastanka konsekutivnog arterijskog ili venskog tromboembolizma, riziku recidiva ICH, lokalizaciji ICH (duboki hemisferalni ili lobarne lokalizacije), sveukupnom kliničkom stanju bolesnika, komorbiditetu, riziku od padova i povređivanja (93,94).

Mada postoje nove preporuke AHA/ASA i ESO iz 2010 god. još uvijek je nedostatan

konsensus temeljen na većim randomiziranim kliničkim studijama o vremenu ponovnog uvođenja varfarina u indiciranih bolesnika koji su pretrpili varfarinom uzrokovano intracerebralno krvarenje, što povećava rizik nastanka naknadnih TE komplikacija i CE MU ukoliko se takvim bolesnicima ne uvede antikoagulantna terapija (95,96).
Niz je kontroverzi vezanih uz primjenu varfarina oko barem tri segmenta u bolesnika u akutnoj fazi moždanog udara: oko indikacije za primjenu, vremenu uvođenja varfarina i potrebnoj inicijalnoj dozi. Uzroci nedoumica leže ne samo u svojstvima samog lijeka već i u vulnerabilnosti bolesnika uzrokovanoj prirodom bolesti sa oštećenjem moždanog parenhima i povećanim rizikom hemoragiziranja infarktne zone (97).
Stoga su nastojanja za čim sigurnijim uvođenjem i održavanjem antikoagulantnog učinka varfarina u cilju optimizacije i individualizaciji terapije sa smanjenjem rizika krvarenja ili drugih komplikacija u primarnoj i sekundarnoj prevenciji te liječenju tromboembolijskih incidenata, poglavito moždanog udara, imperativ kojem je usmjeren niz suvremenih studija i istraživanja.

1.3. Farmakogenetika

Farmakogenetika je grana farmakoloških znanosti koja proučava vezu između genetičke predispozicije pojedinca i njegove sposobnosti da metabolizira farmakološki aktivne tvari. Osnovni zadatak joj je identificirati utjecaj gena na individualne varijacije u odgovoru na neki lijek ili drugu egzogenu supstanciju.
Genotipizacija predstavlja dijagnostički postupak ispitivanja i identifikacije genskog polimorfizma, odnosno ispitivanje DNA zapisa gena koji kodira proteine/enzime uključene u metabolizam lijeka. Naime, ako se mutirana varijanta gena pojavljuje u populaciji učestalošću većom od 1%, govori se o genskom polimorfizmu. Te mutacije uključuju genske promjene koje rezultiraju određenim fenotipom. Fenotip utječe na farmakokinetske parametre (apsorpciju, metabolizam, vezivanje, eliminaciju) te na farmakodinamiku najčešće određenu receptorskim mjestom, a time i na terapijsku učinkovitost lijeka. Genski polimorfizam određuje nekoliko kategorija fenotipova obzirom na farmakoterapijski odgovor, odnosno na intezitet metabolizma lijeka:

a) fenotip dobro izraženog metabolizma (engl.*extensive metabolizer* EM). To je očekivana osobina najvećeg dijela populacije sa oba potpuno funkcionalna alela (divlji genotip, engl *wilde typ*e wt/wt)
b) fenotip slabog/sporog metabolizma (engl.*poor metabolizer* PM) autosomno je recesivno svojstvo nastalo mutacijom i/ili delecijom oba alela sa fenotipskom ekspresijom u vidu nagomilavanja lijekova-supstrata zbog smanjene ili dokinute aktivnosti enzima (genotip mut/mut)
c) fenotip izrazito pojačanog metabolizma (engl.*ultraextensive metabolizer* UEM) autosomno je dominantno svojstvo posljedično amplifikaciji gena sa osobinom ubrzane razgradnje lijeka-supstrata
d) fenotip srednjeg metabolizma (engl.*intermediate metabolizer* IM) nalazi se u heterozigota sa jednim mutiranim i drugim funkcionalnim alelom, prenosi se autosomno recesivno, a metabolizam lijeka može biti normalan ili smanjen (genotip wt/mut)

Rezultati farmakogenetičke analize sa genotipizacijom polimorfnih alela i egzaktnim određivanjem fenotipa omogućuju odabir optimalne doze lijeka čime se mogu prevenirati neželjene komplikacije uzrokovane preniskom ili previsokom dozom lijeka. Na taj se način postiže optimizacija i individualizacija adekvatne terapije uz postizanje željenog terapijskog učinka sa čim manjim rizikom razvoja nuspojava (97).

1.3.1. Farmakogenetika varfarina

U mehanizam antikoagulantnog učinka i veliku interindividualnu osjetljivost na varfarin uključen je niz čimbenika: dob, spol, etnička pripadnost, komorbititet, konkomitantni lijekovi te genetički čimbenici uz poznato uključenje najmanje 30 gena. U farmakokinetici varfarina najizraženiji je učinak gena CYP2C9 koji je odgovoran za njegov metabolizam, kodirajući enzim za katalizaciju konverzije varfarina u inaktivni metabolit. Gen CYP2C9 utječe na individualnu osjetljivost za lijek.

Za farmakodinamiku varfarina najvažniji je gen vitamin K epoksid reduktaza kompleks podjedinica 1 (VKORC1) koji kodira ciljni enzim za varfarin i bitno određuje učinak i potrebnu dozu varfarina. Suvremena istraživanja govore i u prilog mogućeg utjecaja transportnih sustava kodiranih ABC genima (eng.*ATP binding cassete).* To bi se u

prvom redu odnosilo na njegov transport u jetri posredovanjem P-glikoproteina (kodiran MDR1/ABCB1 genom, eng.MDRl „*multidrug resistence 1"),* ali su rezultati dosadašnjih studija još nedostatni za zaključke (98,99).

1.3.1.1. Enzimi P 450 (CYP)

Sustav citokroma P450 predstavlja najvažniji enzimski oksidativni sustav uključen u biotransformaciju prve faze metabolizma niza lijekova. To je skupina hem proteina koji u reduciranom obliku imaju visok afinitet prema ugljičnom monoksidu stvarajući reducirani kompleks citokrom P450-CO koji po spektralnim karakteristikama dostiže apsorpcijski maksmium kod 450 nm, po čemu je i dobio ime. Po definiciji International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) „Citokromi P450 su skupina hem proteina čijom biosintezom upravlja superporodica gena. Ti proteini čine skupinu enzima koji kataliziraju reakcije monooksigenacije velikog broja enzima i endogenih tvari"(101). Najvećim dijelom su lokalizirani u membranama endoplazmatskog retikuluma jetre, ali se nađu i u drugim tkivima (crijeva, bubrezi, placenta, pluća, mozak). Fiziološko značenje enzimskog sustava citokroma P450 je u katalitičkom učinku kod reakcija biosinteze, razgradnje i biotransformacije niza endogenih tvari te ksenobiotika i lijekova. Ti enzimi imaju važnu ulogu u regulaciji učinka i trajanju aktivnosti lijeka, u detoksikaciji egzogenih supstanci te u njihovoj aktivaciji u potencijalno toksične i kancerogene metabolite inhibicijom CYP ili pak njegovom indukcijom jedan lijek može poremetiti biotransformaciju drugog te tako doprinijeti njegovom jačem/slabijem farmakoterapijskom ili toksičnom učinku, oponašajući time njegovu genetički uvjetovanu slabu ekspresiju ili gensku amplifikaciju.
Poznato je preko 50 enzima CYP, od čega manji dio metabolizira gotovo 90% lijekova (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5). Iznimno je izražen polimorfizam u toj superporodici enzima koji uz individualnu, iskazuje i različitu interetničku zastupljenost pojedinih alelnih varijanti. Već je navedeno da je genski polimorfizam povezan sa četiri glavne fenotipske varijante koje rezultiraju različitim metabolizmom, a time i koncentracijom lijeka te potrebnom dozom za održavanje željenog terapijskog učinka (102).

1.3.1.1.1. Sustav enzima CYP2C9

Jedan od najvažnijih izomera CYP2C podporodice je CYP2C9, a gen koji kodira protein CYP2C9 u ljudi je smješten na kromosomu 10q24.2. Značajan je polimorfizam u obitelji CYP2C9 budući se preko njega metabolizira gotovo 20% lijekova što je iznimno važno za njihov farmakoterapijski učinak i potencijalnu toksičnost. On metabolizira klinički važne lijekove, a neki od supstrata /inhibitora tih enzima su: angiotenzin II receptor blokatori, antidijabetici, antikonvulzivi, antimikrobni lijekovi, nesteroidni antireumatici, psihofarmaci, antikoagulansi (varfarin), inhibitori protonske pumpe, inhibitori povratnog unosa serotonina. Jednonukleotidni polimorfizmi (SNP engl.*single nucleotid polymorfismus*) su DNA varijante u kojih se jedna nukleotidna sekvenca razlikuje od drugih u istom genomu što dovodi do formiranja različitih alelnih varijanti gena. Otkriveno je više od 30 alelnih varijanti za CYP2C9 među kojima je najučestaliji alel Arg144/Ile359 (CYP2C9*1) koji se smatra divljim tipom (engl. *wild type-wt*). Zamjenom citozina u tiamin (C>T) na nukleotidu 430 nastaje Cys144/Il359 (CYP2C9*2) alelna varijanta, a zamjenom adenina u citozin (A>C) na nukleotidu 1075 nastaje Arg144/Leu359 (CYP2C9*3) alelna varijanta.Ti aleli stvaraju šest različitih genotipova: *1/*1 (wt/wt),*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3. Najveća frekvencija je divljeg tipa CYP2C9 wt alela, a homozigoti za divlji tip imaju normalni metabolički fenotip (NM). Aleli *2 i *3 povezani su sa značajnim smanjenjem metabolizma različitih supstrata CYP2C9 u odnosu na divlji tip i smatraju se važnim rizičnim čimbenicima odgovornim za produženi antikoagulantni učinak varfarina.
Populacijske studije genotipizacije ukazale su na različitu etničku zastupljenost pojedinih alelnih varijanti. Divlji tip je najzastupljeniji u gotovo 85- 95% stanovništva Azije (Japan, Koreja, Kina) te među Afro-amerikancima. Alelna varijanta CYP2C9*2 zastupljena među 10-12% bijelaca, ali je rijetka među Afro-amerikancima (<1%). Alel *3 je rjeđi i nađen je u oko 6-10% bjelačke populacije i gotovo je nepoznat među Afro-amerikancima (1-3%). Lee sa suradnicima je 2002 god. utvrdio da se te dvije alelne varijante odgovorne za fenotip slabih metabolizatora (PM) CYP2C9*2 i *3 mogu naći u gotovo 35% bijelaca (studije za Hrvatsku govore i do 42% zastupljenosti), dok je učestalost homozigota relativno mala u bjelačkoj populaciji (1-2%) (103).
Nađena je različita učestalost alelnih varijanti i unutar raznih etničkih podgrupa bjelačke populacije. Studije u Italiji su ukazale na učestalost alela *1 u oko 80% populacije, alela

*2 u 11% i alela *3 u 3,9%, dok je učestalost mutiranih alela bila veća u populaciji Španjolske sa udjelom od 14,2% za alel *2 i 16,2% za alel *3 (104).

1.3.1.1.1.1. Uloga enzimskog sustava CYPC2C9 u metabolizmu varfarina

Varfarin je racemična smjesa dva enantiomera, od kojih se aktivniji S enantiomer, koji je najvažniji za metabolizam većine lijekova u ljudi, metabolizira primarno procesima oksidacije u jetri preko enzimskog sustava CYP2C9, a R enantiomer preko enzimskog sustava CYP3A4,1A2 i 1A. Kako je već spomenuto, vrlo je izražen polimorfizam gena CYP2C9, što dovodi do kodiranja proteina sa promjenama u aminokiselinskom slijedu te promjene/smanjenja njihove katalitičke aktivnosti. Velike interindividualne te interetničke varijabilnosti u aktivnosti CYP2C9 rezultiraju i različitim odgovorom na indiciranu terapiju sa povećanim rizikom nuspojava i štetnih događaja. To je osobito dobro istraženo za najčešće alelne varijante divljeg tipa CYP2C9*1, varijantu *2 (Cys144/Il359) i varijantu *3(Arg144/Leu359) s utjecajem na lijekove-supstrate s uskim terapijskim rasponom poput fenitoina, tolbutamida te S-varfarina. Navedeni polimorfizmi koji se mogu pojaviti u homozigotnom ili heterozigotnom obliku, rezultiraju različitim učinkom na metabolizam varfarina u uporedbi sa ekstenzivnim metabolizatorima sa divljim („wt“) tipom alela.
Studije su ukazale da nosioci divljeg tipa alela metaboliziraju varfarin normalno dok je u funkcionalno defektnog homozigota CYP9C9*2 reduciran metabolizam varfarina za 30%-50%, a u varijanti CYP2C9*3 redukcija metabolizma iznosi 80-90% (105). To znači da će se u nosioca alelnih varijanti koji slabije metaboliziraju varfarin on duže zadržavati u cirkulaciji te će biti potrebne i manje doze za postizanje terapijskog učinka. Tako nosioci alelne varijante *2 iziskuju smanjenje dnevne doze varfarina od 17- 19%. Nosioci bar jedne alelne varijante *3 (heterozigoti *wt/*3) iziskuju redukciju dnevne doze oko 33-37% da bi se izbjegao previsok antikoagulantni učinak i iznadterapijske vrijednosti INR. Klinički učinak fenotipa slabih metabolizatora (osobito alela *3 i kombinacije *2*3) rezultira produženjem INR i dužim vremenom do postizanja stabilne terapijske doze, značajno manjom dozom održavanja te povećanim rizikom od krvarenja, što je najizraženije pri uvođenju terapije.

Neka su istraživnja ukazala da alelne varijante CYP2C9 *5, *6, *8 i *11 također mogu doprinijeti usporenju metabolizma varfarina S (101-102).
Studija Lindha je ukazala da je među nosiocima alelnih varijanti već u prvom tjednu terapije INR bio iznad terapijskog raspona sa vrijednostima >3. Tako su nosioci alela *3 imali 6 puta veću vjerojatnost, a nosioci *2 alela tri puta veću vjerojatnost postizanja INR iznad terapijskog raspona (INR >3) u odnosu na divlji tip već u prvom tjednu uvođenja varfarina dok je sveukupna incidencija INR > 3 u *3 varijanti bila 2,2 puta, a u *2 alela 1,8 puta veća u odnosu na divlji tip tijekom praćenja od tri tjedna od uvođenja varfarina. Nakon trećeg tjedna nosioci *2 i *3 alelnih varijanti imali su istu incidenciju INR >3 kao i nosioci divljeg tipa (105).
Caraco je u randomiziranoj studiji inkorporirajući farmakogenetičke podatke za CYP2C9 ukazao da je brže postizan prvi terapijski ciljni INR i ranije postizana prva stabilna doza varfarina u skupini sa farmakogenetički vođenom inicijacijom terapije, posebno u skupini nosioca divljih alela u odnosu na samo kliničku predikciju doze (106). Isto tako prisutnost alelnih varijanti, bilo u homozigotnom ili heterozigotnom obliku (CYP2C9 *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) u nekih pacijenata može utjecati na produljenje postizanja optimalnog INR u okviru preporučenih doza za pojedine genske varijante. Na postizanje ciljnog INR za adekvatnu antikoagulanciju dodatni učinak mogu imati dob, spol, težina, etnička pripadnost te jetrena i bubrežna funkcija, zajedno sa mogućim učinkom hrane i konkomitantnih lijekova.
Navedene studije sugeriraju da je praćenje farmakogenetičkog učinka CYP2C9 najvažnije u početnoj fazi uvođenja terapije dok se kasnije taj učinak gubi zbog praćenja INR, kliničkih parametara i konsekutivne prilagodbe doze lijeka (107,108).

1.3.1.2. Vitamin K ovisna epoksid reduktaza podjedinica 1 (VKORC1)

Ciljno mjesto djelovanja oralnih antikoagulansa je enzim vitamin K ovisna epoksid reduktaza podjedinica 1. To je multiproteinski kompleks koji reciklira vitamin K2,3-epoksid u reduciranu formu vitamin K hidrokinon, esencijalni kofaktor za posttranslacijsku gama karboksilaciju aktivnih čimbenika koagulacije (faktora II,VII, IX i X). Varfarin svoj antikoagulantni učinak postiže inhibicijom vitamin K epoksid reduktaze podjedinice 1 koja reciklira reducirani vitamin K (inaktivni) u aktivni

oksidirani oblik vitamina K i na taj način sprečava ponovnu regeneraciju vitamina K, što dovodi do inhibicije koagulacije. Enzim je poznat od l974 god., a tek je 2004 god. otkriven homonimni gen VKORC1 koji ga kodira, lociran na kromosomu 16p11.2 i dugačak je oko 4 kb. Gen je identificiran među pojedincima u obitelji koji su bili otporni na varfarin i iziskivali su izrazito visoke dnevne doze (17 do 40mg dnevno) za postizanje antikoagulantnog učinka varfarina, a neki nisu niti reagirali na terapiju. Reducirani vitamin K je esencijalni kofaktor za y-glutamilkarboksilazu (GGCX) te je poznato da pacijenti sa kongenitalnom deficijencijom GGCX i VKORC1 imaju bolesti hemostaze, stanja poznata kao kombinirani nedostatak o vitaminu K ovisnih čimbenika zgrušavanja tip 1 i 2. Kongenitalna „missense“ mutacija VKORC1 sa mutacijom Arg98Trp odgovorna je za tip II navedenog deficita koji je fenotipski podložan krvarenju. Druge „missense“ mutacije poput Val45AIa, Arg58Gly i Leu128Arg pronađene su u pacijenata sa rezistencijom na varfarin. Te „missence“ mutacije mogu utjecati na enzimsku funkciju VKORC1 dovodeći do globalnog pada svih o vitaminu K ovisnih koagulacijskih čimbenika (109).

Rieder sa suradnicima je identificirao 10 nekodirajućih jednonukleotidnih polimorfizama sa pet glavnih SNP. No, svega je nekoliko SNP češće zastupljeno u polimorfizmu VKORC1 u populaciji i odgovorno za senzitivnost na varfarin i potrebitu dozu. 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 varfarina. Oni se genotipiziraju za identifikaciju haplotipova VKORC1 (110). Studije su ukazale da je alel -1639G koji je prisutan u haplotipovim VKORC1*1, *3 i *4 udružen sa uobičajenom “normalnom“ dozom varafina, 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 disequlibrium*) sa alelima 1173C>T, 6484C>T, 6853G>C, 7566C>T, prisutna je u haplotipu VKORC1*2 i doprinosi povećanju osjetljivost za varfarin. Nosioci tih haplotipova iziskuju znatno niže doze varfarina u postizanju terapijskog učinka (111).

1.3.1.2.1. Polimorfizam VKORCl i utjecaj na terapiju varfarinom

Genski polimorfizam vitamin K epoksid reduktaze podjedinice 1 (VKORC1) koja je ciljno mjesto djelovanja varfarina bitno utječe na njegovu farmakodinamiku, određujući varijabilnost od 30-60% potrebne doze za pojedinu osobu. Od deset detektiranih jednonukleotidnih polimorfizama (SNP) VKORC1 definiran je set od četiri SNPs, od kojih su najčešći -1639G>A i 1173C>T u kojoj je citozin zamijenio mjesto tiaminom. Alelna varijanta A(ili T) utječe na osjetljivost za varfarin te je procijenjeno da je za svaki mutirani VKORC1 alel A (ili T) potrebna 20- 28% redukcija doze.
Tako nositelji „divljeg“ homozigotnog GG ili CC alela (haplotip BB) iziskuju veću dnevnu dozu varfarina. Heterozigotni genotip C/T (haplotip A/B) iziskuje srednju, a najnižu dozu trebaju nosioci homozigotnog genotipa za alelne varijante TT (haplotip AA) što osobe sa tim haplotipom čini podložnijim krvarenju. Nosioci BB haplotipa su pak izloženi riziku subdoziranja i riziku opetovanja tromboembolijskih incidenata. Tijekom inicijalne faze antikoagulacije genetske varijante VKORC1 pokazale su se kao glavna determinanta osjetljivosti za varfarin, što je osobito važno za rizične pacijente. Nađene su i međuetničke razlike u učestalosti alela VKORC1. U bijelaca je procijenjena učestalost haplotipa VKORC1*2 (sa prisutnom bar jednom alelnom varijantom-1639A ili -1173 T) oko 42%, učestalost VKORC1*3 oko 38%, a učestalost VKORC1 *4 se procjenjuje oko 20%.
U Azijata je učestalost homozigotnog varijantnog genotipa VKORC1-1639AA čak 85-90%, za razliku od bjelačke populacije među kojom je učestalost svega 14%. Kao što je navedeno, učestalost haplotipa VKORC1*2 je u bjelačkoj populaciji 42%, a u crnačkoj niska i iznosi 15%. Najviša frekvencija VKORC l A alela (*2) sa 95% zastupljenosti je među Azijatima te oni iziskuju značajno niže doze varfarina za stabilnu antikoagulanciju, za razliku od populacije Afro-amerikanaca kojima su potrebne više dnevne doze varfarina. Jednako su tako opisane „missence“ mutacije, koje mogu dovesti do rezistencije na varfarin, iznimno rijetke osim među populacijom Etiopije i među Židovima (112-114).

1.3.1.3. Studije zajedničkog utjecaja polimorfizma genotipa CYP2C9 i VKORC1 na interindividualnu varijabilnost pri terapiji varfarinom

Obzirom na osobitosti varfarina koji ima uski terapijski raspon, veliku interindividualnu osjetljivost na lijek i razlike u dnevnoj dozi uz rizik nastanka krvarenja, zadnjih godina proveden je čitav niz studija koje su istraživale učinak polimorfizama genskih varijanti CYP2C9 i VKORC1 na antikoagulantni učinak varfarina. Poznato je da one imaju upliv na poluvrijeme života i vrijeme za postizanje stabilne doze varfarina te je istraživan njihov zajednički utjecaj pri uvođenju terapije na vrijeme potrebno za postizanje prvog ciljnog INR, vrijeme provedeno u okviru terapijskog raspona INR, vrijeme potrebno da se postigne stabilna doza održavanja, potrebnu dozu ovisnu o genotipu, rizik krvarenja ovisno o genotipu, učinak interakcije s drugim lijekovima. Tako su u svom istraživanju Sconce i sur. 2005 godine dali regresijski algoritam za predikciju potrebne doze varfarina koji je u sebi uključivao dob, spol, težinu, visinu te alelne varijante CYP2C9 i VKORC1. Ustanovili su da pacijentov spol ne pridonosi značajno klirensu, a da dob, visina i genetički polimorfizam utječući na klirens varfarina utječu i na potrebnu dozu. Zaključili su da se inkorporacijom tih parametara može predvidjeti 55% varijabilnosti dnevne doze varfarina (115).

Anderson je u svojoj studiji 2007 god. primjenom posebnih algoritama za predikciju doze varfarina ukazao da je najveća korist primjene farmakogenetičkog algoritma u procjeni početne doze zabilježena kod 46% populacije koja je zahtijevala manje od 21 mg varfarina tjedno ili 49 mg i više na tjedan za stabilan terapijski učinak, a bila je manje učinkovita za one koji su iziskivali prosječne dnevne doze. Studija je također ukazala da primjena kliničkih parametra uz genetičke značajno doprinosi učinkovitosti i sigurnosti primjene varfarina pri uvođenju terapije. Ranije je postizan ciljni INR, mada se nije uspjela postići značajna redukcija u postotku INR izvan terapijskog raspona. U „divljih“ tipova i nosioca multiplih alelnih varijanti postotak INR izvan terapijskog raspona je bio bolje kontroliran u farmakogenetički vođenoj grupi. Kod te je skupine uočena redukcija od 10% vremena provedenog u izvanterapijskom rasponu INR u odnosu na standardnu primjenu varfarina. (116).

Schwartz je u svojoj retrospektivnoj studiji zaključio da su bolesnici sa jednim ili dva haplotipa A alela VKORC1 imali kraće vrijeme do postizanja ciljnog terapijskog INR, ali i da im je trebalo manje vremena da postignu supraterapijski INR>4 za razliku od

haplotipa B („divljeg“). Istovremeno u njegovoj studiji CYP2C9 genotip nije imao učinak na vrijeme postizanja terapijskog INR, ali je imao učinak na ranije postizanje supraterapijskog INR>4 tako da su nosioci alelnih varijanti CYP2C9 *2 i *3 trebali kraće vrijeme za postiznje INR>4 u odnosu na divlji *1 alel (108).

Zhu je u svojoj studiji istraživao učinak genetičkog polimorfizma na potrebnu dozu varfarina među bolesnicima sa fibrilacijom atrija. Zaključak istraživanja je bio da su nosioci alelnih varijanti CYP2C9 *2 i *3 koji utječe na redukciju metabolizma iziskivali manje doze varfarina i ranije postizali supraterapijski INR >4, slično kao i AA genotip koji ima slabiju ekspresiju VKORC1 u odnosu na divlji tip (117).

Već spomenuta studija Lindha je pokazala da su nosioci alela CYP2C9 *3 imali 6 puta veću vjerojatnost, a nosioci *2 alela tri puta veću vjerojatnost postizanja INR iznad terapijskog raspona (INR >3) u odnosu na divlji tip već u prvom tjednu uvođenja varfarina, navodeći važnost farmakogenetičke predikcije doze u samom početku terapije. Rezultati studije Carracoa, koja je uz polimorfizam CYP2C9 uključivala i genske varijante VKORC1 su ukazali na slične nalaze (105,106). Rizik krvarenja značajno je povezan sa varijanatama CYP2C9*2 i *3 kao i sa alelnim varijantama VKORC1 -1173C>T u odnosu na nosioce „divljeg“ genotipa, što su pokazale studije Sandersona i Montesa (118-120).

Studija Epsteina iz 2010 god. ukazala je na doprinos primjene farmakogenetičkih podataka kod uvođenja varfarina u vidu smanjenja dana bolničkog liječenja (121).

Li je ustvrdio da je rani INR odgovor (4-6 dana od uvođenja) bio najviše povezan sa svim ishodima varfarinske terapije (vrijeme do INR >4 i vrijeme do stabilne doze), više i od genetičkih čimbenika nakon prvog tjedna od primjene varfarina. A upravo su genetički polimorfizmi CYP2C9 i VKORC1 odgovorni za postizanje ranog INR te je i njihova utjecaj najizraženiji u prvom tjednu uvođenja terapije, dok se kasnije taj učinak gubi praćenjem INR i prilagodbom doze (122).

Studija genomske udruženosti koju su proveli Cooper i suradnici te rezultati studije koje iznosi Takeuschi su ustvrdili da je najznačajniji neovisan učinak na dozu održavanja varfarina povezan sa polimorfizmom VKORC1, veći gotovo 2-3 puta u odnosu na polimorfizam CYP2C9 (123,124). Revijalni pregled dosadašnjih studija uz osvrt na rezultate vlastitih istraživanja među bolesnicima u Mayo klinici opisao je Moyer sa sur. 2009 godine. Oni su potvrdili da su najčešće alelne varijante udružene sa osjetljivošću na varfarin CYP2C9*1*1 VKORC1 CC (manja osjetljivost na varfarin od uobičajene);

CYP2C9*1*1 VKORC1 TT (značajna varijabilnost u INR tijekom započinjanja terapije); CYP2C9*1*2 VKORC1 CT (više osjetljivi od prosjeka); CYP2C9*1*3 VKORC1 TT (značajno osjetljiviji) te CYP2C9*2*2 VKORCl CT (značajno osjetljiviji). Bijelci imaju značajne varijacije u alelima CYP2C9, dok populacija Afrike i Azije rijetko nosi te polimorfizme. Među populacijom Azije dominira VKORC1 TT alelna varijanta koja ukazuje na veliku varfarinsku osjetljivost i iziskuje niže doze, a rjeđa je među bijelcima i populacijom Afrike među kojima dominira alelna varijanta VKORC1 CC povezana sa manjom osjetljivošću i većom dnevnom dozom (125) (125). Studije drugih enzima poput CYP4F2 oksidaze vitamina K(1) i njegovih alelnih varijanti CYP4F2 V33M (rs2108622) ukazale su da taj polimorfizam također ima ulogu u farmakokinetici varfarina te su njegovi nosioci iziskivali veće dnevne doze u postizanju antikoagulantnog učinka (126-128).

Zadnjih godina niz je istraživanja koja ukazuju na utjecaj drugih gena na varijabilnost odgovora na terapiju varfarinom i potrebnu dozu među bolesnicima. Nađeni su dokazi koji ukazuju na utjecaj GGCX (vitamin K-ovisni gamakarboksilacijski gen) i čimbenika koagulacije (protein C i S, faktor II i faktor VII) na interindividualnu osjetljivost na varfarin (129-131). Niz studija je istraživao utjecaj gena uključenih u transport vitamina K, uključivši apolipoprotein E i P glikoprotein te druge gene uključene u metabolizam vitamin K-epokisida (132-134). Svega nekoliko studija, od kojih su neke u tijeku, ispituje kliničku vrijednost i financijsku opravdanost primjene farmakogenetičkog algoritma pri uvođenju terapije u pacijenta sa moždanim udarom (135- 138).

1.3.1.4. Algoritmi primjene varfarina zasnovani na farmakogenetici

Spoznaje o utjecaju genskog polimorfizma na vrijeme postizanja antikoagulantnog učinka i dozu varfarina rezultirale su nizom algoritama zasnovanih na farmakogenetičkim podacima. Prvi je put 2007 god. američka uprava za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration - FDA*) dala preporuke o primjeni genetičkih podataka prije doziranja nekog lijeka što se odnosilo na primjenu varfarina otvarajući nove puteve u individualizaciji terapije za svakog pacijenta. Prema tim uputama niže početne doze varfarina „treba razmotriti kod bolesnika s određenim genskim varijacijama“. Za uspostavu algoritma doziranja preporučila je genotipiziranje CYP2C9

i VKORC1 (132). Pojednostavljena shema preporuka primjene doze varfarina ovisna o genotipu prikazana je na slici 1.3.1.4.

Medscape® www.medscape.com

	CYP2C9 Genotype					
	Rapid Metabolism,	Intermediate Metabolism,	Poor Metabolism			
VKORC Haplotype	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
High dose (BB)	6.7	5.4	4.5	4.4	3.6	3.0
Medium dose (AB)	4.8	3.9	3.2	3.2	2.6	2.2
Low dose (AA)	3.5	2.8	2.3	2.3	1.9	1.6

Data are daily doses (mg).
INR = international normalized ratio; BB = wild-type; AB = heterozygote for variant allele; and AA = homozygote for variant allele.
Doses are derived from a warfarin dosing algorithm with the following parameters: age = 65 years, body surface area = 1.96 m^2 (weight = 180 lbs, height = 5′8″), nonsmoker, target INR = 2.75, and taking no other drugs.[65]

Source: Pharmacotherapy © 2008 Pharmacotherapy Publications

Slika 1.3.1.4. Potrebna dnevna doza varfarina ovisno o genotipu CYP2C9 i VKORC1.

Spomenuti su već algoritmi Andersona i Sconcea koji su uz učinak kliničkih parametara uključivali i farmakogenetičke parametre u predikciji inicijalne doze varfarina(115,116). Međutim, jedan od danas najkorištenijih algoritama zasnovanih na farmakogenetici je Gageov algoritam (139,140). Kod navedenog modela autori su našli R2 od 54% (jednadžba je objašnjavala 54 % varijabilnosti varfarinske doze):

y (doza) = / 0,628-0,0135 x dob (god.) – 0,24 x CyP2C9*2- 0,37 x CYP2C9*3- 0,241 x VKORC1 +0,062 x visina (cm)/2

gdje je iznos vrijednosti za genotip CYP2C9 bio 0, 1 ili 2 za broj alela *1,*2,*3 u bolesnikovom genotipu, a za VKORC1 genotip je 1 za GG, 2 za GA i 3 za AA. Slične preporuke o inkorporiranju farmakogenetičkih uz kliničke parametre prije započinjanja terapije varfarinom dao je 2009 godine The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium (141). Kako bi se olakšala uporaba ovih farmakogenetičkih i kliničkih algoritama, izrađena je neprofitna mrežna stranica dostupna na : http://www.WarfarinDosing.org (142) sa algoritmom u koji su uključeni dob, spol, težina, etnička pripadnost, razlog primjene varfarina, pušenje, primjena amiodarona ili statina, ciljni INR te alelne varijante VKORC1 i CYP2C9, uz procjenu potrebne dnevne doze varfarina i preporukom za uvođenje terapije primjenom tzv.“*mini loading dose*“ prva dva dana kako bi se ranije postigao ciljni INR i antikoagulantni učinak.

Poglavlje 2.

2. HIPOTEZA

1. Farmakogenetičkom analizom polimorfizama gena CYP2C9 (*1,*2,*3) i VKORC1 1173 C>T u pacijenata sa ishemičkim moždanim udarom prije započinjanja terapije varfarinom moguće je ranije postići ciljni INR i stabilan antikoagulantni učinak

2. Farmakogenetičkom analizom polimorfizama gena CYP2C9 (*1,*2,*3) i VKORC1 -1173C>T u pacijenata sa ishemičkim moždanim udarom prije započinjanja terapije varfarinom moguće je ranije ranije postići stabilnu optimalnu dozu održavanja

Poglavlje 3.

.

3. CILJEVI I SVRHA ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj našeg istraživanja je ispitati prediktivnu vrijednost kombinacije polimorfizma gena CYP2C9 (alelnih varijanti *1,*2,*3) i polimorfizma VKORC1 -1173 C>T na antikoagulantni učinak varfarina pri uvođenju terapije i individualizaciji optimalne doze varfarina u pacijenata u ranoj fazi moždanog udara ishemičkog tipa kod kojih je indicirana primjena oralne antikoagulantne terapije u odnosu na standardnu fiksnu primjenu doze.

Bolesnici sa moždanim udarom su viskorizična skupina u kojih postoji veća vjerojatnost krvarenja u infarktnu zonu zbog prirode same bolesti i moždanog oštećenja kao i recidiva moždanog udara tromboembolijskog tipa. Stoga je iznimno važno upravo u takvih bolesnika postići čim ranije adekvatan antikoagulantni učinak i stabilnu dozu održavanja da bi se izbjegla/smanjila učestalost mogućih komplikacija.

U okviru istraživanja ćemo ispitati slijedeće specifične ciljeve:

1. Istražiti utjecaj kombinacije polimorfizma gena CYP2C9 (*1,2*,3*) i VKORC1 -1173 C>T na vrijeme potrebno za postizanje ciljnih INR vrijednosti unutar terapijskog raspona pri uvođenju terapije

2. Utvrditi vrijeme potrebno za postizanje prvog ciljnog INR u bolesnika sa terapijom započetom farmakogenetičkom predikcijom doze u odnosu na bolesnike kojima je varfarin uvođen standardnom fiksnom dozom

3. Utvrditi vrijeme potrebno za postizanje stabilne terapijske doze i optimalu dozu održavanja varfarina u odnosu na genotip

4. Utvrditi vrijeme potrebno za postizanje stabilne terapijske doze u bolesnika sa terapijom započetom farmakogenetičkom predikcijom doze u odnosu na bolesnike sa standarnom fiksnom dozom

5. Utvrditi učestalost komplikacija/krvarenja u ranom razdoblju uvođenja varfarina između bolesnika sa terapijom započetom farmakogenetičkom predikcijom doze u odnosu na bolesnike sa standarnom fiksnom dozom

6. Valorizirati klinički ishod pri otpustu primjenom modificirane Rankinove skale (mRS) između bolesnika sa terapijom započetom farmakogenetičkom predikcijom doze u odnosu na bolesnike sa standarnom fiksnom dozom

Poglavlje 4.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Odabir početne doze varfarina baziran na individualnom genotipu primjenom posebnih farmakogenetičkih algoritama umjesto započinjanja terapije po važećem kliničkom algoritmu ili fiksnom dozom pokazala se temeljem rezultata dosadašnjih studija učinkovitijim u ranijem potizanju ciljnog INR tijekom faze uvođenja uz ranije postizanje stabilne doze održavanja. Navedeno je iznimno važno za pacijenate sa moždanim udarom koji iziskuju primjenu antikoagulantne terapije varfarinom budući je to skupina bolesnika sa povećanim rizikom razvoja komplikacija. U njih je povećna opasnost nastanka intracerebralnog krvarenja u infarktnu zonu uslijed predoziranja ili emboličkih incidenata i recidiva MU u slučaju nedostatne doze što potencijalno povećava rizik od pogoršanja neurološkog deficita, produženja hospitalizacije, smrtnog ishoda i povećanja troškova liječenja.

Ovo istraživanje je planirano i provedeno kao prospektivna "case-control" studija u trajanju od 6 mjeseci, a ispitanici su hospitalizirani bolesnici sa ishemičkim moždanim udarom i indikacijom za uvođenje varfarina u terapiju. Istraživanje je provedeno nakon prethodnog odobrenja od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Zagreb te odobrenja od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Istraživanje je provedeno na Klinici za neurologiju Medicinskog fakulteta

Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od 1.10. 2010 god. do 1. 04. 2011. godine

4.1. Ispitanici

U istraživanje je uključeno 210 bolesnika oba spola starijih od 18 godina hospitaliziranih u Klinici za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od 1.10.2010 do 1.4.1011 godine. U studiju su uključeni isključivo bolesnici sa kliničkom slikom akutnog ishemičkog moždanog udara koji su prethodno u terapiji uzimali varfarin, bolesnici sa kardioembolijskim moždanim udarom te bolesnici sa drugim specifičnim uzrocima nastanka ishemičkog moždanog udara u kojih je prema postojećem algoritmu liječenja indicirano uvođenje varfarina u terapiju tijekom hospitalizacije.
Skupinu ispitanika (označeni kao FG skupina) sačinjavalo je 106 bolesnika oba spola starijih od 18 godina hospitaliziranih u Referentnom centru za intenzivnu neurologiju Klinike za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb u periodu od 1.10.2010 do 1.4.2011 godine sa kliničkom slikom i dijagnozom ishemičkog moždanog udara potvrđenog nalazom MSCT mozga, a u kojih je prema postojećem algoritmu liječenja planirana primjena indicirane terapije varfarinom tijekom hospitalizacije. U toj skupini bolesnika je provedena farmakogenetička analiza za genski polimorfizam CYP2C9 *1,*2,*3 i VKORC1 -1173C>T prije uvođenja varfarina. Inicijalna doza varfarina je uvođena prema nalazu genotipizacije i kliničkih parametra za svakog pacijenta koristeći se algoritmom za farmakogenetičku predikciju doze dostupnog na neprofitnoj mrežnoj stranici: http://www.WarfarinDosing.org (142). Parametri praćenja predloženi ovim algoritmom bilježeni su u bazu podataka za svakog ispitanika: dob, spol, težina, visina, etnička pripadnost, razlog za primjenu terapije varfarinom, primjena statina, amiodarona, pušenje, ciljni raspon INR, alelne varijante gena CYP2C9 i VKORC1. U svih ispitanika inicijalna doza varfarina je uvođena primjenom tzv.“mini loading doze“ koja je predstavljala oko 1,5 puta veću dozu od farmakogenetičkim algoritmom predviđene doze. Ta je doza primjenjivana tijekom prva dva dana od uvođenja, a potom je doza modificirana ovisno o vrijednostima postignutog INR. Jedino je u prvoj

farmakogenetičkoj skupini u kojoj su bili „divlji“ tipovi za gensku varijantu CYP2C9 i za VKORCl / CYP2C9 *1/*1 (wt/wt) , VKORC 1 CC/ primijenjena dupla doza od farmakogenetičkim algoritmom procijenjene inicijalne doze tijekom prva dva dana terapije da bi se ranije postigao antikoagulantni učinak i ciljni INR budući je za te alele poznato da najsporije postižu ciljni INR, a nakon toga je doza prilagođavana ovisno o vrijednostima postignutog INR (141).

Kontrolnu skupinu (označenu kao NF skupina) sačinjavalo je 104 bolesnika oba spola starijih od 18 godina hospitaliziranih na ostalim odjelima Klinike za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb u istom vremenskom periodu od 1.10.2010. -1.4.2011.godine sa dijagnozom akutnog ishemičkog moždanog udara te sličnim indikacijama za primjenu antikoagulantne terapije kao u ispitanika u FG skupini. U njih je terapija varfarinom uvođena primjenom fiksne doze od 6 mg tijekom prva dva dana prema standardnim kriterijima bez prethodne farmakogenetičke analize, a potom je doza prilagođavana ovisno o postignutim vrijednostima INR. Jedino je u trojice bolesnika inicijalna fiksnu doza umanjena za 25% zbog istovremenog uzimanja amiodarona (84).

Pri prijamu je u svakog bolesnika utvrđen neurološki deficit primjenom NIHSS skale (eng. *National Institute Health Stroke Scale*) stupnjevan od 0-42 gdje je 0 značila nepostojanje neurološkog deficita, a 42 najteži deficit (143).

Neurološki deficit pri otpustu iz bolnice procjenjivan je primjenom modificirane Rankinove skale (mRS) u rasponu od 0-6, gdje je 0 predstavljala stanje bez neurološkog deficita, a 6 je označavao smrtni ishod (144,145).

Kriteriji ulaska u studiju su bili jednaki u obje skupine ispitanika:

1. prethodno antikoagulirani bolesnici sa kliničkom slikom akutnog ishemičkog moždanog udara sa inicijalnim nalazom MSCT mozga učinjenim neposredno po prijamu u bolnicu kojim se isključilo intracerebralno krvarenje. U toj skupini su bili bolesnici koji su prethodno primali varfarin zbog fibrilacije atrija, bolesnici sa mehaničkim srčanim zaliscima te bolesnici na terapiji varfarinom zbog preboljele plućne embolije, duboke venske tromboze ili drugim razlogom za primjenu varfarina.
2. Bolesnici sa moždanim udarom i novootkrivenom fibrilacijom atrija (FA) potvrđene nalazom EKG-a i 24-satnim monitoringom EKG-a

3. bolesnici sa akutnom disekcijom ekstrakranijskih krvnih žila kao uzrokom moždanog udara potvrđenom nalazima ultrazvučne dijagnostike ekstrakranijskih krvnih žila, nalazima cerebralne MSCT angiografije ili MR angiografije
4. Bolesnici sa moždanim udarom kardioembolijskog porijekla u kojih je nalaz transezofagealnog ultrazvuka srca (TEE) potvrdio foramen ovale apertum (FOA) uz prisutnu atrijsku septalnu aneurizmu
5. Bolesnici sa moždanim udarom posljedičnim trombozi cerebralnih venskih sinusa potvrđenoj nalazom MSCT mozga, nalazom MSCT angiografije, MR angiografije ili cerebralne panangiografije uz prikaz venske faze, bez obzira da li je MSCT mozga pokazao u njih znakove parenhimskog intrakranijskog krvarenja ili ishemije

U svih je bolesnika nakon standardne antikoagulantne terapije primjenom nefrakcioniranog heparina ili niskomolekularnog heparina (enoxiparin) tijekom 5-7 dana od prijama u bolnicu zbog akutnog ishemičkog moždanog udara u terapiju uveden varfarin. Svaki je bolesnik dobio informirani pristanak sastavljen po etičkim principima sa ciljem upoznavanja sa terapijom, mogućim komplikacijama, predviđenim postupcima i svrhom istraživanja. Za bolesnike koji zbog neurološkog deficita ili bilo kojeg drugog razloga nisu bili u mogućnosti razumjeti i/ili potpisati informirani pristanak, tražilo se odobrenje obitelji ili nisu bili uključeni u istraživanje.
Kriteriji isključivanja iz studije su bili: poznata maligna bolest, trudnoća i intracerebralno krvarenje u inicijalnom MSCT mozga (osim u pacijenata sa dokazanom trombozom cerebralnih venskih sinusa). Iz studije su isključeni i bolesnici u kojih je unutar tjedan dana od prijama, a prije uvođenja varfarina, utvrđeno kliničko pogoršanje sa progresijom neurološkog deficita posljedično krvarenju u infarktnu zonu koje je potvrđeno nalazom kontrolnog MSCT mozga.
Obilježja koja su praćena u svih ispitanika:

1. Dob (l8-85 g.)
2. Spol (m/ž)
3. težina (kg)
4. Razlog uvođenja varfarina: prethodna primjena varfarina (kronična FA, implantirani mitralni ili aortalni zalisci, preboljeli DVT ili PE), novootkivena

FA, prisutna FOA uz atrijsku septalnu aneurizmu, disekcija ekstrakranijskih arterija, tromboza venskih sinusa

5. neurološki deficit: pri prijemu procijenjen NIHSS (*National Institut Health Stroke Scale*) pri otpustu procijenjen modificiranom Rankinovom skalom (mRS)
6. INR pri prijamu (INRp)
7. INR na dan uvođenja prve doze varfarina (inicijalni INRo 5.-7. dan po prijemu)
8. INR nakon 48 sati,72 sata, peti dan, sedmi dan, četrnaesti dan i dvadeset i prvi dan od uvođenja terapije
9. doza varfarina pri uvođenju terapije (inicijalna doza Du) i doza održavanja (Do)
10. vrijeme potrebno da se dostigne ciljni INR (2- 3) Tc
11. vrijeme potrebno da se postigne stabilna terapijska doza održavanja
12. pojava nuspojava/komplikacija (manje ili veće krvarenje)

Ispitanici su praćeni prosječno mjesec dana tijekom trajanja bolničkog liječenja uz kontrole INR neposredno pri prijamu, potom na dan uvođenja varfarina (definiran kao inicijalni INR) te tijekom tri tjedna bolničkog liječenja.

Kontrole INR u rađene drugi, treći, peti i sedmi dan tijekom prvog tjedna od uvođenja varfarina. Potom su kontrole INR rađene svaki ili svaki drugi ili treći dan tijekom drugog i trećeg tjedna ovisno o vrijednostima postignutog INR i potrebe za korekcijom doze. Vrijednost INR na četrnaesti dan označavao je prosječne vrijednosti postignutog INR kroz mjerenja tijekom drugog tjedna od osmog do četrnaestog dana (izražen kao aritmetička sredina zbroja vrijednosti INR podijeljeno s brojem mjerenja u drugom tjednu), a INR dvadeset i prvog dana je uključivao prosječne vrijednosti mjerenja INR tijekom trećeg tjedna praćenja (od l5. do 21. dana, iskazan kao aritmetička sredina izmjerenih vrijednosti INR izračunata kao u drugom tjednu).

Ciljni terapijski raspon INR je uključivao vrijednosti INR od 2-3. Iznadterapijski INR je definiran u slučaju dostignutog INR > 3,1. Mada se u literaturi iznadterapijskim najčešće definiraju vrijednosti INR>4 obzirom na visokorizičnost naših ispitanika zbog same prirode bolesti, iznadterapijskim su uzete vrijednosti INR koje nadmašuju preporučeni terapijski raspon (78,116).

Stabilna terapijska doza održavanja je definirana kao doza primijenjenog varfarina koja se nije mijenjala unutar 3 konsekutivna mjerenja INR najmanje tijekom pet dana. U slučaju da je bolesnik ranije od dvadeset i prvog dana praćenja u studiji otpušten na

rehabilitaciju, na kućnu njegu ili u kroničnu stacionarnu ustanovu (ukupno 17 bolesnika u obje skupine, ali ne ranije od l4.og dana od uvođenja terapije varfarinom), u njega je vađena krv za praćenje INR koja se iza analizirala u istom laboratoriju kao i tijekom hospitalizacije (Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku KBC Zagreb).
Komplikacije uzrokovane primjenom varfarina svrstane su u dvije grupe:
1. manje komplikacije: blaža krvarenja (potkožni hematomi, subungualna, konjuktivalna ili gingivalna krvarenja)
2. veće komplikacije:
a) komplikacije koje nisu iziskivale prekidanje terapije varfarinom:
diskretna hemoraška tranzicija infarktne zone u kontrolnom MSCT mozga bez kliničkog pogoršanja, mikrohematurija, blaže vaginalno krvarenje
b) komplikacije zbog kojih je prekidana terapija varfarinom:
opsežnija hemoraška tranzicija infarktne zone ili intracerebralni hematom u kontrolnom MSCT mozga, opsežno genitourinarno, gastrointestinalno ili drugo masivno krvarenje.
U slučajevima opsežnijih krvarenja uz prekidanje terapije varfarinom, pacijentima je primijenjen K-vitamin u dozi 10-20mg iv. te svježe smrznuta plazma (prosječno oko 600 ml iv.infuzije). U jednog je pacijenta bila potrebna transfuzija 500 ml koncentrata eritrocita.

4.2. Genotipizacija alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1

U svih je bolesnika krv vađena u sklopu osnovne dijagnostičke obrade i terapijskog praćenja tijekom boravka u Klinici za neurologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb koja se analizirala u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Genotpizacija alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 za bolesnike u kojih je predviđeno uvođenje terapije farmakogenetičkom predikcijom doze izvršena je u u Laboratoriju za farmakogenetiku Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i KBC Zagreb.
Za genotipizaciju je venepunkcijom uzeto 5 ml pune krvi u epruvetu s Na-EDTA (Becton Dickinson, Meylen Cedex, Francuska).
Izolacija DNA provodila se metodom isoljavanja prema Milleru.

Genotipizacija alelnih varijanti CYP2C9 (*1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2; *2/*3, *3/*3) se provela metodom lančane reakcije polimerazom (PCR), brzom enzimskom tehnikom kojom se male količine DNA in vitro selektivno uvišestruče na količinu potrebnu za daljnju analizu. Koristila se metoda „Real time PCR"- metoda PCR u stvarnom vremenu upotrebom *TIB MOLBIOL LightMix* u aparatu *Roche LightCycler*.
Genotpizacija alelnih varijanti VKORC1 1173C>T (CC, CT, TT) se provela metodom PCR u stvarnom vremenu – „Real time PCR" u aparatu *Roche LightCycler* upotrebom *TIB MOLBIOL LightMix.*

4.3. Statistička obrada

Statistička obrada je provedena korištenjem statističkog programskog paketa STATISTICA ver. 6.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).
Kvantitativne varijable su prikazane kao aritmetička sredina (AS) i standardna devijacija (SD) kada je distribucija bila normalna, odnosno kao medijan te interkvartilni raspon (IQR) u suprotnom.
Kvalitativne varijable su prikazane kao učestalost i udio (%).
Studentov t-test ili Mann-Whitney U-test je korišten za usporedbu među skupinama za kvantitativne varijable (vrijeme potrebno za postizanje ciljnog INR, vrijeme i postotak vremena provedenog u terapijskom rasponu INR, vrijeme provedeno u iznadterapijskom INR) .
χ2-test je korišten za usporedbu među skupinama za kvalitativne varijable.
Za usporedbu među podskupinama za kvantitativne varijable korištena je analiza varijance (ANOVA) odnosno Kruskal-Wallis ANOVA ovisno o distribuciji.
Povezanost pojedinih varijabli ocijenjenjena je primjenom Spearmanovog koeficijenta korelacije (rho). Statistički značajnom je uzimana vjerojatnost sa P=0,05.

4.4. Rezultati

4.4.1. Osobine ispitanika

Tablica 4.4.1.1. Skupni deskriptivni rezultati za skupinu ispitanika sa farmakogenetičkom predikcijom početne doze varfarina (FG skupina)

FG-grupa	N	A.S.	-95% CI	+95% CI	Median	Minimum	Maximum	IQR		SD
Dob	106	67,679	65,083	70,275	72,000	25,000	85,000	62,000	77,000	13,480
Težina	106	75,160	73,160	77,161	75,000	56,000	99,000	67,000	83,000	10,387
procijenjena doza	106	3,917	3,632	4,202	3,800	1,200	7,500	2,800	5,000	1,478
INR(p)	106	1,073	1,004	1,143	0,950	0,530	3,650	0,890	1,120	0,360
INR(0)	106	0,992	0,972	1,013	0,965	0,810	1,560	0,930	1,020	0,106
INR(2)	106	1,283	1,246	1,319	1,240	1,020	2,190	1,160	1,360	0,191
INR(3)	106	1,572	1,525	1,620	1,535	1,130	2,500	1,420	1,660	0,245
INR(5)	106	2,017	1,927	2,108	2,020	1,380	4,200	1,760	2,120	0,470
INR(7)	106	2,340	2,263	2,416	2,265	1,630	4,190	2,130	2,420	0,396
INR(14)	106	2,405	2,346	2,463	2,360	1,860	4,620	2,240	2,540	0,304
INR(21)	106	2,337	2,277	2,396	2,350	0,000	2,900	2,280	2,450	0,309
Tc	106	5,632	5,345	5,919	5,000	3,000	9,000	5,000	7,000	1,489
Du	106	6,206	5,824	6,587	6,000	2,500	12,000	4,500	7,500	1,982
D(0)	106	3,758	3,437	4,080	3,500	1,000	8,500	2,500	5,000	1,670
D(0)G	106	2,028	1,740	2,316	1,000	1,000	6,000	1,000	3,000	1,496
Du-D(0)	106	2,447	2,248	2,646	2,500	-2,500	5,500	2,000	3,000	1,033
Dp-D(0)	106	0,158	0,012	0,305	0,200	-4,000	2,000	-0,200	0,500	0,761
T(D0)	106	10,330	9,964	10,696	10,000	7,000	17,000	9,000	12,000	1,901
Vcilj – vrijeme u ciljnom rasponu (lin.interpol)	106	16,092	15,698	16,487	16,705	4,448	18,818	15,366	17,133	2,049
Vprevis (vrijeme iznad 3,1)	106	0,421	0,078	0,764	0,000	0,000	13,401	0,000	0,000	1,781
Vcilj% (% u th rasponu – Linerna interpolacija)	106	76,629	74,750	78,509	79,547	21,182	89,610	73,171	81,587	9,758
V ulas (vrijeme ulaska u th raspon)	106	4,394	4,120	4,667	4,167	1,350	9,763	3,585	5,333	1,421

Tablica 4.4.1.2. Skupni deskriptivni rezultati za kontrolnu skupinu bolesnika (NF skupina) sa uvođenjem fiksne doze

NF grupa	N	A.S.	-95% CI	+95% CI	Median	Minimum	Maximum	IQR		SD
Dob	104	69,529	67,161	71,897	72,500	32,000	85,000	63,500	78,500	12,177
Težina	104	74,394	72,331	76,457	74,000	56,000	100,000	67,000	82,000	10,607
INR(p)	104	1,050	1,000	1,101	0,935	0,780	1,750	0,885	1,120	0,259
INR(0)	104	0,966	0,949	0,983	0,950	0,820	1,320	0,915	1,025	0,089
INR(2)	104	1,237	1,209	1,264	1,210	0,990	1,800	1,150	1,285	0,141
INR(3)	104	1,513	1,473	1,554	1,480	1,140	2,600	1,375	1,590	0,210
INR(5)	104	1,950	1,846	2,054	1,780	1,250	4,150	1,615	2,120	0,536
INR(7)	104	2,371	2,255	2,486	2,240	1,540	4,200	1,875	2,630	0,595
INR(14)	104	2,576	2,472	2,679	2,420	1,670	4,410	2,245	2,770	0,531
INR(21)	104	2,407	2,365	2,449	2,370	1,650	3,500	2,320	2,520	0,216
Tc	104	7,115	6,735	7,496	7,000	3,000	14,000	6,000	8,000	1,957
Du	104	6,000			6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	0,000
D(0)	104	4,098	3,691	4,506	4,000	1,000	9,000	2,000	6,000	2,096
Du-D(0)	104	1,902	1,494	2,309	2,000	-3,000	5,000	0,000	4,000	2,096
T(D0)	104	13,894	13,332	14,457	13,000	9,000	21,000	12,000	16,000	2,893
Vcilj	104	14,084	13,558	14,610	14,621	3,988	18,016	13,052	15,914	2,707
Vprevis	104	1,683	1,073	2,293	0,000	0,000	15,012	0,000	2,262	3,137
Vcilj%	104	67,067	64,560	69,573	69,626	18,989	85,790	62,151	75,782	12,889
Vulas	104	5,109	4,790	5,428	5,082	2,000	9,563	3,720	6,379	1,640

4.4.1.1. Raspodjela ispitanika s obzirom na dob i spol u FG i NF skupini

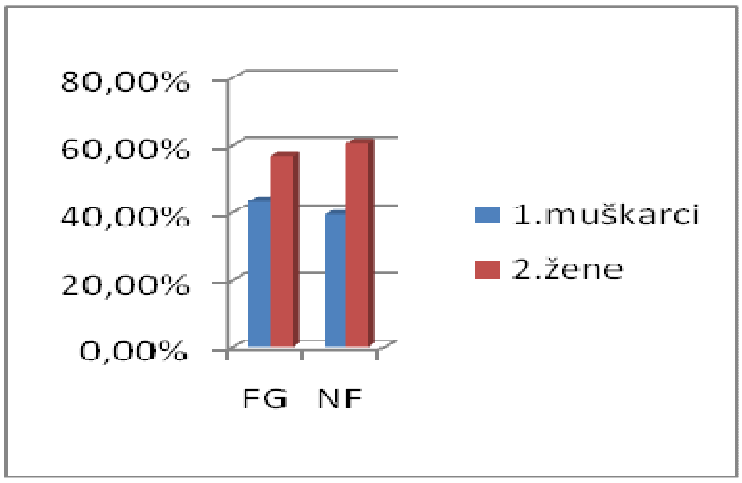
Prosječna dob među ispitanicima razvrstanih u 5 dobnih podskupina analizirana primjenom $\chi 2$ testa nije se razlikovala između FG i NF skupine (p= 0,669). Prosjek dobi ispitanika je bio 67,6 godina u FG skupini (medijan 72, IQR 62- 77) te 69,5 godina (medijan 72,5, IQR 63,5-78,5) godina u NF skupini.

Najmanje je bilo ispitanika mlađih od 49 godina, ukupno 11,9%, sa nešto većom zastupljenošću od 14,15% u FG skupini u odnosu na 9,62% ispitanika u kontrolnoj NF skupini. Najmlađa bolesnica u FG skupini je imala 22 godine (Emery Dreyfusov sy sa FA), a u NF skupini 34 godine (disekcija ekstrakranijskih arterija).

Najzastupljenija dobna skupina u obje grupe su bili bolesnici u dobi od 71-80 godine sa učestalošću od 37,62% (38,68% u FG skupini i 37,62% u NFskupini), s tim da je proporcija bolesnika starijih od 71 godine iznosila 54,76%.

Tablica 4.4.1.1.1. Raspodjela bolesnika po dobnim skupinama u FG i NF skupini ($\chi 2$=2,360, p= 0,669)

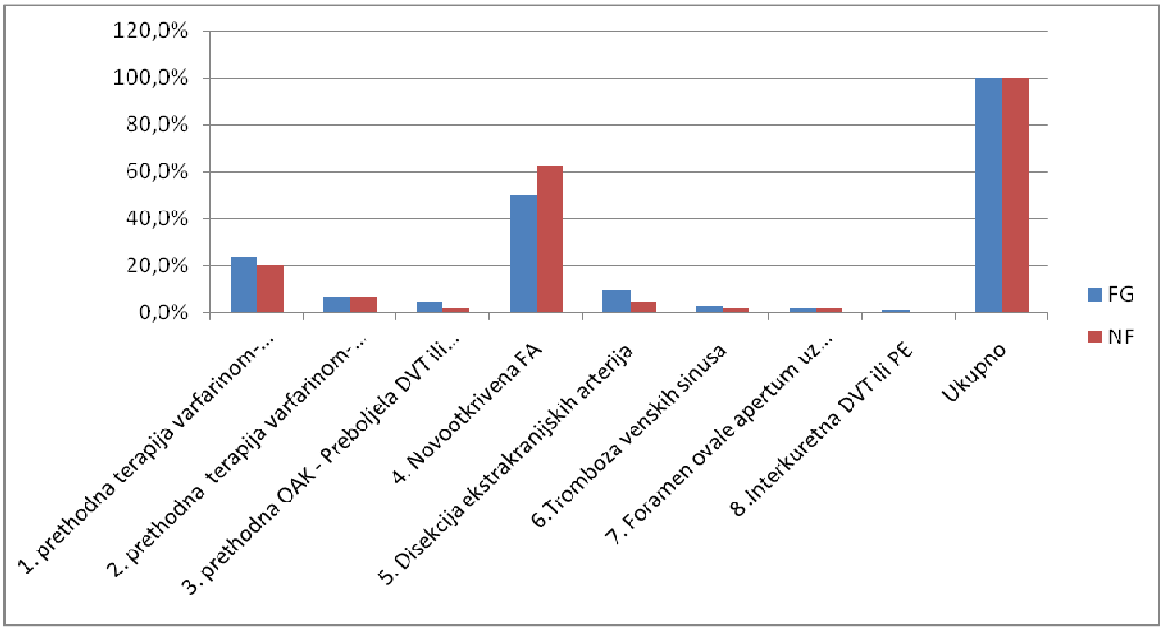
Dob (godine)	FG	NF	Ukupno
1. od 18-49g.	15	10	25
%	14,15%	9,62%	11,91%
2. od 50-60 g.	10	12	22
%	9,43%	11,54%	10,48%
3. od 61-70 g.	25	23	48
%	23,58%	22,12%	22,86%
4. 71-80 g.	41	38	79
%	38,68%	36,54%	37,62%
5. Iznad 81 g.	15	21	36
%	14,15%	20,19%	17,14%
Ukupno	106	104	210



Slika 4.4.1.1.1.Učestalost po spolu u FG skupini i NF skupini ($\chi 2$=0,341; df=1; p=0,5590)

Skupine se međusobno nisu razlikovale po zastupljenosti spolova primjenom $\chi 2$ testa (p=0,559). U obje je skupine bila veća proporcija žena u odnosu na muškarce, ukupno 58,57% žena (56,60% u FG skupini i 60,58% u NF skupini) u odnosu na 41,43% muškaraca (43,40% u FG skupini; 39,42% u NF skupini).

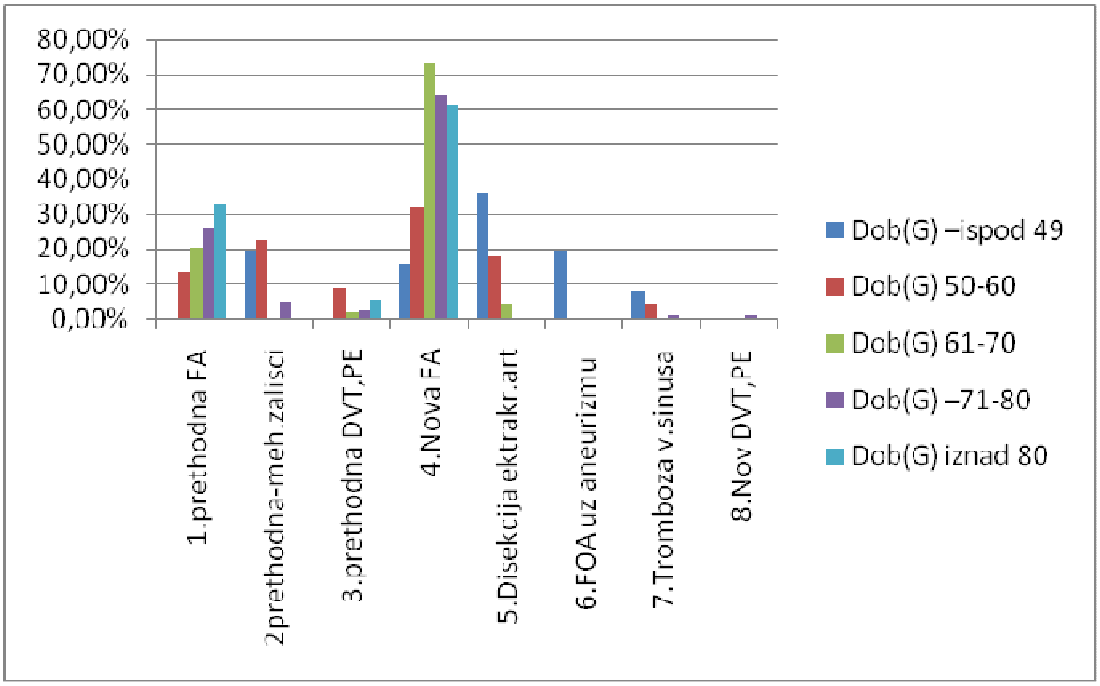
4.4.1.2. Raspodjela ispitanika s obzirom na razlog primjene varfarina



Slika 4.4.1.2.1. Učestalost podskupina razvrstanih prema razlogu primjene varfarina između FG i NF skupine (1.prethodna terapija varfarinom zbog FA 2.prethodno zbog mehaničkih valvula 3.prethodno zbog DVT ili PE 4.novootkrivena FA 5.disekcija 6.tromboza venskih sinusa 7.interkurentna DVT ili PE ($\chi 2$=5,568; df=7; p=0,5910)

Između FG i NG skupine nije bilo statistički značajne razlike u odnosu na podskupine razvrstane prema razlogu primjene varfarina (p=0,591).
Od ukupno 210 bolesnika njih 32% je prije MU primalo varfarin (FG skupina 34,9%; NF skupina 28,8%) i u svih je INRo pri prijamu u bolnicu bio ispod terapijskog raspona, što govori u prilog nedovoljne antikoaguliranosti i primijenjene doze.
Najčešći razlog kardioembolijskog MU je bila novootkrivena FA, ukupno u 56,2% bolesnika (FG skupina 50,48%, NF skupina 62,5%), što je prikazano na slici 4.4.1.2.1..
Disekcija ekstrakranijskih arterija u FG skupini bila je zastupljena sa 9,5%, a rjeđa je bila u NF skupini sa zastupljenošću od 4,81%.

4.4.1.3. Raspodjela ispitanika s obzirom na dob i razlog primjene varfarina



Slika 4.4.1.3.1. Učestalost podskupina razvrstanih prema razlogu primjene varfarina (x os) ovisno o dobnim skupinama ($\chi 2$=134,01; df=28; p=0,0000)

Statistički značajna razlika upotrebom $\chi 2$-testa je nađena među dobnim podskupinama u odnosu na razloge uvođenja varfarina (p=0,0000)). Novootkrivena FA je u mlađoj dobnoj skupini bila rijetka sa zastupljenošću od 16%, za razliku od dobne skupine od

61-70 godine gdje je bila zastupljena sa 73%. Općenito je novootkrivena FA bila uzrokom MU u 65,6 % bolesnika starijih od 61 godine, a 67% među onima starijim od 71 godinu (slika 4.4.1.31). Kao razlog primjene varfarina FA je bila prisutna u 62% prethodno antikoaguliranih bolesnika starijih od 71 godinu. U mlađoj dobnoj skupini (< 49godina) najčešći razlozi prethodne primjene antikoagulantne terapije su bili mehanički srčani zalisci sa učestalošću od 20%, a kao uzrok MU sa indikacijom za primjenu varfarina je bila diskecija ekstrakranijskih arterija u 39% slučajeva.

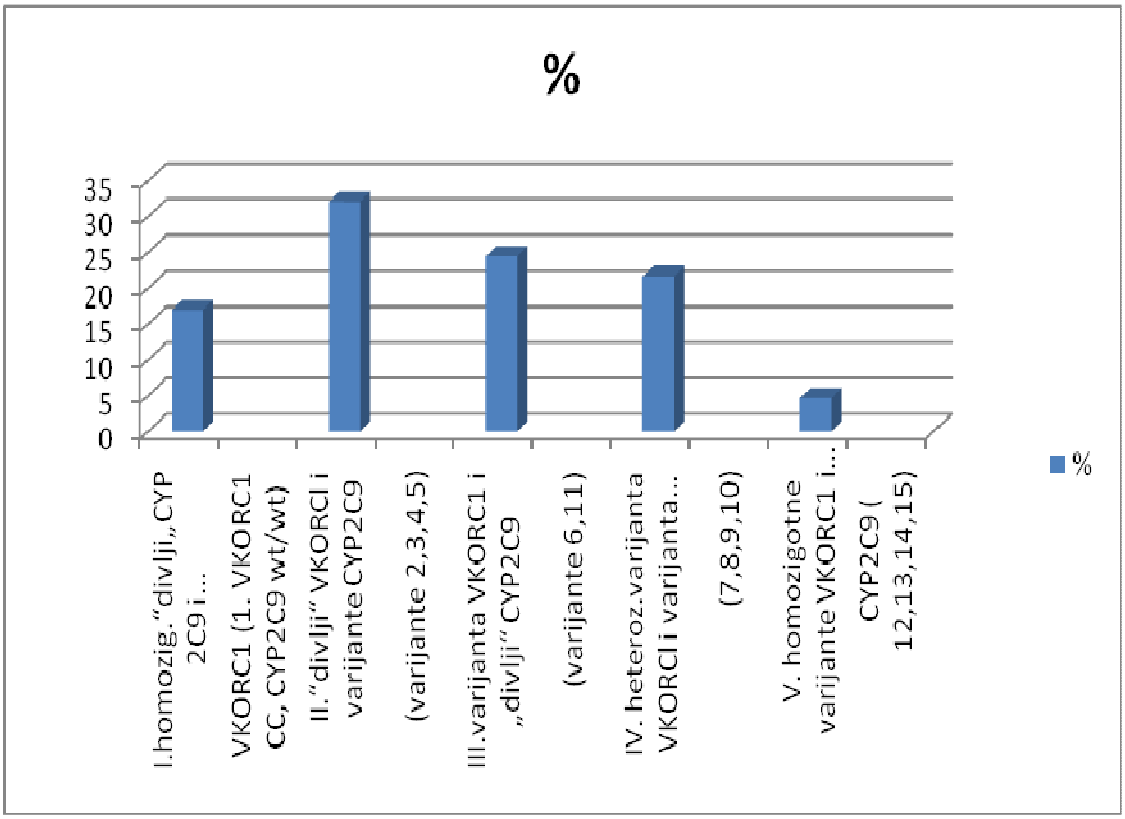
4.4.1.4. Raspodjela učestalosti alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 među ispitanicima u FG skupini

Tablica 4.4.1.4.1. Učestalost alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 među ispitanicima u FG skupini

Alelne varijante VKORC1 i CYP2C9	Broj	Kumulat.zbroj	postotak%
1. VKORC1 CC, CYP2C9 wt/wt (*1/*1)	18	18	17,0
2. VKORC1 CC, CYP2C9 wt/*2	14	32	13,2
3. VKORC1 CC, CYP2C9 wt/*3	6	38	5,6
4. VKORC1 CC, CYP2C9 *2/*2	9	47	8,5
5. VKORC1 CC, CYP2C9 *2/*3	5	52	4,7
6. VKORC1 CT, CYP2C9wt/wt	19	71	17,9
7. VKORC1 CT, CYP2C9wt/*2	8	79	7,6
8. VKORC1 CT, CYP2C9wt/*3	13	92	12,3
9. VKORC1 CT,CYP2C9*2/*2	0	0	0
10. VKORC1 CT, CYP2C9*2/*3	2	94	1,88
11. VKORC1 TT, CYP2C9wt/wt	7	101	6,6
12. VKORC1 TT, CYP2C9wt/*2	1	102	0,94
13. VKORC1 TT, CYP2C9wt/*3	1	103	0,94
14. VKORC1 TT, CYP2C9*2/*2	2	105	1,89
15. VKORC1 TT,CYP2C9*2/*3	1	106	0,94
			100%

Učestalost alelnih varijanti gena CYP2C9 (wt,*2,*3) i VKORC1 C>T iskazana je postotkom od ukupnog broja od 106 ispitanika u FG skupini. Nije bilo niti jednog ispitanika sa genotipom 9.(VKORC1 CT, CYP2C9 *2/*2).

Najučestaliji je genotip 6 sa heterozigotnom varijantom VKORC1 i „divljim“ homozigotom CYP2C9 (VKORC1 CT,CYP2C9 wt/wt) sa 18% te „divlji“ homozigot za oba gena (VKORC1 CC, CYP2C9 wt/wt) sa 17 % udjela, potom sa 13% udjela heterozigot za oba gena (VKORC1 CT,CYP2C9 wt/*3) što je razvidno iz tablice 4.4.1.4.1. Najčešći je bio homozigotni “divlji“ genotip VKORC1 CC sa zastupljenošću od 49,5%, te homozigotni „divlji“ tip CYP2C9 wt/wt zastupljen u 41,5% ispitanika, a homozigotne alelne varijante VKORC1 TT su bile zastupljene u 11,3% ispitanika. Obje alelne varijante sa smanjenom aktivošću enzima CYP2C9 (*2,*3) su bile zastupljene u 17,92% bolesnika.



Slika 4.4.1.4.1. Učestalost (%) skupina genotipova ovisno o alelnim varijantama u FG skupini

I skupina: Homozigoti za oba „divlja“ alela VKORC1 CC,CYP2C9 wt/wt: - zastupljenost 17%

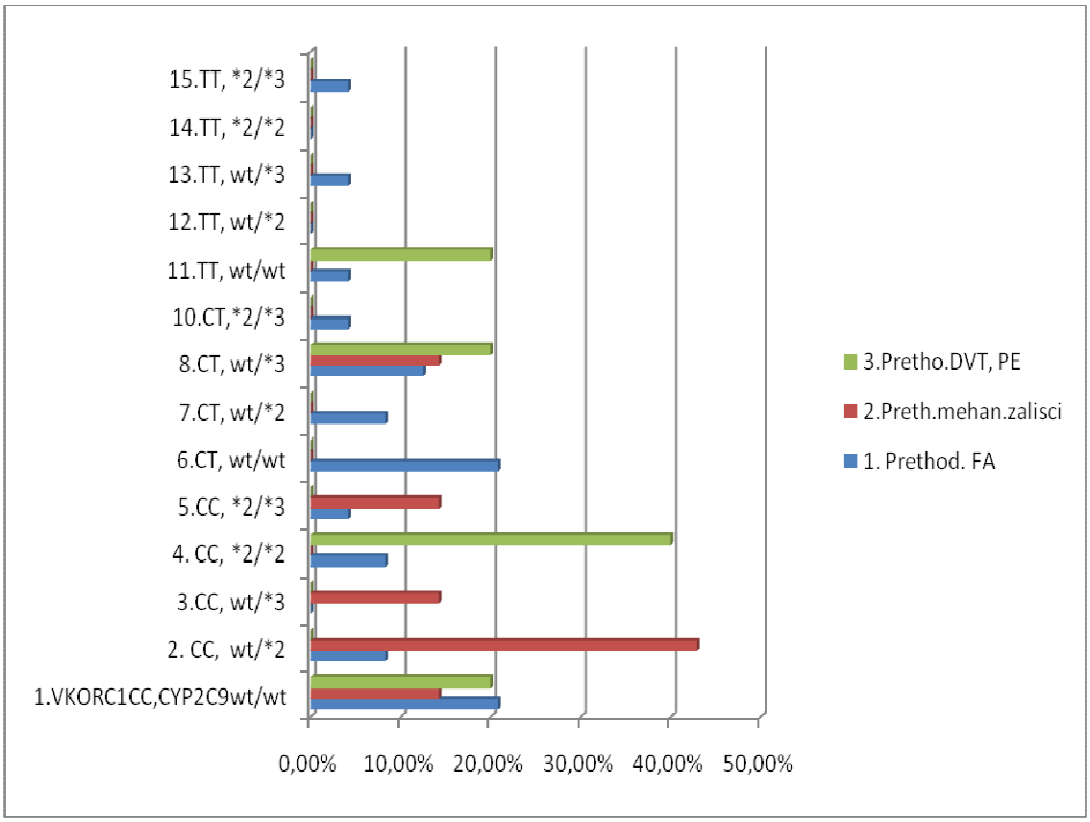
II skupina: Homozigoti za „divlje“ alele VKORC1, heterozigoti za CYP2C9– (CC,w/*2,wt/*3, *2/*2)- najzastupljenija sa 32,1%

III skupina: Homozigoti za „divlje“ alele CYP2C9, alelne varijante VKORC1 (CT,TT, wt/wt) - zastupljenost 24,5%

IV skupina: Heterozigoti za oba genotipa (CT,wt/*2,wt/*3,*2/*2, *2/*3 ,*3/*3)- zastupljenost 21,7%.

Vskupina : Homozigoti za alelne varijante VKORC1, heterozigoti za CYP2C9 (TT,wt/*2,wt/*3*, 2/*2,*2/*3, *3/*3) - najrjeđa, zastupljenost 4,7%.

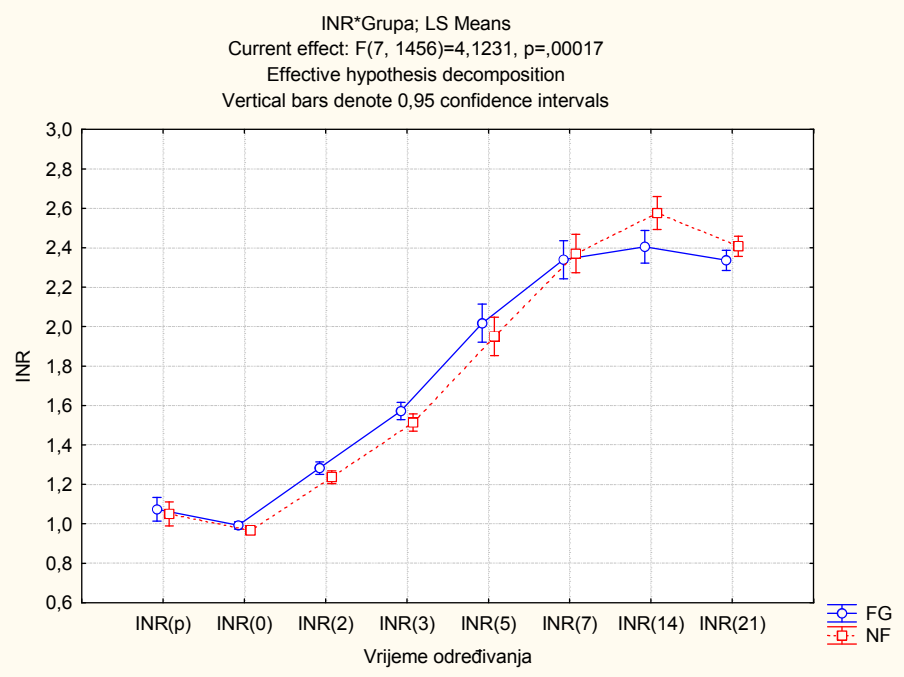
4.4.1.5. Raspodjela alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 u podskupinama ovisno o razlogu primjene varfarina u prethodno antikoaguliranih ispitanika u FG skupini



Slika 4.4.1.5.1. Učestalost (%) alelnih varijanti gena CYP2C9 i VKORC1 u prethodno antikoaguliranih bolesnika sa moždanim udarom u FG skupini

Među 36 prethodno antikoagulirana ispitanika najučestaliji je homozigotni „divlji“ genotip CYP2C9 wt/wt i VKORCl CC sa učestalošću od 19,5% među kojima se FA javlja učestalošću od 20,3%, implantirane mehaničke srčane valvule su bile u 14,2% ispitanika, a prethodna DVT ili PE je bila zastupljena u 20% ispitanika.
Sa podjednakim udjelom od 13,9 % javljaju se heterozigotne alelne varijante CYP2C9 wt/*2 uz „divlji“ homozigot VKORC1 CC, „divlji“homozigot CYP2C9 uz heterozigotni VKORC1 CT, te obje heterozigotne varijanta wt/*3 i CT (ukupno „divlji“wt/wt u 34,2%). Nedovoljna antikoaguliranost zbog implantiranih mehaničkih valvula javljala se u 19,4% ispitanika, a najčešće u genotipu VKORC1 CYP2CTwt/*2 sa udjelom od 42,8% (slika 4.4.1.5.1).

4.4.1.6. Usporedba vremena do postizanja ciljnog INR i iznadterapijskog INR između FG i NF skupine



Slika 4.4.1.6.1. Usporedba prosječnih vrijednosti INR ovisno o danu mjerenja i vremena potrebnog za postizanja ciljnog INR između FG i NF skupine

Primjenom $\chi 2$ testa za usporedbu frekvencije bolesnika koji su postigli cilji INR 2-3 ovisno o danima između FG i NF skupine, dobiju se statistički značajne razlike među njima već za treći dan primjene terapije (p=0,0218), za 5 dan (p=0,0026), 7 dan (p=0,0005) i 14 dan (p=0,0001).

Tablica 4.4.1.6.1. Usporedba postignutog ciljnog INR 3.dan od uvođenja varfarina između FG i NF skupine ($\chi 2$=5,259; df=1; p=0,0218)

INR(3)C	FG	NF	Ukupno
Izvan ciljnog INR	88	97	185
%	83,02%	93,27%	
U ciljnom INR	18	7	25
%	16,98%	6,73%	
ukupno	106	104	210

Već treći dan terapije je 16,98% ispitanika u FG skupini postiglo ciljni INR u odnosu na 6,73% u NF skupini, što je prikazano na tablici 4.4.1.6.1. (p=0,0218).

Tablica 4.4.1.6.2. Usporedba postignutog ciljnog INR među skupinama 5.dan od uvođenja varfarina ($\chi 2$=14,264; df=3; p=0,0026)

INR(5)C	FG	NF	Ukupno
0. ispod ciljnog INR	36	56	92
%	33,96%	53,85%	
1 – ciljni INR	67	42	109
%	63,21%	40,38%	
2 – INR iznad 3,1	0	4	4
%	0,00%	3,85%	
3 –INR > 4	3	2	5
%	2,83%	1,92%	
ukupno	106	104	210

Peti dan od uvođenja terapije statistički je značajno (p=0,0026) više ispitanika u FG skupini ušlo u terapijski raspon, njih 63,2l% u odnosu na 40,38% bolesnika u NF skupini. U FG skupini 2,83% bolesnika je postiglo iznadterapijski INR>4, a u NF

skupini je 3,85% bolesnika imalo INR >3,1 te 1,92% ispitanika INR >4. Ukupno je 2,83% bolesnika u FG skupini i 5,77% u NF skupini postiglo INR iznad terapijskog raspona petog dana primjene varfarin (tablica 4.4.1.6.2).

U FG skupini sedmi dan terapije statistički je značajno veći udio od 90,57% ispitanika postiglo ciljni INR u odnosu na 67,31% u NF skupini (p=0,0005). Istovremeno je u NF skupini 13,36% ispitanika postiglo INR > 3,1 i 1,92% INR > 4 (ukupno 15,38% iznad terapijskog INR). U FG skupini je bilo 4,72% ispitanika sa INR>3,1 i 0,94% sa INR >4 (ukupno 5,66% iznad terapijskog raspona) što je prikazano na tablici 4.4.1.6.3.

Tablica 4.4.1.6.3. Usporedba postignutog ciljnog INR između FG i NF skupine 7.dan od uvođenja varfarina ($\chi 2$=17,560; df=3; p=0,0005)

INR(7)C	FG	NF	Ukupno
0-ispod Ciljni INR	4	18	22
%	3,77%	17,31%	
1.ciljni INR	96	70	166
%	90,57%	67,31%	
2.INR iznad 3,1	5	14	19
%	4,72%	13,46%	
3.INR >4	1	2	3
%	0,94%	1,92%	
ukupno	106	104	210

Tablica 4.4.1.6.4. Usporedba postignutog ciljnog INR među skupinama14.dan od uvođenja varfarina ($\chi 2$=20,649; df=3; p=0,0001)

INR(14)C	FG	NF	Ukupno
0-ispod ciljni INR	0	4	4
%	0,00%	3,85%	
1.ciljni INR	105	84	189
%	99,06%	80,77%	
2.INR iznad 3,1	0	14	14
%	0,00%	13,46%	
3.INR >4	1	2	3
%	0,94%	1,92%	
ukupno	106	104	210

Četrnaestog dana terapije je postojala statistički značajna razlika među skupinama (p=0,0001). U FG skupini 99,06% ispitanika je postiglo ciljni INR sa svega 0,94% ispitanika u kojih je INR>3,1, za razliku od NF skupine u kojoj je ciljni INR postiglo 80,77% bolesnika uz značajan postotak od 13,46% bolesnika sa INR>3,1 i 1,92% sa INR>4 (ukupno 15,38% bolesnika je postiglo iznad terapijski INR). Nalazi su prikazani na tablici 4.4.1.6.4.

Tablica 4.4.1.6.5. Usporedba postignutog ciljnog INR među skupinama 21.dan od uvođenja varfarina ($\chi 2$=0,688; df=2; p=0,5133)

INR(21)C	FG	NF	Ukupno
0-ispod ciljni INR	2	1	3
%	1,89%	0,96%	
1.ciljni INR	104	102	206
%	98,11%	98,08%	
2.INR iznad 3,1	0	1	1
%	0,00%	0,96%	
ukupno	106	104	210

Dvadeset i prvog dana terapije nije bilo statistički značajne razlike među skupinama (p=0,5133). Svega 1,89% bolesnika u FG skupini je bilo ispod terapijskog raspona INR i niti jedan nije bio iznad terapijskog raspona (tablica 4.4.1.6.5).

Primjenom Studentova t-testa za uporedbu distribucije vremena do postizanja ciljnog INR što je prikazano na slici 4.4.1.6.1 i na tablici 4.4.1.6.6. našla se statistički značajna razlika između skupina (p=0,0056).

FG skupina je ranije postizala prvi ciljni INR za prosječno 5,63 dana (SD 1,48) u odnosu na NF skupinu kojoj je trebalo prosječno 7,15 dana (SD 1,95). Analizom varijance dobiju se još kraća vremena ulaska u ciljni terapijski raspon INR. Za FG skupinu je to 4,394 dana (medijan 4,167, interkvartilni raspon IQR 3,585 do 5,333). U NF skupini se dobije ciljno vrijeme ulaska u terapijski raspon INR od 5,19 dana (medijan 5,082, IQR 3,720 do 6,379).

Primjenom metode linearne interpolacije i analizom varijance statistički je značajna razlika u vremenu provedenom u terapijskom rasponu INR između FG i NF skupina

(p=0,0049). FG skupina je provela 16,09 dana (medijan 16,7, IQR 15,366-17,13), a NF skupina14,08 dana (medijan 14,62, IQR 13,05-15,91).

Proporcija vremena provedenog u terapijskom rasponu INR primjenom metode linearne interpolacije i analizom varijance ukazala je na statistički značajnu razliku među skupinama (p=0,0049). FG skupina je provela 76,62% vremena (medijan 79,54, IQR 73,17- 81,58) u odnosu na 67,06% vremena (medijan 69,26, IQR 62,15-75,82) koje je u terapijskom rasponu INR provela NF skupina.

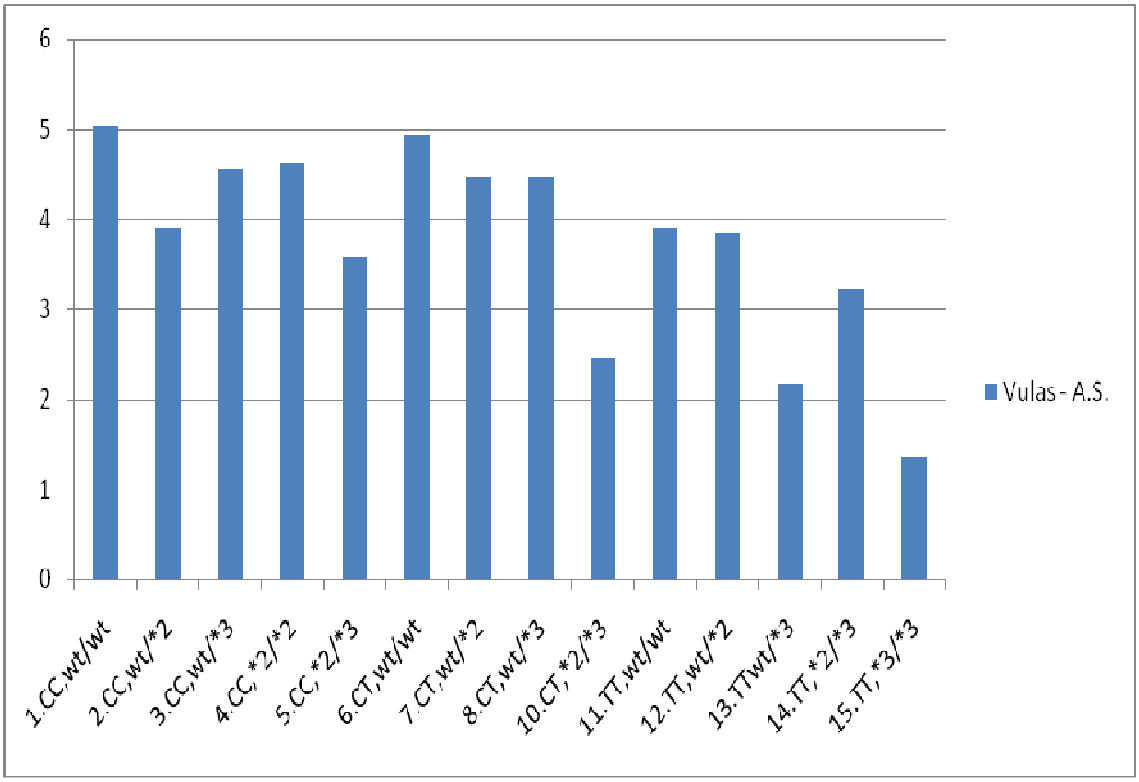
Skupine su se razlikovale sa statističkom značajnošću od p=0,0000 u vremenu provedenom iznad terapijskog raspona (Vprevis) sa INR>4 koje je za FG iznosilo 0,421 dan, a u NF skupini 1,683 dana.

Tablica 4.4.1.6.6. a) Uporedba prosječnih vrijednosti INR ovisno o danu mjerenja (INR 0,INR2,INR3,INR5,INR7,INR14,INR21 i vremena (Tc) do postizanja ciljnog INR između FG i NF skupine
b) Uporedba vremena provedenog unutar terapijskog raspona INR (Vcilj), % vremena provedenog u terapijskom rasponu INR (Vcilj%), vremena ulaska u terapijski raspon INR(Vulas), vremena iznad terapijskog raspona (Vprevis) između FG i NG grupe.

	AS FG	AS NF	t-value	df	p	N FG	N NF	SD FG	SD NF	p - Variances
INR(p)	1,073	1,050	0,54	208	0,5931	106	104	0,360	0,259	0,0009
INR(0)	0,992	0,966	1,92	208	0,0562	106	104	0,106	0,089	0,0742
INR(2)	1,283	1,237	1,98	208	0,0495	106	104	0,191	0,141	0,0023
INR(3)	1,572	1,513	1,87	208	0,0630	106	104	0,245	0,210	0,1086
INR(5)	2,017	1,950	0,97	208	0,3356	106	104	0,470	0,536	0,1829
INR(7)	2,340	2,371	-0,44	208	0,6582	106	104	0,396	0,595	0,0000
INR(14)	2,405	2,576	-2,88	208	0,0045	106	104	0,304	0,531	0,0000
INR(21)	2,337	2,407	-1,92	208	0,0566	106	104	0,309	0,216	0,0003
Tc	5,632	7,115	-6,19	208	0,0000	106	104	1,489	1,957	0,0056
Vcilj	16,092	14,084	6,07	208	0,0000	106	104	2,049	2,707	0,0049
Vprevis	0,421	1,683	-3,59	208	0,0004	106	104	1,781	3,137	0,0000
Vcilj%	76,629	67,067	6,07	208	0,0000	106	104	9,758	12,889	0,0049
Vulas	4,394	5,109	-3,38	208	0,0009	106	104	1,421	1,640	0,1455

4.4.1.7. Raspodjela prosječnog vremena do postizanja ciljnog INR ovisno o genotipu u FG skupini

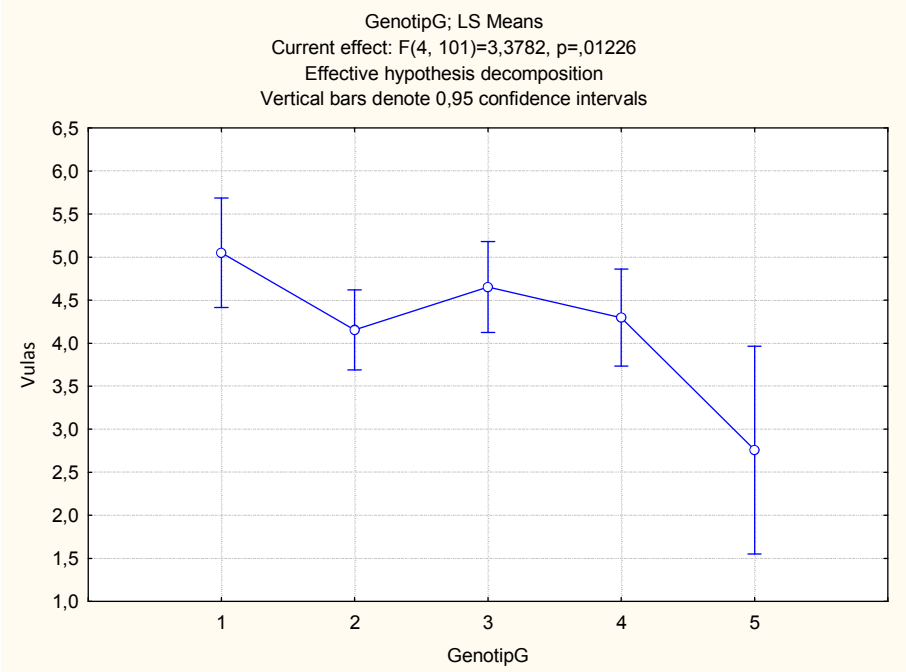
Analizom varijance nađena je statistički je značajna razlika među genotipskim varijantama u vremenu postizanja ciljnog INR (p=0,025).
Ciljni INR za cijelu FG skupinu postignut je za 4,394 dana (SD 1,421; 95% CI 4,12 do 4,667, a najprije ga je postigao homozigotni genotip sa polimorfizmom za obje alelne varijante VKORC1TT i CYP*3/*3 (prosječno 1,35), potom genotip homozigota za alelne varijante VKORCl uz heterozigotnu varijanta sa alelom *3 u CYP2C9 genotipu (VKORCl TT, CYP2C9 wt/*3 prosječno 2,182), a najsporije je postizao homozigotni „divlji“ genotip za oba gena VKORC1CC,CYP2C9 wt/wt za 5,05 dana (SD 1,17, 95% CI 4,47 do 5,634), što je prikazano na slici 4.2.1.7.1.



Slika 4.4.1.7.1. Raspodjela prosječnog vremena (y=dani) ulaska u ciljni INR ovisno o alalnim varijantama VKORC1 i CYP2C9 (p=0,025)

Tablica 4.4.1.7.1.Prosječno vrijeme ulaska u ciljni INR ovisno genotipu (p=0,0122)

	Skupina genotipa	N	Vulas - AS	Vulas - Std.Dev.	Vulas - -95,00%	Vulas – +95,00%
ukupno		106	4,394	1,421	4,120	4,667
Genotip I	CC,wt/wt	18	5,050	1,175	4,466	5,634
Genotip II	CC,w/*2,wt/*3,*2/*2	34	4,154	1,145	3,755	4,554
Genotip III	CT,TT,wt/wt	26	4,653	1,499	4,047	5,258
Genotip IV	CT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3	23	4,296	1,648	3,584	5,009
Genotip V	TT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3	5	2,759	1,041	1,466	4,051



Slika 4.4.1.7.2. Prosječno vrijeme ulaska (V-ulas/dani) u ciljni INR ovisno o kombinaciji genotipova: 1) CC,wt/wt; 2) CC,w/*2,wt/*3,*2/*2; 3) CT,TT,wt/wt ; 4) CT,wt/*2,wt/*3, *2/*2,*2/*3, *3/*3; 5) TT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3 (p=0,0122)

Nađena je statistička je značajnost primjenom metode linearne interpolacije i analizom varijance (p=0,0122) među skupinama genotipova u vremenu postizanja ciljnog INR, što je prikazano na na slici 4.4.1.7.2.

U ciljni INR najprije dolazi 5. skupina genotipova sa homozigotnim alelnim varijantama VKORC1TT i alelnim varijantama CYP2C9 (*2,*3), već za 2,75 dana (SD 1,041; 95%CI 1,466-4,501) od početka terapije, potom za 4,15 dana (SD 1,145; 95%CI 3,755-4,554) je u ciljni INR ušla skupina 2. sa homozigotom za „divlji“VKORC1CC i alelnim varijantama CYP2C9 (*2,*3). Za 4,29 (SD 1,648) dana ciljni INR dostiže skupina 4. (heterozigotne alelne varijante VKORC1 i heterozigotne alelne vrijante CYP2C9), a najsporije grupa 1. sa homozigotima za „divlje tipove VKORC1CC,CYP2C9 wt/wt za 5,05 dana (SD 1,175) što prikazuje tablica 4.4.1.7.1

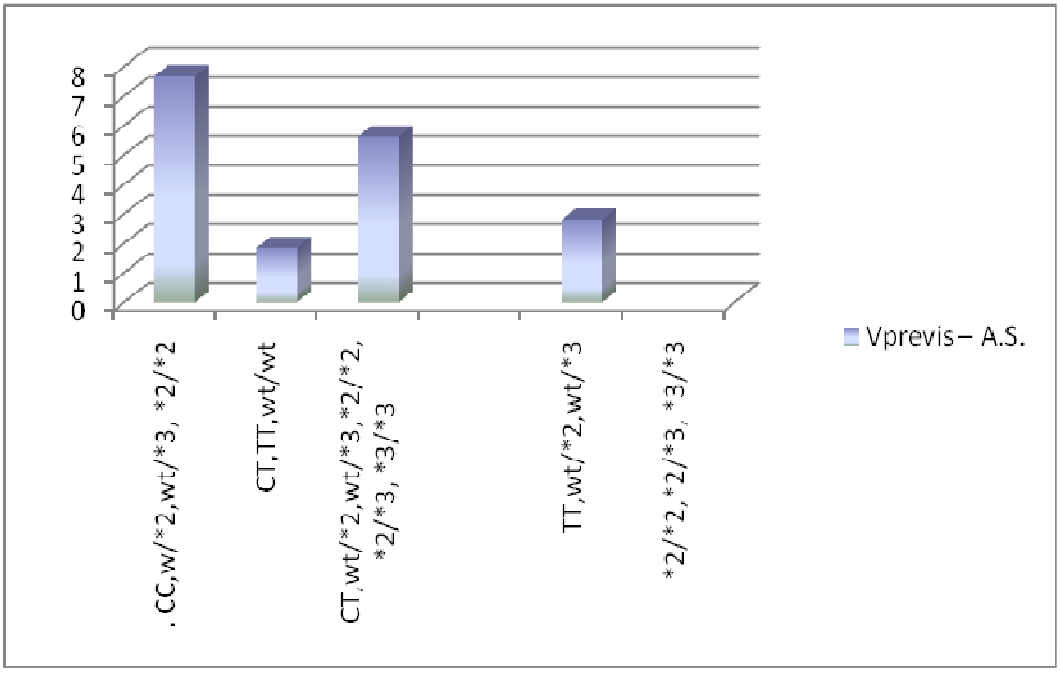
4.4.1.8. Distribucija prosječnog vremena u iznadterapijskom INR ovisno o genotipu

Tablica 4.4.1.8.1. Vrijeme provedeno u iznadterapijskomINR>3,1 ovisno o genotipu
(Kruskal-Wallis test: H (13, N=106)=18,42; p=0,1422)

	Genotip	N	Vprevis –AS	Vprevis - S.D.	Vprevis – -95,00%	Vprevis – +95,00%
Ukupno		8	5,575	3,840	2,4	8,79
Genotip	2.CC,wt/*2	2	9,989	4,826	-33,4	53,35
Genotip	5.CC,*2/*2	1	3,076			
Genotip	6.CT,wt/wt	1	1,852			
Genotip	7.CT,wt/*2	1	3,327			
Genotip	8.CT,wt/*3	2	6,778	2,295	-13,8	27,40
Genotip	15.TT,*2/*3	1	2,811			

Prosječno vrijeme provedeno u iznadterapijskom rasponu INR >3,1 za FG skupinu je iznosilo 5,575 dana (SD 3,84;95%CI 2,5-8,78) što se vidi na tablici 4.4.1.8.1.

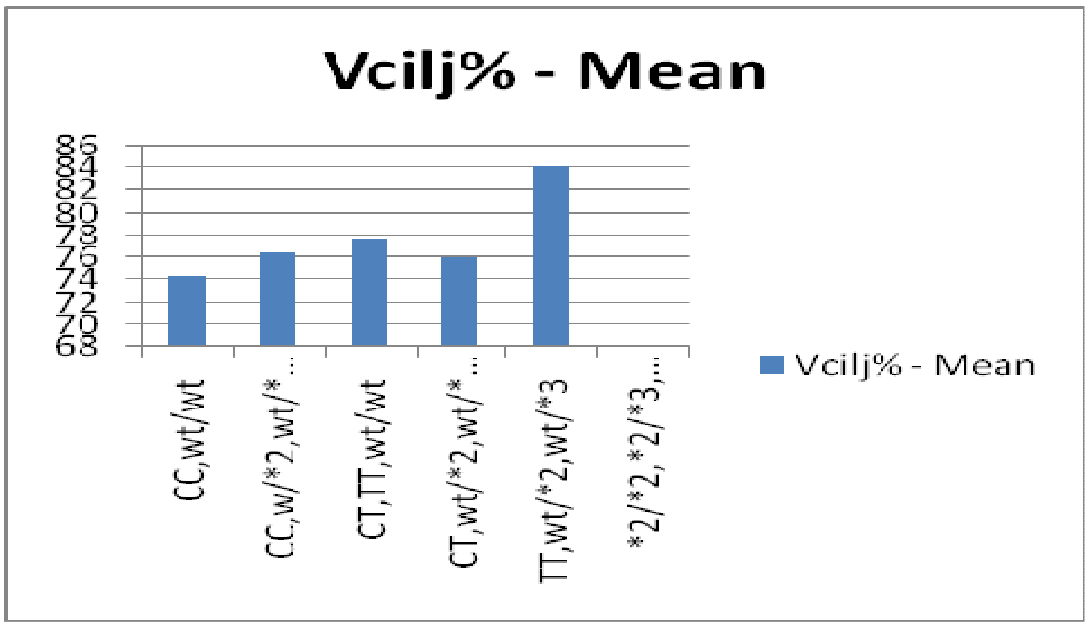
Za usporedbu distribucije vremena provedenog u iznadterapijskom INR>3,1 između alelnih varijanti genotipova koristio se Kruskal-Wallisov test (ANOVA). Iznadterapijski INR>3,1 najčešće je postizan u genotipu VKORC1CC CYP2C9wt/*2 koji je najduže proveo u iznadterapijskom INR od prosječno 9,98 dana (SD 4,86). Jednaka učestalost postiznja iznadterapijskog INR je bila u heterozigotnom genotipu za alelne varijante VKORC1 1173CT CYP2C9 wt/*3 sa nešto kraćim vremenom od 6,778 (SD 2,295) dana, te u genotipovima sa bar jednom alelnom varijantom za VKORC1 ili CYP2C9 koji su bili iznad tearapijskog raspona INR u trajanju od 1,8 do 3,3 dana.
Usporedbom distribucije vremena u iznadterapijskom INR između skupina genotipova primjenom Kruskal-Wallisova testa u odnosu na sve pacijente raspoređene u skupine genotipova, nije se našla statistički značajna razlika među njima vjerojatno zbog malog broja pacijenata unutar skupina koji su postigli INR >3,1 (p=0,247). No uvidom u dijagram na slici 4.4.1.8.1. razvidno je da je najduže vremena u iznadterapijskom INR>3,1 provela skupina genotipova 2. sa alelnim varijantama CYP2C9 (wt/*2,wt/*3,*2/*2) od 7,685 (SD 5,251) dana, a ta skupina genotipova je i najčešće



Slika.4.4.1.8.1.Vrijeme provedeno u iznadterapijskom INR > 3,1 ovisno o skupinama genotipova: 2. CC,w/*2,wt/*3,*2/*2; 3. CT,TT,wt/wt ; 4. CT,wt/*2,wt/*3, *2/*2,*2/*3, *3/*3; 5. TT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3 (Kruskal-Wallis test: H (3, N=8)=4,111;p=0,249

postizala iznadterapijski INR. Jednakom učestalošću iznadterapijski INR>3,1 je postizan i u skupini genotipova 4. sa jednom alelnom varijantom VKORC1 i alelnim varijantama CYP2C9 (CT, wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2,*3) sa nešto kraćim vremenom od 5,68 (SD 2,57) dana iznad terapijskog INR>3,1. Skupina 1. genotipova sa „divljim“ varijantama wt/wt/CC nije bila u iznadterapijskom rasponu.
Podaci upućuju na najveću ulogu alelnih varijanti CYP2C9 u postizanju iznadterapijskog INR.

4.4.1.9. Distribucija vremena unutar terapijskog INR ovisno o skupini genotipova

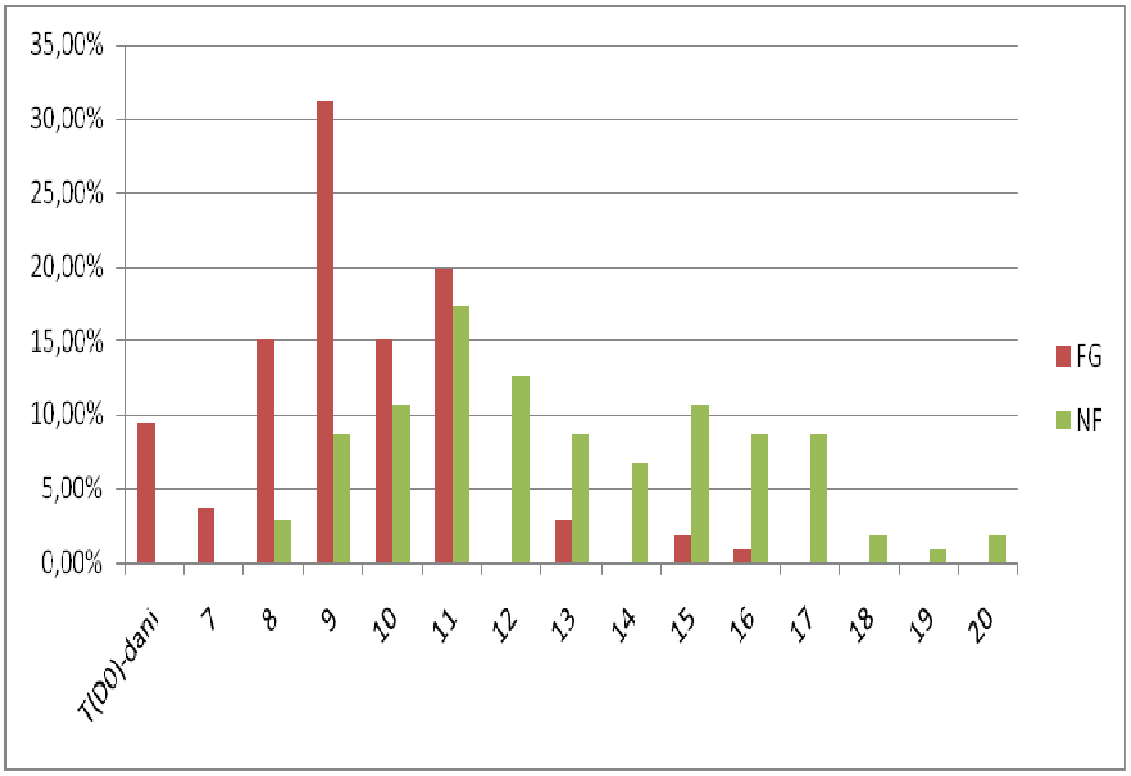


Slika 4.4.1.9.1. Prosječna proporcija vremena unutar ciljnog INR ovisno o skupini genotipova (na y-osi % vremena u ciljnom rasponu INR Vcilj, na X-osi grupe genotipova: I. CC,wt/wt; II. CC,w/*2,wt/*3,*2/*2; III. CT,TT,wt/wt ; IV. CT,wt/*2,wt/*3, *2/*2,*2/*3, *3/*3; V. TT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3 (p=0,370).

Primjenom $\chi 2$ za usporedbu proporcije vremena provedenog unutar ciljnog terapijskog raspona INR za cijelu FG skupinu je dobiven udio od 76,6% (SD 9,76) vremena što je razvidno iz slike 4.2.1.9.1. Najdulje vremena u terapijskom rasponu INR je provela V skupina genotipova sa homozigotom za alelne varijante VKORC1 i polimorfizmom alela CYP2C9 (wt/*2, wt/*3, *2/*2,*2/*3, *3/*3) od 84,19% (SD 3,94 ; 95%CI 79,29

do 89,08) vremena, a najkraće „divlji“ homozigot za VKORC1 1173 CC CYP2C9wt/wt od 74,32% (SD 10,13; 95% CI 69,28-79,36) vremena, ali analizom varijance nije ustanovljena statistički značajna razlika među skupinama (p=0,370).

4.4.1.10. Usporedba vremena potrebnog do postizanja stabilne terapijske doze između FG i NF skupine



Slika 4.4.1.10.1. Usporeba proporcije ispitanika u vremenu potrebnom za postizanje stabilne terapijske doze među FG i NF skupinom (p=0,000)

Primjenom $\chi 2$ testa za usporedbu proporcije ispitanika ovisno o vremenu potrebnom do postizanja stabilne terapijske doze nađena je statistički značajna razlika između FG i NF skupine (p=0,0000) što je prikazano na slici 4.4.1.10.1. Unutar sedam dana od primjene varfarina 9,43% ispitanika u FG skupini je postiglo stabilnu dozu, a u NF nijedan. Deveti dan u FG skupini je postiglo 15,9% ispitanika, a u NF skupini 2,88 % ispitanika. Deseti dan u FG skupini stabilnu dozu je postiglo 31,13% (ukupno do tada 59,5%)

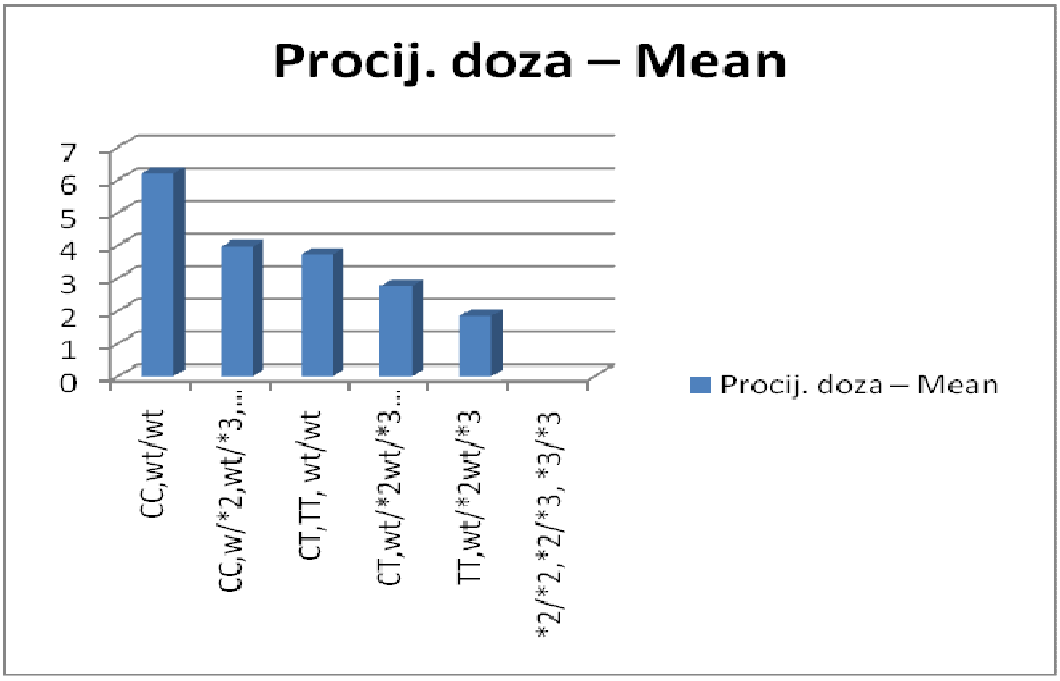
ispitanika, a u NF skupini 8,65 % (ukupno do tada 11,53%) ispitanika. Do dvanaestog dana je u FG skupini ukupno 94,3% ispitanika imalo stabilnu dozu za razliku od NF skupine sa svega 39,42% ispitanika. Nakon dva tjedna 97,1% ispitanika u FG skupini je postiglo stabilnu dozu, a u NF skupini 60,5%. Dvadeset i prvi dan svi ispitanici u FG skupini su primali stabilnu dozu, dok se u NF skupini ona nije uspjela postići u 1,92% ispitanika.

Upotrebom Studentova t- testa za usporedbu vremena potrebnog do postizanja stabilne doze održavanja i analizom varijance našla se statistički značajna razlika između FG i NF skupine (p=0,0049). FG skupinaje ranije postizala stabilnu dozu održavanja za što joj je trebalo 10,33 dana (medijan 10, IQR 9-12), a NF skupinaje stabilnu dozu održavanja postigla za 13,89 dana (medijan 13, IQR 12-16).

4.4.1.11. Raspodjela prosječno procijenjene doze uvođenja, prosječne doze uvođenja i doze održavanja ovisno o genotipu u FG skupini i usporedba sa NF skupinom

Tablica 4.4.1.11.1. Prosječna procijenjena doza uvođenja (mg) ovisno o skupini genotipova

	Grupa genotipa	N	Procij. doza AS	Procij.doza – S.D.	Procij. doza - 95,00%	Procij. doza - +95,00%
Total		106	3,92	1,48	3,63	4,20
GenotipI	CC,wt/wt	18	6,19	0,88	5,76	6,63
GenotipII	CC,w/*2,wt/*3, *2/*2	34	3,96	0,93	3,64	4,29
GenotipIII	CT,TT, wt/wt	26	3,71	1,01	3,30	4,12
GenotipIV	CT,wt/*2wt/*3 ,*2/*2, *2/*3, *3/*3	23	2,75	0,79	2,41	3,09
GenotipV	TT,wt/*2wt/*3 *2/*2,*2/*3, *3/*3	5	1,84	0,50	1,22	2,46



Slika 4.4.1.11.1. Prosječno procijenjena doza (mg) uvođenja ovisno o skupini genotipova 1) CC,wt/wt; 2) CC,w/*2,wt/*3,*2/*2; 3) CT,TT,wt/wt ; 4) CT,wt/*2,wt/*3, *2/*2,*2/*3, *3/*3; 5) TT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3

Najnižu procijenjenu dozu uvođenja od 1,84 mg je trebala skupina genotipova sa homozigotnom alelnom varijantom VKORC1TT i polimorfizmom alelnih varijanti CYP2C9 (TT,wt/*2, wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3), a najvišu od 6,19 mg varfarina „divlji“ homozigot za oba gena VKORC1CC, CYP2C9wt/wt.

Analizom varijance procjenjene doze su se između skupina genotipova statistički značajno razlikovale sa p=0,0000. Nalazi prosječnih procijenjenih doza za skupine genotipova su prikazani na tablici 4.4.1.11.1 i slici 4.4.1.11.1.

U NF skupini procjena doze nije rađena budući je doza uvođenja bila fiksna i iznosila 6 mg i primijenjivala se kroz dva dana, osim u trojice bolesnika koji su primali amiodarone. Njima smo uvodili 25% nižu dozu od 4,5 mg, a potom tijekom praćenja za sve bolesnike dozu prilagođavali ovisno o postignutim vrijednostima INR.

Prosječna doza uvođena je primjenom „mini loading“ doze nakon farmakogenetičkim algoritmom procijenjene doze za genotip II,III,IV i V tijekom dva dana, a primjenom duple procijenjene doze za homozigotni „divlji“ genotip VKORC1 1173 TT CYP2C9wt/wt.

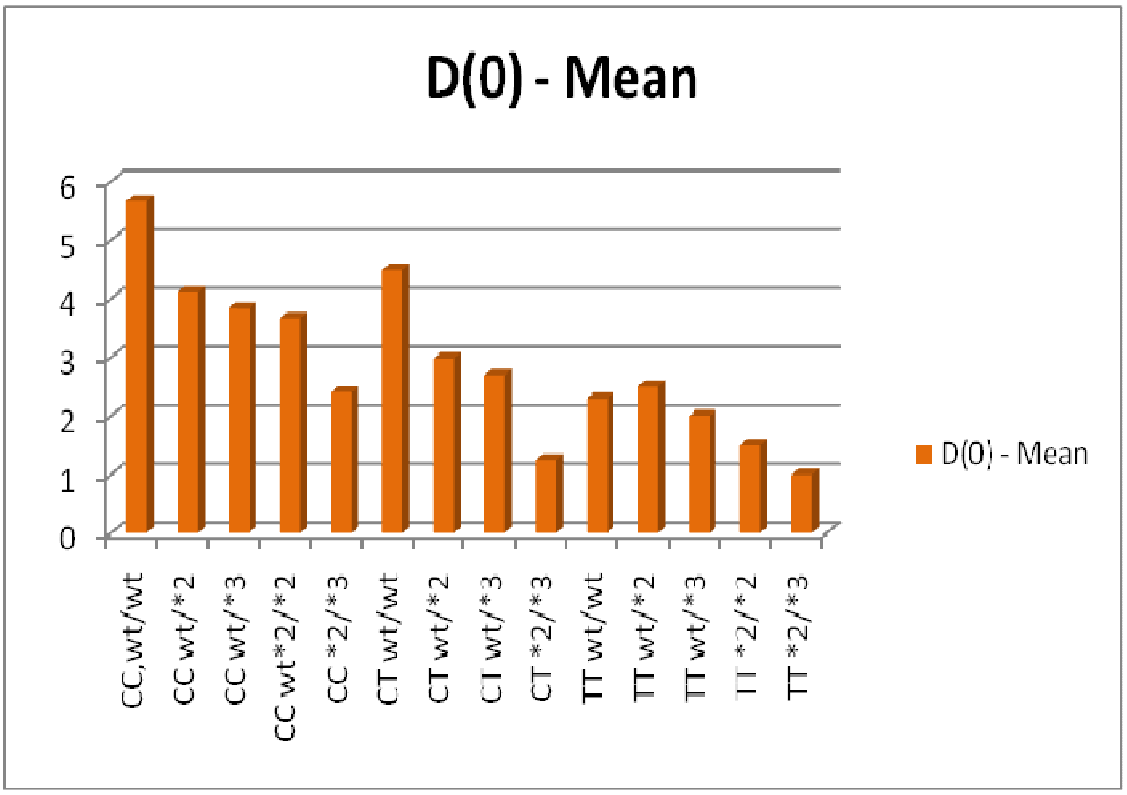
Tablica 4.4.1.11.2. Prosječna doza uvođenja varfarina ovisno o skupini genotipova

	Grupa genotipa	N	Du - AS	Du - S.D.	Du - - 95,00%	Du - +95,00%
Ukupno		106	6,21	1,98	5,82	6,59
Genotip I	CC,wt/wt	18	9,00	1,25	8,38	9,62
GenotipII	CC,w/*2,wt/*3, *2/*2	34	6,17	1,60	5,61	6,73
GenotipIII	CT,TT, wt/wt	26	6,00	1,45	5,41	6,59
GenotipIV	CT,wt/*2,wt/*3,*2/*2, *2/*3, *3/*3	23	4,73	1,20	4,21	5,24
GenotipV	TT,wt/*2,wt/*3 *2/*2,*2/*3, *3/*3	5	4,26	1,26	2,70	5,82

Doza uvođenja bila je najviša za „divlji“genotip iznoseći 9 mg (SD1,25, 95% CI 8,38-9,62), a najniža u skupini genotipa sa homozigotnom alelnom varijantom VKORC1 1173 TT i polimorfizmom alelnih varijanti CYP2C9 (TT,wt/*2, wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3), a koja je iznosila 4,26 mg (SD 1,26;95%CI 2,70-5,82) što se vidi na tablici 4.4.1.11.2.

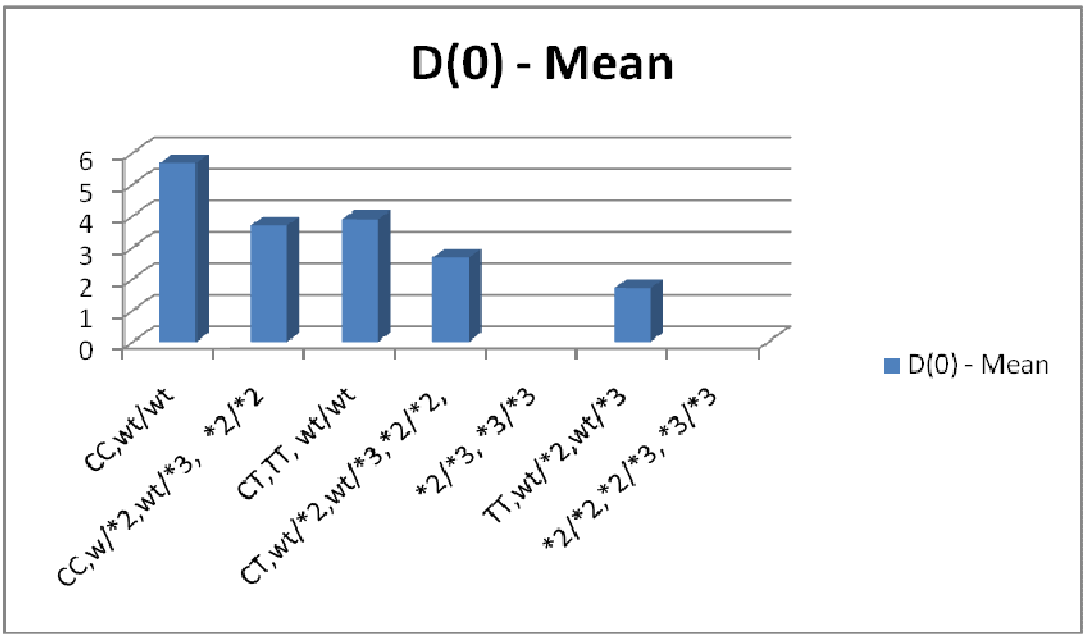
Tablica 4.4.1.11.3. prosječna doza održavanja ovisno o genotipu

VKORC1	CYP2C9	wt/wt	wt/*2	wt/*3.	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Ukupni broj / posj.doza(SD)							
CC		18 5,67(1,07)	14 4,11(1,20)	6 3,83(1,29)	9 3,69/1,30)	5 2,40(0,55)	0
CT		19 4,48(1,77)	8 2,98(0,85)	13 2,69(0,93)	0	2 1,25(0,35)	0
TT		7 2,29(0,76)	2 2,50	1 2,00	2 1,50	1 1,00	0



Slika 4.4.1.11.2. prosječna doza održavanja ovisno o genotipu (Y doza u mg, x-genotip)

Prosječna dnevna doza održavanja u FG skupini je iznosila 3,76 mg (SD 0,16; 95%CI 3,44-4,08). Genotipovi su se međusobno statistički značajno razlikovali u potrebi dnevne doze održavanja sa značajnošću od p=0,000. Najnižu dozu je zahtijevao genotip VKORC1 1173 TT CYP2C9*2/*3 od 1 mg dnevno, potom genotip sa svim homozigotnim alelnim varijantama VKORC1 1173 TT uz alelne varijante CYP2C9 (wt/*3, *2/*2), te heterozigot VKORC1 CT uz obje alelne varijante CYP2C9*2/*3 sa dnevnom dozom održavanja od 1,25mg (SD 0,35; 95%CI-1,93 do 4,43).



Slika 4.4.1.11.3. Prosječna doza održavanja ovisno o skupini genotipova

Prosječna doza održavanja od 1,70 mg je bila najniža u V skupini genotipova sa homozigotima za alel VKORC1TT i polimorfizmom alelnih varijanti CYP2C9 (VKORC1 1173TT CYP2C9 wt/*2, wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3) te IV grupi genotipa (VKORC1 CT CYP2C9 wt/*2wt/*3 ,*2/*2, *2/*3, *3/*3) kojoj je prosječno dnevno trebalo 2,67 mg. Najvišu dnevnu dozu održavanja od 5,67mg je zahtijevao "divlji" genotip VKORC1 1173 CC CYP2C9wt/wt.

Tablica 4.4.1.11.4. Omjer između procijenjene doze i doze održavanja ovisno o skupini genotipova

	Grupa genotipa	N	Dp-D(0) – A.S.	Dp-D(0) S.D.	Dp-D(0) - 95,00%	Dp-D(0) - +95,00%
ukupno		106	0,16	0,76	0,01	0,31
Genotip I	CC,wt/wt	18	0,53	0,49	0,28	0,77
Genotip II	CC,w/*2,wt/*3, *2/*2	34	0,27	0,67	0,04	0,51
Genotip III	CT,TT, wt/wt	26	-0,18	1,13	-0,64	0,27
Genotip IV	CT,wt/*2,wt/*3,*2/*2,*2/*3, *3/*3	23	0,09	0,40	-0,09	0,26
Genotip V	TT,wt/*2,wt/*3 *2/*2,*2/*3, *3/*3	5	0,14	0,35	-0,30	0,58

Usporedbom procijenjene inicijalne doze (Dp) i doze održavanja (Do) između skupina genotipova nije se našlo statističke značajnosti (p=0,3108). Za cijelu FG skupinu prosječni omjer procijenjene doze (Dp) i stabilne doze održavanja (Do) iznosio je 0,16 (SD 0,07; 95% CI 0,01-0,31. Skupina genotipova III sa“divljim“ homozigotom CYP2C9wt/wt i alelnim varijantama VKORC1 1173TT i CT iziskivao je nešto nižu dozu od procijenjene, omjer -0,18, (SD 1,13; 95%CI -0,64 do 0,27), dok je omjer bio najveći za homozigotne „divlje varijante VKORC1CC,CYP2C9wt/wt od 0,53 (SD 0,49; 95%CI 0,28-0,77).

Tablica 4.4.1.11.5. Omjer između doze uvođenja i doze održavanja u FG skupini

	Grupa genotipa	N	Du-D(0) – A.S.	Du-D(0) - S.D.	Du-D(0) - - 95,00%	Du-D(0) - +95,00%
Ukupno		106	2,45	1,03	2,25	2,65
Genotip I	CC,wt/wt	18	3,33	0,71	2,98	3,68
Genotip II	CC,w/*2,wt/*3, *2/*2	34	2,48	0,99	2,13	2,83
Genotip III	CT,TT, wt/wt	26	2,11	1,23	1,61	2,61
Genotip IV	CT,wt/*2,wt/*3,*2/*2, *2/*3, *3/*3	23	2,06	0,56	1,82	2,30
GenotipV	TT,wt/*2,wt/*3 *2/*2,*2/*3, *3/*3	5	2,56	1,17	1,11	4,01

Omjer doze uvođenja (Du) i doze održavanja (Do) za FG skupinu iznosio je 2,44 (medijan 2,5, IQR2-3), a analiza varijance iskazala je statistički značajnu razliku sa p= 0,00036 (proistekla razlika je poslijedična uvođenju „mini loading“ doze).
U NF skupini omjer doze uvođenja (Du) i doze održavanja (Do) je iznosio 1,902 (medijan 2,00, IQR 00,00-4,00), uz analizom varijance dobivenu statistički značajnu razliku sa p=0,0000.

4.4.1.12. **Raspodjela korektno procijenjene doze između FG i NF skupine**

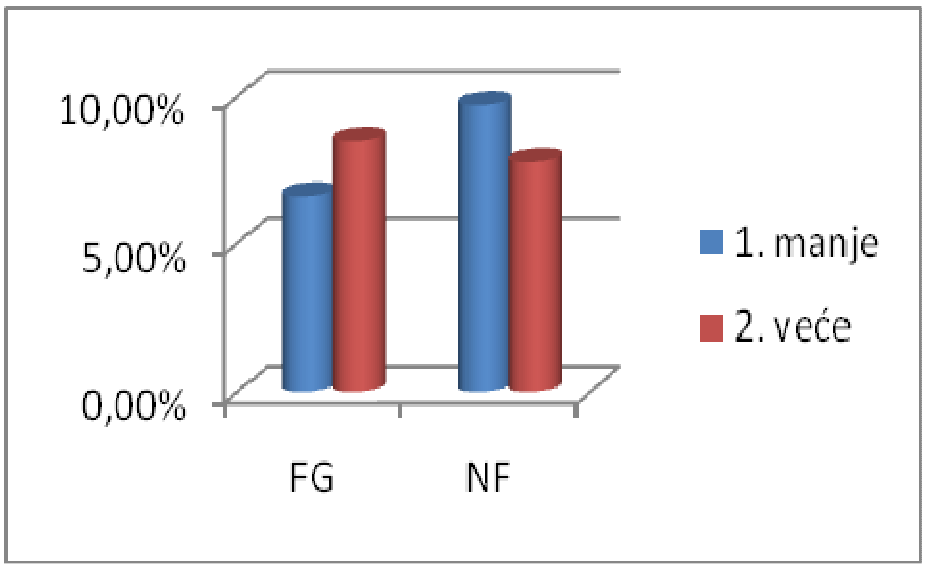
Tablica 4.4.1.12.1. Raspodjela ispitanika (%) koji su iziskivali višu ili nižu dozu od prosječne među FG i NF skupinom; korektno procijenjeni (%) ispitanici koji su iziskivali dozu <3 mg ili > 6mg u FG skupini

DOZA	**≤3 mg**		**≥6 mg**	
Skupina	**FG**	**NF**	**FG**	**NF**
Broj (%) pacijenata procijenjen da treba ekstremnu dozu	40 (37,7)	0 (0)	15 (14,2)	104 (100)
Broj (%) pacijenata koji aktualno zahtijeva ekstremnu dozu	50 (47,2)	45 (43,3)	15 (14,2)	27 (26,0)
Broj (%) pacijenata korektno procijenjenih da zahtijeva ekstremnu dozu	39 (97,5)	-	14 (93,3)	25 (24,0)

U FG skupini je procijenjeno da 37,7% od ukupno 106 bolesnika iziskuje nižu dozu od od 3 mg dnevno (21 mg tjedno) te 14,2% bolesnika koji iziskuje višu dozu od 6 mg dnevno (iznad 42 mg tjedno). U komparaciji sa aktualnim zahtijevima među njima je korektno je procijenjeno 97,5% bolesnika koji su iziskivali nižu dnevnu dozu, a u komparaciji sa ukupnim brojem koji su aktualno zahtijevali nižu dozu korektno je procijenjena doza za 78% bolesnika. Od onih koji su zahtijevali višu dozu korektno je procijenjeno 93,3% bolesnika. Od ukupno 61% bolesnika koji su aktualno iziskivali više ili niže doze od uobičajenih korektno smo procijenjenili dozu za 81,5% bolesnika. U NF skupini aktualno je 43% bolesnika primalo nižu dozu od 3 mg, a 26% koji su primali višu dozu od uobičajene (ukupno 69% u NF skupini je iziskivalo veću ili manju dozu od uobičajene).

4.4.1.13. Raspodjela učestalosti komplikacija između FG i NF skupine

Između FG i NF skupina nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti pojave komplikacija (p=0,7089). Od ukupnog broja od 210 ispitanika 34% je razvilo komplikacije sa podjednakim udjelom od 8,09% manjih ili većih komplikacija.U FG skupini ukupno je 16 ispitanika (15,09%) razvilo komplikacije od čega 6,60% (ukupno 7 ispitanika) manje, a 8,49% (9 ispitanika) veće komplikacije (slika 4.4.1.13.1.).



Slika 4.4.1.13.1. Učestalost komplikacija među FG i NF skupinom (χ2=0,688; df=2; p=0,7089)

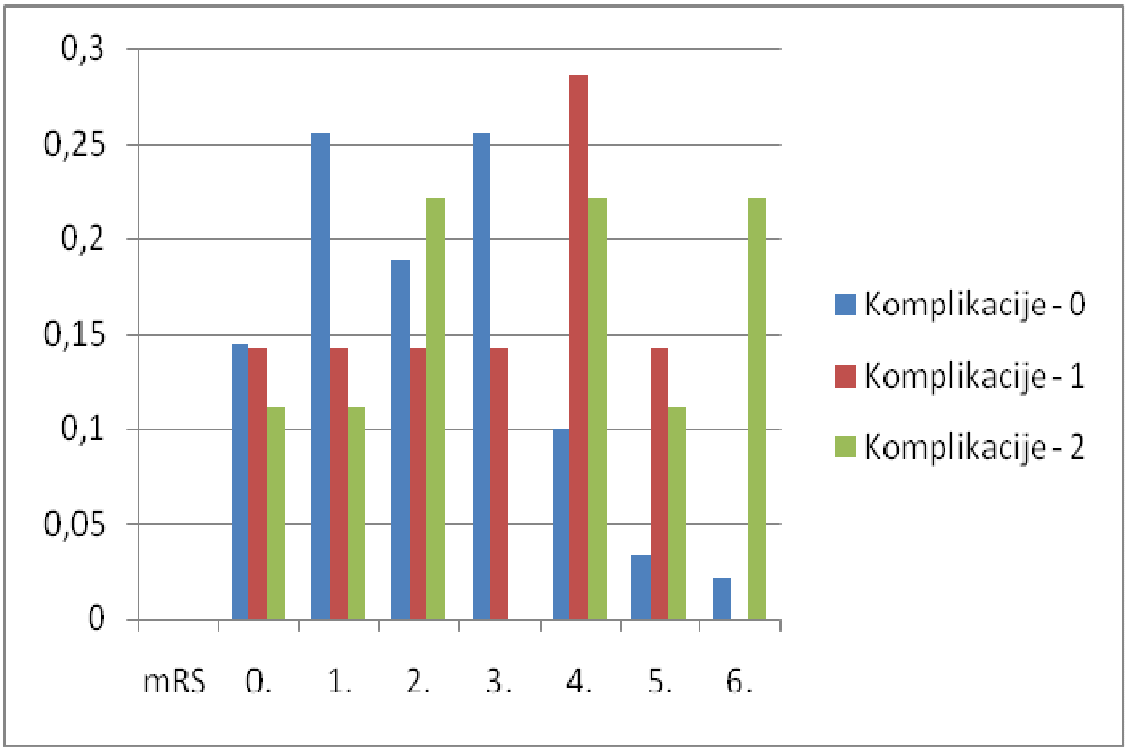
Tablica 4.4.1.13.1. Učestalost blažih komplikacija u FG skupini ovisno o genotipu

VKORC1	CYP2C9	wt/wt	wt/*2	wt/*3.	*2/*2	*2/*3	*3/*3
1.Manje komplikacije							
CC		1	0	0	1	0	0
CT		0	1	2		1	
TT		0	0	0	1	0	

Tablica 4.4.1.13.2. učestalost težih komplikacija u FG skupini ovisno o genotipu
a. podskupina- teže komplikacije koje nisu iziskivale prekidanje varfarina
b. podskupina- teže komplikacije koje su iziskivale ukidanje varfarina

VKORC1	CYP2C9	wt/wt	wt/*2	wt/*3.	*2/*2	*2/*3	*3/*3
2.Veće komplikacije							
CC		1a	1a	0	1a	1a	0
CT		1a	0	1a		0	
TT		2 a	0	0	0	1b	

Komplikacije su bile nešto češće među nosiocima alelnih varijanti CYP2C9 (68,9%) u odnosu na nosioce alelnih varijanti VKORC1 (62,5%) s tim da su teže komplikacije (2a i 2b) bile češće među alelnim varijantama VKORC1 (62,5%) i nosiocima obje defektne alelne varijante CYP2C9 *2 i *3 (37,5%) ali bez statističke značajnosti među genotipovima (p=0,698), što je prikazano na tablici 4.4.1.13.2.
Među bolesnicima sa većim krvarenjima (2a podskupina), trojica su imala diskretnu hemorašku tranziciju infarktne zone potvđenu nalazom MSCT mozga bez kliničkog pogoršanja te se nije prekidala terapija varfarinom već se prilagođavala doza uz praćenje kliničkih parametara, MSCT mozga i INR. U četvoro bolesnika (2a.podskupina) sa mikrohematurijom i jednom bolesnicom sa blažim vaginalnim krvarenjem također nismo ukidali varfarin zbog procjene većeg rizika od tromboemboličkih incidenata zbog neprimjene lijeka. U četvoro bolesnika INR je bio u terapijskom rasponu, a u troje INR > 3,1 i oni su imali alelne varijante CYP2C9.
Bolesnik kojem smo ukinuli terapiju varfarinom (2b podskupina) unatoč INR u terapijskom rasponu (INR 2,5) razvio je opsežno gastrointestinalno krvarenje trećeg dana nakon završenog praćenja u studiji, a tijekom bolničkog liječenja (genotip VKORC1 1173TT CYP2C9*2/*3) te je primijenjena terapija 20 mg K vitamina i.v uz infuziju 690 ml svježe smrznute plazme bez potrebe za transfuzijom uz dobar naknadni



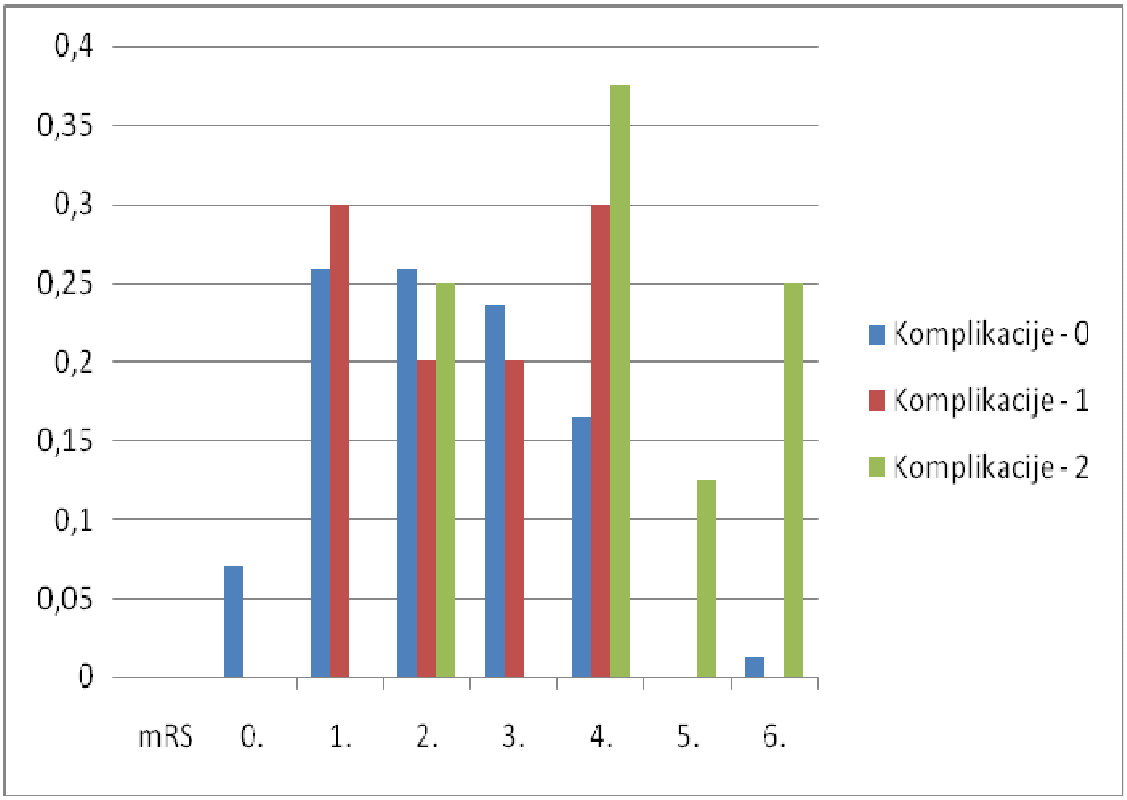
Slika 4.4.1.13.2. Proporcija bolesnika ovisno o težini neurološkog deficita pri otpustu u FG skupini (y) iskazanog mRS (x os) ovisno o komplikacijama; $\chi 2=17,87$; df=12; p=0,1198

klinički oporavak. Jedna bolesnica je dvadeset i petog dana bolničkog liječenja umrla zbog komplikacija sa razvojem opsežne obostrane aspiracijske pneumonije.

U FG skupini nismo našli povezanost neurološkog deficita pri otpustu sa pojavom komplikacija što je prikazano na slici 4.4.1.13.2. Težina neurološkog deficita pri otpustu iskazana mRS u FG skupini nije bila statistički značajna u korelaciji sa pojavom komplikacija iskazana primjenom Spermanova koeficijenta korelacije (rho 0,189765).

U NF skupinii je 18 ispitanika (17,47%) razvilo komplikacije od čega 9,71% (10 ispitanika) blaže, a 7,77% (8 ispitanika) teže komplikacije. Među bolesnicima sa težim komplikacijama troje je razvilo blažu hemorašku tranziciju infaktne zone bez kliničkog pogoršanja potvrđenu nalazom MSCT mozga te je nastavljena terapija varfarinom kao i u trojice pacijenata sa mikrohematurijom (2a podgrupa) uz praćenje INR i prilagodbu doze. U trojice pacijenata je ciljni INR bio u iznadterapijskom rasponu INR>3,1, a ostali su bili unutar terapijskog raspona INR. Jedan je pacijent devetnaesti dan od primjene varfarina razvio opsežno intracerebralno krvarenje sa kliničkim pogoršanjem. Unatoč ukinuću varfarina i primijenjenom liječenju K-vitaminom i svježe smrznutom plazmom treći je dan od razvoja ICH umro. Smrtni ishod je bio i u jedne pacijentice sa

mehaničkim valvulama četvrti dan nakon završetka studije zbog opsežnog abdominalnog krvarenja posljedičnog rupturi abdominalne aneurizme potvrđene nalazom obdukcije. Smrtni ishod u jednog bolesnika je bio uzrokovan urosepsom nakon završetka studije, no to nismo uzimali u procjenu ishoda posljedičnog primjeni varfarina.



Slika 4.4.1.13.3. Proporcija bolesnika ovisno o težini neurološkog deficita pri otpustu iskazanog mRS u NF skupini ovisno o komplikacijama ($\chi 2$=34,22; df=12; p=0,0006)

U NF skupini statistički je bila značajna povezanost neurološkog deficita pri otpustu sa pojavom komplikacija (p=0,0006) što je prikazano na slici 4.4.1.13.3. Smrtni ishod (mRS 6) bio je u skupini sa pojavom težih komplikacija u dva slučaja, kao i teži neurološki deficit sa mRS 4 u skupini u kojoj je bilo tri manje komplikacije i tri veća krvarenja. Korelacija težine deficita pri otpustu sa pojavom komplikacija potvrđena je i primjenom Spearmanova koeficijenta korelacije gdje rho iznosi 0,2617. Smrtni ishod (mRS 6) je bio u 4 ispitanika među obje naše ispitivane skupine od čega u dva bolesnika (1,88%) povezan sa primjenom varfarina i pojavom većih komplikacija u NF skupini.

Tablica 4.4.1.13.3. Pojava komplikacija ovisno o postotku vremena (Vcilj %) provedenog u ciljnom rasponu INR u FG i NF skupini

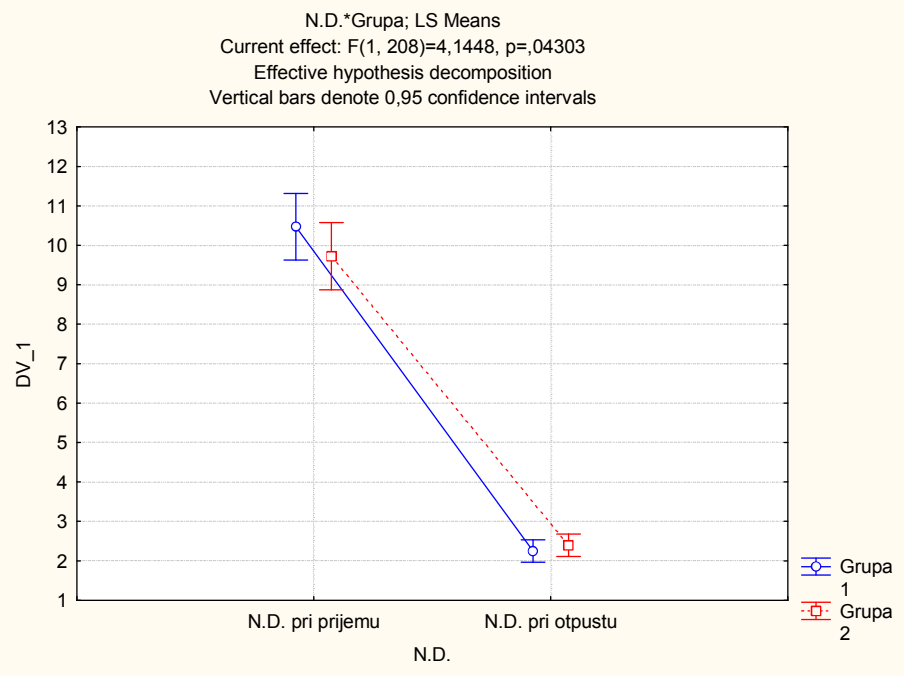
FG/ V cilj%	Kompl.	N	Vcilj% - AS	Vcilj% - S.D..	Vcilj% - -95,00%	Vcilj% +95,00%
Total		106	76,63	9,76	74,75	78,51
Komplikacije	0	90	76,82	10,04	74,71	78,92
Komplikacije	1	7	78,26	5,84	72,86	83,66
Komplikacije	2	9	73,50	9,49	66,20	80,79
	Kompl.	N	**Vcilj% - AS**	**Vcilj% - S.D..**	**Vcilj% - -95,00%**	**Vcilj% - +95,00%**
NF/ V cilj %		103	67,01	12,94	64,48	69,54
Komplikacije	0	85	67,64	12,50	64,94	70,33
Komplikacije	1	10	63,54	16,45	51,77	75,30
Komplikacije	2	8	64,70	13,72	53,23	76,18

Analizom varijance nije nađena statistički značajna razlika među skupinama u pojavi komplikacija povezana sa proporcijom vremena provedenog u ciljnom terapijskom rasponu INR (za FG skupinu p=0,565, za NF skupinu p=0,560), mada se pojava većih komplikacija u obje skupine javljala u onih ispitanika koji su proveli više vremena izvan terapijskog raspona INR (u FG skupini 9,59%, u NF skupini 9,65% više vremena) što je prikazano na tablici 4.4.1.13.3.

4.4.1.14. Raspodjela ispitanika prema težini neurološkog deficita pri prijemu i pri otpustu između FG i NF skupine

Tablica 4.4.1.14.1. Neurološki deficit pri prijemu (NIHSS) i pri otpustu (mRS) između FG i NF skupine

FG grupa	N	A.S.	-95% CI	+95% CI	Median	Minim	Maxim	IQR		SD
N.D. prijemu NIHSS	106	10,472	9,5070	11,436	9,0000	3,0000	24,000	6,0000	14,000	5,0090
N.D. pri otpustu mRS	106	2,245	1,9401	2,550	2,0000	0,0000	6,000	1,0000	3,000	1,5845
NF grupa	**N**	**A.S.**	**-95% CI**	**+95% CI**	**Median**	**Minim**	**Maxim**	**IQR**		**SD**
N.D. pri prijemu NIHSS	104	9,721	**9,002**	10,44	9,000	3,000	18,000	7,000	12,00	3,6988
N.D. pri otpustu mRS	104	2,394	2,128	2,66	2,000	0,000	6,000	1,000	3,00	1,368



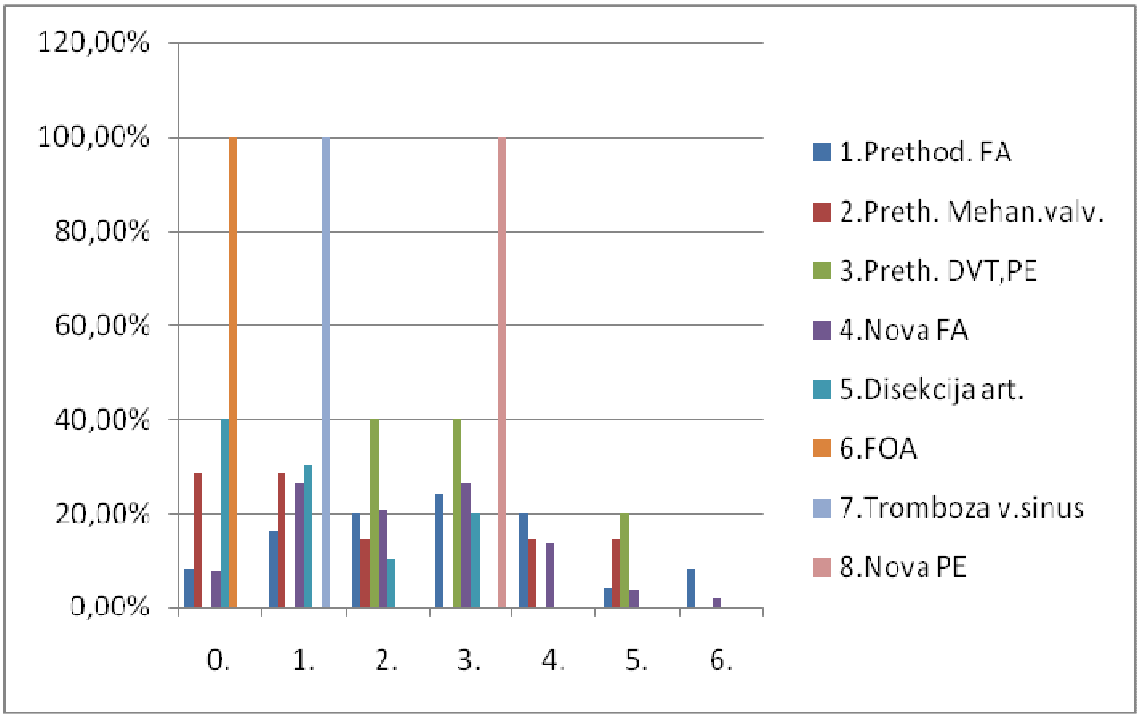
Slika 4.4.1.14.1. Neurološki deficit pri prijemu i pri otpustu između FG i NF skupine (p=0,0430)

Neurološki deficit pri prijamu iskazan upotrebom NIHSS skale za FG skupinu je iznosio 10,472 (medijan 9, IQR 6,00-14,00), a u NF skupini 9,721 (medijan 9,IQR 7,00-12,00). Rezidualni neurološki deficit pri otpustu iskazan primjenom mRS u FG skupini je iznosio 2,245, a za NF skupinu 2,394, uz medijan 2 za obje skupine (IQR od 1,00-3,00), što je prikazano na tablici 4.4.1.14.1.

Usporedbom neurološkog deficita pri prijamu iskazanog NIHSS skalom i pri otpustu iskazanog mRS skalom između FG i NG skupine korištenjem analize varijance (ANOVA) našla se statistički značajna razlika sa boljim oporavkom u FG skupini na razini statističke značajnosti od p= 0,0430, što je razvidno iz slike 4.4.1.14.1.

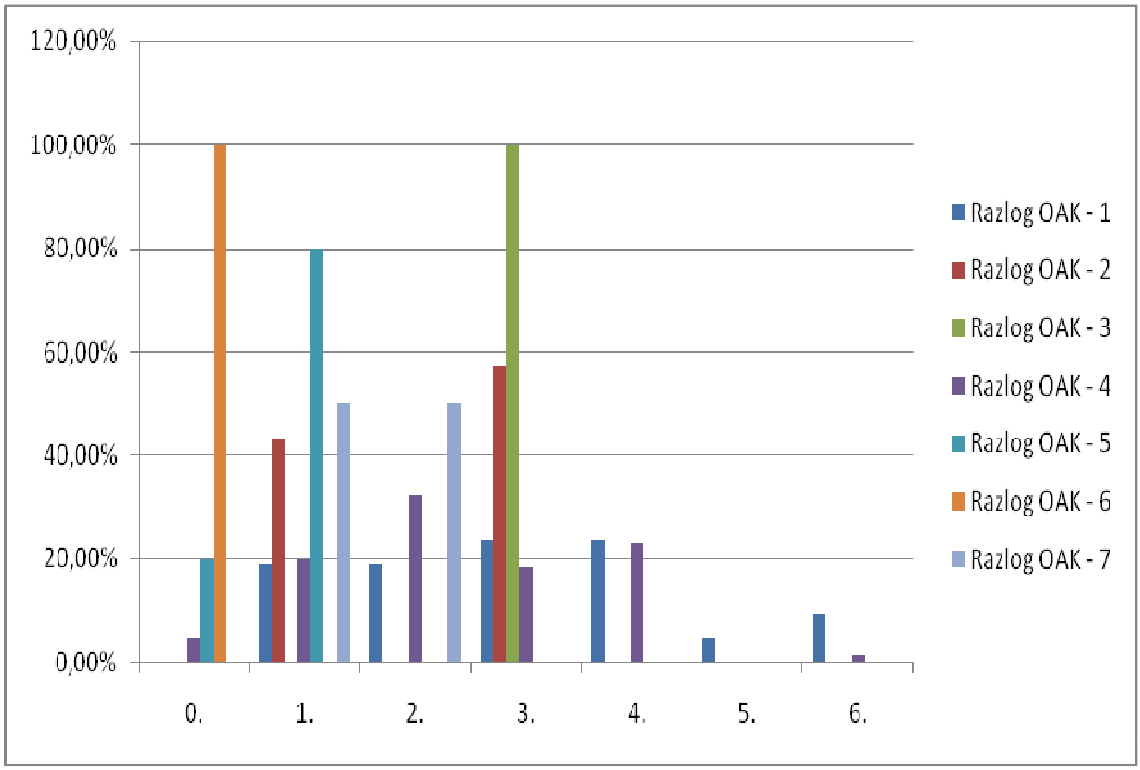
Usporedbom među dobnim skupinama za sve ispitanike primjenom $\chi 2$-testa nije se našlo povezanosti između neurološkog deficita pri otpustu iskazanog mRS sa dobi ispitanika (p= 0,1562), mada su se svi smrtni ishodi desili u dobi iznad 61 godine (u 42% u dobnoj skupini od 61-70god. i 42% u dobi od 71-80 godina).

Usporedbom dobnih skupina unutar FG skupine nije se našlo povezanosti na razini statističke značajnosti sa neurološkim deficitom pri otpustu (p=0,4445), kao niti usporedbom dobnih skupina unutar NF skupine (p=0,4103).



Slika 4.4.1.14.2. neurološki deficit pri otpustu (% mRS u podgrupi za terapiju varfarinom na y-osi) ovisno o razlogu za primjenu varfarina u FG skupini (na x osi mRS 0-6 i razlog za primjenu varfarina) $\chi 2$=53,871; df=42; p=0,103

Značajna statistička povezanost je nađena između kliničkog ishoda iskazanog primjenom mRS i razloga za uvođenje varfarina u terapiju među 210 ispitanika iz obje skupine (p=0,0000). Tako je od 21,9% ispitanika koji su prethodno antikoagulirani zbog FA njih 26,08% (odnosno 5,71% od 210 ispitanika) imalo teški neurološki deficit iskazan mRS 4 i 5, a 8,69% bolesnika je umrlo (1,9% ukupno). Među 56,1% bolesnika sa novootkrivenom FA, 20,3% (11,4% od ukupnog broja) imalo je teški deficit sa mRS 4 i 5 sa 1,7% smrtnih ishoda (0,95% od ukupnog broja). Najbolji oporavak sa mRS 0 i 1 bio je u 86,6% bolesnika sa disekcijom ekstrakranijskih krvnih žila.
U FG skupini se primjenom t-testa nije našla statistički značajna povezanost između razloga za primjenu varfarina i kliničkog ishoda pri otpustu (p=0,1037) što je prikazano na slici 4.4.1.14.2. Istovremeno smo našli značajnu povezanosti kliničkog ishoda i razloga za primjenu varfarina u NF skupini (p=0,0002) prikazane na slici 4.4.1.14.3.



Slika 4.4.1.14.3. Raspodjela neurološkog deficita pri otpustu (% mRS 0-6) ovisno i razlogu primjene OAK (varfarina) u NF skupini.: na x-osi mRS, na y osi % mRS ovisno o razlogu terapije 1.prethodna FA 2.prethodno mehaničke valvule 3.prethodna DVT ili PE 4.novootkrivena FA5.Disekcija arterija 6. FOA 7.Tromboza v.sinusa ($\chi 2$=74,50; df=36; p=0,0002)

Od 20,1% prethodno antikoaguliranih bolesnika sa FA u NF skupini je 9,5% umrlo (1,9% od ukupno 104 bolesnika), a u 28,57% je zaostao teški neurološki deficit (mRS 4 i 5). U 23,07% bolesnika od ukupno 62,5% sa novotkrivenom FA je zaostao teški neurološki deficit (mRS 4 i 5) sa 1,5% smrtnih ishoda (0,96% od ukupnog broja bolesnika). Dobar klinički oporavak sa mRS 0 (20%) i 1 (80%) je bio među bolesnicima sa disekcijom ekstrakranijskih arterija.

Upotrebom Spermanova koeficijenta korelacije nije se našlo statistiki značajne povezanosti između neurološkog deficita pri otpustu sa vremenom potrebnim za postizanje stabilne terapijske doze (rho= 0,09066), kao niti sa postotkom vremena provedenom u ciljnom terapijskom rasponu INR (rho = - 0,068093).

Spearmanov koeficijent korelacije nije ukazao na povezanost neurološkog deficita pri otpustu sa pojavom komplikacija u FG skupini (rho= 0,189765), za razliku od statistički značajne pozitivne korelacije između kliničkog ishoda pri otpustu i pojave komplikacija u NF skupini (rho=0,26171)

Poglavlje 5

5. RASPRAVA

Varfarin je danas najčešće korišteni peroralni antikoagulans u svijetu sa jasnim indikacijama i dokazanoj učinkovitosti u primarnoj i sekundarnoj prevenciji i liječenju arterijskog i venskog tromboembolizma, uskim terapijskim rasponom, velikom interindividualnom osjetljivošću na lijek i rizikom od pojave komplikacija među kojima je intracerebralno krvarenje jedno od najugrožavajućih (146). Komplikacije uzrokovane njegovom primjenom najčešće se zbivaju u samom početku terapije i predstavljaju vodeći razlog hitnih prijema u bolnicu i vodeći uzrok smrtnosti posljedičnih komplikacijama uslijed terapije nekim lijekom (147-148).

Upravo je taj paradoks između učinkovitosti i istovremene rizičnosti njegove primjene bio razlogom da se prvi put u povijesti medicine preporuči primjena dostignuća farmakogenomike u kliničku praksu u pokušaju individualizacije terapije. Godine 2007. Američka uprava za hranu i lijekove (eng.*Food and Drug Administration* -FDA) je preporučila primjenu farmakogenetičkih algoritama sa alelnim varijantama gena CYP2C9 i VKORC1 prije započinjanja terapije varfarinom (142).

Genetički polimorfizmi CYP2C9 i VKORC1 su odgovorni za postizanje ranog terapijskog INR i potrebne doze varfarina te je i njihova značajnost najvažnija u prvom tjednu uvođenja terapije dok se kasnije taj učinak gubi praćenjem kliničkih parametara, INR i prilagodbom doze (122).

Nekoliko je studija zadnjih godina valoriziralo učinkovitost inkorporacije farmakogenetičkih algoritama sa polimorfizmom alela CYP2C9 i VKORC1 uz kliničke parametre u predikciji inicijalne doze na klinički ishod liječenja varfarinom u rizičnih pacijenata poput studije Sandersona, studije PREVENT (Prevention of Reccurent Venous Tromboembolism) provedene među pacijentima sa venskim tromboembolizmom, studije Millicana i suradnika među rizičnim operiranim ortopedskim bolesnicima, studije Kima i suradnika među bolesnicima sa implantiranim mehaničkim srčanim zaliscima ili studije MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study) koju je Epstein proveo na Mayo klinici, a u kojoj su analizirali učinkovitost primjene farmakogenetičkim algoritamom uvođene doze na redukciju dana bolničkog liječenja (118,149-152).

Našim istraživanjem analizirali smo ulogu polimorfizma alelnih varijanti CYP2C9 wt, *2,*3 i VKORC1 1173 C>T na predikciju inicijalne doze varfarina u postizanju ranijeg antikoagulantnog učinka iskazanog terapijskim rasponom ciljnog INR 2-3 i ranijem postizanju stabilne terapijske doze u odnosu na standardnu fiksnu primjenu doze u visokorizičnih bolesnika sa akutnim ishemičkim moždanim udarom.
Uz navedeno, ispitivali smo povezanost tih pojava sa pojavom komplikacija i kliničkim ishodom ispitanika pri otpustu u komparaciji sa ispitanicima u kontrolnoj skupini istih karakteristika kojima je uvođena standardna fiksna doza od 6 mg varfarina.
U nama dostupnoj literaturi osim pojedinačnih prikaza slučajeva (153) ovo je do sada jedino prospektivno „case-control" istraživanje provedeno isključivo u visokorizičnoj skupini bolesnika sa akutnim moždanim udarom.
Tek je u tijeku veća, multicentrična, duplo-slijepa, randomizirana COAG studija (eng.*Clarification of Optimal Anticoagulation Through Genetics*) organizirana od američkog National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) koja uz ostale pacijente sa indikacijom za terapiju varfarinom uključuje i one sa moždanim udarom. U studiju je uključeno 1238 pacijenata, a studija teče od 2009 god. do 2012 godine sa ciljem procjene učinka farmakogenetičkim algoritmom započete terapije u odnosu na kliničkim parametrima započete terapije na kontrolu antikoagulancije i klinički ishod (154).
Imajući u vidu da su bolesnici sa embolijskim moždanim udarom, a posebno kardioembolijskim MU uzrokovanim fibrilacijom atrija poput 77% naših ispitanika viskorizična skupina sa značajnim rizikom recidiva MU od 5-7% unutar 7-12 dana od incijalnog MU sa istovremenim rizikom od intracerebralnog krvarenja posljedičnog prirodi same bolesti, u njih je iznimno važno čim ranije postići antikoagulantni učinak i stabilnu terapijsku dozu (52,139,155).
Naši rezultati su potvrdili vrijednost primjene farmakogenetičkog algoritma koji uključuje polimorfizam CYP2C9 (wt,*2,*3) i VKORC1 1173C>T u predikciji inicijalne doze varfarina za ranije postizanje antikoagulantnog učinka iskazanog ciljnim INR 2-3. Za farmakogenetički praćenu skupinu naših bolesnika (FG skupina) to je vrijeme iznosilo 4,167 dana u odnosu na 5,33 dana u kontrolnoj skupini sa fiksnom primjenom doze (NF skupina).
Alelne varijante koje su doprinosile ranijem postizanju ciljnog INR su bile homozigotne „defektne" varijante VKORC1 1173TT CYP2C9*3/*3 koje su ciljni INR postizale već

za 1,35 dana, potom alelne varijante CYP2C9 *2 i *3, dok je najduže vremena za antikoagulantni učinak i postizanje ciljnog INR bilo potrebno „divljem“ homozigotnom genotipu VKORCl 1173CC CYP2C9 wt/wt u trajanju od 5,05 dana.
Iznadterapijski INR >3,1 najprije je postignut u genotipu sa alelnim varijantama CYP2C9wt/*2 i wt/*3 uz „divlji“ VKORC1 1173CC te heterozigotnim alelnim varijantama CYP2C9 *2/*3, *3/*3 uz heterozigote VKORC1 1173CT. Najduže vremena u iznadterapijskom INR sa otežanim postizanjem stabilnog antikoagulantnog učinka je proveo genotip CC wt/*2 te skupina genotipa sa polimorfizmom za sve alele VKORC1 1173TT CYP2C9*2/*3.
Najkraću proporciju vremena provedenu u terapijskom rasponu INR sa sporijim postizanjem ciljnog INR je imao „divlji“ homozigotni genotip CC wt/wt sa 74,32% provedenog vremena, a najdulje skupina genotipa sa izmijenjenim homozigotom VKORC1 1173TT te alelnim varijantama CYP2C9 wt/*2,*2/*2, *2/*3 sa ukupno 84,19% provedenog vremena u terapijskom rasponu INR (procjenjujemo da je taj učinak posljedičan pojačanom oprezu kojeg smo imali u praćenju i doziranju u pacijenta sa takvim alelnim varijantama).
Naši podaci ukazuju na dominantni učinak polimorfizma CYP2C9 na ranije postizanje ciljnog INR i ranije postizanje iznadterapijskog INR>3,1 što je sukladno podacima iz studija koje su proveli Rieder, Higashi, Lindh, Zhu, Anderson, Kim i drugi (105,110,116-7, 122,156). Za razliku od njih Schwartz je veću ulogu u postizanju ciljnog INR našao među nosiocima alelnih varijanti VKORC1 1173TT dok su za ranije postizanje iznadterapijskog INR u njegovoj studiji veći učinak imale alelne varijante CYP2C9 *2 i *3 (108).
U našem smo istraživanju dokazali učinkovitost primjene farmakogenetičkog algoritma na ranije postizanje ciljnog INR u odnosu na standarnu fiksnu primjenu doze, na smanjenje broja bolesnika u izvanterapijskom INR kojih je sedmog dana terapije u FG skupini bilo samo 5,66% za razliku od 15,38% u NF skupini, na skraćenje vremena provedenog u iznadterapijskom rasponu INR <3,1 (0,421 dana u FG u odnosu na 1,683 dana u NF skupini) uz veću proporciju vremena provedenog u terapijskom rasponu INR (76,62% vremena u FG skupini , 67,07% u NF skupini).
Naši podaci se razlikuju od studije McMillicana objavljene 2010 god. koju je proveo među ortopedskim bolesnicima. On nije našao razlike u ranijem postizanju ciljnog INR, u vremenu provedenom u terapijskom rasponu, kao niti u razlike u incidenciji

komplikacija između farmakogenetičkom dozom i standardnom dozom vođene grupe. U njegovoj je studiji svega 13% pacijenata imalo samo alelne varijante CYP2C9, 44% samo polimorfizam VKORC1, a 19% polimorfizam za oba gena, za razliku od naše FG skupine gdje je polimorfizam samo gena CYP2C9 bio zastupljen u 32%, polimorfizam samo VKORC1 u 24,5% , a polimorfizam u oba gena u 28,3% ispitanika. To je moglo doprinositi razlikama u komparaciji sa našim rezultatima obzirom na značajno veću zastupljenost polimorfizma CYP2C9 i heterozigotnih varijanti u naših bolesnika, a koje primarno doprinose farmakokinetičkom učinku varfarina (poluvrijeme t/2) koje je pod utjecajem CYP2C9. U zaključnici Mc Millican objašnjava neuspjeh postizanja primarnog cilja u dokazivanju bržeg postizanja ciljnog INR i smanjenja komplikacija u farmakogenetički vođenoj skupini kao rezultantu „dobrog praćenja antikoagulatnog učinka od strane iskusnog servisnog tima za antikoaguliranost“(157).

U ovom je istraživanju dokazana značajna razlika sa skraćenjem vremena potrebnog za postizanje stabilne terapijske doze koje je za farmakogenetički vođenu skupinu iznosilo 10,33 dana (IQR 9-12) za razliku od grupe sa standardnom dozom kojoj je trebalo 13,89 dana (IQR 12-16). Desetog dana stabilnu dozu u FG skupini je postiglo 60% u odnosu na 11,53% bolesnika u NF skupini, a 14.tog dana 97% ispitanika u FG skupini je postiglo stabilnu dozu u odnosu na 60,5% ispitanika u NF skupini, dok dvadeset i prvog dana nije bilo razlike međuskupinama. Naši podaci upućuju na veći doprinos prediktivnog učinka farmakogenetičkog algoritma uz kliničke parametre od opisanih 12% nakon 7 dana terapije koje je našao Feder sa suradnicima. On je u PREVENT studiji (eng. *Prevention of Reccurent Venous Tromboembolism)* zaključio da su CYP2C9 i VKORC1 značajni prediktori inicijalne doze objašnjavajući 43% doze neposredno prije uvođenja lijeka, što uz kliničke parametre daje predikciju od 54% inicijalno, dok nakon sedam dana terapije prediktivna vrijednost pada na 12%, a četrnaestog dana na samo 4% zbog učinka praćenja INR i modifikacije doze (149). Usporedbom farmakogenetičkim algoritmom procijenjene inicijalne doze i stabilne doze održavanja nije se našlo statistički značajne razlike među skupinama genotipova u našem istraživanju (p=0,318).

Najnižu dnevnu dozu održavanja zahtijevao je izmijenjeni homozigotni genotip VKORC1 1173TT, CYP2C9*2/*3 od l mg, genotip TT *2/*2 od 1,5 mg, a najvišu dozu od 6 mg dnevno „divlji“ homozigotni genotip CC wt/wt. Općenito su najnižu stabilnu dozu održavanja trebali svi izmijenjeni homozigoti TT te alelne varijante *2/*3. Naši

podaci su sukladni dosadašnjim istraživanjima koja su istaknula dominantni učinak polimorfizma VKORC1 1173C>T na potrebnu dozu održavanja varfarina.Neke od tih studija daju pojednostavljenu shemu preporuka za dnevnu dozu potrebnu pojedinom genotipu kao što je prikazano na slici 1.3.1.1.4.1 (158-164).

Rezultati ove studije su potvrdili relativno visoku prevalencija od 83% nosioca multiplih alelnih varijanti, jedne (27,3%), dvije (46,2%) ili više alelnih varijanti VKORC1 i CYP2C9 koji zahtijevaju značajno manju dozu u odnosu na „divlje“ genotipove CC wt/wt na što su ukazala istraživanja Caldwella ili Ruana (165-167).

Studije međuetničke razlike u osjetljivosti na varfarin koje je proveo Takeuchi među populacijom Japana ili Limdi sa suradnicima među tri rasne skupine Azijata, Europljana i Afro-amerikanaca potvrdile su da polimorfizam VKORC1 ima značajno veći utjecaj na varijabilnost doze među bijelcima nego među Azijatima ili Afro-amerikancima, što je posljedica rasno-specifičnih razlika u frekvenciji polimorfizma VKORC1 1173T i 1639A alela, a što smo potvrdili i u našoj studiji (124,168).

Zanimljiv je nalaz u jednog našeg bolesnika sa genotipom CT wt/wt čija je farmakogenetičkim algoritmom procijenjena inicijalna doza bila 4,5 mg. On je vrlo sporo dosezao ciljni INR, a stabilnu terapijsku dozu je postigao tek 19.tog dana od primjene lijeka sa dozom koja je iznosila 12 mg dnevno i bila više nego dvostruko veća od procijenjene. Zaključili smo da je on vrlo brzi metabolizator (engl.*ultraextensive metabolizer*) za CYP2C9 za koje do sada još nije prezentirana molekularna analitička metoda. Premda studije upućuju na dominantnost utjecaja VKORC1 u senzitivnosti na varfarin i potrebnom dozom, očito u ovog bolesnika učinak mogućih „missence“ ili drugačijih mutacija CYP2C9 nadilazi utjecaj VKORC1 u svjetlu najnovijih spoznaja (169-170).

Od ukupno 61% bolesnika koji su iziskivali višu ili nižu dozu od prosječne (manje od 3 mg ili više od 6 mg dnevno) u farmakogenetički vođenoj skupii, korektno smo procijenjenili potrebnu dozu za 81,5% takvih bolesnika (78% koji su iziskivali nižu dozu i 93,5% višu dozu). Istovremeno je u kontrolnoj NF skupini bilo 69% bolesnika koji su iziskivali višu (26%) ili nižu (43%) dozu od prosječne. Ti podaci su sukladni podacima iz dosadašnjih studija poglavito International Warfarin Pharmacogenetic Consortiuma, a na koje se osvće Garcia komentirajući u New Journal of Medicine da je najveća učinkovitost primjene farmakogenetičke predikcije doze pri uvođenju terapije upravo za skupinu bolesnika koja iziskuje „ekstremne“ doze varfarina <21 mg ili >49

mg tjedno dok za ostalu populaciju nema učinkovitost u odnosu na standardno inicijalno uvođenje varfarina i praćenje INR (141,171).

Najveći broj komplikacija vezanih uz terapiju varfarinom zbiva se u samom početku primjene lijeka, u našoj studiji najčešće između 6-12 dana. Istraživanjem nismo našli smanjenje komplikacija između farmakogenetički praćene skupine u odnosu na skupinu sa standardnom dozom (15,09% u FG skupini je razvilo komplikacije u odnosu na 17,47% u NF skupini) niti je bilo razlike u pojavi većih ili manjih komplikacija determiniranih kao manja ili veća krvarenja (8,49% u FG, 7,78% u NF skupini) između skupina. Učestalost pojave komplikacija u početku uvođenja varfarina među našim skupinama u okvirima je rezultata objavljenih istraživanja, poput studije Hirschla i Wysovskog gdje se kreću u rasponu 5-17%, a u nalazima Gurwitza do 25% (147,172-173). Nismo našli niti značajnu razliku između skupina u pojavi komplikacija sa proporcijom vremena provedenog u ciljnom terapijskom rasponu INR, mada se pojava većih krvarenja u obje skupine javljala u onih ispitanika koji su proveli više vremena izvan terapijskog raspona INR (u FG skupini 9,59% više vremena, u NF skupini 9,65% više vremena). Slične rezultate navodi Kangelaris i suradnici koji su temeljem pretraživanja nalaza recentnih studija u PubMed, EMBASE i Internacionalnih farmaceutskih članaka objavljenih do 2009 god. zaključili da u većini studija nije nađena razlika u pojavi komplikacija između bolesnika sa farmakogenetičkim uvođenjem u odnosu na standarnu dozu uvođenja. Navode da rezultati većine studija nisu pokazali razlike u vremenu provedenem u ciljnom terapijskom rasponu INR između skupina ispitanika, za razliku od rezultata naše studije kojima smo tu razliku jasno dokazali sa većom proporcijom vremena provedenog u ciljnom terapijskom rasponu INR u farmakogenetički praćenoj skupini (174).

U našem su se istraživanju komplikacije češće javljale među nosiocima alelnih varijanti CYP2C9 (68,9%) u odnosu na nosioce alelnih varijanti VKORC1 (62,5%). Teže komplikacije su bile češće među nosiocima oba promijenjena alela *2/*2 i *3/*3 (37%) što je bilo povezano sa većim udjelom iznadterapijskog INR >3,1 koji su ti genotipovi brže postizali. Slični su nalazi dosadašnjih istraživanja koji ukazuju na povećani rizik krvarenja među nosiocima alelnih varijanti *2 i *3 uz gotovo tri puta povećan rizik među nosiocima alelnih varijanti *3 (115,118,147-8,175).

Vrijednost našeg istraživanja je i u tome što smo dokazali razliku između kliničkog ishoda i pojave komplikacija među ispitivanim skupinama.U skupini sa

farmakogenetičkom predikcijom doze nije nađena povezanost nastanka komplikacija sa kliničkim ishodom iskazanim rezidualnim neurološkim deficitom koji je procijenjen primjenom mRS. Nasuprot tome je nađena pozitivna korelacija u skupini sa standardnom dozom između pojave komplikacija i lošijeg kliničkog ishoda sa težim neurološkim deficitom uz dva smrtna slučaja (p=0,0006).

Pretpostavljamo da su razlike između skupina bile posljedične razlici u intezitetu krvarenja u podskupini komplikacija koju smo kategorizirali kao veće krvarenje, među kojima su bile i one koje nisu iziskivale prekidanje terapije varfarinom. To se dogodilo trojici bolesnika u FG skupini sa diskretnom hemoraškom tranzicijom infarktne zone u nalazu kontrolnog MSCT mozga bez pogoršanja neurološkog deficita, u kojih smo procijenili da je veći rizik od mogućeg tromboembolizma zbog ukidanja varfarina (jedan sa mehaničkim valvulama, dvoje sa FA uz CHADS2 skor 3 i 4, u dvojice INR >3,1) od rizika dodatnog krvarenja. Samo smo jednom bolesniku sa genotipom TT *2/*3 devetnaesti dan liječenja ukinuli terapiju zbog kliničkog pogoršanja i nalazom MSCT mozga potvrđenog intracerebralnog krvarenja, dok su u kontrolnoj skupini dvojica bolesnika kojima smo ukinuli varfarin zbog masivnog krvarenja imala smrtni ishod.

Neurološki deficit pri prijemu procijenjen primjenom NIHSS skale nije se razlikovao između FG i NF skupine, za razliku od neurološkog deficita pri otpustu procijenjenog primjenom mRS skale. Tu smo našli značajnu razliku sa boljim oporavkom u skupini vođenoj farmakogenetičkom predikcijom doze (p=0,043), a tu razliku povezujemo sa nastankom težih komplikacija u NF skupini što se odrazilo na lošiji ishod.

Ni u jednoj supini nismo našli povezanost između neurološkog deficita sa dobi ispitanika, mada su smrtne ishode imali bolesnici stariji od 71 godine. Nismo našli povezanost težine neurološkog deficita pri otpustu sa vremenom potrebnim za postizanje stabilne doze, kao ni povezanost proporcije vremena provedenog u terapijskom rasponu sa kliničkim ishodom.

Premalo studija valorizira učinak primjene farmakogenetičkog uvođenja doze na klinički ishod bolesnika kao što smo mi u istraživanju učinili. Taj nedostatak navodi Martina i suradnike u njihovom preglednom članku na zaključak „da farmakogenetičko testiranje nije primjenjivo u rutinskoj kliničkoj praksi jer ne predviđa svu varijabilnost pacijentova odgovora na terapiju i njegov doprinos na poboljšanje kliničkog ishoda je

još nepoznanica“, a isti zaključak u pregledu dostupne literature o farmakogenetici varfarina iznose Garsia i Hynika u svojim osvrtima (172,176-7).

U našoj studiji smo analizirali učestalost nedovoljne antikoaguliranosti među bolesnicima sa MU koji su prethodno primali terapiju varfarinom sa vrijednostima INR koji je u svih pri prijamu bio ispod terapijskog raspona. Ukupno je bilo 32% takvih bolesnika (34,9% u FG i 28,8% u NF skupini). Među njima je 62% bolesnika starijih od 71 godinu primalo varfarin zbog fibrilacije atrija, dok su u dobnoj skupini mlađoj od 49 godina najčeši uzrok terapije bili implantirani srčani zalisci. Ti su pacijenti imali i lošiji klinički ishod te je 26,08% ispitanika koji su prethodno antikoagulirani zbog FA imalo teški neurološki deficit iskazan mRS 4 i 5, a dvoje bolesnika je umrlo.

Među prethodno antikoaguliranim bolesnicima kojima smo radili genotipizaciju 34,2% su bili nosioci divljeg genotipa CYP2/C9 wt/wt. Zaključili smo da je visoka zastupljenost „divljeg genotipa“ CYP2C9 wt/wt doprinosila nedovoljnoj antikoaguliranosti uz ostale uzroke poput prekida terapije prije stomatološkog zahvata ili operativnog zahvata bez prijelazne terapije primjenom NMH, nedovoljno čestih kontrola INR uz prilagodbu doze, nedostatnog pridržavanja uzimanja preporučene doze lijeka od samih bolesnika (eng.“*compliance“)* zbog nedovoljne informiranosti o učinkovitosti terapije, ali i uslijed straha liječnika od primjene potrebne doze u starijih bolesnika zbog rizika od krvarenja, što nalazimo i u opisima drugih istraživača (88-92,178-9).

Gattelari temeljem svojeg istraživanja navodi da gotovo 60% pacijenata dobije moždani udar zbog propisane nedovoljne terapijske doze varfarina uslijed straha od krvarenja, najčešće među starijom populacijom. Obzirom na starenje (eng. „*ageing“*) suvremene populacije i rast rizika od FA na 25% od 80-te godine života, iznimno je važno upravo u toj starijoj dobnoj skupini farmakogenetičkom analizom procijeniti rizičnost primjene varfarina. Ovisno o prisutnosti alelnih varijanti te kliničkim parametrima, uključivši CHADS2 zbroj potrebno je procijenti da li uvoditi varfarin, te ako da, u kojoj dozi, da li jednakoj ili manjoj od one u mlađim dobnim skupinama ili dati drugu antitrombotičku terapiju u prevenciji MU (158,180). To ističe Eckman u studiji u kojoj je istraživao isplativost (engl.“*cost-benefit“*) primjene farmakogenetičkim algoritmom uvođene doze u starijih bolesnika sa FA i nižim CHADS2 zbrojem pri donošenju odluke koji tip antitrombotičke terapije uvoditi kod njih u odnosu na prisutnost „rizičnih“ alelnih varijanti. Iznosi zaključak da je upravo za takvu

manjerizičnu skupinu isplativost primjene genotipiziranja veća u smislu izbjegavanja mogućih komplikacija adekvatnom procjenom tipa antitrombotičke terapije u ovisnosti na prisutnost alelnih varijanti, kao i za visokorizične bolesnike koji su nosioci multiplih alelnih varijanti (181,182).

U sekundarnoj prevenciji kardioembolijskog moždanog udara zbog FA, mehaničkih valvula, FOA sa septalnom aneurizmom, u našoj skupini ispitanika sa akutnim moždanim udarom su bili i oni sa specifičnim neurološkim indikacijama za primjenu varfarina koji su imali opsežnu disekciju ekstrakranijskih arterija i trombozu venskih sinusa. U istraživanju smo ukazali na značajnu povezanost između razloga za primjenu varfarina i kliničkog ishoda pri otpustu. Tako je među 56,1% bolesnika sa novootkrivenom FA njih 20,3% imalo teški deficit sa mRS 4 i 5 te 1,7% smrtnih ishoda. Najbolji oporavak sa mRS 0 i 1 je bio u 86,6% bolesnika sa disekcijom ekstrakranijskih krvnih žila. Ta povezanost se nije našla u FG skupini, za razliku od statistički značajne povezanosti kliničkog ishoda i razloga za primjenu varfarina u NF skupini (p=0,0002). U toj skupini od 20,1% prethodno antikoaguliranih bolesnika sa FA je 9,5% je umrlo, a u 28,57% je zaostao teški neurološki deficit sa mRS 4 i 5. Među 23,07% bolesnika od ukupno 62,5% sa novotkrivenom FA u NF skupini je zaostao teški neurološki deficit sa jednim smrtnim ishodom (0,96% od ukupnog broja bolesnika), a dobar klinički opravak sa mRS 0 i 1 je bio među bolesnicima sa disekcijom ekstrakranijskih arterija. Moramo napomenuti da je možebitna razlika u rezultatima našeg istraživanja mogla proistjecati dijelom i iz toga, što je bolesnike sa farmakogenetičkom predikcijom doze u kliničkom tijeku pratio tim iskusnih neurologa iz područja cerebrovaskularnih bolesti i intezivne medicine u Referentnom centru za intenzivnu neurologiju Klinike za neurologiju KBC, dok su bolesnike iz kontrolne skupine u kliničkom tijeku pratili neurolozi na drugim odjelima Klinike za neurologiju KBC.

Genotipizacija alelnih varijanti CYP2C9 i VKORC1 je relativno skupa dijagnostička metoda što još uvijek ograničava njenu širu primjenu u kliničkoj praksi. Rezultanta toga su i preporuke pojedinih svjetskih udruženja poput American College of Chest Physicians (ACCP) koji navode "u sadašnjem trenutku za bolesnike koji započinju terapiju varfarinom bez podataka iz randomiziranih studija, mi ne savjetujemo upotrebu farmakogenetički baziranog inicijalnog uvođenja u individualizaciji terapije varfarinom dok randomizirani podaci ne ukažu da je taj način uspješniji" (183).

Svoj stav je dao i American College of Medical Genetics (ACMG) 2008 god. koji

navodi „u ovom trenutku još su nedostatni podaci prospektivnih studija da bi se rutinska primjena farmakogenetičkog testiranja prije uvođenja varfarina mogla preporučiti. Genotipiziranje se može učiniti kao dio dijagnostičke obrade za pronalaženje uzroka u slučajevima koji iziskuju iznimno male dnevne doze ili kod iznimno visokog INR tijekom standardnog doziranja“ (175).
Slične navode daje i The California Technology Assessment Forum (CTAF) „obzirom da za sada nema ili su nedostatni dokazi za poboljšanje ishoda temeljeni na većim randomiziranim studijama u komparaciji sa prihvaćenim alternativama, upotreba genotipizacije CYP2C9 i VKORC1 još nije dosegla kriterije za preporuku“(184-186).

Mi smatramo da rutinska primjena farmakogenetičkog algoritma pri uvođenju terapije varfarinom nije neophodna u rutinskoj praksi ako se doza pažljivo titrira uz češće kontrole INR u početku terapije.
Selekcija inicijalne doze varfarina bazirana na individualnom genotipu umjesto započinjanja terapije fiksnom dozom temeljena na znanstvenim dokazima iz naše studije, važan je doprinos za sigurnu intervenciju upravo u visokorizičnih pacijenata sa ishemičkim moždanim udarom u fazi uvođenja varfarina**.**
Naši podaci omogućuju stvaranje preduvjeta za oblikovanje novih protokola koji bi uključivali farmakogenetičke algoritme u individualizaciji terapije i primjenu istih u kliničkoj praksi u visokorizičnih bolesnika.

5.1. Zaključci:

1. Naši rezultati su potvrdili vrijednost primjene farmakogenetičkog algoritma za polimorfizam CYP2C9 (wt,*2,*3) i VKORC1 1173C>T u predikciji inicijalne doze varfarina sa ranijim postizanjem antikoagulantnog učinka iskazanog skraćenjem vremena do prvog ciljnog INR u bolesnika sa moždanim udarom u uporedbi sa standardnom fiksnom primjenom doze
2. Alelne varijante koje su doprinosile ranijem postizanju ciljnog INR su homozigotne varijante VKORC1 1173TT CYP2C9*3/*3
3. Iznadterapijski INR >3,1 je najprije postignut u genotipu sa alelnim varijantama CYP2C9wt/*2 i wt/*3 uz „divlji“ VKORC1 1173CC te heterozigotnim alelnim varijantama CYP2C9 *2/*3, *3/*3 što potvrđuje dominantni učinak polimorfizma CYP2C9 na ranije postizanje ciljnog INR i ranije postizanje iznadterapijskog INR
4. Primjena inicijalne doze uvođene prema farmakogenetičkom algoritmu u odnosu na primjenu fiksne doze doprinijela je boljoj kontroli antikoagulantnog učinka sa većom proporcijom vremena provedenog u terapijskom rasponu INR 2-3 uz skraćenje vremena provedenog u iznadterapijskom rasponu INR >3,1
5. Primjena inicijalne doze uvođene prema farmakogenetičkom algoritmu je doprinijela skraćenju vremena potrebnom za postizanje stabilne terapijske doze održavanja u odnosu na uvođenje terapije fiksnom dozom
6. Najnižu dnevnu dozu održavanja zahtijevao je homozigotni genotip VKORC1 1173TT CYP2C9*2/*3 te genotip TT *2/*2 što potvrđuje dominantnu ulogu VKORC1 u senzitivnosti na varfarin i potrebnoj dnevnoj dozi
7. Primjenom inicijalne doze uvođene prema farmakogenetičkom algoritmu korektno smo procijenili potrebnu dozu u 81,5% od ukupno 62 % bolesnika koji iziskuju više ili niže doze od prosječnih što je iznimno važno obzirom na visoku zastupljenost od 83% nosioca alelnih varijanti VKORC1 i CYP2C9 među našim bolesnicima sa moždanim udarom.
8. Najčešći genotip sa udjelom od 34% među nedovoljno antikoaguliranim bolesnicima koji su razvili moždani udar je „divlji genotip“CYP2/C9 wt/wt
9. Komplikacije su se javljale češće među nosiocima alelnih varijanti CYP2C9 u odnosu na nosioce alelnih varijanti VKORC1.

10. Nismo našli smanjenje razvoja komplikacija u bolesnika sa primjenom inicijalne doze uvođene prema farmakogenetičkom algoritmu niti razliku između farmakogenetički uvođene ili standardno uvođene fiksne doze u pojavi komplikacija sa proporcijom vremena provedenog u ciljnom terapijskom rasponu INR.
11. Nismo našli povezanost razvoja komplikacija sa dobi bolesnika niti povezanost kliničkog ishoda sa dobi što upućuje na sigurnu primjenu varfarina u indiciranih starijih bolesnika.
12. Dokazali smo razliku između kliničkog ishoda i pojave komplikacija sa boljim kliničkim ishodom među farmakogenetički praćenim bolesnicima zbog nastanka blažih komplikacija (krvarenja) u odnosu na veća krvarenja i lošiji klinički ishod u pacijenata sa fiksnom dozom uvođenja.
13. Dokazali smo bolji klinički ishod sa blažim neurološkim deficitom iskazanim primjenom mRS u odnosu na neurološki deficit pri prijemu među bolesnicima sa primjenom inicijalne doze uvođene prema farmakogenetičkom algoritmu u odnosu na bolesnike sa primjenom fiksne doze.
14. Našim istraživanjem otvorili smo mogućnosti stvaranja novih protokola koji bi uključivali farmakogenetičke algoritme u individualizaciji terapije u viskorizičnih pacijenata.

Poglavlje 6.

6. SAŽETAK

Pacijenti sa ishemičkim moždanim udarom (IMU) kardioembolijskog porijekla uz specifične uzroke IMU zbog disekcije ekstrakranijskih arterija ili tromboze venskih sinusa, iziskuju hitno uvođenje antikoagulantne terapije. To je visokorizična skupina bolesnika sa vjerojatnošću od 5-7% za recidiv embolijskog IMU unutar prvog tjedna ili sa visokim rizikom krvarenja u infarktnu zonu i pogoršanjem neurološkog deficita. Poznato je da polimorfizam gena CYP2C9 i VKORC1 značajno utječe na interindividualnu osjetljivost, varijabilnost antikoagulantnog učinka i potrebnu dozu varfarina. Stoga je u bolesnika sa IMU važna selekcija inicijalne doze varfarina bazirana na individualnom genotipu sa ciljem ranijeg postizanja antikoagulantnog učinka i stabilne terapijske doze uz smanjenje rizika razvoja komplikacija u ranoj fazi uvođenja terapije, posebno među nosiocima multiplih alelnih varijanti.

Na Klinici za neurologiju KBC Zagreb smo proveli prospektivno „case-control“ istraživanje tijekom 6 mjeseci među hospitaliziranim bolesnicima sa akutnim IMU, kojima je indicirana antikoagulantna terapija sa hipotezom da je primjenom inicijalne doze prema farmakogenetičkom algoritmu za polimorfizam gena CYP2C9 (wt,*2,*3) i VKORC1 1173 C>T u takvih pacijenata prije započinjanja terapije varfarinom moguće ranije postići antikoagulantni učinak i stabilnu dozu održavanja u odnosu na standardno uvođenje fiksnom dozom. U studiju je uključeno 106 bolesnika sa IMU kojima je prije uvođenja varfarina provedeno farmakogenetičko testiranje u procjeni inicijalne doze uvođenja (FG skupina). Kontrolnu skupinu je sačinjavalo 104 bolesnika sa akutnim IMU kojima je lijek uvođen standarnom fiksnom primjenom doze. U svih se ispitanika pratio INR pri uvođenju terapije, INR nakon 48 h, 72h, 5. dan, 7., l4. i 21. dan, vrijeme potrebno za postizanje prvog ciljnog INR, postotak vremena provedenog u terapijskom rasponu INR, vrijeme potrebno da se postigne stabilna doza održavanja te pojava komplikacija.

Osnovni cilj primjene farmakogenetičkog algoritma je bilo ranije postizanje prvog ciljnog INR, veća proporcija vremena provedena u terapijskom rasponu INR i ranije

postizanje stabilne doze održavanja, što se u skupini bolesnika s inicijalnom dozom varfarina uvedenom po farmakogenetičkom algoritmu uspjelo i postići. FG skupina bolesnika je manje vremena provela u iznadterapijskom INR >3,1 u odnosu na grupu sa fiksnom primjenom doze. Primjenom farmakogenetičkog algoritma korektno je procijenjena potrebna doza za 81,5% od ukupno 62% bolesnika koji su iziskivali višu ili nižu dozu varfarina od uobičajene. Nismo našli smanjenje razvoja komplikacija u FG skupini u odnosu na fiksnu primjenu doze, ali smo dokazali razliku između kliničkog ishoda i pojave komplikacija sa boljim kliničkim ishodom zbog pojave blažih krvarenja u FG skupini u odnosu teža krvarenja u bolesnika sa fiksnom primjenom doze.
Dokazali smo bolji klinički ishod sa blažim neurološkim deficitom u odnosu na neurološki deficit pri prijemu među bolesnicima sa farmakogenetičkom predikcijom doze u odnosu na bolesnike sa fiksnom primjenom doze.
Rezultati našeg istraživanja ukazuju na važnost selekcije inicijalne doze varfarina bazirane na individualnom genotipu umjesto započinjanja terapije fiksnom dozom za sigurniju terapijsku intervenciju u viskorizičnih bolesnika sa moždanim udarom.

Ključne riječi: Moždani udar, varfarin, farmakogenetika, polimorfizam CYP2C9,VKORC1

Poglavlje 7

7. SUMMARY

Svjetlana Šupe, MD: *The role of genetic polymorphism of CYP2C9 and VKORC1 in the individualization of warfarin therapy in patients with acute stroke*

Patients with cardioembolic stroke and stroke due to dissection of extracranial artery or cerebral sinus thrombosis require urgent anticoagulant therapy initiation.This high risk group of patients are at risk of 5-7% of embolic stroke recurrence within the first week or at the risk of bleeding into the infarct zone with worsening of neurologic deficits. Many reports confirmed that CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphisms have strong influence on interindividual warfarin sensitivity, variability of anticoagulant effects and dose requirement.Therefore, in patients with ischemic stroke it is important to select initial doses of warfarin based on individual genotype.The aim of individualisation is to achieve earlier anticoagulant effect and stable maintenance dose in order to reduce the risk of developing warfarin therapy side effects in early initiation of therapy due to hypo or overanticoagulation, particularly among carriers of multiple allelic variants.

At the Department of neurology University hospital Centre Zagreb we conducted a prospective case-control study during 6 months among patients hospitalized for acute ischemic stroke with indications for anticoagulant therapy.

The hypothesis was that by using the algorithm for pharmacogenetic polymorphism of CYP2C9 gene (wt, * 2, * 3) and VKORC1 1173C> T in these patients before initiating warfarin therapy, one can achieve an erlier anticoagulant effect and a stable maintenance dose in comparasion to the introduction of a standard fixed dose. The consented stroke patients (n=106) admitted at Referral centre for intensive neurologic care were pharmacogenetic tested for CYP2C9 and VKORC1 polymorphism before the initial dose of warfarin was predicted. The control group (n=104) were consented acute stroke patients hospitalized at other subunits of Department of neurology with the drug induction using the standard fixed dose, without pharmacogenetic prediction. Among both groups of patients we recorded initial International normalised ratio (INR), INR

after 48 hours, 72 hours, on day 5., 7.,14. and 21. of warfarin therapy induction and studied time to reach first target INR value, time to reach stable maintance dose, percent of time spent in therapeutic INR range and appearance of eventual complications.
The main goal of this research is to achieve the first target INR erlier, to have larger proportion of time spent in therapeutic INR range and to reach earlier achievement of a stable maintenance dose. Mentioned goals were achieved and confirmed by this study among patients with initial dose introduction after pharmacogenetic algorithm (FG) in comparasion with the group to which standard fixed dose was given. Time spent in over therpeutic INR >3,1 was shorter in genotype guided group, compared to standard fixed dose initiating group. Application of pharmacogenetic algorithm enabled the correct assessment of warfarin dose in 81,5% of 62% of patients who required a higher or lower dose of warfarin.
We found no reduction in the development of complications in the FG group compared to group with standard fixed dose application, but we have proved the difference between clinical outcome in this group patients with complications had better clinical outcome due to the occurrence of mild bleeding in the FG group, in comparison with severe bleeding in patients using a standard fixed dose.We've shown a better clinical outcome with mild neurological deficits in relation to neurological deficit on admission among patients with pharmacogenetic prediction of doses in comparasion to the group of patients with standard fixed doses.
Our findings highlight the importance of selection of initial warfarin dose based on individual genotype to therapy instead of a fixed dose for safer therapeutic intervention in high risk patients with acute stroke

Keywords: Stroke, warfarin, pharmacogenetic, polymorphism CYP2C9, VKORC1

Poglavlje 8

8. LITERATURA

1. World Health Organisation (1978). Cerebrovascular Disorders (Offset Publications). Geneva: World Health Organization. ISBN 9241700432. OCLC 4757533
2. World Health Organization. World Health Statistics Annual 1993. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1994
3. Albers GW,Caplan LR,Easton JD et al: Transient Ischaemic Attack- proposal for a new definition, N Engl J Med 2002; 347(21): 1713-6
4. WHO Regional Office for Europe and the European Stroke Council. Report on Pan European Consensus Meeting on Stroke Management, Helsingborg; Sweden, 8–10 November, 1995. Copenhagen, Denmark: World Health Organization; 1996
5. Bamford JM : "The role of the clinical examination in the subclassification of stroke". Cerebrovascular Diseases , 2000; 10 (4): 2–4
6. Asplund K, Tuomilehto J, Stegmayr B et al : Diagnostic criteria and quality control of the registration of stroke events in the MONICA project. Acta Med Scand. 1998; 728 (1): 26–39
7. Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP, Sicks JO et al : Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. Stroke. 1999; 30: 2513–2516
8. Tetri S, Hahala J, Juvela S et al: Safety of low-dose subcutaneous enoxaparin for the prevention of venous thromboembolism after primary intracerebral haemorrhage, Thromb Res. 2008;123(2):206-12
9. World Health Organisation. The international Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision, 1992
10. Bamford JM,Sandercock P, Dennis M et al: Classification and Natural History f Clinically Identifable Subtypes of Cerebral Infarction, Lancet 1991;337:1521-1526
11. Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ et al. :"Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment". Stroke 1993;24 (1): 35–41
12. Marnane M, Duggan CA, Sheehan OC et al:Stroke Subtype Classification to Mechanism-Specific and Undetermined Categories by TOAST, A-S-C-O, and Causative Classification System,Direct Comparison in the North Dublin Population Stroke Study, Stroke. 2010;41:1579-1586
13. Toda N, Ayajiki,Okamura T: Cerebral Blood Flow Regulation by Nitric Oxide: Recent Advances, Pharmacolog Rev 2009; 61 (1): 62-97
14. Zlokovic BV, Wang L, Schreiber SS : Haemostatic functions of the blood-brain barrier: possible implicationsin the pathogenesis of stroke. In: Greenwood J, Begley DJ, Segal MB, editors. New Concepts of a Blood Brain Barrier. New York: Plenum; 1995. p. 14−5. 1
15. Felberg RA, Burgin WS, Grotta : Neuroprotection and the Ischemic Cascade. JCCNS Spectr (2000) 5: 52-58.

16. DeGarcia DJ: Towards a dynamical network view of brain ischemia and reperfusion. Part III: therapeutic implications J Exp Stroke Transl Med (2010) 3(1): 90-103
17. Phan TG, Wright PM, Markus R et al:Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? Clin Exp Pharmacol Physiol. 2002 Jan-Feb;29(1-2):1-10.
18. Heiss WD, Sobesky J, Hesselmann V. Identifying thresholds for penumbra and irreversible tissue damage. Stroke. 2004; 35 (I): 2671–2674
19. Fischer M, Ginsberg M: Current Concepts of the Ischemic Penumbra, Stroke. 2004;35:2657
20. Weinstein PR, Hong S, Sharp FR. Molecular identification of the ischemic penumbra. Stroke. 2004; 35 (I): 2666–2670
21. Deb P, Sharma S, Hassan KM : Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis Pathophysiology. 2010 Jun;17(3):197-218
22. Christensen K,Doblhammer G,Rau R et al: Ageing poplations: The challenges ahead. Lancet 2009;374:1196-1208
23. Fries JF: Frailty, heart disease and stroke:The Compression of Morbidity paradigm, Am J Prev Med 2005; 29(1): 164-168
24. Mithitski AB: Trends in Survival and Recovery From troke and Compression on Morbidity, Stroke 2010; 41:415-416
25. Rothwell PM,Coull AJ, Giles MF et al: Change in Stroke incidence, mortality,case fatality,severity and risk factors in Oxfordshire, UK from 1981 to 2004,Lancet 2004;363:1295-33
26. Carandang R, Seshedri S ,Beiser A et al: Trends in incidence, lifetime risk,severity and 30-day mortality of stroke over past 50 years, JAMA 2006; 296:2939-46
27. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL et l: Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. Lancet Neurol. 2009 ; 8(4):355-69
28. Hajat C, Heuschmann PU, C. Coshall C et al. Incidence of aetiological subtypes of stroke in a multi-ethnic population based study: the South London Stroke Register J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, October 25, 2010;
29. Kleinndorfer D, Khoury J, MoomaW CJ et al: Stroke Incidence Is Decreasing in Whites But Not in Blacks: A Population-Based Estimate of Temporal Trends in Stroke Incidence From the Greather Cincinnati/Northern Kentucky Stroke Study, Stroke 2010;41:1326-1331
30. World Health Organization. „Health for All“ Database. Copenhagen, January 2010.
31. Demarin V, Lovrenčić-Huzjan A, Šerić V et al:. Preporuke za zbrinjavanje bolesnika s moždanim udarom. Drugi dio: Primarna i sekundarna prevencija moždanog udara. Liječ Vjesn 2003; 125: 322 – 8
32. Hrvatski zavod za javno zdravstvo. Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2007. godinu. Zagreb, 2008
33. Kralj V, Hrabak-Žerjavić V, Čorić T. Epidemiology of cerebrovascular diseases in Croatia. 5th Central European Meeting on Hypertension. Kidney Blood Press Res 2009;32(5):316.
34. Hrabak-Žerjavić V, Kralj V,Dika Ž et al: Epidemiologija hipertenzije, moždanog udara i infarkta miokarda u Hrvatskoj, Medix 2010; 87/88:102-107

35. Demarin V,Lovrenčić-Huzjan A,Trkanjec Z et al: Recommendations for stroke management – update 2006, Acta Clinica Croat 2006; 45: 219-285
36. Asplund K, Bonita R, Kuulasmaa K et al :Multinational comparisons of stroke epidemiology: evaluation of case ascertainment in the WHO MONICA Stroke Study. Stroke. 1995; 26: 355–360
37. Sacco RL, Shi T, Zamanillo MC et al : Predictors of mortality and recurrence after hospitalized cerebral infarction in an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. Neurology. 1994; 44: 626–634
38. Petty GW, Brown RD Jr, Whisnant JP et al : Ischemic stroke subtypes: a population-based study of functional outcome, survival and recurrence. Stroke 2000; 31:1062–68
39. Kolominsky-Rabas Pl, Weber M, Gegeller O et al: Epidemiology of Ischaemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria: Incidence,Reccurence and LONG-Term Survival in Ischaemic Stroke Subtypes, Stroke 2001;32:2735-40
40. Lovett JK, Coull AJ, Rothwell PM: Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies, Neurology 2004; 62(4): 569 - 573
41. Ay H, Gungor L, Arsava EM et al: A score to predict early risk of recurrence after ischemic stroke, Neurolog 2010;74(2): 128 – 135
42. Endres M, Heuschmann PU, Laufsand U et al: Primary prevention of stroke: blood pressure, lipids, and heart failure, Eur. Heart J 2011; 32(5): 545 – 552
43. Schulz UGR ,P.M. Rothwell PM: Differences in Vascular Risk Factors Between Etiological Subtypes of Ischemic Stroke: Importance of Population-Based Studies. Stroke 2003; 34(8): 2050 – 2059
44. Sacco RL, Wolf PA, Gorelick PB: Risk factors and their menagement for stroke prevention: outlook far and beyond. Neurology 1999;53 (4):15-24
45. Vermeer SE, *et al* : Prevalence and risk factors of silent brain infarcts in the population-based Rotterdam Scan Study. Stroke. 2002 Jan;33(1):21-546
46. Ferro JM: Cardioembolic stroke: an update, Lancet neurol 2003;2:177-88
47. Schneck MJ,Xu L : Cardioembolic stroke, 2010 http://emedicine.medscape.com/article/1160370-overview
48. Jin KN, Chun EJ, Choi SI et al: Cardioembolic Origin in Patients With Embolic Stroke: Spectrum of Imaging Findings on Cardiac MDCT Am. J. Roentgenol 2010; 195(1): 38 – 44
49. Wolf PA, Abbot RD, Kannel WB: Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: Framingham Study. Stroke 1991; 22: 983-8
50. Petersen P, Kastrup J, Heliveg-Larsen S et al: Risk factors for thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. The Copenhagen AFASAK study. Arch Intern Med 1990; 150:819-821
51. Lip GY, Halperin JL: Improving stroke risk stratification in atrial fibrillation.Am J Med. 2010 Jun;123(6):484-8. Review.
52. Go AS, Hylek EM, Chang A, et al : Anticoagulation Therapy for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation. How Well Do Randomized Trials Translate Into Clinical Practice? JAMA 2003; 290:2685-2692
53. Bejot Y, Salem DB, Osseby GV et al**:** Epidemiology of ischemic stroke from atrial fibrillation in Dijon, France, from 1985 to 2006 Neurology, 2009; 72(4): 346 – 353

54. Gage BF, Boechler M, Doggette AL, et al : Adverse outcomes and predictors of underuse of antithrombotic therapy in medicare beneficiaries with chronic atrial fibrillation. Stroke 2000; 31: 822-7
55. ACTIVE Investigators.Clopidogrel plus aspirin versus oral anticoagulation for atrial fibrillation in the Atrial fibrillation Clopidogrel Trial with Irbesatan for prevention of Vascular Events (ACTIVE W): a randomised controlled trial,Lancet 2006;367:1903-12
56. SPORTIF-III Investigators : Ximelagatatran versus warfarin for stroke prevention in patients with non-valvular atrial fibrillation:randomised controlled trial,Lancet 2003; 362:1691-98
57. Pepi M, Evangelista A, Nihoyannopoulos P et al: Recommendations for echocardiography use in the diagnosis and management of cardiac sources of embolism: European Association of Echocardiography (EAE) (a registered branch of the ESC) Eur J Echocardiogr 2010; 11(6): 461 – 476
58. Bando K, Kobayashi J, Hirata M et l: Early and late stroke after mitral valve replacement with a mechanical prosthesis: risk factor analysis of a 24-year experience J Thorac Cardiovasc Surg. 2003 Aug;126(2):358-64
59. Oppenheimer S: Editorial Comment: Is MVP an MVP in Ischemic Cerebral Events? Stroke, 2003; 34(6): 1345 – 1345
60. Detaint D, Sundt TM, Nkomo VT et al: Surgical Correction of Mitral Regurgitation in the Elderly: Outcomes and Recent Improvements, Circulation, 2006; 114(4):265 – 272
61. Homma S, Sacco RL, DiTullio MR et al for the PFO in Cryptogenic Stroke Study (PICSS) Investigators: Effect of medical treatment in stroke patients with patent foramen ovale: Patent Foramen Ovale in Cryptogenic Stroke Study. *Circulation.* 2002;105: 2625–31
62. Homma S,Sacco RL:Patent Foramen Ovale and Stroke,Circulat 2005;112(7): 1063 – 72
63. Maisel WH and Laskey WK:Patent Foramen Ovale Closure Devices: Moving Beyond Equipoise JAMA, 2005; 294(3): 366 – 369
64. Redekop GJ: Extracranial carotid and vertebral artery dissection: a review. Can J Neurol Sci. 2008;35(2):146-52.
65. Goyal MS, Derdeyn CP. The diagnosis and management of supraaortic arterial dissections. Curr Opin Neurol. 2009;22(1):80-9
66. Debette S, Leys D. Cervical-artery dissections: predisposing factors, diagnosis, and outcome. Lancet Neurol. 2009;8(7):668-78
67. Famakin BM, Chimowitz MI, Lynn MJ et aland for the WASID Trial Investigators: Causes and Severity of Ischemic Stroke in Patients With Symptomatic Intracranial Arterial Stenosis,Stroke, 2009; 40(6): 1999 – 2003
68. Metso AJ,Metso TM,Tatlisumak T: Local Symptoms and Recanalization in Spontaneous Carotid Artery Dissection ;Stroke 2009; 40(11)
69. Cothren CC, Moore EE, Biffl WL et al: Anticoagulation is the gold standard therapy for blunt carotid injuries to reduce stroke rate. Arch Surg.2004;139(5):540-5
70. Bush RL, Fagan SC, Halperin JL, Johnston SC, et al: Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke or transient ischemic attack: a guideline for healthcare professionals from the Stroke. 2011;42:1-7

71. Karolinska Stroke Update Consensus Statement and Recommentations to the European Stroke Organisation Guidlines Committee; November 2010;www.eso-stroke.org
72. Kim KS,Brophy GM: Symptomatic venous thromboembolism: incidence and risk factors in patients with spontaneous or traumatic intracranial hemorrhage .Neurocrit Care. 2009; 11(1): 28-33
73. De Bruijn SF, Stam J, Vandenbroucke JP: Increased risk of cerebral venous sinus thrombosis with third- generation oral contraceptives. Cerebral Venous Sinus Thrombosis Study Group. Lancet. 1998;351(9113):1404.
74. Einhaupl KM, Villringer A, Meister W, et al. Heparin treatment in sinus venous thrombosis. Lancet. 1991;338(8767):597-600
75. Khan SH, Adeoye O, Abruzzo TA et al: Intracranial dural sinus thrombosis: novel use of a mechanical thrombectomy catheter and review of management strategies. Clin Med Res. 2009 Dec;7(4):157-65
76. Connolly SJ, Ezekowitz MD,Phill D et al: Dabigatran versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation, N Engl J Med 2009; 361:1139-115
77. Marketos M. The top 200 generic drugs in 2003. Drug Topics 2004; 148:76.
78. Baglin TP et al. British Committee for Standards in Haematology - Guidelines on oral anticoagulation (warfarin): third edition - 2005 update British Journal of Haematology 2006; 132 (3): 277-285
79. Bejth RJ, Milligan PE, Gage BF. Risk factors for bleeding in patients taking coumarins. Curr Hematol Rep 2002;1:41-49
80. Penning-van Beest FJA, van Meegen E, Rosendaal FR. Characteristics of Anticaogulation Therapy and Comorbidity Related to Overanticoagulation,. Thromb Haemost 2001; 86:569-74
81. Wittkowsky AK:Factors associated with INR elevation and bleeding complications during Warfarin therapy. Arch Intern Med. 2005 Mar 28;165(6):703.
82. Wijdicks EF, Schievink WI, Brown RD, Mullany CJ:The dilemma of discontinuation of anticoagulation therapy for patients with intracranial hemorrhage and mechanical heart valves. Neurosurgery. 1998;42(4):769-73
83. Fang MC,Go AS,Chang Y et al: Deadh and disability from warfarin-associated intracranial hemorrhages. Am J Med 2007;120:700-705
84. Wittkowsky AK, Boccuzzi SJ, Wogen J, Wygant G et al :Frequency of concurrent use of warfarin with potentially interacting drugs.Pharmacotherapy. 2004 Dec;24(12):1668-7
85. Wittkowsky AK.Drug interactions update: drugs, herbs, and oral anticoagulation. J Thromb Thrombolysis. 2001 Sep;12(1):67-71.
86. Hart RG: Warfarin in atrial fibrillation: underused in the elderly, often inappropriately used in the young Heart 1999;82:539-540
87. Bungard TJ, Ghali WA, Teo KK et al:Why do patients with atrial fibrillation not receive warfarin? Arch Intern Med 2000;160: 41-6
88. Friberg L, Hammar N, Ringh M et al. Stroke prophylaxis in atrial fibrillation: who gets it and who does not? Report from the Stockholm Cohort-Study on Atrial Fibrillation (SCAF-study). Eur Heart J 2006;27:1954-64
89. Budinčević H, Bielen I: Anticoagulant Therapi in Patients With Atrial Fibrillation; Analisis of Routine Clinical Practice in North-Western Croatia, Neurolog Croat 2005;54(2):122

90. Dharmarajan TS, Varma S, Akkaladevi S et al: To anticoagulate or not to anticoagulate? A common dilemma for the provider: physicians' opinion poll based on a case study of an older long-term care facility resident with dementia and atrial fibrillation. J Am Med Dir Assoc 2006;7:23-8
91. Fornari LS, Calderaro D, Nassar IB, et al. Misuse of antithrombotic therapy in atrial fibrillation patients: frequent, pervasive and persistent. J Thromb Thrombolysis 2007;23:65-71
92. Mant J, Hobbs FD, Fletcher K, et al. Warfarin versus aspirin for stroke prevention in an elderly community population with atrial fibrillation (the Birmingham atrial fibrillation treatment of the aged study,BAFTA): a randomised control. trial. Lancet 2007;370:493-503
93. Aguilar MI,Hart RG,Kase CS: Treatment of warffarin associated intracerebral hemorrhage-literature rewiev and expert opinion, Mayo Clin Proc 2007;82:82-92
94. Goldstein JN,Rosand J,Schwamm LH: Warfarin reversal in anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage. Neurocrit Care 2008;9:277-283
95. Fang MC,Go AS,Chang Y et al: Deadh and disability from warfarin-associated intracranial hemorrhages. Am J Med 2007;120:700-705
96. Morgenstern LB,Hemphill JC,Anderson C et al: AHA-ASA Guidelines for the Managment of Spontaneus Intracerebral Hemorrhage. Stroke 2010;41:2108-2129
97. Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. Annu Rev Med. 2006;57:119-137
98. Wadelius M, Pirmohamed M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. The Pharmacogenomics Journal 2007; 7:99-11
99. Sanderson S, Emery J, Higgins J. Cyp2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients:A HuGEnet systematic review and meta-analysis. Genet Med 2005; 7(2):97-104
100. Duffus J et al: IUPAC GLOSSARY OF TERMS USED IN TOXICOLOGY, 2nd EDITION (IUPAC recommendations 2007)Appl. Chem. 2007; 79:(7), 1153-1344,
101. Sundberg Ingelman M , Sim AS, Gomez A i sur. Influence of cytochrom P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacology &Therapeutics 2007; 116: 496-526
102. Pirmohamed M, Park BK. Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. Toxicology. 2003;192(1):23-32
103. 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
104. Schelleman H, Chen J, Chen Z, et al. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. Clin Pharmacol Ther. 2008;84:332-9.
105. Lindh JD, Holm L, Andersson ML, Rane A Influence of CYP2C9 genotype on warfarin dose requirements--a systematic review and meta-analysis. Eur J Clin Pharmacol. 2009 Apr;65(4):365-75.
106. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. Clin Pharmacol Ther 2008:460-70.
107. Lenzini P, Grice G, Milligan P, Gatchel S, Deych E, Eby C, Burnett R, Clohisy J, Barrack R, Gage B. Optimal initial dose adjustment of warfarin in orthopedic patients, Ann Pharmacother 2007;41:1798-804.

108.Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, et al. Genetic Determinants of Response to Warfarin during Initial Anticoagulation N Engl J Med 2008; 358:999-1008.
109. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature 2004; 427: 537-541
110. Rieder MJ, Reine AP, Gage BF, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose.N Engl J Med 2005; 352: 2285-93
111.Tham LS, Goh BC, Nafziger A, Guo JY, Wang LZ, Soong R, Lee SC. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. Clin Pharmacol Ther 2006;80:346-55
112.Nakai K, Tsuboi J, Okabayashi H et al. Ethnic differences in the VKORC1 gene polymorphism and an association with warfarin dosage requirements in cardiovascular surgery patients. Pharmacogenomics 2007, 8(7), 713-719
113.D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P et al. A polymorphism in the VKORC1 Gene associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. Blood 2005; 105: 645-649
114.Osman A, Enstorm 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
115.Sconce EA, Khan TI, Wynne HA et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polimorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements:proposal for a new dosing regimen. Blood 2005; 106:2329-2333
116. Andreson JL et al. Randomized trial of genotype –guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. Circulation 2007; 116: 2563-2570
117.Zhu Y,ShennanM,Reyolds KK et al: Estimation of warfarin maintance dose based on VKORC1(-1639G>A) and CYP2C9 genotypes. Clin Chem 2007; 53(7):1199-1205
118.Sanderson S, Emery J, Higgins J. Cyp2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients:A HuGEnet systematic review and meta-analysis. Genet Med 2005; 7(2):97-104
119.Montes R,Nantes O,Alonso A et al: The influence of polymorphismus of VKORC1 and CYP2C9 on mayor gastrointestinal bleeding risk in anticoagulated patients,Br J Haematol 2008;112:1022-7
120.Wadelius M, Pirmohamed M.: Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. Pharmacogenom J 2007; 7:99-11
121.Epstein RS, Moyer TP,Aubert RE et al: Warfarin Genotyping Reduces Hospitalization Rates: Results From the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study) J Am Coll Cardiol 2010; 55:2804-12
122.Li C,Schwartz UI,Ritchie M et al: Relative contribution of CYP2C9 and VKORC1 genotypes and early INR response to the prediction of warfarin therapy sensitivity during intiation of therapy, Blood 2009;113(17):3925-3930
123.Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY et al:Age nome-wi de scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. Blood 2008;112:1022-7
124.Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. PLoS Genet 2009;5:e1000433

125.Moyer TP, O'Kane DJ,Baudhuin lm et all: Warfarin Sensitivity Genotyping: A Review of the Literature and Summary of Patient Experience. Mayo Clinic Procedings 2009;84;1079-1094
126.McDonald MG, Rieder MJ, Nakano Met al: CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. Mol Pharmacol 2009;75:1337-46.
127. Pérez-Andreu V, Roldán , Antón AI et al:Pharmacogenetic relevance of CYP4F2 V433M polymorphism on acenocoumarol therapy. Blood 2009;113: 4977-9.
128. Borgiani P, Ciccacci C, Forte V et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. Pharmacogenomics 2009;10:261-6
129.Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K–dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. Thromb Haemost 2006;95:205–11.
130.Wadelius M, Chen LY, Downes K et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated witthwarfarin dose. Pharmacogenom J 2005;5:262–70
131.Kimura R, Kokubo Y, Miyashita K, et al. 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
132.Kimmel SE, Christie J, Kealey C, et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. Pharmacogenomics J 2008;8:53–60.
133.Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. Pharmacogenomics J 2004;4:40–8.
134.Loebstein R, Vecsler M, Kurnik D, et al. Common genetic variants of microsomal epoxide hydrolase affect warfarin dose requirements beyond the effect of cytochrome P450 2C9. Clin Pharmacol Ther 2005;77:365–72.
135.Hafner JW, Belknap Sm, Squillante MD, et al. Adverse drug events in emergenmcy department. Ann Emerg Med 2002; 39: 258-266
136.Meschia MD: Pharmacogenetics and Stroke,Stroke 2009;40:3641-45
137.Howryluk GW,Austin J,Furlan J: Towards optimal management of aticoagulation following CNS hemorrhage with high tromboembolic risk. Stroke 2010,41;7
138.Tomek A, Matoska V, Eisert C et al: Optimisation of Anticoagulation with Warfarin for Stroke prevention: Pharmacogenetic Considerations Am J Ther : 2010; PMID 20335792
139.Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych Eet al:Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin.Clin Pharmacol Ther. 2008;84(3):326-31
140.Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen ALEriksson N, Rane Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(5):572-8. Epub 2010
141.The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium.Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. N Engl J Med 2009;360:753-64

142. FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information: New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients, Available at http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/2007/ucm108967.htm Accessed: July 14, 2009
143. NIHSS – stroke booklet; www.ninds.nih.gov
144. Van Swieten JC, Koudstaal PJ, Visser MC et al:"Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients."Stroke 1988;19(5):604-7
145. Bonita R, Beaglehole R. "Modification of Rankin Scale: Recovery of motor function after stroke."Stroke 1988 ;19(12):1497-1500.
146. Budintz DS,Pollock DA,Weidenbach KN et al: National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events, JAMA 2006;296:1858_1866
147. Wysowski DK,Nourjah P,Schwartz L: Bleeding comlications with warfariin use:a prevalent adverse effect in regulatory action, Arch Intern Med 2007;167:1414-19
148. Levine MN, Raskob G, Landefeld S, et al. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. Chest 2001; 119(2): 108-121
149. Feder NS, Eby CS, Deych et al: Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during initial weeks of therapy. J Thromb Haemost 2010;8(1):95-100
150. Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. Blood 2007; 110: 1511-15
151. Kim HS, Lee SS, Oh M et al: 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(2):103-12
152. Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE et al: Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study). J Am Coll Cardiol. 2010 Jun 22;55(25):2804-12
153. Grice GR, Milligan PE, Eby C et al: Pharmacogenetic dose refinement prevents warfarin overdose in a patient who is highly warfarin-sensitive, Jour of Thromb and Haem 2008;6(1):207-209
154. Clarification of Optimal Anticoagulation Through Genetics (COAG) - http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00839657-
155. Baker WL, Cios DA, Sander SDJ : Meta-analysis to assess the quality of warfarin control in atrial fibrillation patients in the United States.Manag Care Pharm. 2009;15(3):244-52.
156. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM,Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. JAMA. 2002;287(13):1690-1698
157. McMillin GA, Melis R, Wilson A et al. Gene-based warfarin dosing compared with standard of care practices in an orthopedic surgery population: a prospective, parallel cohort study. Ther Drug Monit. 2010;32(3):338-45
158. McClain MR, Palomaki GE, Piper Met al. A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding. Genet Med. 2008;10(2):89-98
159. Krynetskiy E, McDonnell P. Building individualized medicine: prevention of adverse reactions to warfarin therapy. J Pharmacol Exp Ther. 2007;322(2):427-34.

160.Langley MR, Booker JK, Evans JP et al. Validation of clinical testing for warfarin sensitivity: comparison of CYP2C9-VKORC1 genotyping assays and warfarin-dosing algorithms. J Mol Diagn. 2009;11(3):216-25.
161.Huang SW, Chen HS, Wang XQet al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. Pharmacogenet Genomics. 2009;19(3):226-34
162.King CR, Porche-Sorbet RM, Gage BF, Ridker PM, Renaud Y, Phillips MS, Eby C. Performance of commercial platforms for rapid genotyping of polymorphisms affecting warfarin dose. Am J Clin Pathol. 2008;129(6):876-83.
163.Yin T ,Toshiyuki Miyata T**:** Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1* - Rationale and perspectives,Thromb Research 2007;120(1):1-10
164.National Academy of Clinical Biochemistry (NACB). Draft Guidelines and Recommendations for Laboratory Analysis and Application of Pharmacogenetics to Clinical Practice. 3rd Draft, December 2007 Version. Accessed June 1, 2010. Available at URL address: http://www.aacc.org/members/nacb/LMPG/OnlineGuide/DraftGuidelines/Pharmacogenetics
165.Caldwell MD, Berg RL, Zhang KQ et al:Evaluation of genetic factors for warfarin dose prediction. Clin Med Res. 2007;5(1):8-16
166.Ruano G,Thompson P, Villagra D et al: High carrier prevalence of combinatorial CYP2C9 i VKORC1 genotypes affecting warfarin dosing Personal med 2008;5(3):225-232
167.Seip RL, Duconge J, Ruaño G:Implementing genotype-guided antithrombotic therapy. Future Cardiol. 2010;6(3):409-24
168.Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L et al.Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. Blood. 2010 6;115(18):3827-34
169.Johansson I, M. Ingelman-Sundberg. Genetic Polymorphism and Toxicology - with Emphasis on Cytochrome P450. Toxicological Sciences Online publication date: 13-Dec-2010
170.Mwinyi J, Nekvindová J, Cavaco I et al: New insights into the regulation of CYP2C9 gene expression: the role of the transcription factor GATA-4. Metab Dispos. 2010;38:415-21
171.Garcia AD, Hylek E: Warfarin pharmacogenetic, N Engl J Med 2009;360:23
172.Hirschl MM, Wollmann C A 2-year survey of treatment of acute atrial fibrillation in an ED. Am J Emerg Med. 2010 Apr 30. [Epub ahead of print]
173.Gurwitz D, Lunshof JE Ancestry in translational genomic medicine: handle with care. Genome Med. 2009 Feb 25;1(2):24
174.Kangelaris KN, Bent S, Nussbaum RL et al. Genetic testing before anticoagulation? A systematic review of pharmacogenetic dosing of warfarin. Gen Intern Med. 2009 ;24(5):656-64
175.Flockhart DA,O'Kane D,Willims M et al. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin, Genetics in Medicine: 2008;10 (2): 139-150
176. Martin HJ. Pharmacogenetics of warfarin - is testing clinically indicated? Australian Prescriber 2009;32:76-80
177. Hynicka LM, Cahoon WD, Jr., Bukaveckas BL. Genetic testing for warfarin therapy initiation. Ann Pharmacother 2008;42:1298-1303

178.Gladstone DJ, Blakely J, Dorian P Detecting paroxysmal atrial fibrillation after ischemic stroke and transient ischemic attack: if you don't look, you won't find.Stroke. 2008;39(5):78-9;
179.Marcu CB,GhantousAE,Caracciolo EA et al: Patterns of anticoagulation in patienst hospitalized with atrial fibrillation:warfarin is underused in paroxismal atrial fibrillation, Conn Med 2003;67:595-598
180.Gattellari M, Worthington J, Zwar N et alBarriers to the use of anticoagulation for nonvalvular atrial fibrillation: a representative survey of Australian family physicians. Stroke. 2008 ;39(1):227-30
181.Eckman MH,Greenberg SM,Rosand J: Should We Test for CYP2C9 Before Initiating Anticoagulant Therapy in Patienst with Atrial Fibrillation, J Gen Inter Med 2009;5(24):543-9
182.Eckman MH, Rosand J,Greenberg SM,Gage B. Cost-Effectiveness of Using Pharmacogenetic Information in Warfarin Dosing for Patients With Nonvalvular Atrial Fibrillation . Ann Intern Med January 20, 2009 150:73-83
183.Ansell J, Hirsh J,Hylek e et al: American College of Chest Physicians. Pharmacology and managment of the vitamin K antagonists:American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th edition).Chest 2008;133(6):160-198
184.California Technology Assessment Forum (CTAF). Use of genetic testing to guide the initiation of warfarin therapy. Technology Assessment. San Francisco, CA: CTAF; March 2008. Accessed:, 2010. Available at URL address: http://ctaf.org/content/general/detail/814
185.Centers for Medicare & Medicaid Services (CMS). Decision Memo for Pharmacogenomic Testing for WARFARIN Response (CAG-00400N). August 2009. Accessed 2010. Available at URL address: http://www.cms.hhs.gov/mcd/viewtrackingsheet.asp?from2=viewtrackingsheet.asp&id=224
186.Ioannidis JPA. Personalized Genetic Prediction: Too Limited, Too Expensive, or Too Soon? Ann Intern Med, 2009 150:139-141

Poglavlje 9.

9. ŽIVOTOPIS

Svjetlana Šupe rođena je 11.studenog 1956 godine u Šibeniku gdje je završila osnovno i srednješkolsko gimnazijsko obrazovanje. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je l975 godine, a diplomirala 1980 godine. Nakon obavljenog pripravničkog staža na KBC Rebro i položenog stručnog ispita 1982 god. radi kao liječnik medicine rada Ambulanti ZET-a u Domu zdravlja Trešnjevka. Od 1985 god. do. 1990 god. je zaposlena na neurološkom odjelu Psihijatrijske bolnice „Dr Ivan Barbot" u Popovači, tijekom čega je tri godine provela na specijalizaciji iz neurologije na Klinici za neurologiju KBC Zagreb, položivši specijalistički ispit iz neurologije 1989 god.
Nakon završenog Poslijediplomskog studija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Biomedicina, Odsjek biologija, 1990 g. obranila je magistarski rad sa temom „Kvantitativna analiza dermatoglifa digitopalmarnog kompleksa u pacijenata oboljelih od Multiple skleroze" pod mentorstvom prof.dr.sc.P. Rudana.
Završila je edukaciju iz tehnika EEG i epileptologije, Dopplerske dijagnostike, evociranih potencijala, elektronistagmografije, posturografije, TPM edukaciju za transplantacijske koordinatore.
Od XII mj. 1990 god. do 1996 god. radi kao neurolog u Centru za cerebrovaskularne bolesti „Dr Z.Poljaković" u Domu zdravlja „Trnje", Zagreb gdje je istovremeno bila voditelj Laboratorija za EEG i REG.
Od 1995 god. do 2008 god. je član organizacijskog odbora i predavač na Međunarodnoj školi Balintove metode „M.Kulenović" u Interuniverzitetskom centru u Dubrovniku u organizaciji Hrvatskog društva Balintovih grupa.
1996 god. dobila Zahvalnicu Zbora liječnika Republike Hrvatske za uloženi trud u zborskoj djelatnosti te trud na unapređenju zdravlja naroda.
Od l996 god. radi kao neurolog u Referentnom centru za intenzivnu neurologiju ministarstva zdravstva pri Neurološkoj klinici KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu sa užim područjem interesa u području neurovaskularnih bolesti i intezivne medicine.

Status primariusa stekla je 2007 god., a 2008 god. stekla status subspecijaliste intenzivne medicine iz područja neurologije.
Višegodišnji je predavač i član organizacijskog odbora niza Poslijediplomskih tečajeva trajne edukacije i predavač na Poslijediplomskom studiju iz neurologije, obiteljske medicine, hitne i intenzivne medicine, aktivni je sudionik niza međunarodnih i domaćih kongresa. Objavila je nekoliko radova indeksiranih u Current contentsu te drugim časopisima i priručnicima, sudionik je nekoliko Javnih tribina za građanstvo iz područja neurovaskularnih bolesti. Član je Hrvatske liječničke komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog neurološkog društva, Hrvatske udruge Balintovih grupa, Hrvatskog društva za intenzivnu medicinu, Hrvatskog društva za intenzivnu neurologiju.

Poglavlje 10.

10. BIBLIOGRAFIJA

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contents:

1. **Šupe S,** Miličić J, Pavičević R: Analysis of the quantitative dermatoglyphics of the digito-palmar complex in the patients with Multiple sclerosis, Coll. Antropolo 21 (1997)1:319-325
2. Habek M, **Šupe S.,** Poljaković Z., Gelpi E., Alesch F, Ozretić D., Brinar V: Subacute brainstem angioencephalopathy : Favorable outcome with anticoagulation therapy, J of th Neurol Sci 2008, 275 (1-2):167-169
3. Petravić D, Habek M, **Šupe S**, Brinar V: Recurrent optic neuromyelitis with endocrinopathies: a new sindrome or just a coincidence ? Multiple Sclerosis 2006; 12: 1-4
4. Matijević V, Alvir D,Malojčić B, Unušić L, **Šupe S**, Boban M et all: Systemic thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator in acute ischaemic stroke :first Croatian experiences, Neurol Sci 2010 Mar 6 (Eupub ahead in print)
5. Boban M, Poljakovic Z, **Supe S**, Pavlisa G: Unrecognized case of indirect carotid-cavernous fistula. Acta Neurol Belg. 2010 Jun;110(2):216
6. Pavićević R, Miličić J, Bubanović G, **Šupe S** : Serum Tumor Marker Cyfra 21-1 in the Diagnostics of NSCLC Lung Cacner, Coll. Antropol. 1998; 22(2):629-635
7. **Šupe S**, Poljaković Z, Pavliša I, Habek M: An anusual condition of trombolyse-a case report, prihvaćeno za objavu u Cerebrovascular Disease 2011 god.

Radovi objavljeni u časopisima indeksiranim u Index Medicusu, Exerpta Medica, Biological abstract, Chemical abstract

1. **Šupe S,** Blažeković-Milaković S, Stojanović-Špehar S: Sensibility to the unconscious (Balint approach) , Psychiatr Danub. 2005 Dec;17(3-4):230-3
2. **Šupe S,** Matijević V., Kondić Lj, Alvir D: Series of seizures as a sign of development of recurrent malignant neuroleptic syndrome – a case report, Psychiatr Danub. 2006 Jun; 18(1-2):97-101
3. Stojanović-Špehar S, Blažeković-Milaković S, Jokić-Begić N, Pranić SM, **Šupe** S, Katić M. Unaided general practitioners' clinical diagnosis in evaluation of depressive patients: a pilot study. Psychiatr Danub. 2010 Dec;22(4):535-9
4. Stojanovic-Spehar S, Blazeković MS, Amerl SV, Kolic N, **Šupe** S.: Depression prevalence and estimation of psychosocial parameters within adult population in city of Zagreb, Psych Danub 2009, 21(4):497-507
5. Blažeković-Milaković S, Matijašević I, Stojanović-Špehar S, **Šupe S**: Family physicians'views on disclosure of a diagnosis of cancer and care of terminally ill patients in Croatia, Psychiatr Danub. 2006 ;18 (1-2):19-29

6. Vuković H, Blažeković-Milaković S, Stojanović-Špehar S, Bergman B, **Šupe S**: Sensibiltity for the unconscious, The Balint approach-Application in family practice setting, Med Jad 2005; 35(3-4):87-90
7. Stojanović-Špehar S, Blažeković MS, **Šupe S**: Multidisciplinarni odnos-Balintov pristup, Med Fam Croat 2001, 9(2); 73-79
8. Milakovic BS,Stojanovic SS,Marković BB,Katić M, Zupanić G,**Šupe S**: Training cum research- an obligatory form of continuing medical education in Croatia , Acta med Croatica 2007;61(1):117-20
9. Stojanović-Špehar S, Milaković BS, Grbić E, Kumbrija S, **Šupe S:** Izvori učinkovitosti Balintove metode, Med Fam Croat 2001, 9(2); 69-72
10. Blažeković-MilakovićS. Stojanović-Špehar S., Kumbrija S., **Šupe S**., Vuković H:. Allergic Disease in Family Practice-Balint's Approach, Med Fam Croat. 2003;11 (1-2):163

Radovi objavljeni u drugim časopisima:

1. **Šupe S,** Alvir D, Matijević V, Petravić D: Atypical form of neuroleptic malignant syndrome: A case report, Neurol Croat 2001; 50(3-4); 165-170
2. **Šupe S,** Rustemović N: Healing of the stress ulcers in patients with acute stroke in neurological intensive care unit, Neurol.Croatica 2004 ;53(3-4):87-94
3. **Šupe S,** Poljaković Z, Kondić Lj, Petravić D, Špehar SS: Zbrinjavanje komplikacija kasnog stadija Alzheimerove demencije , Neurol. Croatica 2005, 54(3-4);63-75
4. **Šupe S.** Poljaković Z, Kondić Lj: Stres i moždani udar, recenzirano iprihvaćeno za objavu u Neurologia Croatica 2011
5. **Šupe S**,Poljaković Z: Antikoagulantna terapija kod primarnih intracerebralnih krvarenja, prihvaćeno za objavu u Neurologia Croatica 2011 god.
6. Matijević V, **Šupe S.,** Poljaković Z., Radoš M.: Treatment with rFVII a (Novoseven) in acute intracerebral hemorrhage, Neurol Croat 2007, 56 (3-4):59-67
7. Stojanović-Špehar S, Blažeković-Milaković S. Kumbrija S, **Šupe S**, Bilić V, Galić J, Vuković H: Anksiozni bolesnik u obiteljskoj medicini-Balintov pristup. Medix. 2007;71:111-114.

Radovi objavljeni u priručnicima:

1. **Šupe S :** Hitna neurološka stanja, Priručnik Poslijediplomskog tečaja: „Suvremeni pristup dijagnostici i terapiji u primarnoj zdravstvenoj zaštiti" Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Ministarstvo zdravstva i HZZO 1998, 132-139
2. **Šupe S:** Relationship in contemporary medical practice, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 1999 g.
3. **Šupe S:** Neurološka osnova boli, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2000 g.
4. **Šupe S:** Klinička slika i diferencijalna dijagnoza neurofibromatoze tip I (NF1) u neurologiji , Priručnik Poslijediplomskog tečaja « Multidisciplinarni pristup

dijagnostici, terapiji i prevenciji neurofibromatoze tip 1 (NF1) « , Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatski institut za istraživanje mozga 2001; 61-67

5. **Šupe S:** Opijati i neurološke poslijedice zlouporabe droga, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2001 g.
6. **Šupe S.**:Neurološke komplikacije Neurofibromatoze tip 1 kod odraslih, Priručnik Poslijediplomskog tečaja «Multidisciplinarni pristup dijagnostici, terapiji i prevenciji neurofibromatoze tip 1 (NF1) « , Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatski institut za istraživanje mozga 2001; 89 – 95
7. **Šupe S:** Sensibility to the unconscious, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2002 g.
8. **Šupe S**: Neurološke i druge komplikacije kasnog stadija Alzheimerove demencije, Zbornik radova I. Hrvatske konferencije o demencijama 2003;26-28
9. **Šupe S**: Neurološke osnove poremećaja seksualnih funkcija, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2003 g.
10. **Šupe S**: Patient centered medicine, Priručnik u «Patient Centered medicine» Međunarodne škole Balintove metode , IUC Dubrovnik 2004g.
11. **Šupe S**: Benzodiazepini i neurološke osnove anksioznosti, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2005g.
12. **Šupe S**: Neurološke osnove stresa, Priručnik Poslijediplomskog tečaja trajne izobrazbe liječnika: Burn out liječnika u PZZ, Zavod za javno zdravstvo Grada Zagreba i MEF Sveučilišta u Zagrebu, 2005;1-5
13. **Šupe S:** Jatrogeni pacijent, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2006 g.
14. **Šupe S :** Stres i rizik razvoja moždanog udara , Zbornik radova I Kongresa Društva nastavnika opće/obiteljske medicine 2010, 143-151
15. **Šupe S** : Tromboliza sa rTPA-naša iskustva, Priručnik Poslijediplomskog tečaja iz Intenzivne neurologije u organizaciji Klinike za neurologiju KBC, studeni 2007
16. **Šupe S.,** Poljaković Z: Dijagnostička obrada u odlučivanju o primjeni trombolize : NIHSS Skala , Priručnik iz Poslijediplomskog tečaja iz intenzivne neurologije, 2007 g.
17. **Šupe S:** Neurološke osnove stresa i rizik razvoja moždanog udara**,** Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2007 g.
18. **Šupe S,** Poljaković Z: Dijagnostička obrada u odlučivanju o primjeni trombolize : NIHSS Skala , Priručnik iz Poslijediplomskog tečaja iz intenzivne neurologije, 2007 g.
19. **Šupe S**: Training through research, Priručnik Međunarodne škole Balintove metode, IUC Dubrovnik 2008 g.
20. **Šupe S**: Rizični aterosklerotski plak, Priručnik poslijediplomskog tečaja "Karotidna bolest " u organizaciji Klinike za neurologiju KBC Zagreb i MEF Sveučilišta u Zagrebu 2009 g.
21. **Šupe S:** Komplementarni pristup terapiji vrtoglavica, Priručnik Poslijediplomskog tečaja "Dijagnostika i liječenje vrtoglavica" u organizaciji Klinike za neurologiju KBC Zagreb i MEF 2009 g.
22. **Šupe S:** Dijagnostika i liječenje Sy Guillain Barre, Priručnik Poslijediplomskog studija iz neurologije u organizaciji Klinike za neurologiju KBC i Medicinkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu 2010 g.

23. **Šupe S:** Antitrombotici u prevenciji i liječenju moždanog udara, Priručnik Poslijediplomskog studija iz obiteljske medicine u organizaciji Škole narodnog zdravlja A.Štampar i MEF Sveučilišta u Zagrebu 2011 g.
24. **Šupe S:** Suvremeni pristup liječenju povišenog intrakranijskog tlaka**,** Priručnik Polijediplomskog studija iz Hitne i intezivne medicine u organizaciji Klinike za unutrašnje bolesti KBC Zagreb i MEF Sveučilišta u Zagrebu 2011 g.
25. Akrap V, Kondić Lj, **Šupe S**: Smetnje komunikacije nakon moždanog udara, Priručnik za obitelji ooba sa afazijom, Ministarstvo obitelji, branitelja i međugeneracijske solidarnosti, 2005
26. Kondić Lj, Akrap V, **Šupe S**: Biometeorološki faktori u osoba sa moždanim udarom i poremećajima funkcije mozga, Priručnik za osobe sa afazijom i njihove obitelji, Gradski ured za rad i socijalnu skrb Grada Zagreba, 2005g.

Sažeci radova sa domaćih i međunarodnih kongresnih priopćenja:

1. **Šupe S,**Poljaković Z,Pavliša D: An unusual condition of thrombolyse- a case report - Knjiga sažetaka sa IV World congress of controversis in neurology (CONY), 2010,Barcelona, Spain
2. **Šupe S.** Terapijske dileme u primjeni antikoagulantne terapije kod primarnih intracerebralnih krvarenja - Neurologia croatica 2010 g, Sažeci II Hrvatskog kongresa intenzivne neurologije
3. **Šupe S:** Indikacijski kriteriji uz specifičnost neurološkog statusa te dijagnostička obrada u procjeni bolesnika za primjenu trombolize, Sažetak u Zborniku XXXII Zdravstvenih dana Karlovac 2010g.
4. **Šupe S**: Antikoagulantna terapija u pacijenata sa intracerebralnim krvarenjem, sažeci V Hrvatskog neurološkog kongresa, Neurol.Croat.2009g.
5. **Šupe S,**Matijević V,Poljaković Z,Malojčić B,Alvir D: Treatment with rTPa among patients with intracerebral haemorrhage-our experiencies, Sažetak Zbornika II CONY (Svjetski kongres kontroverzi u neurologiji) Berlin 2008g.
6. **Šupe S**, Alvir D, Matijević V, Malojčić B : Opetovani razvoj malignog neuroleptičkog sindroma- prikaz slučaja , Abstract Neurol Croat 2005, 54 (4), 151-152
7. **Šupe S**, Poljaković Z, Rustemović N, Matijević V: Healing of the stress ulcers in patients with acute stroke in a neurological intensive care unit, Abstract Eur J Neurol 2006: l3;190
8. **Šupe S,** MatijevićV, Alvir D: Serial seizures and acute renal failure – result of a noncritical combination of neuroleptic drugs, Abstract. Neurol Croat 2001, 50(4);64
9. **Šupe S,** Celić-Bunikić S, Matijević V, Alvir D: Epileptic status caused by water intoxication, Abstract Neurol Croat 2004, 53(3);32-34
10. **Šupe S,** Kovač I, Ribarić B: Stabilometrijska analiza ravnoteže u zdravih ispitanika nakon deprivacije spavanja, Acta Clin Croat 1997(36); 201
11. Alvir D, **Šupe S,** Matijević V: Subakutni razvoj parapareze- dijagnostičke dileme, prikaz slučaja, Abstract .Neurol Croat 2001, 50(4); 11
12. Blažeković-Milaković S, Špehar SS, Kumbrija S, Grbić E, **Šupe S**: Allergic Diseases in Family Practice- Balint's Approach, Abstract Med Fam Croat , 2003, vol 11 (1-2); 16

13. Petravić D, Habek M, **Šupe S,** Mahović D, Franjić J: Reccurent optic neuromyelitis with endocrinopathies – case report, Abstract Neurol Croat 2005, 54(1); 47
14. Matijević V, Alvir D, Malojčić B, Radoš M, **Šupe S**: Embolizacijsko liječenje aneurizmi- naša iskustva, Abstract Neurol Croat 2005, 54(4); 106
15. Kumbrija S, Blažeković-Milaković S, Stojanović-Špehar S**,** Grbić E, **Šupe S.** Balint method – sources of efficacy. U: Balint after Balint.12. Mednarodni Balintov kongres. Portorož, 2.-7. Okt. 2001. 2. Slovenski Balintovi dnevi. Portorož, 5. Okt. 2001. Portorož: /vlast. izd./, /s.l./.
16. Grbić E, Blažeković-Milaković S**,** Kumbrija S, Stojanović-Špehar S, **Šupe S.** Balint method – sources of efficacy. U: Balint after Balint.12. Mednarodni Balintov kongres. Portorož,2.-7. Okt. 2001. 2. Slovenski Balintovi dnevi. Portorož, 5. Okt. 2001. Portorož: /vlast. izd./, /s.l./
17. Blažeković-MilakovićS. Stojanović-Špehar S., Kumbrija S.,**Šupe S.,** Vuković H. Alergološke bolesti u ambulanti obiteljske medicine –Balintov pristup. U: Zbornik X.kongres obiteljske medicine. Zagreb, 2003. Hrvatska udružba obiteljske medicine; 2003; 35.
18. Blazekovic-Milakovic S, Stojanović-Špehar S**,** Kumbrija S, Vukovic H, **Supe S**, Galic J.The Balint Method-Source of the Patinet Centred Approach. U:The Doctor, the Patient and their well-being.world wide proceedings of the the 13th International Balint Congress Berlin 2003.International Balint Federation, 2003. p.130-146
19. Božićević V, Turek S, Bamburač J, **Šupe S**, Radočaj M: Značaj procjene kognitivnih funkcija u bolesnika oboljelih od ishemičke cerebrovaskularne bolesti, Abstract u Zborniku V Simpozija o cerebrovaskularnim bolestima 1990 g; 111