Uloga genskih polimorfizama u antikoagulacijskoj terapiji varfarinom

Mandić, Dario

Doctoral thesis / Disertacija

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:731264

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

DARIO MANDIĆ

ULOGA GENSKIH POLIMORFIZAMA U ANTIKOAGULACIJSKOJ TERAPIJI VARFARINOM

DOKTORSKI RAD

Mentori: prof. dr. sc. Lada Rumora

prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med.

Zagreb, 2017.



University of Zagreb

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

DARIO MANDIĆ

THE ROLE OF GENETIC POLYMORPHISMS IN WARFARIN ANTICOAGULANT THERAPY

DOCTORAL THESIS

Supervisors: Lada Rumora, Ph.D.

Nada Božina, MD, Ph.D.

Zagreb, 2017

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku i Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC Osijek i u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije.

Od srca se zahvaljujem svojim mentoricama, prof. dr. sc. Ladi Rumori i prof. dr. sc. Nadi Božini, na stručnom vođenju, savjetima i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se kolegicama i kolegama u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek i u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije na podršci i pomoći u sakupljanju uzoraka i izradi analiza.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Marini Samardžiji, predstojnici Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu KBC Osijek na pomoći u sakupljanju uzoraka i stručnoj pomoći.

Zahvaljujem se svojem šefu, doc. dr. sc. Vatroslavu Šeriću, pročelniku Zavoda za kliničku laboratorijsku dijagnostiku KBC Osijek na velikoj podršci i pomoći tijekom izrade ovog rada.

Najveću zahvalu upućujem svojoj obitelji, osobito supruzi Sanji, na bezgraničnoj vjeri u mene, strpljenju, razumjevanju, i bezuvjetnoj ljubavi i podršci.

SAŽETAK

Oralni antikoagulans varfarin se već desetljećima koristi u terapiji i/ili prevenciji tromboembolijskih stanja različite etiologije. Varfarin ima uzak terapijski raspon i pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost u odgovoru na terapiju, što može potencijalno rezultirati i po život opasnim komplikacijama uslijed prekomjernog antikoagulacijskog učinka i krvarenja.

Cilj ovoga istraživanja je ispitati utjecaj polimorfizama *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2*3* i *GGCX* 12970C>G te čimbenika okoliša i životnih navika (konzumacija alkohola, pušenje, fizička aktivnost, unos vitamina K hranom) na stabilnu dozu održavanja i nuspojave terapije varfarinom, kao i izrada regresijskog modela iz farmakogenetskih i drugih dostupnih podataka pomoću kojega bi se mogla predvidjeti individualna doza varfarina.

U istraživanju su sudjelovala 204 bolesnika na terapiji varfarinom i 420 zdravih ispitanika. Od ispitanika su uzeti podatci o okolišnim i životnim navikama koje mogu utjecati na terapiju varfarinom i zabilježene su doze varfarina i vrijednosti protrombinskog vremena tijekom terapije. Genotipizacija ispitivanih polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.

Rezultati genotipizacije na zdravim ispitanicima pokazuju kako je učestalost polimorfizama *VKORC1* 1639G>A i *VKORC1* 1173>T u populaciji Hrvatske u skladu s učestalošću u drugim europskim populacijama. Rezultati istraživanja na skupini bolesnika na terapiji varfarinom ukazuju na statistički značajnu povezanost stabilne doze održavanja varfarina sa sljedećim čimbenicima: genotipovima *CYP2C9*, *VKORC1* i *CYP4F2*, zatim s fizičkom aktivnošću, tjelesnom površinom, te uzimanjem lijekova koji utječu na metabolizam varfarina. Algoritam za predviđanje doze dobiven višestrukom linearnom regresijom u stanju je objasniti 49,8 % varijabilnosti doze varfarina. Dokazana je povezanost vremena potrebnog za postizanje stabilne doze varfarina s polimorfizmom *CYP4F2*3,* te povezanost udjela vremena provedenog unutar terapijskog raspona i pojave nuspojava terapije varfarinom u obliku prekomjerne antikoagulacije s polimorfizmima *VKORC1* -1639G>A i/ili *VKORC1* 1173C>T. Isto tako, utvrđena je povezanost *VKORC1* -1639G>A i/ili *VKORC1* 1173C>T te *CYP4F2*3* s nuspojavama terapije varfarinom u obliku krvarenja.

Ključne riječi: varfarin, antikoagulacijska terapija, genski polimorfizmi, *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2*, *GGCX*

SUMMARY

Warfarin is the most commonly used oral anticoagulant worldwide. It is used for over a half of century for prevention of thromboembolic disorders. Dosage of warfarin is difficult due to a very narrow therapeutic index (with life-threatening overdose complications) and wide interindividual variability. Factors that influence warfarin therapy response are nutrition, some diseases, drug-drug interactions, and, most significantly, genetic factors.

The aim of this study was to investigate influence of *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2*3* and *GGCX* 12970C>G genetic polymorphisms, along with some clinical and environmental factors (alcohol consumption, smoking, physical activity and dietary vitamin K), on maintenance dose and adverse effects of warfarin therapy and implementation of those data in dosage prediction algorithm.

Study included 420 healthy volunteers and 204 patients on warfarin therapy. Warfarin doses were recorded during therapy for all patients, and clinical and environmental factor data were collected. Anticoagulant therapy monitoring was performed by prothrombin time measurement. Genetic analyses of *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* and *GGCX* polymorphisms were performed using real-time polymerase chain reaction.

Genotyping results on healthy population confirms that allele frequencies for *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T polymorphisms in Croatian population are in good agreement with other populations of European ancestry. Statistically significant association with warfarin maintenance dose in patient population were confirmed with multivariate analysis for following variables: *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* genotype, physical activity, body surface area and number of drugs that increase or decrease warfarin clearance. Multiple regression model obtained in our study could explain 49,8 % of interindividual variability in warfarin maintenance dose. *CYP4F2*3* genetic polymorphism is associated with time to stable warfarin dose. *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T genetic polymorphisms are associated with the time spent in therapeutic range. On the other hand, *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T genetic polymorphisms are associated with overanticoagulation, while *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T, and *CYP4F2*3* genetic polymorphisms are associated with bleedings encountered during warfarin therapy.

Keywords: varfarin, anticoagulation therapy, genetic polymorphisms, *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2*, *GGCX*

SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. GENSKE OSNOVE RAZLIČITOSTI U ODGOVORU NA TERAPIJU LIJEKOVIMA 1

1.2. VARFARIN I ORALNA ANTIKOAGULACIJSKA TERAPIJA 3

1.3. HEMOSTAZA I KOAGULACIJA KRVI 4

1.3.1. VITAMIN K I KOAGULACIJA KRVI 8

1.4. INDIKACIJE I PRIMJENA VARFARINA 10

1.5. FARMAKOKINETIKA VARFARINA 12

1.6. FARMAKODINAMIKA VARFARINA 14

1.7. FARMAKOGENETIKA VARFARINA 15

1.7.1. POLIMORFIZMI GENA *CYP2C9* 16

1.7.2. POLIMORFIZMI GENA *VKORC1* 18

1.7.3. POLIMORFIZMI GENA *CYP4F2* 19

1.7.4. POLIMORFIZMI GENA *GGCX* 20

1.7.5. POLIMORFIZMI DRUGIH GENA 20

1.8. INTERAKCIJE VARFARINA S DRUGIM LIJEKOVIMA 21

1.9. OSTALI UTJECAJI NA TERAPIJU VARFARINOM 23

1.10. PRAĆENJE TERAPIJSKOG UČINKA VARFARINA 24

1.11. NUSPOJAVE ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM 25

1.12. IZAZOVI ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM 27

1.12.1. PRAĆENJE KVALITETE ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE 27

1.12.2. TERAPIJA PREKOMJERNE ANTIKOAGULACIJE I KRVARENJA 28

1.12.3. DOZIRANJE VARFARINA 28

2. OBRAZLOŽENJE TEME 31

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA 33

3.1. ISPITANICI 33
3.2. OBILJEŽJA BOLESNIKA NA TERAPIJI VARFARINOM 34
3.3. METODE ISTRAŽIVANJA 37
3.3.1. ODREĐIVANJE PROTROMBINSKOG VREMENA (PV) 37
3.3.2. IZDVAJANJE DNA 37
3.3.3. GENOTIPIZACIJA 38
3.3.3.1. GENOTIPIZACIJA *CYP2C9* 40
3.3.3.2. GENOTIPIZACIJA *VKORC1* 41
3.3.3.3. GENOTIPIZACIJA *CYP4F2* 42
3.3.3.4. GENOTIPIZACIJA *GGCX* 43
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 44
4. REZULTATI 46
4.1. SKUPINA ZDRAVIH ISPITANIKA 46
4.2. SKUPINA BOLESNIKA NA TERAPIJI VARFARINOM 47
4.2.1. GENOTIPIZACIJA 49
4.2.2. STABILNA DOZA ODRŽAVANJA VARFARINA 51
4.2.2.1. MULTIVARIJATNA ANALIZA – VIŠESTRUKA LINEARNA REGRESIJA 59
4.2.2.2. VRIJEME DO STABILNE DOZE VARFARINA 64
4.2.3. UDIO VREMENA PROVEDENOG U TERAPIJSKOM RASPONU 66
4.2.4. NUSPOJAVE TERAPIJE VARFARINOM 68
4.2.4.1. PREKOMJERNA ANTIKOAGULACIJA (INR > 4) 68
4.2.4.2. KRVARENJA 70
4.2.4.3. TERAPIJA NUSPOJAVA LIJEČENJA VARFARINOM 75
5. RASPRAVA 77
5.1. GENOTIPIZACIJA 77
5.2. STABILNA DOZA ODRŽAVANJA VARFARINA 78

5.2.1. OVISNOST DOZE VARFARINA O GENOTIPU 85
5.2.2. FENOTIP DOZE U OVISNOSTI O GENOTIPU 91
5.2.3. REGRESIJSKA ANALIZA – MODEL ZA PREDVIĐANJE DOZE VARFARINA 92
5.2.4. VRIJEME DO STABILNE DOZE VARFARINA 95
5.3. UDIO VREMENA PROVEDENOG U TERAPIJSKOM RASPONU 96
5.4. NUSPOJAVE TERAPIJE VARFARINOM 97
5.4.1. PREKOMJERNA ANTIKOAGULACIJA (INR > 4) 97
5.4.2. KRVARENJA 99
5.4.3. TERAPIJA NUSPOJAVA LIJEČENJA VARFARINOM 104
5.5. KORISNOST FARMAKOGENETIKE U ANTIKOAGULACIJSKOJ TERAPIJI VARFARINOM 105
5.6. OSVRT NA BUDUĆNOST ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM 105
6. ZAKLJUČCI 107
7. PRILOZI 109
7.1. POPIS OZNAKA I KRATICA 109
LITERATURA 112
ŽIVOTOPIS 133
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 138
BASIC DOCUMENTATION CARD 139

1. UVOD

1.1. GENSKE OSNOVE RAZLIČITOSTI U ODGOVORU NA TERAPIJU LIJEKOVIMA

Jedan od najvećih izazova suvremene farmakoterapije je potreba da bolesnik dobije odgovarajući lijek u odgovarajućoj dozi. Često se susreću velike intraindividualne i interindividualne razlike u odgovoru na lijek, bilo u smislu učinkovitosti tretmana, toksičnosti ili oboje. Varijabilnost odgovora na lijek definirana je interakcijom između fizioloških (dob, spol i dr.), patofizioloških (funkcija jetre, bubrega, pluća, kardiovaskularnog sustava, druge bolesti i dr.), okolišnih (ostali lijekovi, pušenje, konzumacija alkohola, prehrana i dr.) i genetičkih čimbenika (1). Kod određenih lijekova, genski čimbenici imaju dominantan utjecaj u varijabilnosti odgovora na primijenjeni lijek. Smatra se da je učestalost individualnih razlika u genskom zapisu otprilike svakih 100 - 300 nukleotida u ljudskom genomu koji broji oko 3 milijarde nukleotida (2-4). Varijacija u slijedu DNA koja je u populaciji prisutna s učestalošću od 1 % ili više naziva se polimorfizam. Najčešće varijacije u slijedu DNA su jednonukeotidni polimorfizmi (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*). SNP-ovi su zamjene jedne baze u slijedu DNA. Procjenjuje se da je broj SNP-ova u genomu preko 10 milijuna (3). Najrasprostranjeniji alel u populaciji naziva se alel divljeg tipa (wt, od engl. *wild type*) i smatra se „normalnim“, a alel s promjenom u nukleotidu u odnosu na wt predstavlja varijantni, odnosno promijenjeni alel (var). SNP-ovi se mogu javiti u kodirajućoj i nekodirajućoj regiji genoma. Promjene u kodirajućoj regiji rezultiraju promjenama u slijedu aminokiselina koje mogu rezultirati promjenama u strukturi i funkciji proteina. Genske promjene rezultiraju određenim fenotipom, odnosno izražavanjem određenih svojstava. Fenotip se može izraziti u farmakokinetici (apsorpciji, distribuciji, metabolizmu ili izlučivanju lijeka) ili u farmakodinamici, odnosno učinku lijeka na ciljnu molekulu. Farmakogenetika je grana farmakologije koja proučava utjecaj jednog ili nekoliko gena na odgovor organizma na lijek. Farmakogenomika je širi pojam koji proučava utjecaj svih gena (genoma) na odgovor organizma na lijek (1, 5). Farmakogenetički utjecaj na farmakokinetiku lijekova najizraženiji je u metabolizmu lijekova. Metabolizam, odnosno biotransformacija lijekova i ksenobiotika, uključuje dva stupnja: u I. fazi oni se prevode u polarniji oblik (uglavnom reakcijama oksidacije, redukcije i hidrolize), dok se u II. fazi ti aktivirani oblici lijekova i ksenobiotika konjugiraju u oblik topiv u vodi koji je najpogodniji za eliminaciju. Otprilike 80 % reakcija prve faze biotransformacije katalizirano je enzimima natporodice citokroma P450 (CYP) koji

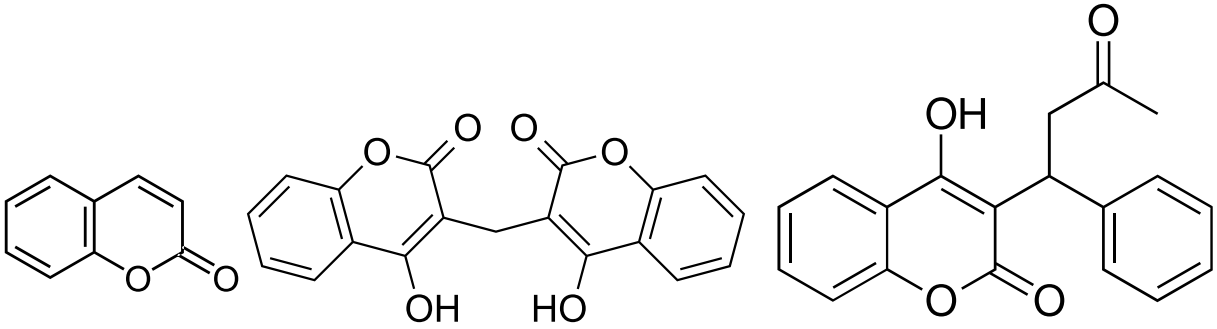
kataliziraju okisidaciju, redukciju i druge reakcije endogenih i egzogenih spojeva. Najveća aktivnost enzima CYP je u jetri, ali može se naći i u drugim tkivima (gastrointestinalni trakt, središnji živčani sustav, pluća i dr.). Smatra se da su enzimi CYP odgovorni za metabolizam oko 75 % lijekova (6). Važno svojstvo nekih enzima CYP je inducibilnost, odnosno učestalo izlaganje određenim supstratima pojačava njihovu aktivnost ili ekspresiju (6). Poznato je 59 aktivnih gena koji kodiraju CYP-ove, razvrstanih u 18 porodica i 43 potporodice. Nomenklatura CYP-ova je definirana prema sličnosti u slijedu aminokiselina – porodice CYP imaju sličnost u slijedu aminokiselina veću od 40 %, potporodice veću od 55 %, a pojedini enzimi imaju sličnost od preko 98 %. Za primjer označavanja možemo uzeti enzim CYP2C9: označavanje počinje s oznakom natporodice (CYP), zatim se nastavlja s oznakom porodice gena (2) koju slijedi veliko slovo koje označava potporodicu (C) i na kraju završava s oznakom pojedinog enzima (9). Reakcije katalizirane enzimima CYP uglavnom rezultiraju inaktivnim metabolitima lijeka, no u nekim slučajevima takve reakcije mogu dati i aktivne metabolite ili toksične produkte (6, 7). SNP-ovi u genima koji kodiraju enzime odgovorne za metabolizam lijekova mogu rezultirati izražajem različitih fenotipova. Prema intenzitetu metabolizma lijeka razlikujemo nekoliko fenotipova:

a) fenotip brzog metabolizma (EM, od engl. *extensive metabolizer*): aktivnost enzima je nepromijenjena; genotip ima oba funkcionalna alela, odnosno homozigot je divljeg tipa (wt/wt);
b) fenotip sporog metabolizma (PM, od engl. *poor metabolizer*): ovo svojstvo nasljeđuje se autosomno recesivno; aktivnost enzima je jako snižena ili je uopće nema tako da dolazi do nakupljanja supstrata odnosno lijeka; genotip ima oba varijantna alela, odnosno u pitanju je varijantni homozigot (var/var);
c) fenotip srednjeg metabolizma (IM, od engl. *intermediate metabolizer*): nasljeđuje se autosomno recesivno; aktivnost enzima je normalna ili snižena; genotip ima jedan alel nepromijenjen, a drugi alel je varijantan, odnosno u pitanju je heterozigot (wt/var);
d) fenotip izrazito ubrzanog metabolizma (UEM, od engl. *ultraextensive metabolizer*): nasljeđuje se autosomno dominantno; aktivnost enzima je izrazito povišena; posljedica je amplifikacije gena (8, 9).

SNP-ovi mogu utjecati i na farmakodinamiku lijeka, odnosno na promjenu strukture ili ekspresije proteina (koji su ili receptori lijeka, transporteri, enzimi ili na neki drugi način reguliraju učinak lijeka), te njihovom promjenom mijenjati i intenzitet učinka lijeka (7, 9).

1.2. VARFARIN I ORALNA ANTIKOAGULACIJSKA TERAPIJA

Dvadesetih godina prošlog stoljeća na sjeveru Sjedinjenih Američkih Država (SAD) i u Kanadi zabilježen je neuobičajen pomor stoke koja bi nakon benignih zahvata iskrvarila. Uzrok krvarenju je nađen u pokvarenom sijenu kojega je stoka jela. Karl Link i suradnici sa Sveučilišta Wisconsin su 1933. godine uspjeli izolirati spoj koji je izazivao krvarenje kojega su nazvali dikumarol (10). Dikumarol nastaje iz kumarina koji se nalazi u mnogim biljkama, ali sam po sebi nema antikoagulacijska svojstva. Metabolizmom kumarina od strane nekih gljivica nastaje prvo 4-hidroksikumarin te na kraju dikumarol. Dikumarol je 1941. godine ušao u kliničku uporabu. Rađena su i testiranja dikumarola kao rodenticida, ali su ispitivanja pokazala da nema dovoljno jaku antikoagulacijsku aktivnost. Tijekom sljedećih godina Karl Link i suradnici su radili na sintezi spojeva sličnih dikumarolu koji su također imali antikoagulacijska svojstva. Ti napori su 1948. godine kulminirali sintezom u vodi topivog kumarinskog spoja broj 42, s puno jačim antikoagulacijskim učinkom od dikumarola. Taj spoj nazvan je varfarin, prema početnim slovima imena organizacije koja je financirala rad profesora Linka (WARF – od *Wisconsin Alumni Research Foundation*) s dodatkom –arin (od kumarina).

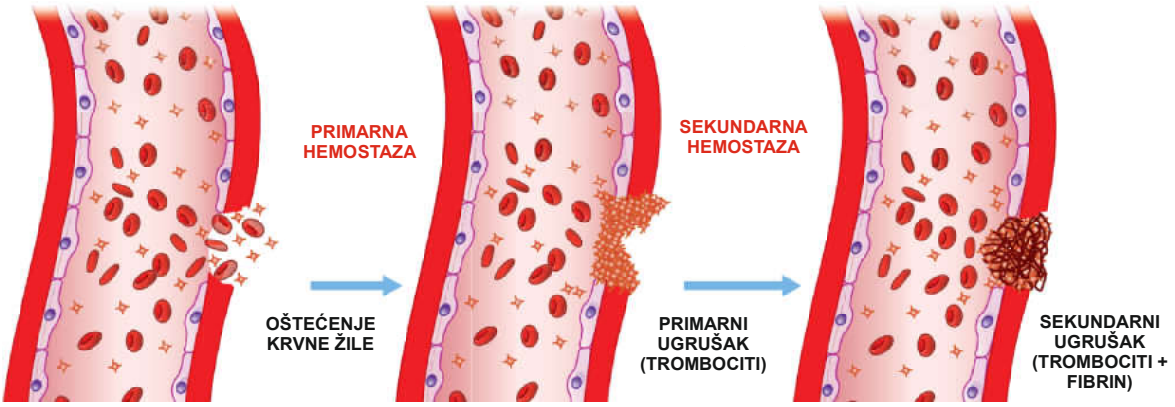


Slika 1-1 Struktura kumarina, dikumarola i varfarina

Varfarin je prvo bio registriran kao rodenticid, ali već 1951. godine započinju prva istraživanja mogućeg terapijskog antikoagulacijskog učinka varfarina. Budući da su istraživanja pokazala puno bolja klinička svojstva varfarina u odnosu na dikumarol, 1954. godine je odobren za kliničku primjenu (11). Nakon što je 1955. prepisan tadašnjem predsjedniku SAD-a Eisenhoweru kao terapija nakon srčanog udara, lijek je naišao na široki prijem u SAD-u i u svijetu. Od tada pa sve do danas, već više od 60 godina, varfarin je najviše korišteni oralni antikoagulacijski lijek u svijetu (12).

1.3. HEMOSTAZA I KOAGULACIJA KRVI

Koagulacijski sustav sastavni je dio mehanizma hemostaze, iznimno precizno reguliranog dinamičkog procesa u organizmu kojemu je svrha održavanje krvi u tekućem stanju te brzo zaustavljanje krvarenja kada ono već nastupi, lokalizacija zgrušavanja krvi na mjestu ozljede te kasnija fibrinoliza i uklanjanje ugruška. Ukoliko je sustav hemostaze poremećen, može doći do po život opasnih krvarenja ili tromboza (13, 14). Glavni dijelovi sustava hemostaze su krvne žile, trombociti, koagulacijski faktori, inhibitori koagulacije te fibrinolitički sustav (13). Proces zaustavljanja krvarenja započinje primarnom hemostazom koja uključuje lokalnu vazokonstrikciju koja smanjuje gubitak krvi i ujedno približava druge komponente sustava hemostaze (trombocite i koagulacijske proteine) bliže stjenki krvne žile i ozljedi. Prvi korak u primarnoj hemostazi je adhezija trombocita na komponente subendotela krvne žile, prvenstveno kolagen, pomoću glikoproteinskih receptora Ia/IIa te VI. Daljnja adhezija je potpomognuta von Wilebrandovim faktorom (VWF) koji se oslobađa iz stanica endotela i trombocita, a pomoću kojega se preko glikoproteinskih receptora Ib/IX vežu novi trombociti. Adhezija trombocita pokreće njihovu aktivaciju koja uključuje promjenu njihova oblika, pojavu glikoproteina IIb/IIIa na membrani te sekreciju sadržaja granula u okolinu. Sekrecijom se oslobađaju adenozin–trifosfat (koji pospješuje daljnju aktivaciju trombocita), serotonin, faktor aktivacije trombocita, trombocitni faktor 4 i tromboksan A_2 koji djeluje tako da pojačava vezanje trombocita jednih na druge, odnosno njihovu agregaciju. Aktivacija trombocita povezana je s povišenjem koncentracije iona kalcija (Ca^{2+}) u citosolu trombocita. Oni uzrokuju aktivaciju određenih enzima koji utječu na ekspresiju glikoproteina IIb/IIIa i promjenu oblika trombocita. Na glikoproteine IIb/IIIa dvaju susjednih aktiviranih trombocita veže se fibrinogen čime ih povezuje i time učvršćuje primarni ugrušak (13, 14).



Slika 1-2 Stupnjevi hemostaze nakon ozljede krvne žile
(prilagođeno prema (14))

Sekundarna hemostaza odnosno koagulacija krvi predstavlja stabilizaciju primarnog ugruška nastalog agregacijom trombocita. Ona uključuje niz enzimskih reakcija, poznatih kao koagulacijska kaskada, koje rezultiraju stvaranjem netopivog fibrinskog ugruška (15). Koagulacijske proteine krvi (Tablica 1) možemo funkcionalno svrstati u supstrate (fibrinogen), enzime (prokoagulacijske faktore), kofaktore i kontrolne proteine (antikoagulacijske faktore). Enzimi se u cirkulaciji nalaze u obliku zimogena, odnosno inaktiviranih enzimskih prekursora koji se aktiviraju u koagulacijskoj kaskadi. Aktivacija se postiže bilo konformacijskom promjenom molekule ili proteolitičkim kidanjem jedne ili više peptidnih veza zimogena. Svi aktivirani enzimi koagulacijske kaskade (osim faktora XIII koji je transglutaminaza) su serinske proteaze koje sadrže serin u aktivnom mjestu i dijele zajednički katalitički mehanizam (14). Za većinu reakcija u koagulaciji krvi nužni su ioni kalcija. Prva faza koagulacije krvi *in vivo* je inicijacija. Ona započinje izlaganjem tkivnog faktora (TF) koji se nalazi na membrani subendotelnih stanica krvnim stanicama i koagulacijskim proteinima krvi. TF na sebe vrlo čvrsto veže dostupni koagulacijski faktor VII (FVII) i aktivira ga. Aktivirani faktor VII (FVIIa), u kompleksu s TF-om (TF:VIIa) katalizira dvije reakcije: jedna je aktivacija faktora X (FX) u aktivirani faktor X (FXa), a druga je aktivacija faktora IX (FIX) u aktivirani faktor IX (FIXa).

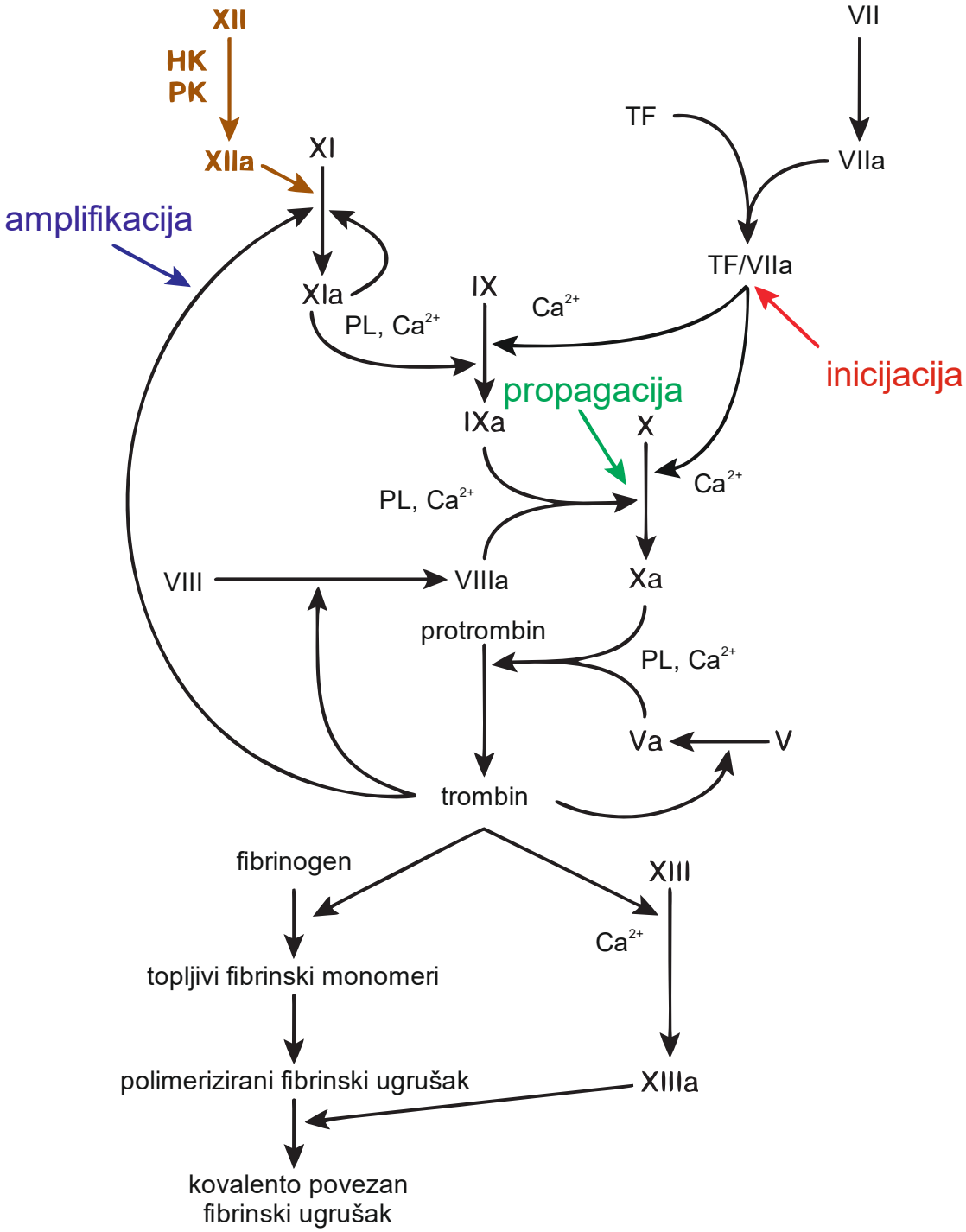
Tablica 1 Koagulacijski proteini razvrstani prema funkciji

supstrat	**enzim**	**kofaktor**	**kontrolni protein**
fibrinogen	faktor II (protrombin)	tkivni faktor (TF)	protein C
	faktor VII	faktor V	antitrombin
	faktor IX	faktor VIII	heparin kofaktor II
	faktor X	HK	TFPI
	faktor XI	trombomodulin	ZPI
	faktor XII	protein S	α_2-makroglobulin
	prekalikrein	protein Z	α_1-antitripsin
	faktor XIII		

HK – kininogen velike molekulske mase; TFPI - inhibitor puta tkivnog faktora; ZPI – inhibitor proteaze ovisan o proteinu Z

FXa se veže s malim količinama aktiviranog faktora V (FVa) oslobođenog sekrecijom iz trombocita prilikom njihove aktivacije. Kompleks FXa/FVa katalizira stvaranje male količine trombina (manje od 5 % ukupno nastalog trombina u reakciji) koji ima ključnu ulogu u sljedećoj fazi koagulacije - amplifikaciji (Slika 1-3). Nastali trombin djeluje na: 1) aktivaciju trombocita; 2) aktivira faktor V (FV) oslobođen sekrecijom iz granula trombocita; 3) aktivira faktor VIII (FVIII) i oslobađa ga iz kompleksa s VWF-om i 4) aktivira faktor XI (FXI) koji aktivira FIX (13-17). Opisani mehanizmi djelovanja trombina u fazi amplifikacije stvaraju preduvjete za nastanak veće količine trombina. U trećoj fazi, fazi propagacije, koja se odvija na površini aktiviranih trombocita, nastaje kompleks FIXa/FVIIIa koji aktivira FX. FXa stvara kompleks s FVa i započinje naglo stvaranje veće količine trombina potrebne za nastanak dovoljne količine fibrina i stvaranje stabilnog ugruška (13, 15, 16). Aktivnost kompleksa FXa/FVa nastalog u fazi propagacije je 50 - 100 puta veća nego istog kompleksa nastalog u fazi inicijacije (16). Nastali trombin kida topivi fibrinogen u fibrinske monomere koji polimeriziraju u fibrinski ugrušak i aktivira faktor XIII (FXIII) koji stabilizira ugrušak stvaranjem kovalentnih križnih veza između polimeriziranih molekula fibrina (16, 17). Takozvani „unutarnji“ put koagulacije, koji uključuje kininogen velike molekulske mase (HK, engl. *High-Molecular-Weight Kininogen*), prekalikrein i faktor XII, nema značajnu ulogu u koagulaciji *in vivo* (14, 16).

Osim prokoagulacijskih faktora koji su važni za sprječavanje krvarenja i stvaranje tromba, za hemostazu su vrlo važni i antikoagulacijski faktori koji sprječavaju neželjen nastanak ugruška i trombozu. U inhibiciji i lokalizaciji koagulacije krvi važnu ulogu imaju: 1) protok krvi koji djeluje tako da razrjeđuje aktivirane faktore koagulacije; 2) jetra koja uklanja aktivirane faktore koagulacije iz cirkulacije; 3) mehanizmi negativne povratne sprege koagulacijskih proteina i 4) inhibitori koagulacije. Inhibitori koagulacije su plazmatski proteini koji reguliraju enzimsku aktivnost serinskih proteaza i djeluju tako da usporavaju aktivaciju prokoagulacijskih faktora i potiskuju nastanak trombina (14, 16). U inhibitore koagulacije ubrajamo: antitrombin, heparinski kofaktor II, protein C, protein S, inhibitor puta tkivnog faktora (TFPI, od engl. *tissue factor pathway inhibitor*), protein Z, inhibitor proteaze ovisan o proteinu Z (ZPI, od engl. *Z-dependent protease inhibitor*), α_2-makroglobulin, α_1-antitripsin i α_2-antiplazmin (14, 16).

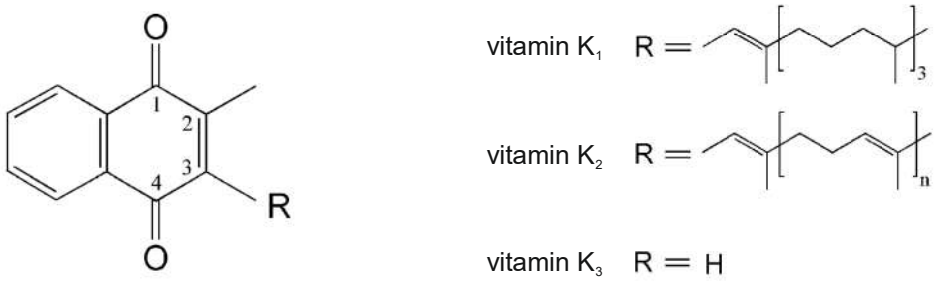


Slika 1-3 Mehanizam koagulacije krvi *in vivo*
V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII – faktori koagulacije; Va, VIIa, VIIIa, IXa, Xa, XIa, XIIa, XIIIa – aktivirani faktori koagulacije; PL - fosfolipidna površina; Ca^{2+} - ioni kalcija; TF – tkivni faktor; HK – kininogen velike molekulske mase; PK – prekalikrein
(prilagođeno prema (14))

1.3.1. VITAMIN K I KOAGULACIJA KRVI

Vitamin K otkriven je tridesetih godina prošlog stoljeća od strane danskog biokemičara Henrika Dama. On je proučavajući utjecaj prehrane na pojavu krvarenja u životinja otkrio liposolubilnu supstanciju koja je, kada bi bila davana životinjama, sprječavala krvarenje. Predložio je naziv vitamin K, prema njemačkom (danskom) *Koagulation*, odnosno koagulacija. Za svoj rad na proučavanju važnosti vitamina K, Dam je 1943. primio Nobelovu nagradu za medicinu (18, 19).

Vitamin K je zajednički naziv za skupinu spojeva sa zajedničkim 2-metil-1,4,-naftokinonskim prstenom. Razlikujemo filokinon ili vitamin K_1 koji nastaje u biljkama, skupinu menakinona, ili vitamin K_2 koje sintetiziraju anaerobne i neke aerobne Gram (+) bakterije, te sintetski menadion ili vitamin K_3 (11, 20, 21). Iako određenu količinu vitamina K sintetiziraju i bakterije u crijevima, ta količina nema veliki utjecaj na status vitamina K u organizmu, tako da je glavni izvor vitamina K prehrana (22).



Slika 1-4 Struktura vitamina K

Najvažniji izvor vitamina K u prehrani je hrana biljnog podrijetla bogata filokinonima. Najviše ga ima u zelenom lisnatom povrću, no može se naći u značajnim količinama i u voću, biljnim uljima, mliječnim proizvodima i dr. (22). Vitamin K je topljiv u mastima i apsorbira se najviše u tankom i nešto u debelom crijevu. Za maksimalnu apsorpciju, koja varira od 40 do 80 %, potrebne su žučne soli i gušteračin sok. Nakon apsorpcije, vitamin K se u krvi transportira putem lipoproteina vrlo niske gustoće (VLDL, engl. *Very Low Density Lipoproteins*) i hilomikrona (19). Transport vitamina K u stanice odvija se preko receptora za apolipoprotein E (ApoE). Najveća količina vitamina K se akumulira u jetri (19). Metabolizam vitamina K započinje s ω-oksidacijom postraničnog lanca, u kojem važnu ulogu ima CYP4F2 (natporodica citokroma P450, porodica 4, potporodica F, enzim 2) (22-24). Metaboliti vitamina K izlučuju se uglavnom putem žuči i mokraće (19). Procijenjene minimalne dnevne potrebe za vitaminom

K su između 0,03 i 1,50 μg/kg po danu (25). Ukupne zalihe vitamina K u organizmu nisu velike (oko 100 μg) i relativno brzo se mogu isprazniti u slučaju nedovoljnog unosa (15). Ipak, deficit vitamina K u zdravih odraslih osoba je uglavnom rijedak iz nekoliko razloga: normalan unos hranom je uglavnom dovoljan da nadoknadimo eventualne gubitke i postojeće zalihe vitamina K se uglavnom uspješno recikliraju ciklusom vitamina K (19, 22, 26).

Za sedam iznimno važnih koagulacijskih proteina koji se sintetiziraju u jetri (protrombin, FVII, FIX, FX te proteini C, S i Z) nužan je vitamin K da bi bili funkcionalni (11, 14). Svi oni prolaze posttranslacijsku modifikaciju koja je iznimno značajna za konačnu aktivnost. Koagulacijski proteini sadrže 10 - 13 glutaminskih (Glu) ostataka koji u jetri prolaze proces γ-karboksilaciju u γ-karboksiglutaminsku kiselinu (Gla). To je posebno važno za prokoagulacijske proteine (protrombin, FVII, FIX, FX) koji se, kako je već navedeno, u cirkulaciji nalaze kao zimogeni, odnosno inaktivne serinske proteaze. Nakon sekrecije u cirkulaciju, dva do tri Gla ostatka vežu po jedan Ca^{2+}, stabilizirajući time tercijarnu strukturu proteina. Taj proces je povezan s konformacijskim promjenama koagulacijskih proteina čime dolazi do izlaganja mjesta vezanja za fosfolipidne membrane. Vezanja prokoagulacijskih faktora (protrombin, FVII, FIX, FX) na fosfolipidne površine oštećenih stanica ili trombocita ključan je proces u koagulacijskoj kaskadi. Upravo ono je posredovano kalcijevim ionima koji koordiniraju vezanje Gla ostataka aktivnog mjesta i anionskih lipida fosfolipidnih membrana te učvršćuju tu vezu (11). Tek nakon vezanja koagulacijski faktori mogu biti podvrgnuti proteolitičkoj aktivaciji i prijeći iz zimogena u aktivne koagulacijske faktore. Otkriće funkcije Gla ostataka objasnilo je zbog čega su kalcijevi ioni nužni za koagulaciju krvi (21). Ukoliko je 9 Glu ostataka γ-karboksilirano dolazi do redukcije u koagulacijskoj aktivnosti od 30 %, dok ako je samo 6 Glu γ-karboksilirano, dolazi do sniženja koagulacijske aktivnosti za više od 95 % (27).

Proces γ-karboksilacije kataliziran je enzimom γ-glutamil karboksilaza (GGCX) čiji je kofaktor vitamin K. Osim za koagulacijske proteine, γ-karboksilacija je važna i za još neke tjelesne proteine (osteokalcin, matriks Gla protein, periostin i dr.). Prilikom γ-karboksilacije dolazi do uklanjanja γ-protona s Glu. Nastali karbanion reagira s CO_2 čime nastaje Gla. U toj reakciji kao elektron-donor sudjeluje reducirani oblik vitamina K – vitamin K hidrokinon (VKH_2) pri čemu se oksidira u vitamin K 2,3-epoksid (VKO) (11, 18, 20, 28, 29). Zbog ograničene zalihe vitamina K u organizmu, VKO se mora reducirati natrag u vitamin K i dalje u VKH_2 da bi se nastavila reakcija γ-karboksilacije. To se postiže kružnom pretvorbom metabolita vitamina K koja se još naziva i ciklus vitamina K (11, 20). Redukciju VKO u vitamin K katalizira enzim

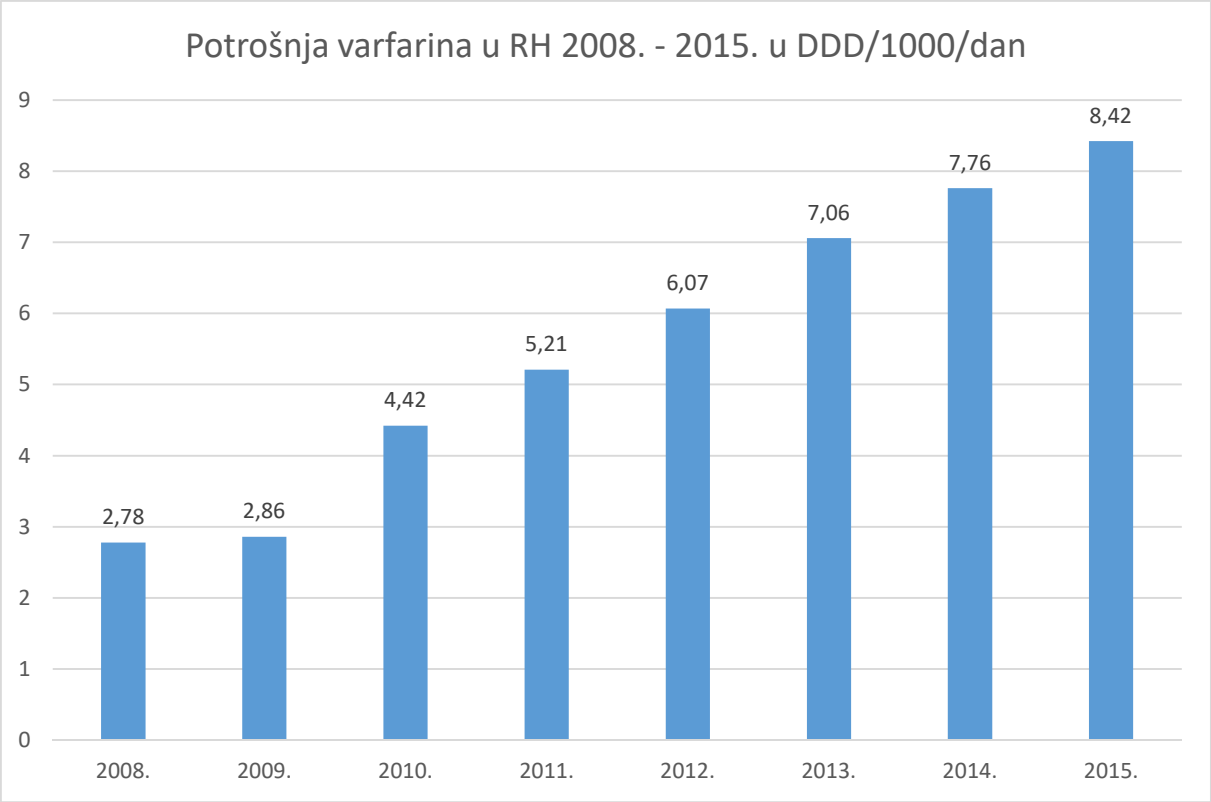
vitamin K ovisna epoksid reduktaza (VKOR), dok se redukcija vitamina K u VKH_2 odvija najvjerojatnije preko dva puta: jedan po svoj prilici katalizira VKOR, dok drugi katalizira kinon reduktaza ovisna o NADPH čija struktura i jasna funkcija još nije određena (11, 18, 22, 28). Moguće je da važnu ulogu u redukciji VKO-a imaju cisteinski ostaci na molekuli VKOR-a koji prilikom redukcije VKO-a protoniraju epoksidnu molekulu kisika i nakon toga se oksidiraju i formiraju disulfidnu vezu (20, 30).

1.4. INDIKACIJE I PRIMJENA VARFARINA

Oralna antikoagulacijska terapija varfarinom ima važnu ulogu u liječenju i profilaksi raznovrsnih tipova venske ili arterijske tromboze u različitim stanjima kao što su:

a) liječenje duboke venske tromboze (DVT) i plućne embolije (PE), kao i prevencija ponovljene DVT/PE;
b) prevencija tromboembolijskih stanja nastalih kao posljedica prirođenih hiperkoagulacijskih stanja (antifosfolipidni sindrom, mutacija fatora V Leiden i dr.) ili kao posljedica trauma, imobilizacije ili opsežnih operacija;
c) prevencija sustavne embolije zbog atrijske fibrilacije (AF), nakon akutnog infarkta miokarda ili kod bolesnika s pektoralnom anginom;
d) prevencija embolije i tromboze kod bolesnika s mehaničkim ili biološkim srčanim zaliscima;
e) prevencija embolijskog i kardioembolijskog moždanog udara (31-35).

Za liječenje i prevenciju navedenih te drugih bolesnih stanja koja mogu dovesti do patoloških promjena u koagulaciji i pridonijeti nastanku tromboze u različitim tkivima, sa svojim posljedicama na ishemiju i nekrozu zahvaćenog tkiva, kao profilaksa koristi se oralna antikoagulacijska terapija (33-35). Najčešće korištena oralna antikoagulacijska terapija u svijetu je terapija antagonistima vitamina K, od kojih se daleko najviše koristi varfarin (12). U SAD-u 2011. godine je izdano gotovo 34 milijuna recepata za varfarin (36). U Republici Hrvatskoj (RH) potrošnja varfarina iznosi 8,42 dnevno definirane doze (DDD) na tisuću stanovnika po danu u 2015. godini i bilježi stalni rast potrošnje iz godine u godinu (Slika 1-5) (37).



Slika 1-5 Potrošnja varfarina u Hrvatskoj u razdoblju od 2008. do 2015. godine

Brojni klinički pokusi su potvrdili korist antikoagulacijske terapije varfarinom za bolesnike. Primjerice, meta-analiza za 5 kliničkih istraživanja provedenih u razdoblju 1989. do 1992. godine potvrdila je smanjenje rizika od razvoja moždanog udara za 61 % kod bolesnika s AF-om koji su bili na terapiji varfarinom u odnosu na skupinu bez terapije (38). Isto je potvrđeno meta-analizom za 6 kliničkih istraživanja provedenih u razdoblju od 1996. do 2007. godine, gdje su bolesnici s AF-om na terapiji varfarinom imali za 64 % manji rizik od razvoja moždanog udara u odnosu na skupinu bez terapije (39).

Istraživanje WARIS-II koje je proučavalo učinak varfarina i acetilsalicilne kiseline kod prevencije reinfarkta miokarda pokazalo je da je varfarin učinkovitiji od aspirina u prevenciji reinfarka i tromboembolijskog moždanog udara (40).

Istraživanje LAFIT koje je ispitivalo učinkovitost dugotrajne primjene varfarina u prevenciji ponavljajuće idiopatske venske tromboembolije pokazalo je da je produžena primjena varfarina nakon tri mjeseca rezultirala smanjenjem ponovljene venske tromboembolije za 95 % u odnosu na placebo (41).

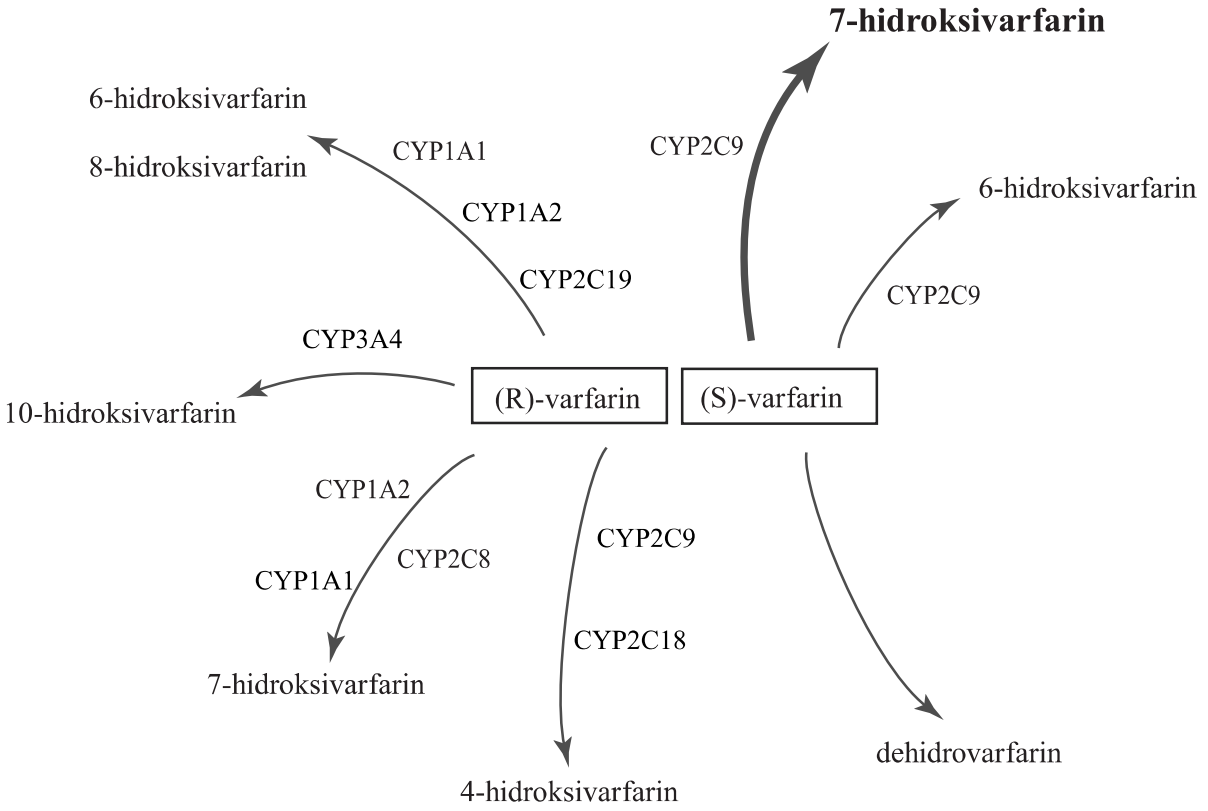
Unatoč vrlo dobrim dokazima o opravdanosti primjene varfarina u smanjenju rizika od razvoja ozbiljnih komplikacija različitih bolesnih stanja, terapija varfarinom se ne propisuje koliko bi bilo potrebno prema indikacijama. Primjerice, u istraživanju opravdanosti primjene varfarina kod bolesnika s kroničnom AF-om, gdje je pokazano da je terapija varfarinom povezana sa smanjenjem relativnog rizika od nastanka ozbiljnih štetnih događaja (kao što su smrt ili hospitalizacija uslijed ishemije) za 24 % u odnosu na bolesnike bez terapije, samo je kod 34 % bolesnika propisan varfarin (42). Slični podatci dobiveni su i u istraživanju o uporabi varfarina u Hrvatskoj gdje je kod samo 36,5 % bolesnika s AF-om propisan varfarin u sekundarnoj prevenciji moždanog udara (43).

Uzrok nedovoljnoj i suboptimalnoj primjeni je, između ostalog, što terapijska primjena varfarina zahtijeva čestu laboratorijsku kontrolu, značajan angažman bolesnika i osobitu pažnju liječnika. Varfarin ima relativno spor nastup djelovanja, uzak terapijski indeks i značajne farmakokinetske i farmakodinamske varijabilnosti koje mogu dovesti do ozbiljnih nuspojava i štetnih događaja (12, 34, 44).

1.5. FARMAKOKINETIKA VARFARINA

Terapijski oblik varfarina je racemična smjesa jednakih dijelova (50:50) dvaju optičkih izomera, odnosno enantiomera (R)- i (S)-varfarina. Varfarin je iznimno topljiv u vodi i vrlo lako se apsorbira iz probavnog trakta, ima vrlo visoku bioraspoloživost (80 - 100 %) i nakon oralne primjene doseže maksimalnu koncentraciju u krvi nakon otprilike 90 minuta (34, 45). U krvi je vezan za proteine plazme (>99 %), uglavnom albumin, a nakuplja se u jetri gdje se i metabolizira, uglavnom u mikrosomalnoj frakciji hepatocita (32, 46).

Enantiomeri varfarina imaju potpuno različite metabolizme (Slika 1-6). Metabolizam (S)-varfarina je gotovo isključivo (>85 %) preko CYP2C9 (natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 9) koji katalizira hidroksilaciju (S)-varfarina i nastanak (S)-7-hidroksivarfarina kao predominantnog metabolita (oko 56 % ukupnog varfarina), te (S)-6-hidroksivarfarina (oko 25 % ukupnog varfarina) (47).

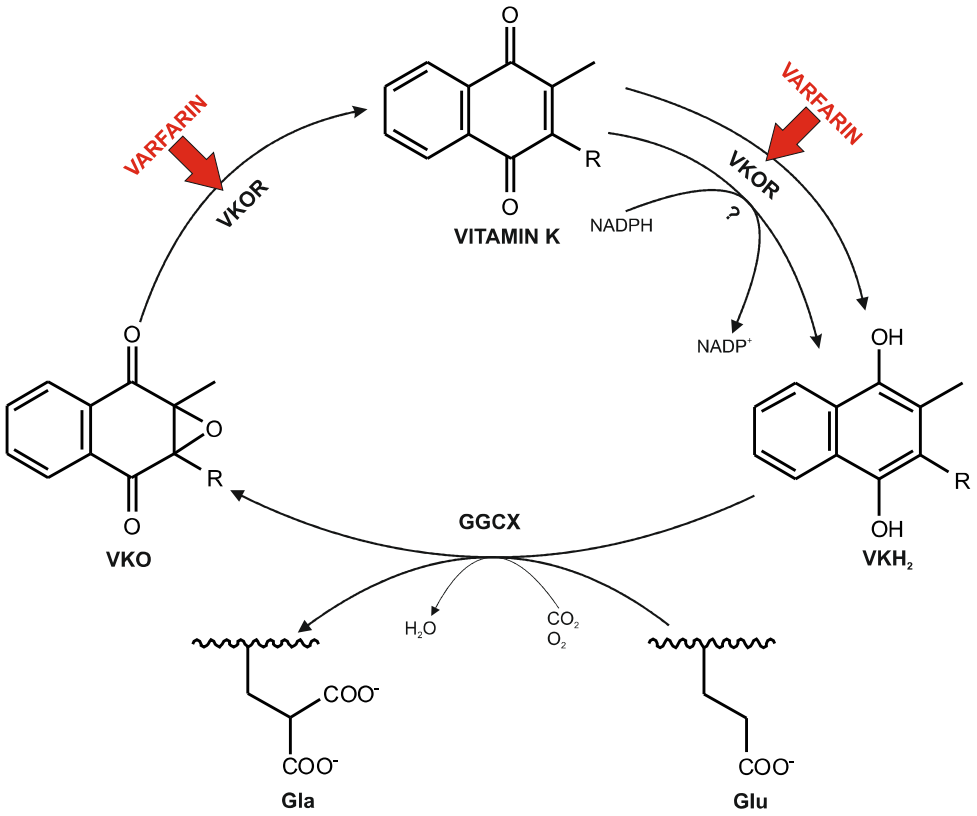


Slika 1-6 Metabolizam varfarina
CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 – enzimi natporodice citokroma P450 (prilagođeno prema (44))

Metabolizam (R)-varfarina je nešto složeniji i odvija se pomoću nekoliko enzima: CYP1A2 (natporodica citokroma P450, porodica 1, potporodica A, enzim 2) katalizira većinom nastanak (R)-6-hidroksivarfarina, CYP2C19 (natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 19) većinom nastanak (R)-8-hidroksivarfarina, dok je CYP3A4 (natporodica citokroma P450, porodica 3, potporodica A, enzim 4) gotovo isključivo odgovoran za nastanak (R)-10-hidroksivarfarina (48). Klirens enentiomera varfarina je isto tako različit: (S)-varfarin ima dvostruko veći klirens od (R)-varfarina (5,2 naspram 2,5 ml/min/70 kg), tako da mu je i poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) značajno niže (24 - 33 sata za (S)- i 35 - 58 sati za (R)-varfarin) (46, 49). Eliminacija varfarina je uglavnom u obliku metabolita, većinom (> 80 %) putem mokraće, manji dio (oko 20 %) stolicom, dok je eliminacija nepromijenjenog varfarina gotovo zanemariva (34, 46, 47). Terapijski učinak (S)-varfarina je 2,7 - 3,8 puta veći od učinka (R) varfarina (34) tako da se smatra da je za učinak varfarina gotovo isključivo odgovoran (S)-enantiomer, iako novija istraživanja ukazuju da i (R)-varfarin može u nekim situacijama imati važnost u terapijskom učinku (48).

1.6. FARMAKODINAMIKA VARFARINA

Varfarin ima snažan inhibicijski učinak na ciklus vitamina K, a time posredno i na γ-karboksilaciju koagulacijskih proteina. Točan mehanizam interakcije varfarina s VKOR-om još nije do kraja poznat, no eksperimentalni podatci ukazuju na mogućnost da se molekula varfarina nekovalentno veže na oksidirani (disulfidni) oblik enzima VKOR i tako ga inhibira (20).



Slika 1-7 Varfarin, γ-karboksilacija i ciklus vitamina K
VKH2 – vitamin K hidrokinon; VKO – vitamin K 2,3-epoksid; VKOR – vitamin K epoksid reduktaza; NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; Gla – γ-karboksiglutaminska kiselina; Glu – glutaminska kiselina; GGCX – γ-glutamil karboksilaza

Kada varfarin inhibira enzim VKOR, dolazi do nakupljanja metabolita VKO koji se više ne može reciklirati natrag u vitamin K, te se za daljnju γ-karboksilaciju koagulacijskih proteina troše raspoložive zalihe vitamina K. Kada se te zalihe potroše, γ-karboksilacija se više ne može odvijati i nastaju djelomično karboksilirani ili nekarboksilirani koagulacijski proteini koji imaju značajno smanjenu koagulacijsku funkciju (18, 20).

Antikoagulacijski učinak terapije varfarinom nije vidljiv odmah nakon uzimanja terapije, budući da ovisi o klirensu funkcionalnih koagulacijskih faktora (protrombin, FVII, FIX, FX) iz sistemske cirkulacije. Najvažniji koagulacijski faktor ovisan o vitaminu K (protrombin) ima

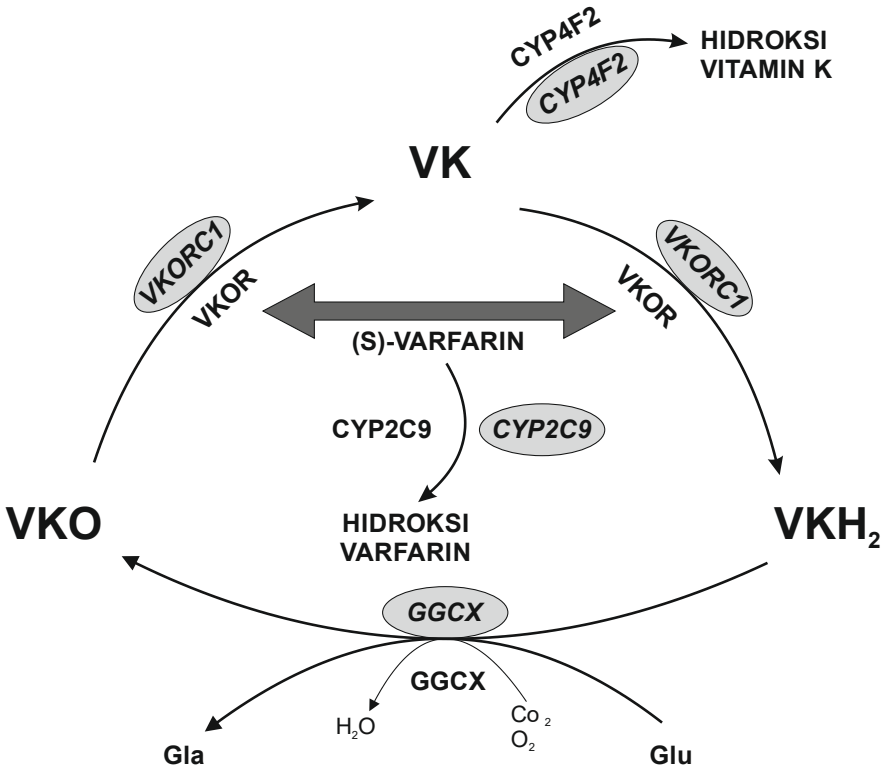
poluživot ($t_{1/2}$) od oko 60 sati, dok je poluživot ostalih faktora znatno manji. Zbog toga je često potrebno započeti ili nastaviti liječenje heparinom kroz 5 - 7 dana dok se ne dobije puni učinak varfarina koji nastupa tek nakon nekoliko dana (33, 34).

Budući da postoji inhibcijski učinak varfarina i na antikoagulacijske proteine ovisne o vitaminu K (protein C, S i Z), koji ujedno imaju puno kraći $t_{1/2}$ od protrombina, postoji određena opasnost od paradoksalnog prokoagulacijskog učinka varfarina u prvim danima terapije (33, 34).

Kao što je vidljivo iz navedenog, učinak varfarina je usko vezan za raspoloživu količinu vitamina K u organizmu. Stoga je za bolesnike koji uzimaju antikoagulacijsku terapiju u obliku varfarina vrlo važno da imaju stalan i ravnomjeran unos vitamina K preko hrane zbog izbjegavanja oscilacija u učinku varfarina koje mogu nastati zbog snižene ili povišene koncentracije vitamina K u organizmu. Isto tako, u slučaju predoziranosti varfarinom, antidot izbora je upravo koncentrat vitamina K (22, 34, 50).

1.7. FARMAKOGENETIKA VARFARINA

Zbog vrlo visoke varijabilnosti doze, varfarin je od početaka farmakogenetike bio vrlo privlačna tema za proučavanje genske povezanosti. Zbog toga je provedeno nekoliko istraživanje povezanosti unutar genoma (GWAS, engl. *genome-wide association study*) čiji je cilj bio utvrditi povezanost određenih polimorfizama gena sa stabilnom dozom varfarina. Cooper i suradnici su 2008. godine napravili prvi GWAS koji je ispitivao preko 550 000 SNP-ova na uzorku od 379 uzoraka DNA bolesnika. Njihovi rezultati su pokazali da značajnu povezanost s dozom varfarina pokazuju jedino polimorfizmi gena *VKORC1* i *CYP2C9* (51). Takeuchi i suradnici su 2009. godine proveli GWAS koja je ispitivala oko 326 000 polimorfizama na uzorku od 1053 bolesnika. Rezultati su opet pokazali da jedino polimorfizmi gena *VKORC1* i *CYP2C9* pokazuju značajnu povezanost, ali nakon detaljne analize pronađeno je i da jedan SNP gena *CYP4F2* također pokazuje značajnu povezanost s dozom (52). Rezultati GWAS-ova su potvrdili da svega nekoliko gena povezanih s metabolizmom varfarina i ciklusa vitamina K pokazuje značajnu povezanost s varfarinskom antikoagulacijskom terapijom (slika 1-8).



Slika 1-8 - Pregled najvažnijih gena s učinkom na terapiju varfarinom
VKH2 – vitamin K hidrokinon; VKO – vitamin K 2,3-epoksid; VK – vitamin K; VKOR/*VKORC1* – vitamin K epoksid reduktaza (enzim/gen); GGCX/*GGCX* – γ-glutamil karboksilaza (enzim/gen); CYP2C9/*CYP2C9* – citokrom P450 2C9 (enzim/gen); CYP4F2/*CYP4F2* – citokrom P450 4F2 (enzim/gen); Gla – γ-karboksiglutaminska kiselina; Glu – glutaminska kiselina

Na metabolizam varfarina, odnosno njegovog (S)-enantiomera, značajan učinak ima gen *CYP2C9* koji kodira enzim CYP2C9. Gen *CYP4F2* kodira enzim CYP4F2, koji je povezan s metabolizmom i klirensom vitamina K u organizmu. Gen *VKORC1* kodira podjedinicu 1 enzima VKOR koji je važan za redukciju i ponovno iskorištavanje VKO-a u ciklusu vitamina K. Gen *GGCX* kodira enzim GGCX koji katalizira γ-karboksilaciju i aktivaciju faktora zgrušavanja i premda u GWAS-ovima nije nađena njegova povezanost s dozom varfarina, postoji mogućnost da bi mogao imati utjecaj na antikoagulacijsku terapiju varfarinom.

1.7.1. POLIMORFIZMI GENA *CYP2C9*

Gen *CYP2C9* kodira enzim CYP2C9 koji je odgovoran za metabolizam (S)-varfarina, enantiomera odgovornog za glavninu učinka lijeka. CYP2C9 je uglavnom lokaliziran u jetri, nešto manje u crijevima, aorti i koronarnim arterijama, a uz CYP3A4 ima najveću aktivnost od svih enzima CYP u jetri. CYP2C9 u hepatocitima može biti induciran (npr. rifampicinom, deksametazonom ili fenobarbitalom), ali isto tako i inhibiran (npr. amiodaronom, flukonazolom ili sulfofenazolom) raznim supstratima, što predstavlja potencijalnu opasnost od interakcija

lijekova (6, 53). Smatra se da je CYP2C9 odgovoran za metabolizam 15 - 20 % svih lijekova u organizmu, kao i mnogih endogenih spojeva (53, 54). Među klinički najznačajnijim lijekovima koje metabolizira CYP2C9 su antiepileptik fenitoin, antitumorski lijek ciklofosfamid, antidepresiv amitriptilin, antidijabetik gliklazid, antihipertenziv losartan i neki nesteroidni protuupalni lijekovi kao što su npr. diklofenak i celekoksib (54).

Gen *CYP2C9* se sastoji od devet eksona koji čine 50 734 baze. Nalazi se na kromosomu 10q24.2 i kodira protein od 490 aminokiselina (55, 56). Gen *CYP2C9* je izrazito polimorfan, a poznato je najmanje 65 alelnih varijanti *CYP2C9* (57). Proučavanjem učestalosti javljanja alelnih varijanti u populaciji uočeno je da postoje značajne razlike među skupinama različitog podrijetla. Najviše su proučavane dvije alelne varijante koje su najvažnije u europskoj populaciji: *CYP2C9*2* (rs1799853; 430C>T) i *CYP2C9*3* (rs1057910; 1075A>C). Najčešći alel (wt) s normalnom aktivnošću enzima je *CYP2C9*1* (12, 53, 55). U populaciji europskog podrijetla frekvencija *CYP2C9*2* je oko 10 - 13 %, u populaciji afričkog podrijetla je oko 1 - 4 %, a u istočnoazijskoj populaciji nije zabilježen. Slično je i s *CYP2C9*3* koji se u populaciji europskog podrijetla javlja s frekvencijom od oko 6 - 9 %, u populaciji afričkog porijekla oko 1 - 3 %, a u istočnoazijskoj populaciji 1 - 2 %. Ostale alelne varijante se u populaciji europskog podrijetla javljaju s vrlo niskom učestalošću i ne smatraju se značajnima za terapiju varfarinom (12, 54, 58).

*CYP2C9*2* SNP predstavlja mutaciju u eksonu 3, odnosno zamjenu citozina (C) timinom (T) na poziciji 430 u genu (430C>T), što dovodi do zamjene arginina cisteinom na aminokiselinskom ostatku broj 144 u molekuli proteina (R144C). Ta promjena dovodi do snižene aktivnosti enzima (20 - 30 % ili više, ovisno o supstratu) u usporedbi s *CYP2C9*1* (6, 55). Učinak na metabolizam (S)-varfarina je značajan: heterozigoti (*CYP2C9*1*2*) imaju 43 % niži, a homozigoti (*CYP2C9*2*2*) 72 % niži klirens (S)-varfarina u odnosu na *CYP2C9*1*1* (58).

*CYP2C9*3* SNP predstavlja mutaciju u eksonu 7, odnosno zamjenu adenozina (A) citozinom (C) na poziciji 1075 u genu (1075A>C), što dovodi do zamjene izoleucina leucinom na aminokiselinskom ostatku broj 359 u molekuli proteina (I359L). To dovodi do promjena u aktivnom mjestu enzima i smanjenog afiniteta za supstrat. Posljedica toga je snižena aktivnosti enzima (70 % ili više, ovisno o supstratu) u usporedbi s *CYP2C9*1* (54, 55, 58). Heterozigoti (*CYP2C9*1*3*) pokazuju 66 %, a homozigoti (*CYP2C9*3*3*) i do 90 % niži klirens (S)-varfarina u odnosu na *CYP2C9*1*1* (58).

Homozigoti wt (*CYP*1*1*) odgovaraju fenotipu EM, heterozigoti (*CYP*1*2* i *CYP*1*3*) fenotipu IM, dok homozigoti promijenjenih alela (*CYP*2*2* i *CYP*3*3*) te njihova kombinacija (*CYP*2*3*) odgovaraju fenotipu PM (59). Bolesnici s EM fenotipom trebaju najveće doze, s IM fenotipom niže, a s PM fenotipom najniže doze varfarina. Razlog tome je snižen klirens (S)-varfarina kod IM i PM fenotipova, što za posljedicu ima povišen $t_{1/2}$, produženo vrijeme za postizanje dinamičke ravnoteže lijeka u krvi i, konačno, potrebu za manjom dozom lijeka (58). Kod nositelja alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3*, osobito njihovih homozigota, zabilježene su potrebe za nižim dozama varfarina (60-63), te povećan rizik od nuspojava (prekomjerne antikoagulacije ili krvarenja) (12, 64) u odnosu na homozigote wt (*CYP2C9*1*1*).

1.7.2. POLIMORFIZMI GENA *VKORC1*

Gen *VKORC1* kodira podjedinicu 1 VKOR-a koja predstavlja ciljno mjesto djelovanja varfarina. Sadrži tri eksona i dva introna, veličine je 5496 baza, nalazi se na kromosomu 10q24.2 i kodira protein od 163 aminokiseline (65). Do otkrića ovoga gena došle su dvije nezavisne skupine znanstvenika 2004. godine (66, 67). Ekspresija *VKORC1* najveća je u jetri, srcu i gušterači (67), a najveća aktivnost VKOR enzima zabilježena je u jetri (28, 68). Premda je proučavano više SNP-ova gena *VKORC1*, samo neki su pokazali značajnu učestalost rjeđeg alela (MAF, od engl. *minor allele frequency*) u populaciji i povezanost s terapijom varfarinom (69-72). Učestalost različitih polimorfizama *VKORC1* u populaciji povezana je s podrijetlom (npr. iznimno velika učestalost SNP-ova povezanih s nižom dozom varfarina u istočnoazijskoj populaciji, što se povezuje s već ranije primijećenim općenito nižim terapijskim dozama u odnosu na populaciju europskog podrijetla) (27, 73-78). Najviše proučavani polimorfizmi gena *VKORC1* su -1639G>A (rs9923231) i 1173C>T (rs9934438) za koje je uočena najveća povezanost s terapijom varfarinom (72, 75, 79). Ova dva polimorfizma su u veznoj neravnoteži (LD, od engl. *linkage disequilibrium*), odnosno njihovi aleli (normalni ili varijantni) se gotovo isključivo uvijek javljaju zajedno (71, 79-82). MAF ovih polimorfizama u različitim populacijama su sljedeće: populacija europskog podrijetla 36,6 - 48,5 %, populacija afričkog podrijetla 3,5 - 10,8 % i u istočnoazijskoj populaciji 91,6 - 94,0 % (83).

VKORC1 -1639G>A predstavlja zamjenu gvanina (G) adeninom (A) u promotoru gena. Prisutnost gvanina (G) na drugom nukleotidu E-sloga promotora (C[A/G]NNTG) remeti uobičajenu strukturu E-sloga, što rezultira povišenom aktivnošću promotora i do 44 %, te povećanom ekspresijom mRNA (70, 84-86). *VKORC1* 1173C>T predstavlja zamjenu citozina (C) timinom (T) u prvom intronu gena i prvi je SNP gena *VKORC1* kod kojega je primijećena

povezanost s dozom varfarina (87). Polimorfizmi *VKORC1* -1639G>A i/ili 1173C>T se koriste i kao *tag* polimorfizmi (reprezentativni SNP-ovi) za identifikaciju određenih haplotipova *VKORC1*: alel A kod *VKORC1* -1639G>A, odnosno alel T kod *VKORC1* 1173C>T odgovaraju haplotipu A (niža doza varfarina), dok alel G kod *VKORC1* -1639G>A, odnosno alel C kod *VKORC1* 1173C>T odgovaraju haplotipu B (viša doza varfarina) prema Riederu (69, 70, 72, 75, 79). Polimorfizmi *VKORC1* imaju utjecaj ne samo na stabilnu dozu lijeka, nego čini se i u još nekim drugim važnim aspektima terapije. Primijećena je povezanost između prisutnosti varijantnih alela u genotipu s nižom dozom lijeka (76, 81, 88-90), s kraćim vremenom potrebnim za postizanje stabilne doze varfarina (91, 92), većim udjelom vremena unutar terapijskog područja (77), te s povećanim rizikom od razvoja štetnih događaja u terapiji, osobito na početku terapije (12, 76, 77, 81, 91, 93, 94).

1.7.3. POLIMORFIZMI GENA *CYP4F2*

Gen *CYP4F2* sadrži 13 eksona i 12 introna, sastoji se od 20 098 nukleotida, nalazi se na kromosomu 19.p13.12 i kodira protein od 520 aminokiselina (95). Enzim CYP4F2 katalizira ω-oksidaciju više spojeva u organizmu, između ostalog leukotriena B_4, arahidonske kiseline, vitamina E i drugih, a sudjeluje i u metabolizmu i oksidaciji vitamina K (23, 96). Najveća ekspresija *CYP4F2* je u jetri i bubrezima (6). Poznate su tri alelne varijante *CYP4F2*, ali najviše proučavan i najvažniji za terapiju varfarinom je *CYP4F2*3* (rs2108622) (57, 97, 98).

*CYP4F2*3* nastaje zamjenom citozina (C) timinom (T) na eksonu 11, koja dovodi do zamjene valina metioninom na poziciji 433 u proteinu (V433M) (23, 24, 96, 99). Ta promjena rezultira sniženom koncentracijom enzima CYP4F2 i smanjenim metabolizmom vitamina K u jetri (23, 96, 100, 101). Stoga nositelji varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju veću koncentraciju vitamina K i imaju potrebe za većim dozama varfarina (59, 60, 63, 97-99, 102, 103). Osim toga, primijećeno je da nositelji varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju smanjen rizik od krvarenja *(104)*, manje su skloni prekomjernoj antikoagulaciji te provode veći postotak vremena unutar terapijskog područja ili ispod njega (105, 106) u odnosu na wt homozigote (*CYP4F2*1*1*).

Za alel *CYP4F2*3* primijećena je također različita učestalost u populaciji ovisna o podrijetlu. MAF u populaciji europskog podrijetla i istočnoazijskoj populaciji je dosta sličan (30,5 - 34,2 % i 24,0 - 30,5 %), dok je u populaciji afričkog podrijetla puno niži (7,0 - 11,7 %) (98, 107).

1.7.4. POLIMORFIZMI GENA *GGCX*

Gen *GGCX* sadrži 15 eksona i 14 introna, sastoji se od 16 825 nukleotida, nalazi se na kromosomu 2.p11.2 i kodira protein od 758 aminokiselina (108-110). Enzim GGCX pokazuje aktivnost u cijelom organizmu, ali najveća aktivnost zabilježena je u jetri (19, 111). Opisano je više od 30 različitih mutacija gena *GGCX*, a najviše proučavani SNP je 12970C>G (rs11676382) *GGCX* gena. Za njega je također primijećena različita učestalost u populaciji s obzirom na podrijetlo: u populaciji europskog podrijetla MAF iznosi 3,5 - 11,0 %, u populaciji afričkog podrijetla je oko 1 %, dok u azijskoj populaciji nije uopće zabilježen (110, 112-115), osim u Indijskoj populaciji gdje iznosi 1 - 1,5 % (116, 117).

GGCX 12970C>G predstavlja zamjenu citozina (C) gvaninom (G) na intronu 14 (112). Prema nekim istraživanjima, nositelji promijenjenog alela imaju potrebe za nižim dozama varfarina u odnosu na homozigote wt alela (97, 110, 112).

1.7.5. POLIMORFIZMI DRUGIH GENA

Osim gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* i neki drugi geni su proučavani zbog utjecaja na terapiju varfarinom. Gen *CALU* kodira protein kalumenin koji je povezan s VKOR i GGCX, a u jednom istraživanju je opaženo da su nositelji varijantnih alela jednog SNP-a tog gena imali potrebe za višim dozama varfarina (118, 119). Gen *EPHX1* kodira mikrosomalnu epoksid hidrolazu za koju se pretpostavlja da formira kompleks s VKOR-om u endoplazmatskom retikulumu i da bi mogla imati ulogu u redukciji VKO (119). Za neke od *EPHX1* polimorfizama primijećena je povezanost s dozom varfarina (113). Gen *APOE* je povezan s unosom lipoproteina u hepatocite, što je važno za terapiju varfarinom jer se apsorbirani vitamin K iz hrane transportira u jetru vezan za lipoproteine (113). U nekim istraživanjima primijećena je povezanost polimorfizama gena *APOE* s dozom varfarina (120, 121). Gen *POR* kodira citokrom P450 oksidoreduktazu koja je elektron donor svim mikrosomalnim citokrom P450 enzimima. Tri polimorfizma gena *POR* pokazala su povezanost s dozom varfarina (122).

Iako su pojedinačna istraživanja polimorfizama navedenih gena pokazala određenu povezanost (uglavnom vrlo slabu) s terapijom varfarinom, veći broj drugih istraživanja koja su proučavala te gene nisu uspjela pronaći povezanost.

1.8. INTERAKCIJE VARFARINA S DRUGIM LIJEKOVIMA

Interakcije lijekova su modifikacije terapijskog učinka jednog lijeka uslijed istovremenog uzimanja nekog drugog lijeka, te predstavljaju vrlo ozbiljan problem u farmakoterapiji. One mogu biti na farmakokinetskoj razini, odnosno međudjelovanje lijekova može utjecati na njihovu apsorpciju (otežavanje ili olakšavanje apsorpcije u probavnom sustavu), distribuciju (učinak na vezanje na transportne proteine u krvi i na količinu slobodne frakcije lijeka), metabolizam (učinak u smislu inhibicije ili indukcije metaboličkog enzima) ili eliminaciju (učinak na izlučivanje lijeka putem bubrega ili nekog drugog organa). Drugi mehanizam međudjelovanja lijekova je na farmakodinamskoj razini, odnosno sinergistički (oba lijeka imaju isti učinak pa dolazi do povećavanja učinka lijeka) ili antagonistički (lijekovi poništavaju učinak jedan drugome) (123). Procjenjuje se da je oko 17 % svih nuspojava farmakoterapije uzrokovano interakcijama lijekova (124).

Zabilježene su brojne interakcije varfarina s drugim lijekovima (125, 126). Upute za lijek (Coumadin label) iz 2007. godine navode 148 lijekova, dok neke druge baze lijekova i interakcija daju različite podatke (ePocrates 90, Clinical Pharmacology 84, a Micromedex čak 245 interakcija) (126).

Mehanizam većeg broja interakcija (osobito onih rjeđih) je uglavnom nepoznat, no neki se mogu objasniti učinkom određenih farmakokinetskih i/ili farmakodinamskih čimbenika.

Za interakciju s kolestiraminom se smatra da je uzrokovana sniženom gastrointestinalnom apsorpcijom varfarina (125, 127).

Određene tvari, kao npr. metaboliti kloral-hidrata, mogu opsežnim vezanjem na albumin teorijski istisnuti varfarin i povećati biološki aktivnu koncentraciju varfarina, a time ujedno i njegov učinak (127)

Učinak na metabolizam varfarina u podlozi je mnogih interakcija. Utjecaj na metabolizam varfarina, odnosno na enzime natporodice citokroma P450 može biti stereoselektivan ili neselektivan. Stereoselektivna interakcija ima učinak samo na jedan enantiomer lijeka, dok neselektivne interakcije utječu na oba enantiomera varfarina (34). Lijekovi koji inhibiraju CYP2C9 (enzim koji je najvažniji za metabolizam (S)-enantiomera varfarina) kao što su amiodaron, flukonazol, fluvastatin, fluvoksamin, izoniazid, lovastatin, fenilbutazon, metronidazol, sulfinpirazon, cimetidin ili sertralin djeluju tako da pojačavaju učinak varfarina usporavanjem njegova metabolizma te stoga bolesnici na terapiji tim lijekovima trebaju niže doze varfarina. Suprotan učinak izazivaju lijekovi koji induciraju CYP2C9 kao što su

karbamazepin, fenitoin, rifampicin ili barbiturati. Kod njih je metabolizam varfarina pojačan, smanjuje se klinički učinak i potrebne su veće doze varfarina (125, 127, 128). Lijekovi koji inhibiraju enzime CYP1A2 i CYP3A4 (najvažnije za metabolizam (R)-varfarina) kao što su neki antibiotici (kinoloni i makrolidi) ili azoli (npr. metronidazol, flukonazol, mikonazol i dr.) isto mogu pojačati učinak varfarina (125, 128).

Lijekovi koji imaju isti učinak kao i varfarin, odnosno lijekovi koji utječu na sustav hemostaze i koagulaciju, mogu djelovati tako da potenciraju antikoagulacijski učinak i povećavaju rizik od krvarenja. Neki od njih su drugi antikoagulansi (npr. heparin ili izravni inhibitori trombina ili aktiviranog faktora X), inhibitori agregacije trombocita (npr. acetilsalicilna kiselina, klopidogrel, dipiridamol i dr.) ili nesteroidni protuupalni lijekovi (npr. celekoksib, piroksikam, indometacin i dr.) (125, 129).

Anabolički steroidi, eritromicin te neki cefalosporini mogu pojačati učinak varfarina, a mehanizam do sada nije u potpunosti razjašnjen (125, 130).

Određeni antibiotici mogu poremetiti bakterijsku floru koja proizvodi vitamin K u organizmu, te tako i na taj način djelovati na pojačavanje učinka varfarina (129)

Uzimanje određenih biljnih pripravaka također može dovesti do pojave interakcija s varfarinom. Neki od njih kao što su ginkgo (*Ginkgo biloba*) mogu povećati učinak varfarina, dok neki drugi kao npr. gospina trava (*Hypericum perforatum*) mogu inducirati enzime koji metaboliziraju varfarin i time mu povećati klirens, te smanjiti učinak (125, 129).

Lijekovi koji pokazuju najznačajnije interakcije s oralnom antikoagulacijskom terapijom varfarinom navedeni su u Tablici 2 (lijekovi koji smanjuju učinak varfarina) i Tablici 3 (lijekovi koji pojačavaju učinak varfarina) (129).

Tablica 2 - Lijekovi koji stupaju u interakciju s varfarinom i smanjuju mu učinak

Protuinfektivni lijekovi:
grizeofulvin, nafcilin, ribavirin, rifampicin
Analgetici i protuupalni lijekovi:
mesalazin
Lijekovi s djelovanjem na središnji živčani sustav:
barbiturati, karbamazepin
Ostali lijekovi:
merkaptopurin

Tablica 3 - Lijekovi koji stupaju u interakciju s varfarinom i pojačavaju mu učinak

Protuinfektivni lijekovi:
ciproflaksacin, kotrimoksazol, eritromicin, flukonazol, izoniazid, metronidazol, mikonazol,
Kardiovaskularni lijekovi:
amiodaron, diltiazem, propafenon, propranolol
Analgetici i protuupalni lijekovi:
fenilbutazon, piroksikam,
Lijekovi s djelovanjem na središnji živčani sustav:
citalopram, entakapon
Lijekovi s djelovanjem na probavni sustav:
cimetidin, omeprazol
Ostali lijekovi:
anabolički steroidi

1.9. OSTALI UTJECAJI NA TERAPIJU VARFARINOM

U kliničkim istraživanjima antikoagulacijske terapije varfarinom, osim već navedenih genskih čimbenika koji su pokazali najznačajniji utjecaj, primijećena je povezanost nekih drugih čimbenika s dozom i /ili učinkom varfarina.

Dob bolesnika je povezana s dozom varfarina, odnosno opaženo je da doza varfarina opada s dobi bolesnika za oko 8 - 10 % po dekadi života (27, 34, 131-134). Dob bolesnika je povezana i s povećanim rizikom od razvoja ozbiljnih nuspojava, odnosno opaženo je da stariji bolesnici imaju oko pet puta veću učestalost značajnih i smrtonosnih krvarenja u odnosu na mlađe bolesnike (135).

Spol bolesnika je isto tako povezan s dozom varfarina, odnosno primijećeno je da je tjedna doza varfarina kod žena niža za oko 4,5 mg u odnosu na muškarce (134), a opaženo je i da žene imaju veći rizik za nastanak krvarenja u oralnoj antikoagulacijskoj terapiji (135, 136).

Tjelesna težina, odnosno indeks tjelesne mase (BMI, od engl. *body mass index*) je povezan s dozom varfarina. Opaženo je da za svaku jedinicu BMI-a više, tjedna doza varfarina raste za 0,69 mg (137). Osim toga, kod bolesnika s iznimno visokim BMI-om je primijećeno da im je bilo potrebno duže vrijeme za postizanje stabilne doze (138).

Pušenje je poznati uzrok značajnih interakcija s lijekovima. Primijećeno je da pušači imaju u prosijeku 12 - 13 % veću terapijsku dozu varfarina u odnosu na nepušače. Vjerojatni uzrok je pojačan metabolizam lijeka uslijed indukcije mikrosomalnih enzima jetre (139, 140).

Opaženo je da su bolesnici koji prekomjerno konzumiraju alkohol skloniji nestabilnoj terapiji (niži postotak vremena u terapijskom rasponu) (141), te da imaju veći rizik od nastanka krvarenja (142), a u bolesnika s kroničnim alkoholizmom primijećen je i povišen klirens varfarina (27).

Razina fizičke aktivnosti bolesnika je u nekim istraživanjima pokazala povezanost s dozom varfarina, odnosno bolesnici s većom razinom fizičke aktivnosti su imali potrebe za većom dozom varfarina (143).

Razne bolesti i bolesna stanja također mogu imati učinak na terapiju varfarinom. Kronične jetrene bolesti mogu potencirati učinak varfarina uslijed smanjene sinteze koagulacijskih faktora i sniženog metabolizma varfarina (34). Kronične bubrežne bolesti, kao što je zatajenje bubrega, povezane su s potrebom za sniženim dozama varfarina (34, 133). Hipermetabolička stanja kao što su visoka temperatura ili hipertireoidizam pojačavaju učinak varfarina (34). Akutna slabost i jaki proljevi mogu pojačati učinak varfarina (89).

Unos vitamina K prehranom je potencijalno vrlo važan čimbenik terapije varfarinom. Kako je rečeno u prethodnim poglavljima, zalihe vitamina K u organizmu su vrlo malene. U slučaju izostanka unosa hranom, zalihe se vrlo brzo iscrpe i pojačava se učinak terapije varfarinom. Isto tako, ako ga se unosi previše, može doći do smanjenja učinka varfarina koji može potrajati danima. Zbog toga, vrlo je važan stalan i stabilan unos vitamina K putem hrane (144-146).

1.10. PRAĆENJE TERAPIJSKOG UČINKA VARFARINA

Terapijski učinak oralne antikoagulacijske terapije varfarinom procjenjuje se mjerenjem protrombinskog vremena. Protrombinsko vrijeme (PV) je laboratorijska pretraga kojom se utvrđuju poremećaji u takozvanom „vanjskom“ putu zgrušavanja ili putu tkivnog faktora u kojem sudjeluju svi faktori zgrušavanja ovisni o vitaminu K: protrombin, faktor VII, IX i X. Princip analize PV-a je mjerenje vremena koje je potrebno za stvaranje fibrinskog ugruška u citratnoj plazmi bolesnika nakon dodatka tromboplastina (smjesa tkivnog faktora i Ca^{2+}) te uspoređivanje tog vremena s vrijednošću srednjeg normalnog protrombinskog vremena (MNPT, engl. *mean normal prothrombin time*) (14, 34, 147). U slučaju manjka funkcionalnih faktora VII, IX, X ili protrombina (ali i drugih kao što su faktor V ili fibrinogen) ili u prisutnosti inhibitora koagulacije, dolazi do produženja PV-a (14, 147). Osjetljivost PV-a na manjak

faktora koagulacije proporcionalno je smanjenju koncentracije njihovih funkcionalnih oblika u cirkulaciji, tako da je PV prvih dana antikoagulacijske terapije varfarinom odraz manjka faktora VII koji ima najkraći $t_{1/2}$ (oko 6 sati). Tek kasnije produženju PV-a pridonose i drugi faktori ovisni o vitaminu K (protrombin i faktor X) koji imaju duži $t_{1/2}$ (34). Ovisno o vrsti korištenog tkivnog faktora i fosfolipida, kao i njegovoj osjetljivosti prema manjku koagulacijskih faktora ovisnih o vitaminu K, vrijednosti PV-a dobivene različitim pripravcima tromboplastina različitih proizvođača mogu se znatno razlikovati (14, 34, 147). Zbog standardizacije rezultata dobivenih na različitim uređajima s različitim reagensima, vrijednost PV se u antikoagulacijskoj terapiji umjesto u sekundama izražava kao međunarodni normalizirani omjer (INR, od engl. *International Normalized Ratio*). INR vrijednost je određena sljedećom formulom:

$$\mathrm{INR} = \left(\frac{\mathrm{PV_{BOL}}}{\mathrm{PV_{MNPT}}}\right)^{\mathrm{ISI}}$$

gdje je PV_{BOL} vrijeme (u sekundama) potrebno za stvaranje ugruška u bolesnikovoj plazmi, a PV_{MNPT} je vrijeme potrebno za stvaranje ugruška u standardnoj normalnoj humanoj plazmi (MNPT). ISI predstavlja vrijednost međunarodnog indeksa osjetljivosti (engl. *International Sensitivity Index*), odnosno osjetljivost primijenjene kombinacije reagensa i uređaja u odnosu na referentni preparat tromboplastina Svjetske zdravstvene organizacije (14, 34, 147).

1.11. NUSPOJAVE ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM

Nuspojave, odnosno neželjeni učinci lijekova (ADR, engl. *adverse drug reactions*) predstavljaju svaku štetnu, neželjenu ili neugodnu reakciju na lijek. Ozbiljne nuspojave (*serious* ADR) uključuje sljedeće: smrt osobe, po život opasno stanje, potrebu za bolničkim liječenjem ili produljenje već postojećega bolničkog liječenja, trajni ili teški invaliditet ili nesposobnost i ostala medicinski značajna stanja. Nuspojave predstavljaju veliki problem u farmakoterapiji. Procjenjuje se da je oko 6 - 7 % svih bolesnika primljenih u bolnicu upravo zbog tegoba uzrokovanih nuspojavama lijekova, a u 2 % slučajeva nuspojave lijekova su odgovorne za smrt bolesnika, što čini oko 0,15 % uzroka smrti svih bolesnika primljenih u bolnice (124).

Antikoagulacijska terapija varfarinom uzrok je oko 10 % svih nuspojava lijekova (124). Nuspojave terapije varfarinom mogu varirati od blagih do vrlo ozbiljnih.

Najbrojnije i najvažnije su krvarenja. Ovisno o intenzitetu i lokaciji, učinak krvarenja može imati vrlo ozbiljne posljedice za zdravlje i život bolesnika. Krvarenja mogu biti blaga kao što su epistakse, hematomi, hemoptiza, hematurija, gastrointestinalna i vaginalna krvarenja te

krvarenja iz desni. Vrlo ozbiljna krvarenja su npr. intrakranijalna, retroperitonealna, intraspinalna ili perikardijalna, zatim ona koja dovode do pada koncentracije hemoglobina za više od 20 g/l ili koja dovode do nužnosti primanja dvije ili više doza transfuzije krvi, ona koja dovode do produžene hospitalizacije ili koja izravno dovode do smrtnog ishoda (148-151). Pojavu krvarenja u bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom treba promatrati u kontekstu cjelokupnog stanja bolesnika i značajki terapije (je li bolesnik tek započeo terapiju ili je već duže na njoj, koja je indikacija za terapiju, uzimanje drugih lijekova, eventualna druga patološka stanja organizma i dr.). Primjerice, određena istraživanja su pokazala da je pojava gastrointestinalnog krvarenja ili hematurije u bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji uglavnom posljedica ishodišnih lezija, koje prije uvođenja terapije nisu bile uočene (34).

Brojna istraživanja su pokazala da u predispoziciji za nastanak krvarenja ulogu imaju određeni čimbenici. Sigurno najznačajniji od njih je intenzitet antikoagulacijske terapije. Rizik od nastanka krvarenja se jako povećava kod INR vrijednosti iznad 5 (34). Osim prekomjerne antikoagulacije, rizični faktori su i dob (>65 godina), komorbiditeti (teške bolesti bubrega ili jetre te rak), arterijska hipertenzija, prijašnja krvarenja ili moždani udar, alkoholizam i interakcije s drugim lijekovima (34, 128).

Osim krvarenja, kao nuspojave antikoagulacijske terapije varfarinom vrlo rijetko (< 0,1 % bolesnika) mogu se javiti i akutne trombotske komplikacije kao što su nekroza kože i gangrena ekstremiteta. Obično se javljaju između trećeg i osmog dana terapije i u slučaju nekroze kože uzrokovane su opsežnom trombozom unutar kapilara i venula potkožnog masnog tkiva, a u slučaju gangrene opsežnom opstrukcijom venske cirkulacije ekstremiteta. Nije do kraja poznata patogeneza tih komplikacija, ali opažena je povezanost s nedostatkom proteina C, proteina S ili antitrombina, iako se komplikacije javljaju i kod osoba koje nemaju manjak navedenih proteina (128, 152).

Sindrom purpurnih prstiju je nehemoragijska kožna komplikacija uzrokovana kolesterolskim mikroembolima koja se obično javlja tri do osam tjedana od početka terapije (34). Druge varijacije tog sindroma u obliku sustavnih ateroembolija mogu se javiti i u bubrezima, gušterači, jetri ili slezeni (128).

Budući da varfarin ometa aktivaciju koštanih Gla proteina, kao posljedica se može javiti kalcifilaksija. Posebnu opasnost može predstavljati uzimanje varfarina u trudnoći jer može uzrokovati vrlo ozbiljna oštećenja ploda (128).

1.12. IZAZOVI ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM

Oralna antikoagulacijska terapija varfarinom je indicirana u mnogim stanjima i brojna klinička istraživanja su potvrdila korist za bolesnika. No, i pored toga, procjena je da se ne koristi uvijek kada je indicirana. Varfarin ima uzak terapijski raspon. Za većinu je indikacija između 2 i 3 jedinice INR-a, pri čemu vrijednosti INR-a ispod 2 predstavljaju neučinkovitu terapiju i povećan rizik od tromboze, dok vrijednosti iznad 4, a osobito iznad 5, predstavljaju prekomjernu antikoagulaciju i povećan rizik od krvarenja (31). Osim toga, varfarin pokazuje iznimno veliku interindividualnu i intraindividualnu varijabilnost u smislu terapijske doze. Terapijska doza varfarina može varirati i preko 60 puta, od 0,5 mg/dan, pa sve do preko 30 mg/dan (153). Intraindividualna varijabilnost, odnosno promjena doze u istog bolesnika tijekom vremena, može biti uzrokovana određenim bolestima ili bolesnim stanjima koje mijenjaju farmakologiju varfarina, zatim promjenama u prehrani zbog povećanog ili smanjenog unosa vitamina K, određenim životnim navikama (kao što su pušenje, alkohol i fizička aktivnost) te mogućim interakcijama lijekova. Interindividualna varijabilnost, odnosno razlike u dozi varfarina između bolesnika, ovise o intraindividualnim čimbenicima, ali i o drugim čimbenicima kao što su dob, spol i prije svega genski čimbenici. Eventualne nuspojave terapije varfarinom (prvenstveno krvarenja) mogu biti vrlo ozbiljne, čak i sa smrtnim posljedicama po bolesnika (31, 34). Sve to su čimbenici koji terapiju varfarinom čine prilično zahtjevnom i koji su najvažniji razlog suboptimalnoj primjeni varfarina.

Vrlo rijedak problem kod antikoagulacijske terapije varfarinom je takozvana varfarinska rezistencija, odnosno slučaj kada su bolesniku potrebne neuobičajeno visoke doze varfarina za postizanje terapijskog učinka ili ga u nekim slučajevima uopće nije moguće postići bez obzira na dozu. Pretpostavlja se da je ovaj fenomen povezan s rijetkim mutacijama gena *VKORC1* (31, 119)

1.12.1. PRAĆENJE KVALITETE ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE

U brojnim istraživanjima kliničari su koristili određene pokazatelje kako bi na neki način kvantificirali učinkovitost antikoagulacijske terapije. Jedan od najčešće korištenih je udio vremena provedenog u terapijskom rasponu (TTR, engl. *time in therapeutic range*). Terapijski raspon (TR, engl. *therapeutic range*) za većinu indikacija je 2 - 3 INR-a, osim za bolesnike s mehaničkim zaliscima gdje je terapijski raspon 2,5 - 3,5 INR-a. TTR nam govori koliko je stabilna terapija bolesnika i poželjno je da on bude što veći, budući da su oscilacije ispod TR-a povezane s rizikom od tromboze, a oscilacije iznad TR-a (prekomjerna antikoagulacija) s

rizikom od krvarenja. Još jedan indikator kvalitete je vrijeme potrebno da bolesnik postigne stabilnu dozu od početka terapije. Za taj parametar bi bilo poželjno da bude što kraći, jer dok se ne postigne stabilna doza bolesnik ne može računati na učinkovitost terapije, a postoji i povećan rizik od nuspojava (tromboza ili krvarenje) koje su najčešće upravo u vrijeme uvođenja terapije dok još nije postignuta stabilna doza. Važan pokazatelj kvalitete terapije varfarinom je broj i učestalost nuspojava terapije (prekomjerna antikoagulacija, krvarenje ili tromboza) (154).

1.12.2. TERAPIJA PREKOMJERNE ANTIKOAGULACIJE I KRVARENJA

Prekomjerna antikoagulacija (vrijednosti PV-a preko 4 ili 5 INR-a) povezana je sa značajnim rizikom od krvarenja. Krvarenje u antikoagulacijskoj terapiji varfarinom može, ovisno o lokaciji i opsegu, imati vrlo ozbiljne posljedice za bolesnika, tako da je na prve znakove takvih nuspojava potrebno pojačati kontrolu PV-a i prema potrebi primijeniti određene terapijske postupke (34, 155).

Pojedina vrijednost PV-a ispod ili iznad TR-a nije razlog za uzbunu, već samo indicira potrebu za praćenjem daljnjeg stanja bolesnika (34, 155).

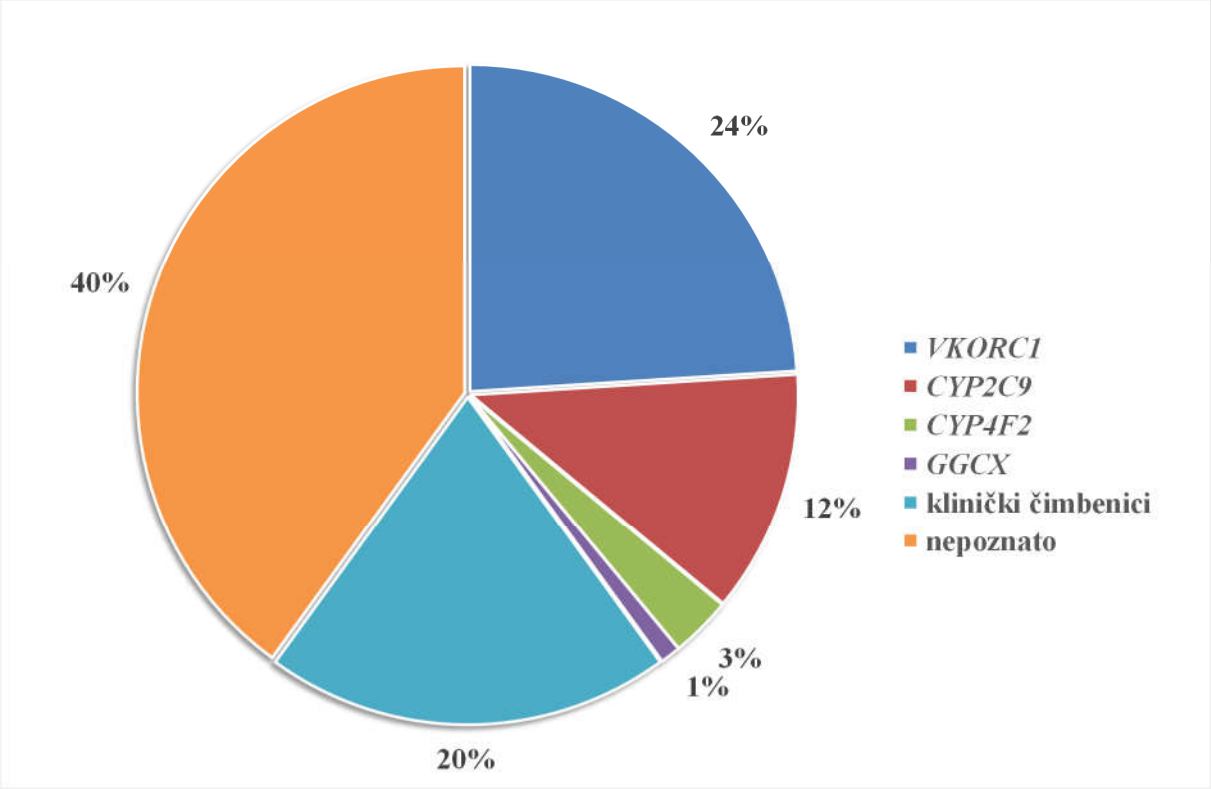
Kod prekomjerne antikoagulacije do 4,5 INR-a bez znakova krvarenja, kao i kod vrijednosti od 4,5 - 10 INR-a, preporuka je da se doza preskoči ili smanji. Kod vrijednosti PV-a većih od 10 INR-a bez krvarenja, preporuka je da se u bolesnika primjeni oralni preparat vitamina K (34, 155).

Kod pojave krvarenja, mogući postupci uključuju davanje vitamina K, svježe smrznute plazme, koncentrata protrombinskog kompleksa ili rekombinantnog faktora VIIa. Kod teških krvarenja preporuka je davanje koncentrata protrombinskog kompleksa uz intravenski vitamin K (155).

1.12.3. DOZIRANJE VARFARINA

Uobičajena praksa prijašnjih godina bila je da se prilikom uvođenja antikoagulacijske terapije varfarinom primjenjivala fiksna doza prema preporukama proizvođača ili se eventualno doza prilagođavala pomoću nekog kliničkog algoritma koji je uzimao u obzir kliničke čimbenike varijabilnosti. Nakon što je veliki broj istraživanja potvrdilo da genski čimbenici mogu objasniti veliki dio varijabilnosti doze, počelo se s izradom algoritama za predviđanje doze prije početka terapije uz pomoć genskih i kliničkih čimbenika. Jedan od danas najčešće korištenih nalazi se na stranici www.warfarindosing.org i uzima u obzir određene kliničke čimbenike i polimorfizme gena *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* i *GGCX*.

Od poznatih čimbenika, najveći utjecaj na varijabilnost doze varfarina pokazuje gen *VKORC1*, zatim slijede klinički čimbenici (dob, spol, BMI, prehrana i interakcije lijekova) i gen *CYP2C9*, dok je utjecaj gena *CYP4F2* i *GGCX* dosta manji, a još uvijek se najveći dio varijabilnosti doze ne može objasniti (Slika 1-9) (156).



Slika 1-9 – Procijenjeni utjecaj najvažnijih čimbenika na dozu varfarina
VKORC1 – vitamin K epoksid reduktaza; *CYP2C9* – citokrom P450 2C9; *CYP4F2* – citokrom P450 4F2; *GGCX* – γ-glutamil karboksilaza

Velika varijabilnost doze varfarina je posebno problematična za one bolesnike s vrlo niskim dozama (oko 0,5 mg/dan) kod kojih fiksna početna doza od 5 ili 10 mg može izazvati vrlo ozbiljne nuspojave. To je ujedno i razlog što se najveći broj nuspojava terapije varfarinom, u smislu krvarenja ili prekomjerne antikoagulacije koja predstavlja rizik za nastanak krvarenja, događa u prvim tjednima uvođenja terapije. Budući da su bolesnici koji zahtijevaju najniže doze varfarina u velikoj većini homozigoti varijantnih alela gena *VKORC1* i *CYP2C9*, smatralo se da će predviđanje doze farmakogenetičkim algoritmima povećati sigurnost bolesnika i smanjiti broj nuspojava, te skratiti vrijeme potrebno za postizanje stabilne doze. Dva velika klinička ispitivanja (COAG i EU-PACT) koja su se bavila usporedbom farmakogenetičkog doziranja (algoritam koji je uzimao u obzir najvažnije SNP-ove gena *CYP2C9* i *VKORC1*) s kliničkim algoritmom ili fiksnim modelom objavljena 2013. godine, dala su proturječne rezultate o koristi

farmakogenetičkog doziranja. Kimmel i suradnici (COAG) su usporedili farmakogenetičko doziranje s kliničkim algoritmom, a njihovi rezultati su pokazali da farmakogenetičko doziranje nije pokazalo statistički značajno poboljšanje s obzirom na TTR, razliku u dozi te nuspojavama terapije (INR ≥ 4, značajno krvarenje ili tromboembolizam) (157). Pirmohamed i suradnici (EU-PACT) su usporedili farmakogenetičko doziranje s fiksnim doziranjem, a njihovi rezultati su pokazali da je u skupini s farmakogenetičkim doziranjem zabilježen veći TTR, manja učestalost prekomjerne antikoagulacije (INR ≥ 4) i kraće vrijeme do terapijske vrijednosti protrombinskog vremena (158). Objava tako proturječnih rezultata izazvala je mnoštvo komentara (159).

Četiri meta-analize, objavljene 2015. godine, uključile su 11 velikih kliničkih ispitivanja koja su uspoređivala farmakogenetičko s konvencionalnim metodama doziranjem (klinički algoritam ili fiksno doziranje) varfarina (160-163). Tang i suradnici su pokazali da je farmakogenetičko doziranje povezano sa značajnim skraćenjem vremena do stabilne doze u odnosu na fiksno doziranje i klinički algoritam, kao i s većim TTR-om u odnosu na fiksno doziranje, ali ne i na klinički algoritam. S obzirom na nuspojave terapije, odnosno incidenciju prekomjerne antikoagulacije i krvarenja, farmakogenetičko doziranje nije pokazalo značajno poboljšanje (162). Meta-analiza Wanga i suradnika pokazala je da je kod farmakogenetičkih doziranja primijećeno značajno poboljšanje u skraćenju vremena do stabilne doze i u smanjenom riziku za značajno krvarenje u odnosu na fiksno doziranje i klinički algoritam, ali nije pokazalo poboljšanje u riziku za ukupna krvarenja ili TTR (163). Shi i suradnici su dobili slične rezultate: farmakogenetičko doziranje je pokazalo značajno poboljšanje u smislu skraćenog vremena do stabilne doze i smanjenja rizika od značajnih krvarenja ili štetnih događaja u odnosu na fiksno doziranje i klinički algoritam, kao i u povećanom TTR-u i smanjenoj incidenciji prekomjerne antikoagulaciji u odnosu na fiksno doziranje, ali ne i u odnosu na klinički algoritam (161). Belley-Cote i suradnici su u svojoj meta-analizi pokazali da farmakogenetičko doziranje pokazuje značajno poboljšanje u TTR-u u odnosu na fiksno doziranje, ali ne i u odnosu na klinički algoritam, te da nije pokazalo poboljšanje s obzirom na incidenciju krvarenja (160). Zajednički zaključak iz navedenih meta-analiza bi bio da farmakogenetičko doziranje pokazuje znatno poboljšanje u skraćenju vremena do stabilne doze u odnosu na konvencionalno doziranje, te u povišenom TTR-u te smanjenju rizika od značajnih krvarenja u odnosu na fiksno doziranje, ali ne i u odnosu na klinički algoritam, te da su potrebna daljnja istraživanja koja će pokazati pruža li farmakogenetičko doziranje neku konkretnu kliničku korist u odnosu na fiksno doziranje, a posebice u odnosu na kliničke algoritme.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Varfarin je najčešće korišten oralni antikoagulans u Hrvatskoj i u svijetu. Koristi se u prevenciji tormboembolijskih stanja različite etiologije i obično se uzima kao doživotna terapija. Premda su brojna istraživanja dokazala povoljni učinak terapije varfarinom u prevenciji različitih bolesnih stanja i komplikacija, smatra se da se ona ne primjenjuje onoliko često koliko bi bilo klinički opravdano. Jedan od razloga tome su potencijalno vrlo teške i ozbiljne nuspojave antikoagulacijske terapije varfarinom, uglavnom u obliku krvarenja, a koje spadaju među najčešće nuspojave terapije lijekovima. Drugi razlog je uzak terapijski raspon i vrlo velika interindividualna i intraindividualna varijabilnost u dozi lijeka, što samu terapiju, a pogotovo njeno uvođenje i određivanje stabilne doze, čini iznimno zahtjevnom i za kliničara i za bolesnika.

Različiti čimbenici mogu utjecati na stabilnu dozu održavanja u oralnoj antikoagulacijskoj terapiji varfarinom: čimbenici okoliša i životnih navika (pušenje, konzumacija alkohola, razina fizičke aktivnosti, unos vitamina K prehranom), antropometrijski i demografski čimbenici (površina tijela, indeks tjelesne mase, dob, spol), popratne bolesti (teške jetrene ili bubrežne bolesti, rak), interakcije s drugim lijekovima i genski čimbenici (jednonukeotidni polimorfizmi nekih gena).

Pretpostavka ovog rada je da su određeni jednonukleotidni polimorfizmi gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* povezani sa stabilnom dozom održavanja te s neželjenim učincima varfarina primijenjenog u oralnoj antikoagulacijskoj terapiji. Nadalje, neke životne navike (pušenje, konzumacija alkoholnih pića, razina fizičke aktivnosti i unos vitamina K prehranom) su također povezane sa stabilnom dozom održavanja, pa bi u kombinaciji s polimorfizmima gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* te *GGCX* i s drugim kliničkim čimbenicima mogle dati regresijski model za predviđanje doze varfarina.

Opći cilj istraživanja je ispitati povezanost polimorfizmama gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* sa stabilnom dozom održavanja te s neželjenim učincima varfarina primijenjenog u oralnoj antikoagulacijskoj terapiji.

Specifični ciljevi istraživanja su:

- odrediti polimorfizme gena *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *VKORC1* -1639G>A (rs9923231), *VKORC1* 1173C>T (rs9934438), *CYP4F2*3* (rs2108622) i *GGCX* 12970C>G (rs11676382) u populaciji bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom;
- odrediti učestalost polimorfizama *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) i *VKORC1* 1173C>T (rs9934438) koji imaju najveći utjecaj na terapiju varfarinom u populaciji Hrvatske (zdravi ispitanici);
- ispitati povezanost polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* sa stabilnom dozom održavanja te s nuspojavama terapije varfarinom;
- ispitati povezanost kliničkih, antropometrijskih i demografskih čimbenika te životnih navika sa stabilnom dozom održavanja varfarina;
- izraditi regresijski model iz farmakogenetičkih (polimorfizmi gena) i drugih dostupnih podataka (klinički, antropometrijski i demografski čimbenici, životne navike) pomoću kojega bi se mogla predvidjeti potencijalna individualna doza varfarina.

3. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje provedeno je u skladu s načelima Dobre kliničke prakse, Helsinške deklaracije, Zakona o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) te Zakona o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04). Istraživanje je provedeno u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra (KBC) Osijek, te u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije. Etička povjerenstva KBC Osijek i Zavoda za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije, te Povjerenstvo za etičnost eksperimentalnog rada Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrila su provođenje ovog istraživanja, a svi ispitanici potpisali su Informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju.

3.1. ISPITANICI

Ovo retrospektivno istraživanje uključivalo je dvije skupine: zdrave ispitanike i bolesnike na stabilnoj antikoagulacijskoj terapiji varfarinom. Regrutacija je vršena na Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu Kliničkog bolničkog centra Osijek među dobrovoljnim davateljima krvi (zdravi ispitanici) i u populaciji bolesnika na oralnoj antikoagulacijskoj terapiji varfarinom (bolesnici) u razdoblju od listopada 2009. do svibnja 2010. godine.

Skupina zdravih ispitanika oba spola prikupljena je u svrhu određivanja učestalost alela dvaju SNP-ova gena *VKORC1* (-1639G>A [rs9923231] i 1173C>T [rs9934438]) za koje postoje literaturni podatci da imaju najveći utjecaj na antikoagulacijsku terapiju varfarinom, a čija učestalost u vrijeme započinjanja istraživanja još nije bila utvrđena u populaciji Hrvatske. Kriteriji uključivanja bili su: punoljetnost ispitanika (>18 godina) i pristanak na sudjelovanje u istraživanju (ispitanici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju). Od zdravih ispitanika nisu zahtijevani daljnji podatci.

Skupina bolesnika oba spola na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom prikupljena je u svrhu određivanja utjecaja genskih čimbenika, čimbenika okoliša te životnih navika na terapiju varfarinom. Kriteriji uključivanja bili su: punoljetnost ispitanika (>18 godina), stabilna doza varfarina odnosno vrijednost PV-a unutar terapijskog raspona u najmanje tri uzastopna mjerenja u razmaku od sedam dana i pristanak na sudjelovanje u istraživanju (bolesnici su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju). Kriteriji isključivanja bili su: dijagnosticiran rak te teške bolesti jetre ili bubrega. Dijagnoze raka i/ili bolesti jetre ili bubrega

utvrđene su uvidom u povijest bolesti bolesnika. Smatrano je da bolesnik boluje od teške jetrene bolesti i da nije prikladan za uključivanje u istraživanje ako je uvidom u povijest bolesti ustanovljeno da ispunjava neki od sljedećih uvjeta: dijagnosticiran kronični hepatitis, ciroza jetre ili vrijednosti serumskih transaminaza povišene tri ili više puta iznad referentnih vrijednosti. Smatrano je da bolesnik boluje od teške bolesti bubrega i da nije prikladan za uključivanje u istraživanje ako je uvidom u povijest bolesti ustanovljeno da ispunjava neki od sljedećih uvjeta: kronične bolesti bubrega, kronično zatajenje bubrega, transplantacija bubrega ili koncentracija kreatinina u serumu iznad 200 μmol/l.

3.2. OBILJEŽJA BOLESNIKA NA TERAPIJI VARFARINOM

Uvidom u povijest bolesti te razgovorom s bolesnikom zabilježeni su sljedeći podatci:

- dob (godine)
- spol
- tjelesna težina (kg)
- tjelesna visina (cm)
- indikacija za primjenu varfarina
- vrijednosti doza varfarina prilikom optimizacije terapije i vrijednosti PV-a zabilježene tijekom terapije: zabilježene su vrijednosti PV-a prilikom uvođenja terapije i kasnije, te vrijeme potrebno do postizanja stabilne doze varfarina (PV unutar terapijskog raspona). Terapijski raspon za indikacije praćenih bolesnika iznosio je 2-3 INR. Kako bi kompenzirali biološku varijabilnost i mjernu nesigurnost PV-a, dozvoljeno je odstupanje od ±0,2 INR-a (terapijski raspon 1,8 - 3,2 INR), kao što je primijenjeno i u drugim istraživanjima (164, 165).
- udio vremena provedenog ispod (INR < 1,8), iznad (INR > 3,2) i unutar terapijskog raspona (INR 1,8 – 3,2). Vrijeme provedeno unutar terapijskog raspona izračunato je metodom udjela INR vrijednosti u terapijskom rasponu (166).
- slučajevi prekomjerne antikoagulacije: kao prekomjerna antikoagulacija uzeta je zabilježena vrijednost PV > 4 INR-a. Zabilježeno je i vrijeme do prvog INR > 4.
- neželjeni učinci terapije, odnosno krvarenja: korištena je klasifikacija krvarenja prema Fihnu (167):
  a) NEZNATNA: krvarenja koja ne zahtijevaju dodatne postupke, testiranja ili posjet liječniku, ali su bila vrijedna pažnje da su bolesnici o njima obavijestili liječnika

(npr. blage epistakse, hematomi, blaga krvarenja iz hemeroida ili mikroskopska hematurija)

b) ZNAČAJNA: krvarenja koja zahtijevaju medicinske postupke i/ili preglede te mogu imati vrlo ozbiljne, pa čak i kobne posljedice za bolesnika. Ona su dalje podijeljena na:

(1) OZBILJNA (npr. očita gastrointestinalna krvarenja, jaka hematurija ili hemoptiza te transfuzija do dvije jedinica krvi)

(2) PO ŽIVOT OPASNA (npr. krvarenja koja su dovela do kardiopulmonarnog aresta ili opsežnog hemotoraksa; koja su zahtijevala kirurške ili angiografske intervencije; koja su dovela do nepopravljivih posljedica kao što su infarkt miokarda ili neurološki deficit uslijed krvarenja u mozgu)

(3) SMRTONOSNA (koja su dovela do smrti bolesnika)

Osim broja i vrste (stupnja) krvarenja zabilježeno je i vrijeme do prvog krvarenja.

- terapije prekomjerne antikoagulacije ili krvarenja (npr. vitamin K, svježa smrznuta plazma ili koncentrat eritrocita)
- lijekovi koje bolesnik uzima, a koji mogu utjecati na dozu varfarina
- razina fizičke aktivnosti: prema postupku opisanom u literaturi (168) procijenjen je stupanj fizičke aktivnosti bolesnika kao jedan od navedenih:
  a) slabo aktivan
  b) umjereno aktivan
  c) svakodnevno vježba
  d) trenira neki sport
- pušenje: status pušenja bolesnika procijenjen je na osnovu sljedeće kategorizacije:
  a) ne puši
  b) puši < 1 kutije cigareta na dan
  c) puši 1 - 2 kutije cigareta na dan
  d) puši > 2 kutije cigareta na dan
- konzumacija alkohola: navika konzumacija alkohola procijenjena je na osnovu sljedeće kategorizacije:
  a) ne pije alkohol
  b) pije 1 - 2 alkoholna pića tjedno
  c) pije 1 - 2 alkoholna pića dnevno
  d) pije > 2 alkoholna pića dnevno

- unos vitamina K procijenjen je upitom bolesnika o prosječnom unosu određenih vrsta namirnica bogatih vitaminom K svojstvenih prehrani ovog područja (Tablica 4), prema postupku opisanom u literaturi (169). Bolesnici su se izjasnili o unosu određene količine namirnice u zadnjih mjesec dana. Ovisno o namirnici, količina je radi lakšeg razumijevanja prezentirana kao porcija: tanjur (150 g), zdjelica (75 g), jušna žlica (10 g), decilitar ili komad (75 g). Vrijednost vitamina K unesenog putem hrane dobivena je množenjem količine hrane u porciji i broja porcija koje je bolesnik konzumirao tijekom mjesec dana. Koncentracije vitamina K u određenim namirnicama preuzete su iz tablice Bootha i suradnika (170).

Tablica 4 - Koncentracija vitamina K u namirnicama

namirnica	koncentracija vitamina k (µg/100 g)
blitva	830
brokula	270
grašak	23
kelj, raštika	817
krastavac, svježi	19
kupus, crveni	44
kupus, kiseli	25
kupus, svježi	145
majoneza	81
margarin	51
maslinovo ulje	49
mrkva	18
peršin	900
prokulice	177
salata, endivija	231
salata, zelena	122
sojino ulje	193
šljive	12
šparoge	40
špinat	400
ulje uljane repice	141

Pomoću podataka o tjelesnoj težini i visini izračunat je indeks tjelesne mase (BMI, engl. *body mass index*) prema poznatoj formuli gdje se tjelesna težina u kg dijeli s kvadratom visine u m^2.

Pomoću podataka o tjelesnoj težini i tjelesnoj visini izračunata je procijenjena površina tijela (BSA, engl. *body surface area*) prema uobičajeno korištenoj formuli (DuBois i DuBois):

$$BSA\ (m^2) = 0.20247 \times visina^{0.725}\ (m) * težina^{0.425}\ (kg)$$

Adherencija bolesnika procijenjena je pomoću skale Moriskyja i suradnika (171). Bolesnici su dali odgovore DA/NE na sljedeća pitanja:

1. Zaboravite li ikada uzeti lijek?
2. Jeste li ste ponekad nemarni u vezi uzimanja lijeka?
3. Ako se osjećate loše kada uzimate lijek, prestanete li ga ponekad uzimati?
4. Kada se osjećate dobro, prestanete li ponekad uzimati lijek?

Na osnovu zbrojenih bodova bolesnika (svaki odgovor DA nosi jedan bod), adherencija se procjenjuje kao visoka (0 bodova), srednja (1 - 2 boda) ili niska (3 - 4 boda).

U skupini bolesnika određene su frekvencije alela sljedećih SNP-ova: *VKORC1* -1639G>A (rs9923231), *VKORC1* 1173C>T (rs9934438), *CYP2C9*2* (rs1799853), *CYP2C9*3* (rs1057910), *CYP4F2*3* (rs2108622) i *GGCX* 12970C>G (rs11676382).

3.3. METODE ISTRAŽIVANJA

3.3.1. ODREĐIVANJE PROTROMBINSKOG VREMENA (PV)

U svrhu praćenja učinkovitosti terapije bolesnika na oralnoj antikoagulacijskoj terapiji varfarinom, bolesnicima je venepunkcijom uzeto 5 ml venske krvi u epruvete s natrij-citratom (Becton-Dickinson, Erembodegem, Belgija). Uzorak krvi se potom centrifugira na 1500 x g. U dobivenom uzorku plazme određena je vrijednost PV-a pomoći *Dade® Innovin®* reagensa na *BCS XP* automatskom koagulacijskom analizatoru (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, Njemačka). Princip određivanja je da se u uzorak plazme dodaje optimalna količina tromboplastina i Ca^{2+}, čime se aktivira koagulacijska kaskada, a analizator turbidimetrijski mjeri vrijeme stvaranja ugruška. Vrijednost PV-a se shodno kliničkim smjernicama izražava kao INR.

Praćenje oralne antikoagulacijske terapije varfarinom rađeno je na sljedeći način: PV se kontrolirao 72 sata nakon početka terapije (u slučaju potrebe i ranije), a zatim dva puta tjedno (učestalost je ovisila o stabilnosti PV-a) do postizanja stabilne doze. Nakon toga praćenje PV-a se vršilo jedanput mjesečno kod bolesnika sa stabilnim PV-om.

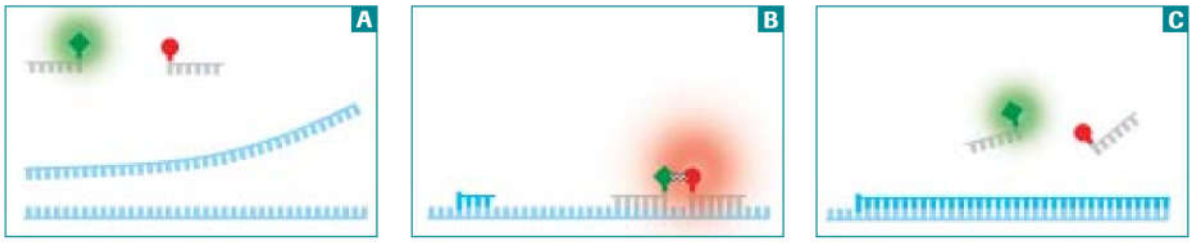
3.3.2. IZDVAJANJE DNA

Od svih ispitanika (zdravi ispitanici i bolesnici na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom), venepunkcijom je uzeto 5 ml venske krvi u epruvete s EDTA antikoagulansom (Becton-Dickinson, Erembodegem, Belgija). U roku od jednog sata od vađenja, u uzorcima krvi

napravljeno je izdvajanje DNA pomoću *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka) komercijalnog kompleta za izdvajanje nukleinskih kiselina za PCR prema uputama proizvođača. Izdvajanje DNA se vrši iz leukocita koji se nalaze u venskoj krvi. Ukratko, djelovanjem proteinaze se razaraju stanične membrane leukocita uslijed čega dolazi do izlaganja DNA. Vezujući pufer koji se zatim dodaje inhibira nukleaze, a smjesa koja sadrži DNA se prebaci u epruvetice koje sadrže staklena vlakna na koja se veže DNA. Nakon nekoliko ispiranja puferima za pročišćavanje, na kraju se vezana DNA ispire elucijskim puferom. Nakon izdvajanja, uzorci DNA označeni šifrom ispitanika čuvani su u osiguranom hladnjaku na 4°C do analize.

3.3.3. GENOTIPIZACIJA

Genotipizacija se provodila metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (RT-PCR, od engl. *real-time polymerase chain reaction*). Metoda RT-PCR omogućava istovremeno umnažanje i detekciju polimorfizama, što znatno pojednostavljuje i ubrzava postupak genotipizacije, a to je posebno važno u kliničkom okruženju. Genotipizacija je rađena na uređaju *LightCycler® 1.5* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka). Princip rada uređaja *LightCycler®* temelji se na mjerenju promjene fluorescencije uporabom posebno obilježenih hibridizacijskih sondi. *SimpleProbe®* sustav koristi jednu hibridizacijsku sondu (oligonukleotid specifičan za SNP kojega određujemo) obilježenu fluoresceinom. Fluorescein na hibridizacijskoj sondi pobuđen plavim svjetlom uređaja (470 nm) emitira zeleno fluorescentno svjetlo (530 nm), ali samo kada je hibridiziran za umnoženi slijed DNA. Emitirano zeleno fluorescentno svjetlo mjeri se na zasebnom kanalu uređaja (530 nm). *HybProbe®* sustav sastoji od dva različita oligonukleotida specifična za SNP kojega određujemo, a koji su na kraju obilježeni s karakterističnim fluoroforima. Jedna sonda je obilježena s donor-bojom (fluorescein), a druga s akceptor-bojom (*LightCycler®Red 640*). Te dvije hibridizacijske sonde dolaze u neposrednu blizinu nakon hibridizacije na umnoženi DNA kalup iz uzorka. Kada se sonde nađu u blizini, emitirana zelena fluorescencija donor-boje (fluorescein) pobuđuje akceptor-boju (*LightCycler®Red*), uslijed čega sonda obilježena *LightCycler®Red 640* bojom emitira crvenu fluorescenciju (640 nm) koju mjerimo na zasebnom kanalu uređaja (Slika 3.1 B). Taj proces nazivamo prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, od engl. *fluorescence resonance energy transfer*). FRET se događa samo kada su sonde u neposrednoj blizini (do 15 nukleotida), a ne tijekom faze denaturacije ili elongacije DNA (Slika 3.1 A i C).



Slika 3-1 Načelo prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom kod uređaja LightCycler (preuzeto iz „The LightCycler System“, Roche Applied Science)

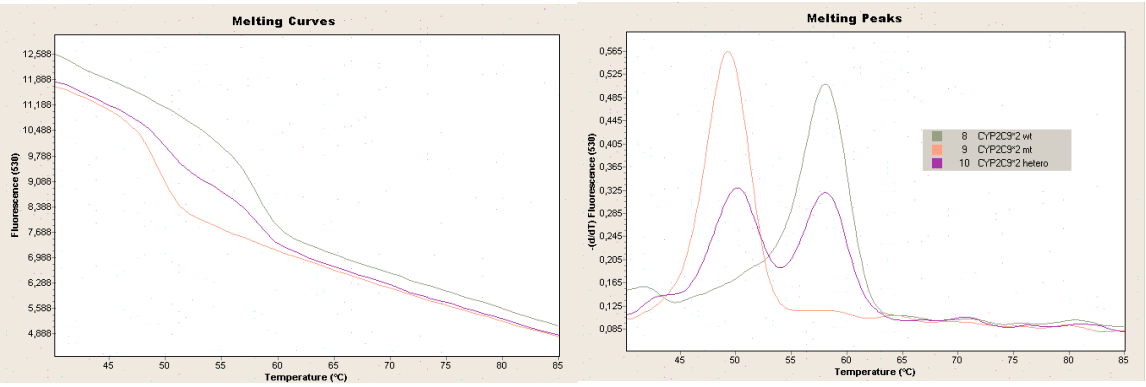
Genotipizacija se na uređaju *LightCycler*® vrši analizom krivulja taljenja (engl. *melting curve analysis*) nakon završenog umnažanja ciljne DNA. Povećavanjem temperature reakcijske smjese hibridizirane DNA dolazi do razdvajanja lanaca i hibridizacijskih sondi, što se u jednom trenutku, na određenoj temperaturi, očituje kao nagli pad fluorescencije reakcijske smjese. Tu temperaturu nazivamo temperaturom taljenja (Tm, od engl. *melting temperature*). Tm je temperatura kod koje je 50 % DNA jednolančano i on nije ovisan samo o duljini oligonukleotida i njegovom GC sadržaju, nego i o stupnju podudarnosti između hibridizacijske sonde i DNA kalupa. Na primjer, ako su hibridizacijske sonde komplementarne genotipu divljeg tipa (wt), ukoliko se u slijedu DNA koju analiziramo nalazi varijantni alel (nositelji varijantnog alela) dolazi do pogrešnog sparivanja između hibridizacijske sonde i ciljnog slijeda DNA, što rezultira destabiliziranim hibridom koji ima nižu Tm. Kod nositelja alela divljeg tipa (wt) dolazi do savršenog sparivanja i nastali hibrid je stabilniji i ima višu Tm. Naravno, moguć je i obrnuti slučaj, da wt genotip ima nižu, a varijantni aleli višu Tm. U svakom slučaju, analizom Tm-a je moguće ciljano otkrivanje promjena u slijedu nukleotida DNA, uključujući i jednonukleotidne polimorfizme (SNP). Za primjer analize krivulja taljenja možemo uzeti analizu *CYP2C9*2* polimorfizma (Slika 3-2). Na lijevom segmentu Slike 3-2 (*Melting Curves*) vidimo tri krivulje taljenja, za *CYP2C9*1*1* (*wt* – homozigot divljeg tipa, zelena krivulja), *CYP2C9*2*2* (*mut* - varijantni homozigot, narančasta krivulja) i *CYP2C9*1*2* (*het* – heterozigot, ljubičasta krivulja). Vidimo da se te tri krivulje razlikuju prema temperaturi kod koje je došlo do naglog pada fluorescencije (Tm), odnosno u točki infleksije krivulje. Tm je puno uočljiviji ako napravimo transformaciju krivulja, kao na primjer na desnom segmentu Slike 3-2 (tzv. „*Melting Peaks*“) tako da na os y umjesto fluorescencije postavimo negativnu vrijednost prve derivacije krivulja fluorescencije (-dF/dT), gdje Tm-ovi postaju vidljivi kao vršne vrijednosti (engl. *peak*). Kao što vidimo, *CYP2C9*1*1* genotip ima jedan, viši Tm, *CYP2C9*2*2* genotip ima jedan, niži Tm, a *CYP2C9*1*2* dva Tm-a (jedan za *wt* alel i jedan za *var* alel).

3.3.3.1. GENOTIPIZACIJA *CYP2C9*

Genotipizacija alelnih varijanti *CYP2C9 *1/*1*, **1/*2*, **1/*3*, **2/*2*; **2/*3*, **3/*3* utvrđena je pomoću *LightMix® for the detection of human CYP2C9*2 and CYP2C9*3* (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) i *LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka).

Reakcijska smjesa za RT-PCR sadržava: 4 µl *LightMix® for the detection of human CYP2C9*2 and CYP2C9*3*, 2 µl *FastStart DNA Master Hybridization Probes*, 1,2 µl 25 mM otopine Mg^{2+}, 7,8 µl sterilne H_2O i 5 µl DNA.

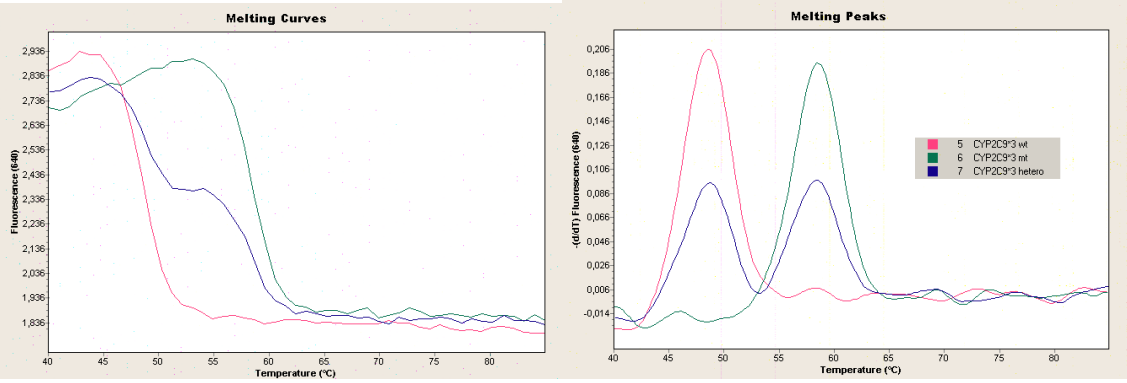
RT-PCR uvjeti: denaturacija 10 minuta na 95 °C; amplifikacija 45 ciklusa (5 sekundi na 95 °C, 10 sekundi na 60 °C i 15 sekundi na 72 °C); analiza krivulja taljenja 20 sekundi na 95 °C, 20 sekundi na 40 °C i postepeno podizanje temperature (0,2 °C/sekundi) do 85 °C; hlađenje 20 sekundi na 40 °C.



Slika 3-2 Analiza krivulja taljenja *CYP2C9*2*

Analiza *CYP2C9*2* (430C>T; rs1799853):

Kanal F1 (530 nm); *CYP2C9*1*1* Tm 58,5 °C, *CYP2C9*2*2* Tm 50,5 °C, *CYP2C9*1*2* Tm 50,5 °C i 58,5 °C.



Slika 3-3 Analiza krivulja taljenja *CYP2C9*3*

Analiza *CYP2C9*3* (1075A>C; rs1057910):

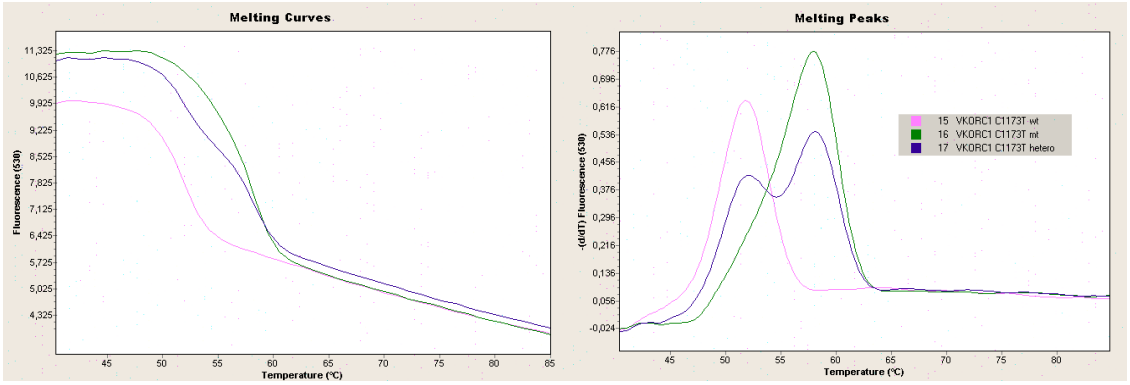
Kanal F2 (640 nm); *CYP2C9*1*1* Tm 48,3 °C, *CYP2C9*3*3* Tm 58,3 °C, *CYP2C9*1*3* Tm 48,3 °C i 58,3 °C.

3.3.3.2. GENOTIPIZACIJA *VKORC1*

Genotipizacija alelnih varijanti *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) i *VKORC1* 1173C>T (rs9934438) rađena je pomoću *LightMix® for the detection of human VKORC1 C1173T and VKORC1 G-1639A* (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) i *LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka).

Reakcijska smjesa za RT-PCR sadržava: 4 µl *LightMix® for the detection of human VKORC1 C1173T and VKORC1 G-1639A*, 2 µl *FastStart DNA Master Hybridization Probes*, 0,8 µl 25 mM otopine Mg^{2+}, 8,2 µl sterilne H_2O i 5 µl DNA.

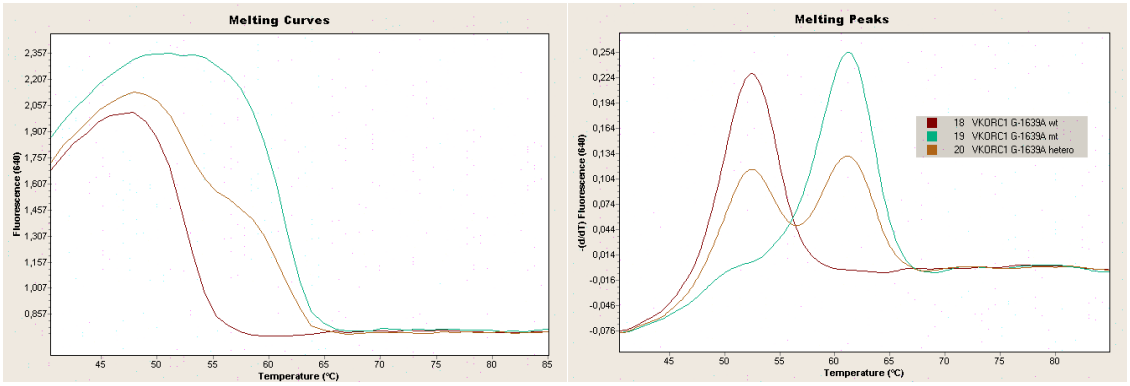
RT-PCR uvjeti: denaturacija 10 minuta na 95 °C; amplifikacija 45 ciklusa (5 sekundi na 95 °C, 10 sekundi na 60 °C i 15 sekundi na 72 °C); analiza krivulja taljenja 20 sekundi na 95 °C, 20 sekundi na 40 °C i postepeno podizanje temperature (0,2 °C/sekundi) do 85 °C; hlađenje 30 sekundi na 40 °C.



Slika 3-4 Analiza krivulja taljenja *VKORC1* 1173C>T

Analiza *VKORC1* 1173C>T (rs9934438):

Kanal F1 (530 nm); *VKORC1* 1173 CC (wt) Tm 51,8 °C, *VKORC1* 1173 TT (mut) Tm 58,1 °C, *VKORC1* 1173 CT (hetero) Tm 51,8 °C i 58,1 °C.



Slika 3-5 Analiza krivulja taljenja *VKORC1* -1639G>A

Analiza *VKORC1* -1639G>A (rs9923231):

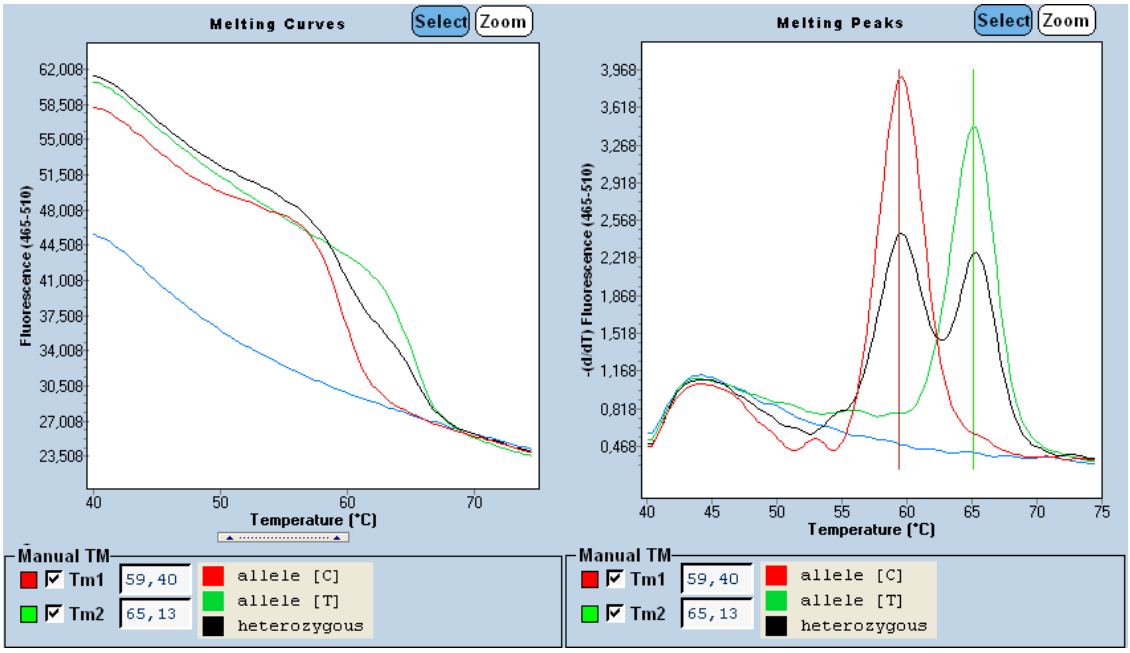
Kanal F2 (640 nm); *VKORC1* -1639 GG (wt) Tm 52,6 °C, *VKORC1* -1639 AA (mut) Tm 61,3 °C, *VKORC1* -1639 GA (hetero) Tm 52,6 °C i 61,3 °C.

3.3.3.3. GENOTIPIZACIJA *CYP4F2*

Genotipizacija alelnih varijanti *CYP4F2* (rs2108622) rađena je pomoću *LightSNiP rs2108622 CYP4F2* (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) i *LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka).

Reakcijska smjesa za RT-PCR sadržava: 1 µl *LightSNiP rs2108622 CYP4F2*, 2 µl *FastStart DNA Master Hybridization Probes*, 1,6 µl 25 mM otopine Mg^{2+}, 10,4 µl sterilne H_2O i 5 µl DNA.

RT-PCR uvjeti: denaturacija 10 minuta na 95 °C; amplifikacija 45 ciklusa (10 sekundi na 95 °C, 10 sekundi na 60 °C i 15 sekundi na 72 °C); analiza krivulja taljenja 20 sekundi na 95 °C, 20 sekundi na 40 °C i postepeno podizanje temperature (0,2 °C/sekundi) do 85 °C; hlađenje 30 sekundi na 40 °C.



Slika 3-6 Analiza krivulja taljenja *CYP4F2* (rs2108622)

Analiza *CYP4F2* (rs2108622):

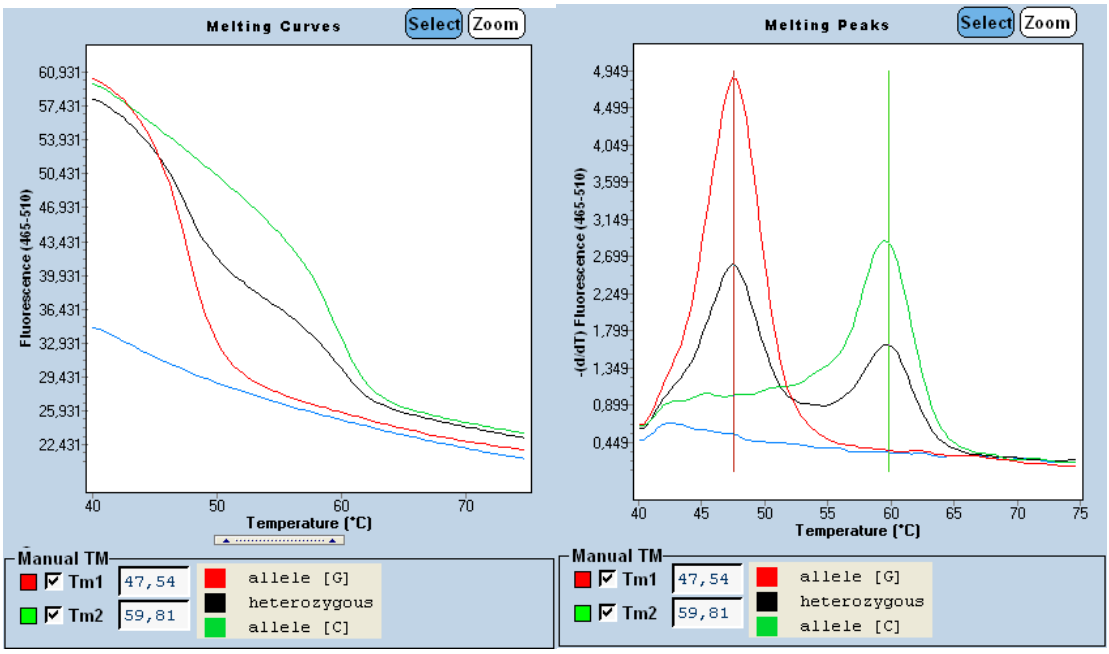
Kanal F1 (530 nm); *CYP4F2*1*1* (rs2108622) CC Tm 59,40 °C, *CYP4F2*3*3* (rs2108622) TT Tm 65,13 °C, *CYP4F21*3** (rs2108622) CT Tm 59,40 °C i 65,13 °C.

3.3.3.4. GENOTIPIZACIJA *GGCX*

Genotipizacija alelnih varijanti *GGCX* (rs11676382) rađena je pomoću *LightSNiP rs11676382 GGCX* (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka) i *LightCycler® FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka).

Reakcijska smjesa za RT-PCR sadržava: 1 µl *LightSNiP rs11676382 GGCX*, 2 µl *FastStart DNA Master Hybridization Probes*, 1,6 µl 25 mM otopine Mg^{2+}, 10,4 µl sterilne H_2O i 5 µl DNA.

RT-PCR uvjeti: denaturacija 10 minuta na 95 °C; amplifikacija 45 ciklusa (10 sekundi na 95 °C, 10 sekundi na 60 °C i 15 sekundi na 72 °C); analiza krivulja taljenja 20 sekundi na 95 °C, 20 sekundi na 40 °C i postepeno podizanje temperature (0,2 °C/sekundi) do 85 °C; hlađenje 30 sekundi na 40 °C.



Slika 3-7 Analiza krivulja taljenja *GGCX* (rs11676382)

Analiza *GGCX* (rs11676382):

Kanal F1 (530 nm); *GGCX* (rs11676382) GG Tm 47,54 °C, *GGCX* (rs11676382) CC Tm 59,81 °C, *GGCX* (rs11676382) GC Tm 47,54 °C i 59,81 °C.

Kod određivanja povezanosti varijantnih alela testiranih polimorfizama s različitim učincima korištene su dvije metode. U prvoj su uspoređivani nositelji varijantnih alela (u koje ubrajamo heterozigote i homozigote varijantnih alela) s homozigotima wt što je kao metoda pogodnija za alele s manjom učestalošću i jačim učinkom jer imamo veće izglede da uočimo moguću povezanost. U drugoj metodi, koja je pogodnija za alele s većom učestalošću i slabijim učinkom, uspoređivani su homozigoti varijantnih alela (kod kojih se očekuje najjači učinak) s homozigotima wt.

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Razina statističke značajnosti za sve testove određena je na $P < 0,050$, a svi intervali pouzdanosti (CI, engl. *confidence interval*) su dani na razini od 95 %.

Za sve analizirane polimorfizme izračunato je postoji li odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže χ^2 metodom.

Svi podatci su testirani na normalnost razdiobe Shapiro-Wilkovim testom. Ovisno o raspodjeli, za usporedbu dvaju skupina kvantitativnih podataka korišteni su t-test ili Mann-Whitney U test. Za usporedbu više skupina korišteni su test analize varijancije (ANOVA) ili Kruskal-Wallisov

test. Za određivanje povezanosti kvantitativnih podataka korišten je Spearmanov test korelacije rangova (rho). Za usporedbu kvalitativnih podataka, koristio se χ^2 ili Fisherov egzaktni test. Usporedba stopa incidencija, odnosno omjer stopa incidencije (IRR, engl. *incidence rate ratio*) određena je egzaktnim dvostranim Poissonovim testom. Za analizu cenzuriranih podataka (krivulje preživljenja - vrijeme do nekog događaja), korišten je log-rank test, Kaplan-Meierova analiza i Coxova regresijska analiza s omjerom ugroženosti (HR, od engl. *hazard ratio*). Povezanost dihotomnih varijabli (npr. prekomjerna antikoagulacija ili krvarenje) s genotipovima i drugim varijablama određena je logističkom regresijom. Povezanost stabilne doze varfarina s farmakogenetičkim i kliničkim parametrima te životnim navikama određena je multivarijatnom analizom. Korišten je model višestruke linearne regresije (MLR, engl. *multiple linear regression*) a u model su inicijalno bili uključeni svi dostupni parametri, bez obzira jesu li pokazali statističku povezanost u univarijatnoj analizi ili ne. Odabran je postupni model (engl. *stepwise*) u kojemu se varijable postepenu uključuju u model (prvo one koje zasebno pokazuju statističku značajnost), a ako se utvrdi da postaju statistički neznačajne, izbacuju se iz modela. Varijable su uključene u model ukoliko su pokazale statističku značajnost < 0,050, a iz modela bi bile isključene ukoliko su pokazale statističku značajnost > 0,200. Izrađena su dva regresijska modela: Regresijski model 1 (RM1) u kojemu su genotipovi uvršteni kao kategorije (1-6 za *CYP2C9* i 1-3 za ostale gene) unutar varijable koja predstavlja ispitivani gen odnosno polimorfizam, te Regresijski model 2 (RM2) u kojemu je svaki genotip svakog ispitanog polimorfizma prikazan kao zasebna binarna varijabla (1-0, odnosno je li prisutan ili ne).

Statističke analize su rađene uz pomoć aplikacija MedCalc for Windows, verzija 12.4.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija) i R: A language and environment for statistical computing, verzija 3.2.4 (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

4. REZULTATI

4.1. SKUPINA ZDRAVIH ISPITANIKA

Skupina zdravih ispitanika prikupljena je u svrhu određivanja učestalosti alela dvaju najvažnijih polimorfizama gena *VKORC1*: *VKORC1* 1173C>T (rs9934438) i *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) u populaciji Hrvatske.

Skupinu je činilo 420 ispitanika, većinom dobrovoljnih davatelja krvi, iz područja istočne Hrvatske: 269 muškaraca i 151 žena, dobi 21 - 79 godina (medijan 41 godina).

Polimorfizmi *VKORC1* 1173C>T (rs9934438) i *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) bili su u potpunoj veznoj neravnoteži (LD = 1), odnosno njihovi wt i varijantni aleli su uvijek dolazili zajedno, tako da će biti prikazani jedinstveni rezultati za oba SNP-a.

Od 420 ispitanika, 151 osoba (36 %) je homozigot wt alela (genotip C/C odnosno G/G), 196 osoba (47 %) su heterozigoti (genotip C/T odnosno G/A), a 73 osobe (17 %) su homozigoti varijantnih alela (genotip T/T odnosno A/A). Frekvencija alela je sljedeća: 498 alela (59,3 %) su wt aleli (C odnosno G), a 342 alela (40,7 %) su varijantni aleli (T odnosno A). Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže među genotipovima (P = 0,495).

4.2. SKUPINA BOLESNIKA NA TERAPIJI VARFARINOM

U ovo retrospektivno istraživanje bilo je uključeno ukupno 204 bolesnika na stabilnoj terapiji varfarinom oba spola. Doziranje varfarina je provođeno fiksnim režimom prema uputama proizvođača (130). Demografske, antropometrijske i kliničke osobine bolesnika prikazane su u Tablici 5.

Tablica 5 – Demografski, antropometrijski i klinički podatci za skupinu bolesnika na terapiji varfarinom

spol	n = 204
muški, n (%)	121 (59,3)
ženski, n (%)	83 (40,7)
dob u godinama, medijan (Q_1 - Q_3)	61 (49 - 68)
dob veća od 65 godina, n (%)	68 (33,3)
dob manja od 65 godina, n (%)	136 (66,6)
tjelesna visina u cm, medijan (Q_1 - Q_3)	174 (165 - 180)
tjelesna težina u kg, medijan (Q_1 - Q_3)	85 (72 - 96)
BSA u m^2, medijan (Q_1 - Q_3)	2,0 (1,8 – 2,1)
BMI u kg/m^2, medijan (Q_1 - Q_3)	27,8 (24,9 - 31,2)
do 25 kg/m^2, n (%)	52 (25,5)
od 25 do 29,99 kg/m^2, n (%)	82 (40,2)
preko 30 kg/m^2, n (%)	70 (34,3)
indikacija za primjenu varfarina	n = 204
atrijska fibrilacija, n (%)	86 (42,2)
duboka venska tromboza, n (%)	66 (32,4)
cerebrovaskularni inzult, n (%)	27 (13,2)
ostalo*, n (%)	25 (12,3)
adherencija za varfarin (%)	
visoka	40
srednja	44
niska	16

Q1 - Q3 – interkvartilni raspon; BMI – indeks tjelesne mase; BSA – površina tijela; *ostale indikacije: traume lokomotornog sustava, plućne embolije

U skupini bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom napravljena je procjena utjecaja određenih čimbenika životnih navika na terapiju varfarinom, posebice stabilnu dozu varfarina.

Procijenjen je status pušenja, konzumacija alkohola, razina fizičke aktivnosti te prosječni unos vitamina K prehranom (Tablica 6).

Tablica 6 - Čimbenici životnih navika u skupini bolesnika na terapiji varfarinom

status pušenja	n = 204
ne puši, n (%)	146 (71,6)
< 1 kutije/dan, n (%)	19 (9,3)
1 - 2 kutije/dan, n (%)	34 (16,7)
>2 kutije/dan, n (%)	5 (2,5)
konzumacija alkohola	n = 204
ne pije, n (%)	112 (54,9)
1 - 2 pića tjedno, n (%)	78 (38,2)
1 - 2 pića dnevno, n (%)	14 (6,9)
> 2 pića dnevno, n (%)	0 (0)
razina fizičke aktivnosti	n = 204
slabo aktivan, n (%)	50 (24,5)
umjereno aktivan, n (%)	145 (71,1)
svakodnevno vježba, n (%)	9 (4,4)
trenira neki sport, n (%)	0 (0)
unos vitamina K u µg/dan, medijan (Q1 - Q3)	265,9 (207,5 - 378,9)

Q1 - Q3 – interkvartilni raspon

Uzeti su podatci o drugim lijekovima koje bolesnici uzimaju uz varfarin, a koji bi mogli imati učinak na terapiju varfarinom. Prema Tablici 2 i Tablici 3 određeni su lijekovi koje bolesnici uzimaju, te su svrstani u dvije skupine: one koji djeluju na smanjenje te one koji djeluju na povećanje doze varfarina. Od lijekova koji smanjuju dozu, odnosno koji inhibiraju enzime koji metaboliziraju varfarin, bolesnici su uzimali azole (n = 7), statine (n = 29) te amiodaron (n =

32). Od lijekova koji povećavaju dozu, odnosno koji induciraju enzime koji metaboliziraju varfarin, bolesnici su uzimali samo karbamazepin (n = 5). Ukupno 62 bolesnika je uzimalo neki od navedenih lijekova istovremeno s varfarinom. S obzirom na broj lijekova koji su bolesnici uzimali istovremeno, 53 bolesnika je uzimalo samo jedan lijek, 7 ih je uzimalo dva lijeka, a 2 ih je uzimalo tri lijeka.

4.2.1. GENOTIPIZACIJA

U skupini bolesnika na terapiji varfarinom određene su učestalosti alela polimorfizama sljedećih gena:

CYP2C9 430C>T (*CYP2C9*2*; rs1799853) i *CYP2C9* 1075A>C (*CYP2C9*3*; rs1057910):

Genotipizacijom polimorfizama *CYP2C9* dobivene su sljedeće učestalosti alela i genotipova:

Tablica 7 - Učestalost alela za ispitivane polimorfizme *CYP2C9*

alel	broj alela (n = 408)	%
*CYP2C9*1* (wt)	334	81,9
*CYP2C9*2* (430C>T)	51	12,5
*CYP2C9*3* (1075A>C)	23	5,6

Tablica 8 - Učestalost genotipova za ispitivane polimorfizme *CYP2C9*

genotip	broj bolesnika (n = 204)	%
*CYP2C9*1*1*	141	69,1
*CYP2C9*1*2*	36	17,6
*CYP2C9*1*3*	16	7,8
*CYP2C9*2*2*	5	2,5
*CYP2C9*2*3*	5	2,5
*CYP2C9*3*3*	1	0,5

Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže među genotipovima polimorfizama *CYP2C9* gena (P = 0,246) i nisu pronađene razlike u učestalosti alela s obzirom na spol (P = 0,741).

VKORC1 -1639G>A (rs9923231) i *VKORC1* 1173C>T (rs9934438):

Genotipizacijom polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T utvrđeno je da su ti SNP-ovi u potpunoj veznoj neravnoteži (LD = 1) kod svih ispitanika, odnosno kod svakog ispitanika pronađeni su isti aleli (wt ili varijantni) i za *VKORC1* -1639G>A i za 1173C>T te su stoga rezultati za navedene polimorfizme prikazani zbirno:

Tablica 9 - Učestalost alela za ispitivane polimorfizme *VKORC1*

alel	broj alela (n = 408)	%
VKORC1 -1639 G (wt) *VKORC1* 1173 C (wt)	246	60,3
VKORC1 -1639 A (var) *VKORC1* 1173 T (var)	162	39,7

Tablica 10 - Učestalost genotipova za ispitivane polimorfizme *VKORC1*

genotip	broj bolesnika (n = 204)	%
VKORC1 -1639 G/G *VKORC1* 1173 C/C	75	36,8
VKORC1 -1639 G/A *VKORC1* 1173 C/T	96	47,0
VKORC1 -1639 A/A *VKORC1* 1173 T/T	33	16,2

Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže među genotipovima *VKORC1* -1639G>A i *VKORC1* 1173C>T (P = 0,806) i nisu pronađene razlike u učestalosti alela s obzirom na spol (P = 0,236).

CYP4F2 (*CYP4F2*3*; rs2108622):

Genotipizacijom polimorfizma rs2108622 u genu *CYP4F2* dobiveni su sljedeći rezultati:

Tablica 11 - Učestalost alela za ispitivani polimorfizam *CYP4F2*

alel	broj alela (n = 408)	%
*CYP4F2*1* (wt)	266	65,2
*CYP4F2*3* (var)	142	34,8

Tablica 12 - Učestalost genotipova za ispitivani polimorfizam *CYP4F2*

genotip	broj bolesnika (n = 204)	%
*CYP4F2*1*1*	85	41,7
*CYP4F2*1*3*	96	47,0
*CYP4F2*3*3*	23	11,3

Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže među genotipovima polimorfizma rs2108622 u genu *CYP4F2* (P = 0,598) i nisu pronađene razlike u učestalosti alela s obzirom na spol (P = 0,166).

GGCX 12970C>G (rs11676382):

Genotipizacijom polimorfizma *GGCX* 12970C>G dobiveni su sljedeći rezultati:

Tablica 13 - Učestalost alela za ispitivani polimorfizam *GGCX*

alel	broj alela (n = 408)	%
GGCX 12970 C (wt)	384	94,1
GGCX 12970 G (var)	24	5,9

Tablica 14 - Učestalost genotipova za ispitivani polimorfizam *GGCX*

genotip	broj bolesnika (n = 204)	%
GGCX 12970 C/C	180	88,2
GGCX 12970 C/G	24	11,8
GGCX 12970 G/G	-	-

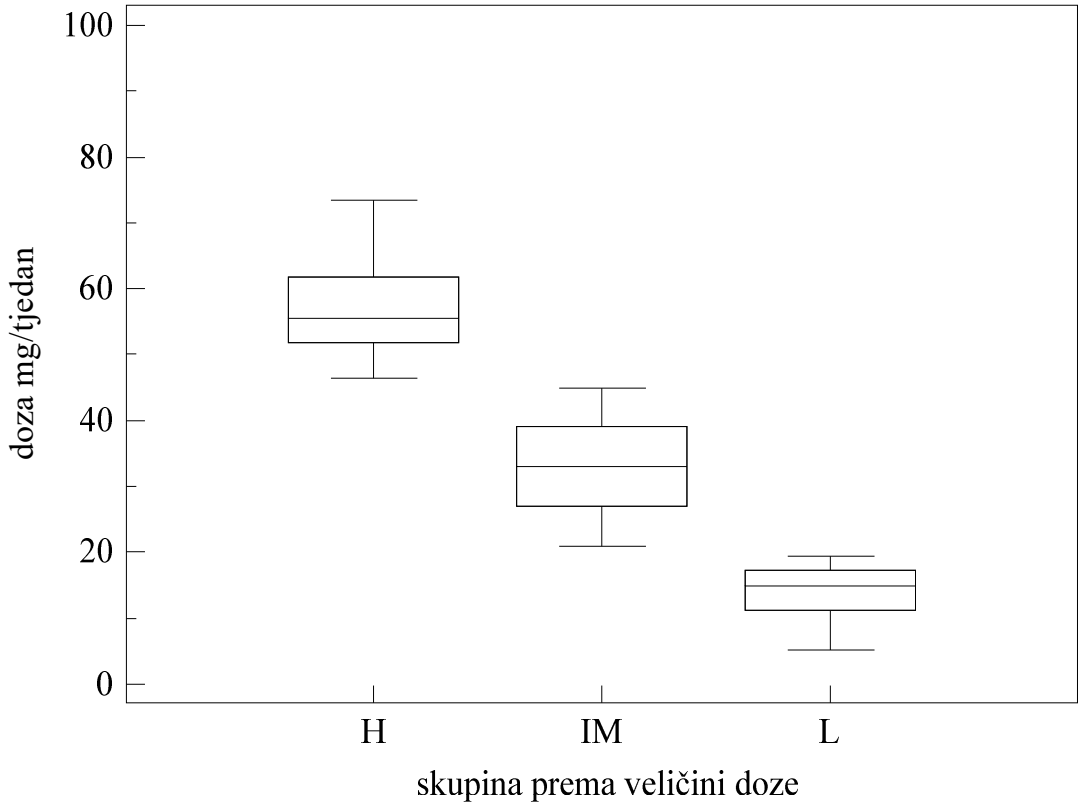
Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže među genotipovima polimorfizma *GGCX* 12970C>G (P = 0,372) i nisu pronađene razlike u učestalosti alela s obzirom na spol (P = 0,576).

4.2.2. STABILNA DOZA ODRŽAVANJA VARFARINA

Medijan tjedne stabilne doze održavanja varfarina u skupini bolesnika na terapiji iznosio je 33 mg/tjedan (interkvartilni raspon 25,5 - 43,5 mg/tjedan).

Raspodjelu bolesnika prema veličini doze na one s visokom dozom (preko 49 mg/tjedno), srednjom dozom (21 - 49 mg/tjedan) i niskom dozom (manje od 21 mg/tjedan) možemo vidjeti na Slici 4-1.

Visoku dozu održavanja imalo je 20,1 %, srednju 66,2 %, a nisku dozu održavanja varfarina 13,7 % bolesnika.



Slika 4-1 - Raspodjela bolesnika prema veličini doze varfarina
H > 49 mg/tjedan, IM 21 - 49 mg/tjedan, L < 21 mg/tjedan

Vrijednosti stabilne doze varfarina u populaciji bolesnika ispitane su na normalnost razdiobe, a dobiveni rezultati (Shapiro-Wilk test, $P < 0,001$) ukazuju da njihova razdioba ne potječe iz populacije s normalnom razdiobom. Stoga su za daljnju analizu korišteni neparametrijski testovi.

Ispitana je ovisnost stabilne doze varfarina o određenim kliničkim čimbenicima i životnim navikama, a rezultati univarijatne analize prikazani su u Tablicama 15 i 16. U Tablici 15 prikazani su rezultati povezanosti stabilne doze varfarina s kategoričkim, a u Tablici 16 s brojčanim varijablama.

Naknadnom analizom dobivene povezanosti konzumacije alkohola sa stabilnom dozom varfarina (Tablica 15) dobivena je statistički značajna razlika između bolesnika koji ne konzumiraju alkohol i bolesnika koji konzumiraju alkohol bez obzira na količinu ($P < 0,001$),

a nije dobivena statistički značajna razlika u dozi varfarina između bolesnika koji konzumiraju 1 - 2 pića tjedno i 1 - 2 pića dnevno (P > 0,05).

Tablica 15 - Stabilna doza varfarina u ovisnosti o kliničkim čimbenicima i životnim navikama

čimbenik		medijan doze (mg/tjedan)	interkvartilni raspon doze (mg/tjedan)	P
spol	muški	37,50	25,50 – 45,00	0,050*
	ženski	30,00	21,75 – 42,00	
status pušenja	ne puši	33,00	25,50 – 42,00	0,065†
	< 1 kutije/dan	37,50	30,38 – 44,63	
	1 - 2 kutije/dan	32,25	22,50 – 42,00	
	>2 kutije/dan	54,00	41,25 – 56,25	
konzumacija alkohola	ne pije	30,00	21,00 – 42,00	**0,004†**
	1 - 2 pića tjedno	37,50	30,00 – 46,50	
	1 - 2 pića dnevno	41,25	22,50 – 60,00	
fizička aktivnost	slabo aktivan	26,25	19,50 – 42,00	**0,005†**
	umjereno aktivan	36,00	28,50 – 43,50	
	svakodnevno vježba	27,00	24,38 – 44,63	
lijekovi koji smanjuju klirens varfarina	ne uzima	36,00	25,50 – 43,50	0,075*
	uzima	33,00	22,88 – 42,00	
lijekovi koji pojačavaju klirens varfarina	ne uzima	33,00	25,50 – 43,50	0,337*
	uzima	42,00	24,38 – 76,88	
indikacija	atrijska fibrilacija	30,00	21,00 – 42,00	**0,003†**
	cerebrovaskularni inzult	28,50	21,00 – 37,50	
	duboka venska tromboza	39,00	31,50 – 46,50	
	ostalo‡	33,00	27,00 – 43,88	

P – razina značajnosti; * Mann-Whitney; † Kruskal-Wallis test; ‡ ostale indikacije: traume lokomotornog sustava, plućne embolije

Dobivena razlika u stabilnoj dozi s obzirom na stupanj fizičke aktivnosti (Tablica 15) je naknadno testirana na razliku između skupina, a rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u dozi između slabo aktivnih i umjereno aktivnih bolesnika (P = 0,001), dok između onih koji svakodnevno vježbaju i slabo aktivnih bolesnika nema statistički značajne razlike (P > 0,05). Kada smo bolesnike podijelili na dvije skupine: slabo aktivne i aktivne, dobivena je statističke značajnosti P = 0,002.

S obzirom na povezanost indikacije za terapiju varfarinom sa stabilnom dozom (Tablica 15), u daljnjoj analizi podskupina prema indikaciji, duboka venska tromboza je pokazala statistički značajnu razliku u dozi varfarina u odnosu na ostale uputne dijagnoze (P = 0,001), dok ostale uputne dijagnoze nisu pokazale statistički značajnu razliku međusobno (P > 0,05).

Tablica 16 - Korelacija stabilne doze varfarina s kliničkim čimbenicima i životnim navikama

čimbenik	Spearmanov rho	95 % CI za rho	P*
dob	-0,177	od -0,307 do -0,041	0,011
težina	0,157	od 0,020 do 0,288	0,025
visina	0,246	od 0,112 do 0,371	< 0,001
BMI	0,008	od -0,129 do 0,145	0,909
BSA	0,204	od 0,0688 do 0,332	0,003
unos vitamina K hranom	-0,107	od -0,241 do 0,031	0,127

BMI – indeks tjelesne mase; BSA – površina tijela; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti;
* Spearmanov test korelacije rangova

Dobiveni su sljedeći rezultati povezanosti doze s polimorfizmima gena (Tablica 17):

A. Gen *CYP2C9*

U skupini bolesnika postoji statistički značajna razlika (P = 0,004) u dozi varfarina između genotipova za ispitivane polimorfizme *CYP2C9* (Slika 4-2), kao i između homozigota wt, heterozigota te homozigota varijantnih alela (P < 0,001) (Slika 4-3).

B. Gen *VKORC1*

U skupini bolesnika postoji statistički značajna razlika (P < 0,001) u dozi varfarina između genotipova za ispitivane polimorfizme *VKORC1* (Slika 4-4), kao i između homozigota wt i nositelja nekog varijantnog alela (P < 0,001) (Slika 4-5).

C. Gen *CYP4F2*

U skupini bolesnika nije pronađena statistički značajna razlika u dozi varfarina između genotipova za ispitivani polimorfizam *CYP4F2* (P = 0,767), kao ni između homozigota wt i nositelja varijantnog alela (*CYP4F2*3*) (P = 0,598).

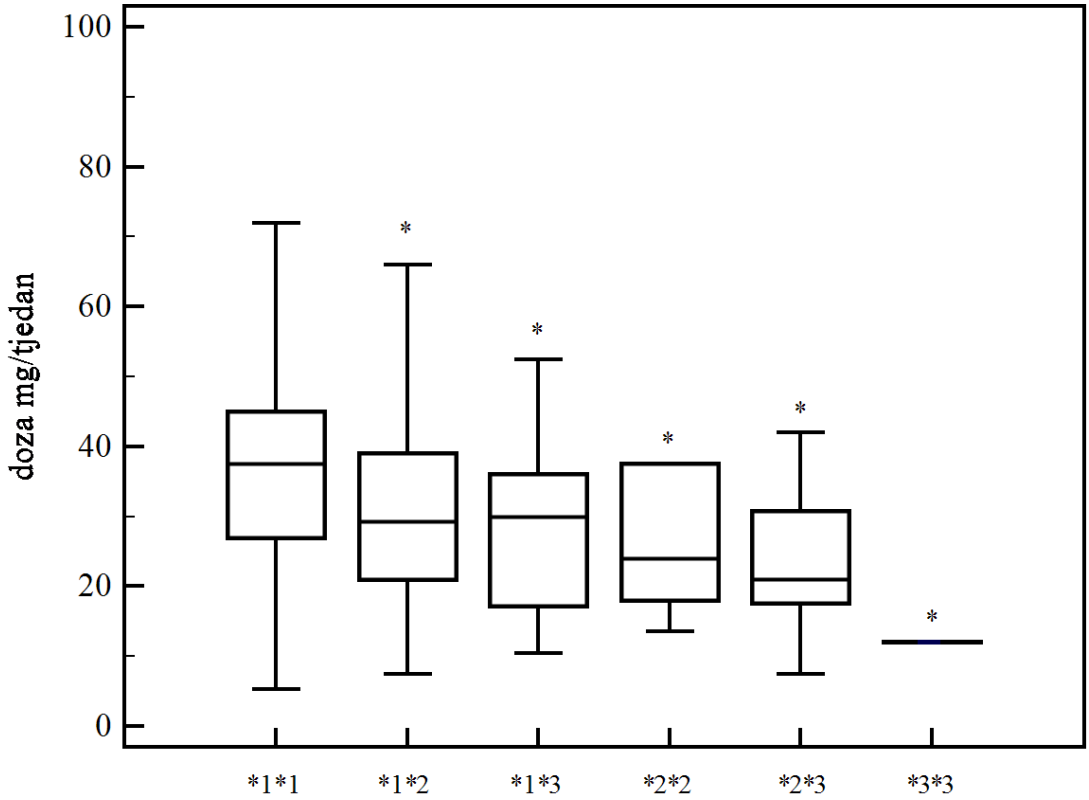
D. Gen *GGCX*

U skupini bolesnika nije pronađena statistički značajna razlika u dozi varfarina između homozigota wt i nositelja varijantnog alela (P = 0,902) za ispitivani polimorfizam *GGCX*.

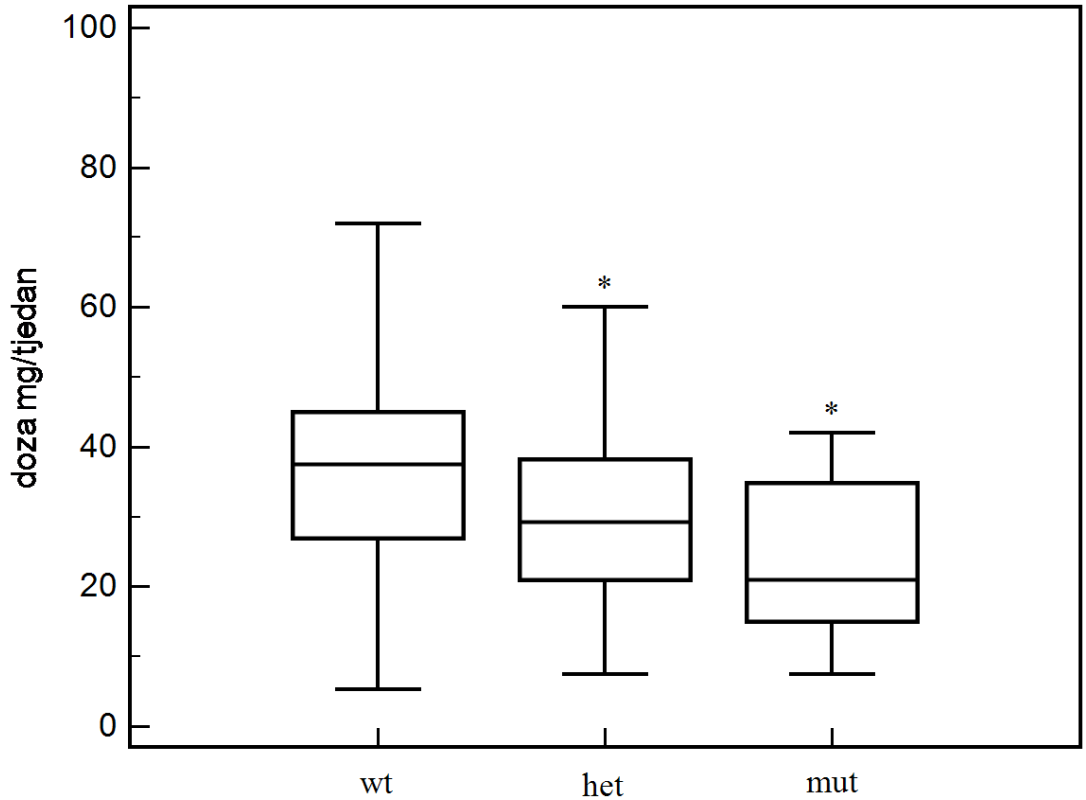
Tablica 17 - Stabilna doza varfarina u ovisnosti o prisutnosti varijantnih alela

gen	aleli	broj bolesnika	medijan doze (mg/tjedan)	interkvartilni raspon doze (mg/tjedan)	P
CYP2C9	*1*1	141	37,50	27,00 - 45,00	**< 0,001†**
	*1*2, *1*3	52	29,25	21,00 - 38,25	
	*2*2, *2*3, *3*3	11	21,00	15,00 - 34,88	
VKORC1	wt	75	42,00	31,50 - 52,50	**< 0,001***
	var	129	30,00	21,00 - 39,00	
CYP4F2	wt	85	33,00	25,50 - 42,00	0,598*
	var	119	33,00	24,38 - 45,00	
GGCX	wt	180	33,00	25,50 - 42,75	0,902*
	var	24	33,75	23,25 - 87,00	

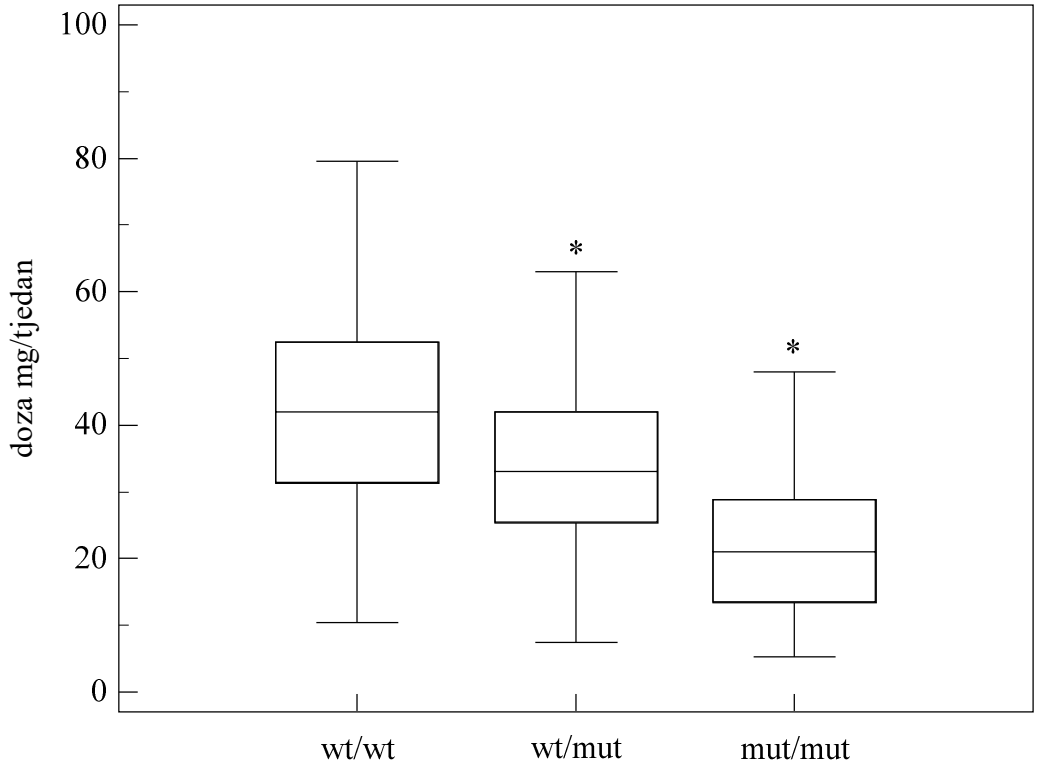
P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; * Mann-Whitney, † Kruskal-Wallis test



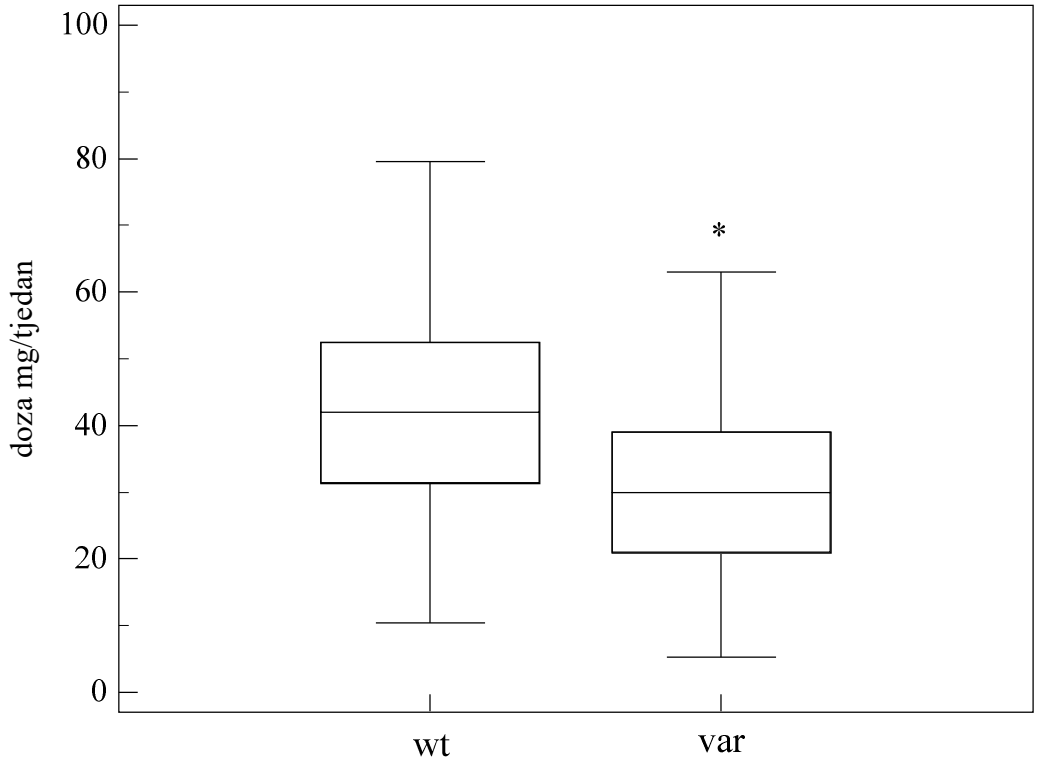
Slika 4-2 - Doza varfarina s obzirom na genotip za ispitivane polimorfizme *CYP2C9*
* statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip (*1*1)



Slika 4-3 - Doza varfarina kod homozigota wt, heterozigota i homozigota varijantnih alela za ispitivane polimorfizme *CYP2C9*
wt – homozigoti wt (*1*1); het – heterozigoti wt i varijantnog alela (*1*2, *1*3); mut – homozigoti varijantnih alela (*2*2, *2*3, *3*3); * statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip (*1*1)



Slika 4-4 - Doza varfarina s obzirom na genotip za ispitivane polimorfizme *VKORC1*
wt/wt – homozigot alela divljeg tipa; wt/mut – heterozigot; mut/mut – homozigot varijantnog alela; * statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip



Slika 4-5 - Razlike u dozi varfarina između homozigota wt i nositelja varijantnog alela za ispitivane polimorfizme *VKORC1*
wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; * statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip

Izračunati su omjeri izgleda (OR, od engl. *odds ratio*) da će bolesnik imati dozu u skupini niske (< 21 mg/tjedan), srednje (21 - 49 mg/tjedan) ili visoke doze (> 49 mg/tjedan) s obzirom na to je li nositelj nekoga varijantnog alela u odnosu na homozigote wt određenog polimorfizma gena, a podatci se nalaze u Tablici 18.

Tablica 18 - Omjer izgleda za veličinu doze kod nositelja varijantnih alela

niska doza (< 21 mg/tjedan)	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	**9,21**	**2,12 - 40,04**	**0,003**
CYP4F2 var *vs.* wt	1,12	0,50 - 2,53	0,783
GGCX var *vs.* wt	1,30	0,41 - 4,13	0,656
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	**3,22**	**1,34 - 7,74**	**0,009**
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	**6,14**	**1,57 - 24,01**	**0,009**
srednja doza (21 - 49 mg/tjedan)	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	1,40	0,77 - 2,55	0,266
CYP4F2 var *vs.* wt	0,65	0,36 - 1,18	0,155
GGCX var *vs.* wt	0,46	0,20 - 1,09	0,080
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,84	0,43 - 1,63	0,610
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	0,85	0,24 - 3,04	0,799
visoka doza (> 49 mg/tjedan)	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	**0,22**	**0,10 - 0,45**	**< 0,001**
CYP4F2 var *vs.* wt	2,01	0,98 - 4,14	0,058
GGCX var *vs.* wt	2,23	0,88 - 5,64	0,091
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,49	0,20 - 1,19	0,114
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	0,14	0,01 - 2,36	0,173

OR – omjer izgleda; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * χ^2 test

Naknadnom analizom povezanosti alela *CYP4F2*3* s fenotipom doze varfarina, usporedili smo homozigote *CYP4F2*3* alela s homozigotima wt i dobivena je statistički značajna povezanost (OR = 2,95, 95 % CI 1,04 – 8,37, P = 0,042) s fenotipom visoke doze (> 49 mg/tjedan).

4.2.2.1. MULTIVARIJATNA ANALIZA – VIŠESTRUKA LINEARNA REGRESIJA

Koristeći rezultate analize povezanosti farmakogenetičkih i kliničkih čimbenika te životnih navika sa stabilnom dozom varfarina, napravljena je multivarijatna analiza višestrukom linearnom regresijom (MLR) čiji je cilj izrada modela za bolje predviđanje doze varfarina prije započinjanja terapije, a koja je uključivala sve dostupne varijable u istraživanju.

Vrijednost doze je prije regresijske analize logaritmirana prirodnim logaritmom (ln).

Kako bi izbjegli moguću pristranost (bias) kod procjene regresijskog algoritma zbog validacije na istim podatcima s kojima je rađena regresija, ispitanike smo podjelili u dvije skupine: nasumično smo odabrali 24 bolesnika za validacijsku skupinu dok je preostalih 180 bolesnika činilo derivacijsku skupinu za izračun regresijskog modela.

U Regresijskom modelu 1 (RM1) genotipovi su u regresijski model uvršteni kao kategorije (1-6 za *CYP2C9* i 1-3 za ostale gene) unutar varijable koja predstavlja ispitivani gen odnosno polimorfizam.

Varijable koje su pokazale statistički značajnu povezanost i ušle u konačni model RM1 prikazane su u Tablici 19.

Za RM1 su u derivacijskoj skupini (n = 180) dobivene sljedeće vrijednosti:

- koeficijent determinacije (R^2): 0,4898 (prilagođeni R^2 = 0,4659)
- višestruki koeficijent korelacije (r): 0,6998

Vrlo slični rezultati dobiveni su i regresijskom analizom prema RM1 na populaciji svih bolesnika (n = 204): dobiven je koeficijent determinacije (R^2) 0,4670 (prilagođeni R^2 = 0,4451) i višestruki koeficijent korelacije (r) 0,6834 (ostali podatci nisu prikazani).

Pomoću koeficijenata varijabli dobivenih višestrukom linearnom regresijom podataka iz derivacijske skupine napravljena je regresijska jednadžba za RM1, pomoću koje su izračunate predviđene doze za 24 bolesnika u validacijskoj skupini.

$$\text{RM1 doza varfarina (mg/tjedan)} = e^{REG}$$

REG = 3,7413 + [(-0,1540 · *CYP2C9*) + (-0,3547 · *VKORC1*) + (0,1018 · *CYP4F2*) + (0,1830 · AK) + (-0,0059 · DOB) + (0,2579 · BSA) + (0,5839 · IND) + (-0,1120 · INH)]

Moguće vrijednosti varijabli u regresijskoj jednadžbi su:

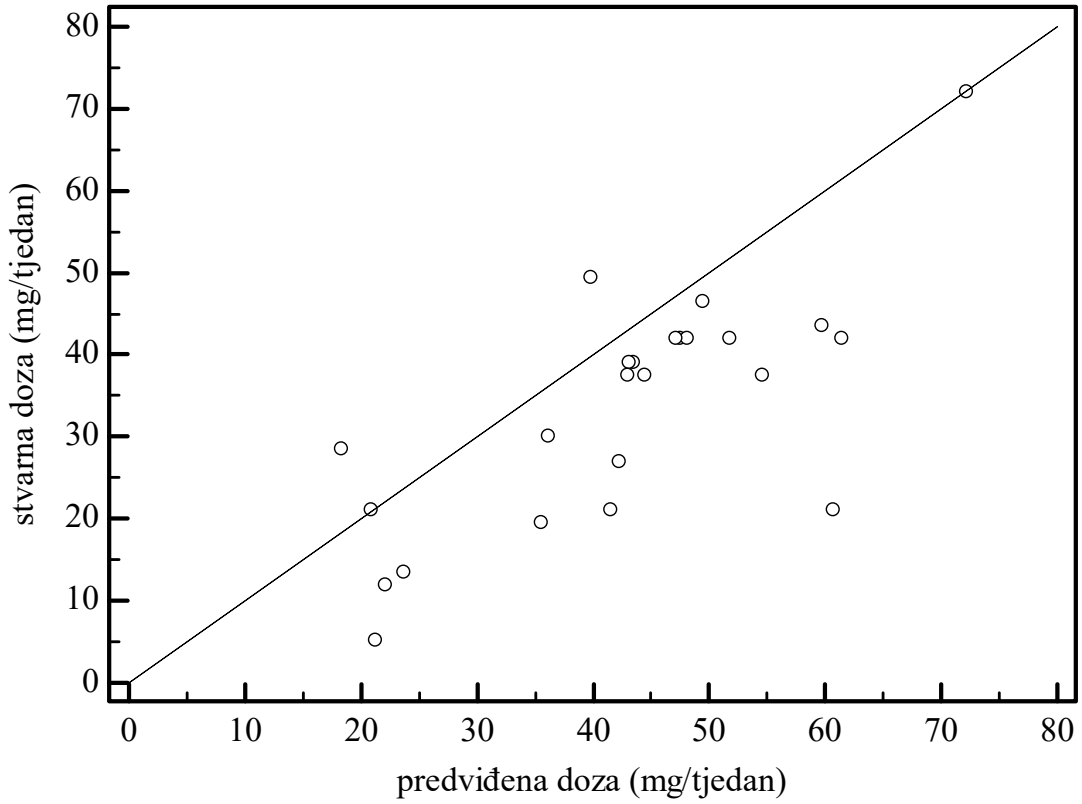
- za genotip *CYP2C9* moguće vrijednosti su od 1 do 6, što odgovara mogućim kombinacijama alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* (1 = *1*1; 2 = *1*2; 3 = *1*3; 4 = *2*2; 5 = *2*3; 6 = *3*3)
- za genotip *VKORC1* moguće vrijednosti su od 1 do 3, što odgovara mogućim kombinacijama alela *VKORC1* -1639G>A i *VKORC1* 1173C>T (1 = G/G [C/C]; 2 = G/A [C/T]; 3 = A/A [T/T])
- za genotip *CYP4F2* moguće vrijednosti su od 1 do 3, što odgovara mogućim kombinacijama alela *CYP4F2*3* (1 = *1*1; 2 = *1*3; 3 = *3*3)
- za fizičku aktivnost (AK) moguće vrijednosti su 0 i 1 (0 = slabo aktivan, 1 = aktivan)
- vrijednost DOB su godine bolesnika (brojčana varijabla)
- vrijednost BSA je tjelesna površina bolesnika u m^2 (brojčana varijabla)
- broj lijekova koji pojačavaju klirens varfarina (IND): moguće vrijednosti su od 0 do 1
- broj lijekova koji smanjuju klirens varfarina (INH): moguće vrijednosti su od 0 do 3

Tablica 19 - Varijable i koeficijenti regresijske jednadžbe višestruke linearne regresije za derivacijsku skupinu (n = 180) regresijskog modela 1

varijabla (moguće vrijednosti)	koeficijent varijable	parcijalni koeficijent korelacije	P*
konstanta	3,7413	-	-
genotip *CYP2C9* (1 - 6)	-0,1540	-0,3914	<0,001
genotip *VKORC1* (1 - 3)	-0,3547	-0,5942	<0,001
genotip *CYP4F2* (1 - 3)	0,1018	0,1981	0,009
fizička aktivnost (0 - 1)	0,1830	0,2234	0,003
dob	-0,0059	-0,2303	0,002
BSA	0,2579	0,1583	0,038
broj lijekova koji pojačavaju klirens varfarina (0-1)	0,5839	0,2439	0,001
broj lijekova koji smanjuju klirens varfarina (0-3)	-0,1120	-0,1706	0,025

P – razina značajnosti; BSA – tjelesna površina; * višestruka linearna regresija

Analizom korelacije stvarnih vrijednosti doze varfarina validacijske skupine s predviđenim vrijednostima dobivenim regresijskom jednadžbom iz derivacijske skupine (prikazano na Slici 4-6) dobivene su vrijednosti ($r = 0,7405$ (95 % CI 0,4806 - 0,8808); $R^2 = 0,5483$; $P < 0,001$).



Slika 4-6 – Regresijski model 1 - usporedba stvarnih s predviđenim vrijednostima doze varfarina u validacijskoj skupini (n = 24)

U Regresijskom modelu 2 (RM2) genotipovi su u model uvršteni kao binarne varijable (1-0, odnosno je li genotip prisutan ili ne).

Varijable koje su pokazale statistički značajnu povezanost i ušle u konačni model RM2 prikazane su u Tablici 20.

Za RM2 su u derivacijskoj skupini (n = 180) dobivene sljedeće vrijednosti:

- koeficijent determinacije (R^2): 0,5261 (prilagođeni $R^2 = 0,4980$)
- višestruki koeficijent korelacije (r): 0,7253

Vrlo slični rezultati dobiveni su i regresijskom analizom prema RM2 na populaciji svih bolesnika (n = 204): dobiveni su koeficijent determinacije (R^2) 0,5290 (prilagođeni $R^2 = 0,5046$) i višestruki koeficijent korelacije (r) 0,7273 (ostali podatci nisu prikazani).

Tablica 20 - Varijable i koeficijenti regresijske jednadžbe višestruke linearne regresije za derivacijsku skupinu (n = 180) regresijskog modela 2

varijabla (moguće vrijednosti)	koeficijent varijable	parcijalni koeficijent korelacije	P*
konstanta	2,6539	-	-
genotip *CYP2C9*1*1* (0 - 1)	0,1691	0,2241	0,003
genotip *CYP2C9*2*3* (0 - 1)	-0,4814	-0,2219	0,003
genotip *CYP2C9*3*3* (0 - 1)	-0,6498	-0,1446	0,049
genotip *VKORC1* heterozigot (0 - 1)	-0,3271	-0,3895	<0,001
genotip *VKORC1* mut homozigot (0 - 1)	-0,8231	-0,6379	<0,001
genotip *CYP4F2*3*3* (0 - 1)	0,2184	0,2048	0,007
fizička aktivnost (0 - 1)	0,1642	0,207	0,007
BSA	0,4514	0,2772	< 0,001
broj lijekova koji pojačavaju klirens varfarina (0-1)	0,4932	0,2054	0,007
broj lijekova koji smanjuju klirens varfarina (0-3)	-0,1722	-0,2456	0,001

P – razina značajnosti; BSA – tjelesna površina; * višestruka linearna regresija

Pomoću koeficijenata varijabli dobivenih višestrukom linearnom regresijom podataka iz derivacijske skupine napravljena je regresijska jednadžba za RM2, pomoću koje su izračunate predviđene doze za 24 bolesnika u validacijskoj skupini.

$$\text{RM2 doza varfarina (mg/tjedan)} = e^{REG}$$

REG = 2,6539 + [(0,1691 · *CYP2C9*1*1*) + (-0,4814 · *CYP2C9*2*3*) + (-0,6498 · *CYP2C9*3*3*) + (-0,3271 · *VKORC1 het*) + (-0,8231 · *VKORC1 mut*) + (0,2184 · *CYP4F2*3*3*) + (0,1642 · AK) + (0,4514 · BSA) + (0,4932 · IND) + (-0,1722 · INH)]

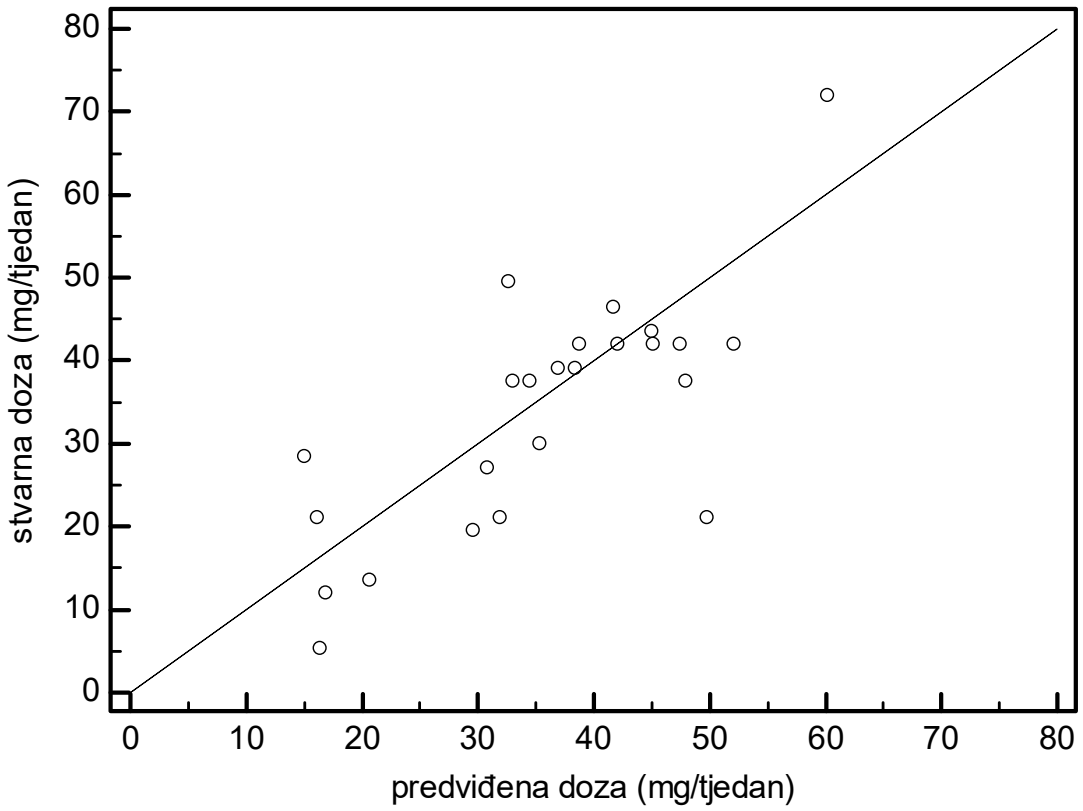
Moguće vrijednosti varijabli u regresijskoj jednadžbi su:

- genotipovi *CYP2C9* *1*1, *2*3 i *3*3 mogu imati vrijednosti 1 ili 0 (prisutan ili ne), a samo jedan može biti pozitivan u istog bolesnika
- genotipovi *VKORC1 het* (heterozigot, tj. genotip G/A za VKORC1 -1639G>A, odnosno C/T za *VKORC1* 1173C>T) i *VKORC1 mut* (mutirani homozigot, tj. genotip A/A za

VKORC1 -1639G>A, odnosno T/T za *VKORC1* 1173C>T) mogu imati vrijednosti 1 ili 0 (prisutan ili ne), a samo jedan može biti pozitivan u istog bolesnika

- genotip *CYP4F2*3*3* može imati vrijednosti 1 ili 0 (prisutan ili ne)
- za fizičku aktivnost (AK) moguće vrijednosti su 0 i 1 (0 = slabo aktivan, 1 = aktivan)
- vrijednost BSA je tjelesna površina bolesnika u m^2 (brojčana varijabla)
- broj lijekova koji pojačavaju klirens varfarina (IND): moguće vrijednosti su od 0 do 1
- broj lijekova koji smanjuju klirens varfarina (INH): moguće vrijednosti su od 0 do 3

Analizom korelacije stvarnih vrijednosti doze varfarina validacijske skupine s predviđenim vrijednostima dobivenim regresijskom jednadžbom iz derivacijske skupine (prikazano na Slici 4-7) dobivene su vrijednosti ($r = 0,7542$ (95 % CI 0,5042 - 0,8876); $R^2 = 0,5688$; $P < 0,001$) vrlo slične onima dobivenima regresijskom analizom predviđenih i stvarnih doza varfarina derivacijske skupine i svih ispitanika.



Slika 4-7 – Regresijski model 2 - usporedba stvarnih s predviđenim vrijednostima doze varfarina u validacijskoj skupini (n = 24)

Usporedili smo rezultate dobivene algoritmom u validacijskoj skupini s rezultatima za iste bolesnike (validacijska skupina, n = 24) koje smo dobili koristeći IWPC/IWDRC algoritam za predviđanje doze varfarina (www.warfarindosing.org). Dobivena je visoka korelacija između

rezultata dobivenih pomoću RM1 (r = 0,9039 (95 % CI: 0,7877 - 0,9580); R^2 = 0,8175; P < 0,001) i pomoću RM2 (r = 0,8994 (95 % CI: 0,7785 - 0,9560); R^2 = 0,8089; P < 0,001) s rezultatima dobivenim IWPC/IWDRC algoritmom.

4.2.2.2. VRIJEME DO STABILNE DOZE VARFARINA

Medijan vremena potrebnog bolesnicima da postignu stabilnu dozu varfarina iznosio je 41,5 dan (interkvartilni raspon: 20,0 - 82,0 dan).

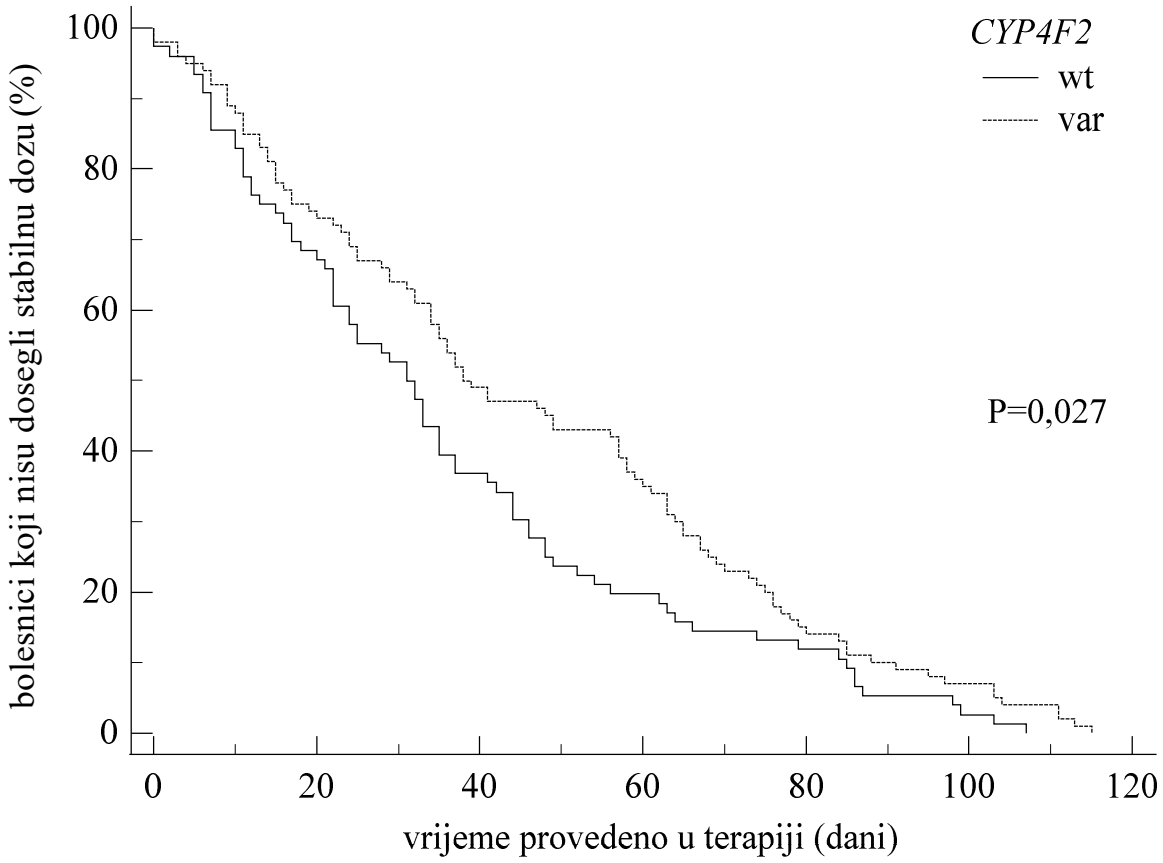
Podatci o vremenu potrebnom da bolesnici postignu stabilnu dozu s obzirom na to je li bolesnik nositelj nekoga varijantnog alela u odnosu na homozigote wt određenog polimorfizma gena nalaze se u Tablici 21.

Kod nositelja varijantnih alela za ispitivani polimorfizam *CYP4F2* opaženo je da im je potrebno duže vrijeme da postignu stabilnu dozu u odnosu na homozigote wt (P = 0,019). Isto je potvrđeno i analizom vremena do ishoda, odnosno log-rank testom (P = 0,027), pri čemu omjer ugroženosti (HR) za nositelje varijantnih alela gena *CYP4F2* iznosi 0,72 (95 % CI: 0,53 - 0,98). Na Slici 4-8 prikazana je Kaplan-Meierova krivulja vremena do stabilne doze za nositelje varijantnog alela ispitivanog polimorfizma *CYP4F2*. Rezultati log – rank analize za ostale polimorfizme prikazani su u Tablici 22.

Tablica 21 - Ovisnost vremena potrebnog da se postigne stabilna doza kod nositelja varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

gen	nositelj alela	broj bolesnika	medijan (dani)	interkvartilni raspon (dani)	P
CYP2C9	*1*1 (wt)	141	46,0	21,75 - 88,75	0,373†
	*1*2, *1*3	52	34,5	19,50 - 69,00	
	*2*2, *2*3, *3*3	11	44,0	14,50 - 64,00	
VKORC1	wt	75	49,0	20,75 - 102,00	0,108*
	var	129	37,0	18,75 - 76,25	
CYP4F2	wt	85	33,0	16,75 - 64,50	**0,019***
	var	119	57,0	24,00 - 87,25	
GGCX	wt	180	41,0	20,00 - 79,00	0,866*
	var	24	45,0	20,00 - 90,50	

P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; * Mann-Whitney, † Kruskal-Wallis test



Slika 4-8 - Vrijeme do stabilne doze za nositelje varijantnog alela ispitivanog polimorfizma *CYP4F2*
wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela

Tablica 22 - Omjer ugroženosti za stabilnu dozu: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	HR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	1,21	0,89 - 1,64	0,212
CYP4F2 var *vs.* wt	**0,72**	**0,53 - 0,98**	**0,027**
GGCX var *vs.* wt	0,89	0,57 - 1,37	0,594
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	1,02	0,73 - 1,42	0,911
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,01	0,54 - 1,88	0,972

HR – omjer ugroženosti; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * log-rank test

4.2.3. UDIO VREMENA PROVEDENOG U TERAPIJSKOM RASPONU

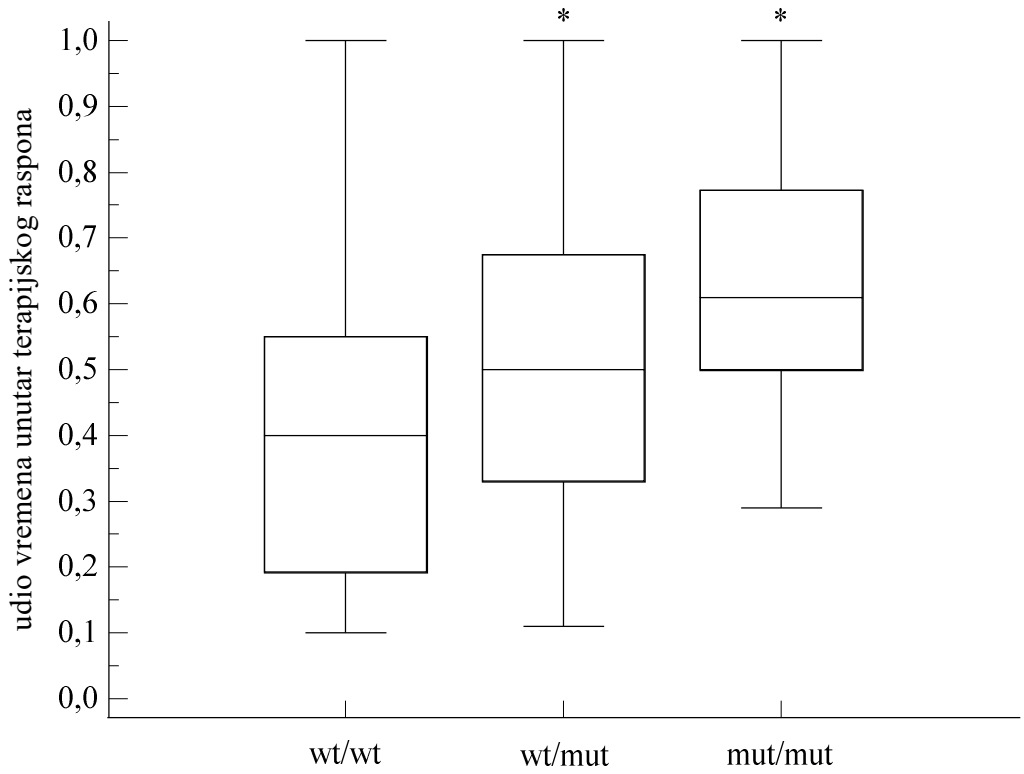
Medijan udjela vremena provedenog u terapijskom rasponu za bolesnike na terapiji varfarinom iznosio je 0,50 (50 %). Rezultati analize ovisnosti udjela vremena u terapijskom rasponu o genotipu prikazani su u Tablici 23.

Udio vremena provedenog u terapijskom rasponu pokazao je statistički značajnu ovisnost jedino o genotipu *VKORC1* (P < 0,001), što je prikazano i na slikama 4-9 i 4-10.

Tablica 23 – Udio vremena provedenog u terapijskom rasponu u ovisnosti o genotipu

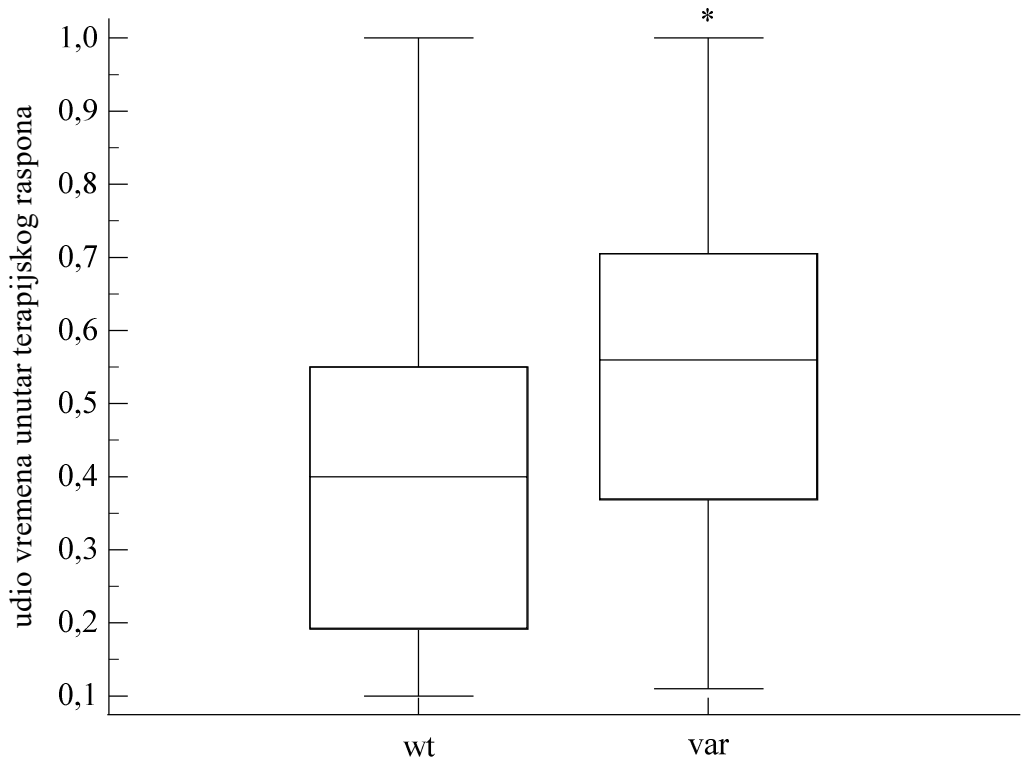
CYP2C9	P
*1*1 *vs.* *1*2 *vs.* *1*3 *vs.* *2*2 *vs.* *2*3 *vs.* *3*3	0,059†
wt (*1*1) *vs.* heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* mut (*2*2, *2*3, *3*3)	0,193†
wt (*1*1) *vs.* nositelji var alela (*1*2, *1*3, *2*2, *2*3, *3*3)	0,098†
VKORC1	P
wt *vs.* heterozigoti *vs.* mut	**< 0,001†**
wt *vs.* var	**< 0,001***
CYP4F2	P
wt *vs.* heterozigoti *vs.* mut	0,084†
wt *vs.* var	0,510*
GGCX	P
wt *vs.* var	0,134*

P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * Mann-Whitney, † Kruskal-Wallis test



Slika 4-9 - Udio vremena u terapijskom rasponu s obzirom na genotip ispitivanih polimorfizama *VKORC1*

wt/wt – homozigot alela divljeg tipa; wt/mut – heterozigot; mut/mut – homozigot varijantnog alela; *statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip



Slika 4-10 - Razlike u udjelu vremena u terapijskom rasponu između homozigota wt i nositelja varijantnog alela polimorfizama ispitivanih polimorfizama *VKORC1*

wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; *statistički značajna razlika (P < 0,05) u odnosu na wt genotip

4.2.4. NUSPOJAVE TERAPIJE VARFARINOM

Od nuspojava terapije varfarinom, zabilježeni su prekomjerna antikoagulacija (vrijednost PV > 4 INR) i krvarenja. Nije zabilježen niti jedan slučaj tromboze u bolesnika na terapiji.

4.2.4.1. PREKOMJERNA ANTIKOAGULACIJA (INR > 4)

Tijekom praćenja skupine bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom zabilježeno je ukupno 88 slučajeva prekomjerne antikoagulacije (OA, engl. *overanticoagulation*) definirane kao PV > 4 INR-a kod 52 bolesnika za ukupno 359,85 bolesnik-godina (ukupno trajanje praćenja svih bolesnika), što daje stopu incidencije (stopa incidencije je broj slučajeva / vrijeme praćenja bolesnika) OA od 24,5 događaja / 100 bolesnik-godina.

Omjeri izgleda za OA između nositelja varijantnih alela i homozigota wt ispitivanih polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9* dobiveni univarijatnom analizom nalaze se u Tablici 24. Niti jedan polimorfizam nije pokazao statistički značajnu povezanost s pojavom OA u bolesnika. Napravljena je i logistička regresijska analiza omjera izgleda za OA u kojoj su bili uključeni svi genotipovi *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9*, gdje isto tako nije dobivena statistička značajnost niti za jednu varijablu (podatci nisu prikazani).

Omjer stopa incidencije (IRR, engl. *incidence rate ratio*) OA za nositelje varijantnih alela u odnosu na homozigote wt nalazi u Tablici 25.

Tablica 24 - Omjer izgleda za prekomjernu antikoagulaciju: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	0,66	0,34 - 1,25	0,197
CYP4F2 var *vs.* wt	1,19	0,63 - 2,28	0,587
GGCX var *vs.* wt	1,23	0,48 - 3,17	0,660
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,75	0,35 - 1,62	0,469
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,61	0,44 - 5,80	0,470

OR – omjer izgleda; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * χ^2 test

Tablica 25 - Omjer stopa incidencije prekomjerne antikoagulacije: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	IRR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	0,72	0,46 - 1,13	0,129
CYP4F2 var *vs.* wt	1,28	0,80 - 2,08	0,282
GGCX var *vs.* wt	0,93	0,43 - 1,79	0,819
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	1,14	0,69 - 1,83	0,585
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,34	0,42 - 3,31	0,530

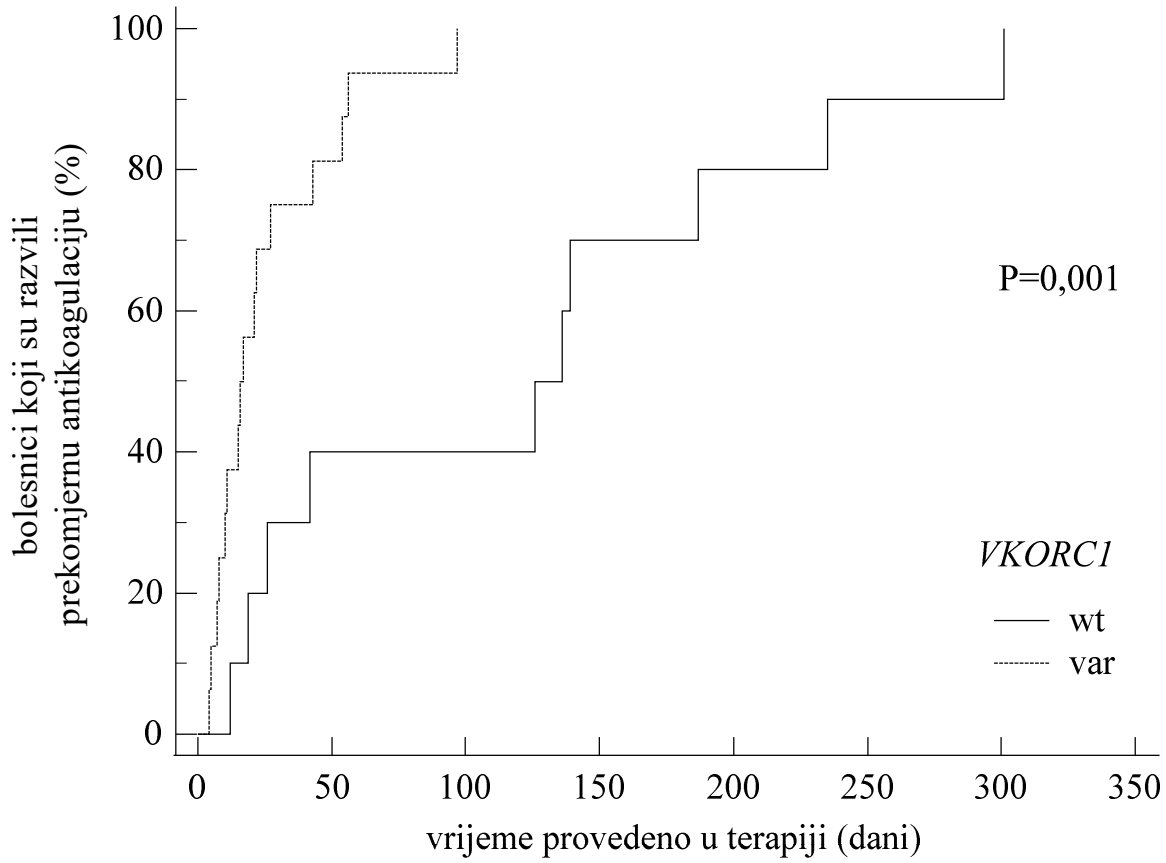
IRR – omjer stopa incidencije; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * IRR

Analizom vremena do prvog slučaja OA log-rank testom dobivene su vrijednosti prikazane u Tablici 26. Nositelji varijantnih alela *VKORC1* pokazali su veći omjer ugroženosti u odnosu na homozigote wt (HR 2,99, 95 % CI 1,34 - 6,71, P = 0,001), što je vidljivo i na Kaplan-Meier krivulji (Slika 4-11).

Tablica 26 - Omjeri ugroženosti za prekomjernu antikoagulaciju: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	HR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	**2,99**	**1,34 - 6,71**	**0,001**
CYP4F2 var *vs.* wt	1,04	0,47 - 2,28	0,915
GGCX var *vs.* wt	1,20	0,42 - 3,38	0,708
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,85	0,34 - 2,08	0,706
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,39	0,26 - 7,43	0,649

HR – omjer ugroženosti; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * log-rank test



Slika 4-11 - Vrijeme do prvog slučaja prekomjerne antikoagulacije za nositelje varijantnog alela ispitivanih polimorfizama *VKORC1*
wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela

4.2.4.2. KRVARENJA

Tijekom praćenja skupine bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom zabilježeno je ukupno 60 slučajeva krvarenja kod 39 bolesnika za ukupno 359,85 bolesnik-godina (ukupno trajanje praćenja svih bolesnika), što daje stopu incidencije od 16,7 krvarenja / 100 bolesnik-godina. S obzirom na intenzitet, krvarenja su klasificirana prema Fihnu, a podatci se nalaze u Tablici 27.

Tablica 27 – Zabilježena krvarenja u skupini bolesnika na terapiji varfarinom, klasificirana prema Fihnu

		broj bolesnika	broj krvarenja
neznatna		27	47
značajna	ozbiljna	11	12
	po život opasna	1	1
	smrtonosna	0	0

Napravljena je analiza povezanosti polimorfizama *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9* gena s brojem bolesnika u kojih se razvilo krvarenje bilo koje vrste te sa stopama incidencije krvarenja, a rezultati se nalazi u Tablicama 28 i 29.

Naknadnom analizom ispitana je međusobna razlika u povezanost genotipova za ispitivani polimorfizam *CYP4F2* s krvarenjima: heterozigoti imaju veće izglede za nastanak krvarenja (OR 2,36, 95 % CI 1,05 - 5,31, P = 0,037) u odnosu na homozigote wt, dok homozigoti varijantnog alela nisu pokazali statistički značajnu razliku (OR 2,65, 95 % CI 0,85 - 8,28, P = 0,094) u nastanku krvarenja u odnosu na homozigote wt, kao ni u odnosu na heterozigote (OR 1,12, 95 % CI 0,39 - 3,18, P = 0,831).

Daljnjom analizom ispitana je povezanost polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9* s pojavom krvarenja i incidencijom krvarenja s obzirom na intenzitet, gdje su krvarenja klasificirana kao neznatna, odnosno ona koja ne zahtijevaju dodatne medicinske postupke, te kao značajna, odnosno ona koja zahtijevaju dodatne medicinske postupke i/ili preglede i mogu imati ozbiljne posljedice. Rezultati su prikazani u Tablicama 30 i 31.

Logističkom regresijskom analizom ispitana je povezanost polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9* s pojavom krvarenja. U inicijalnoj fazi, od ispitivanih polimorfizama, statistički značajnu povezanost (P = 0,002) pokazali su polimorfizmi *VKORC1* i *CYP4F2*. Pronađena je statistički značajna razlika u pojavi krvarenja između nositelja varijantnih alela i homozigota wt gena *VKORC1* (OR 2,89, 95 % CI 1,24 - 6,76) i *CYP4F2* (OR 2,64, 95 % CI 1,19 - 5,84). U naknadnoj analizi, korištenjem logističke regresije uspoređeni su homozigoti varijantnih alela i homozigoti wt gena *VKORC1* i *CYP4F2*. Dobivena je statistički značajna povezanost samo za polimorfizam *VKORC1* (OR 2,53, 95 % CI 1,09 - 5,85, P = 0,017).

Tablica 28 - Omjer izgleda za krvarenje: nositelji varijantnih alela u usporedbi s homozigotima wt

polimorfizmi gena	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	**2,65**	**1,15 - 6,12**	**0,023**
VKORC1 mut *vs.* wt	**7,40**	**2,46 - 22,24**	**<0,001**
CYP4F2 var *vs.* wt	**2,42**	**1,11 - 5,28**	**0,027**
CYP4F2 mut *vs.* wt	2,65	0,85 – 8,28	0,094
GGCX var *vs.* wt	0,35	0,08 - 1,56	0,169
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,88	0,38 - 2,03	0,771
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,58	0,39 - 6,37	0,517

OR – omjer izgleda; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * χ^2 test

Tablica 29 - Omjer stopa incidencije krvarenja: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	IRR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	1,64	0,88 - 3,23	0,102
VKORC1 mut *vs.* wt	**2,91**	**1,31 – 6,50**	**0,002**
CYP4F2 var *vs.* wt	**2,39**	**1,25 - 4,93**	**0,005**
CYP4F2 mut *vs.* wt	1,81	0,64 – 4,81	0,188
GGCX var *vs.* wt	0,52	0,14 - 1,40	0,193
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,86	0,44 - 1,59	0,623
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,46	0,38 - 4,04	0,465

IRR – omjer stopa incidencije; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut –homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * IRR

Tablica 30 - Omjer izgleda za krvarenja prema intenzitetu (neznatno i značajno krvarenje): nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	krvarenje	OR	95 % CI	P
VKORC1 var *vs.* wt	neznatno	2,39	0,92 - 6,24	0,075
	značajno	3,42	0,73 - 16,10	0,120
VKORC1 mut *vs.* wt	neznatno	**6,91**	**2,00 - 23,85**	**0,002**
	značajno	**8,89**	**1,35 - 58,42**	**0,023**
CYP4F2 var *vs.* wt	neznatno	**2,92**	**1,12 - 7,60**	**0,028**
	značajno	1,67	0,48 - 5,75	0,419
CYP4F2 mut *vs.* wt	neznatno	**4,41**	**1,27 – 15,37**	**0,020**
	značajno†	-	-	-
GGCX var *vs.* wt	neznatno	0,25	0,03 - 1,94	0,184
	značajno	0,59	0,07 - 4,80	0,623
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	neznatno	0,59	0,23 - 1,53	0,276
	značajno	0,29	0,08 - 1,02	0,054
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	neznatno	1,21	0,24 - 6,14	0,821
	značajno	0,60	0,07 - 5,11	0,643

OR – omjer izgleda; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut –homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * χ^2 test; † nije zabilježeno značajno krvarenje u homozigota *CYP4F2*3*

Tablica 31 - Omjer stopa incidencije krvarenja prema intenzitetu (neznatno i značajno krvarenje): nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	krvarenje	IRR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	neznatno	1,45	0,74 - 3,08	0,260
	značajno	2,74	0,60 - 25,47	0,171
VKORC1 mut *vs.* wt	neznatno	**2,49**	**1,01 - 6,16**	**0,024**
	značajno	5,43	0,78 - 60,00	0,028
CYP4F2 var *vs.* wt	neznatno	**2,91**	**1,34 - 7,20**	**0,004**
	značajno	1,34	0,37 - 5,96	0,623
CYP4F2 mut *vs.* wt	neznatno	2,71	0,89 - 8,29	0,038
	značajno†	-	-	-
GGCX var *vs.* wt	neznatno	0,49	0,10 - 1,54	0,226
	značajno	0,60	0,01 - 4,07	0,622
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	neznatno	0,88	0,41 - 1,76	0,715
	značajno	0,79	0,14 - 3,15	0,717
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	neznatno	1,41	0,28 - 4,49	0,571
	značajno	1,67	0,04 - 12,03	0,624

IRR – omjer stopa incidencije; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut –homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * IRR † nije zabilježeno značajno krvarenje u homozigota *CYP4F2*3*

Analizom vremena do prvog slučaja krvarenja log-rank testom dobivene su vrijednosti prikazane u Tablici 32.

Tablica 32 - Omjeri ugroženosti za krvarenja: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	HR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	1,17	0,56 - 2,46	0,687
VKORC1 mut *vs.* wt	1,09	0,43 - 2,76	0,843
CYP4F2 var *vs.* wt	1,11	0,55 - 2,47	0,761
CYP4F2 mut *vs.* wt	1,37	0,47 - 3,97	0,520
GGCX var *vs.* wt	0,43	0,16 - 1,15	0,150
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	1,94	0,77 - 4,88	0,070
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt	1,69	0,38 - 7,50	0,374

HR – omjer ugroženosti; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut – homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * log-rank test

4.2.4.3. TERAPIJA NUSPOJAVA LIJEČENJA VARFARINOM

Tijekom praćenja skupine bolesnika na antikoagulacijskoj terapiji varfarinom zabilježeno je ukupno 14 terapijskih postupaka uslijed nuspojava nastalih tijekom liječenja varfarinom kod 8 bolesnika za ukupno 359,85 bolesnik-godina (ukupno trajanje praćenja svih bolesnika), što daje stopu incidencije od 3,89 terapijska postupka / 100 bolesnik-godina. Bolesnici su dobili sljedeću vrstu terapije: devet puta je primijenjen vitamin K, dva puta je dana transfuzija krvi, a tri puta preparat svježe smrznute plazme.

Omjeri izgleda za primjenu terapijskog postupka za neželjenu nuspojavu između nositelja varijantnih alela i homozigota wt polimorfizama gena *VKORC1*, *CYP4F2*, *GGCX* i *CYP2C9* prikazani se u Tablici 33.

Omjeri stopa incidencije za primjenu terapijskog postupka između nositelja varijantnih alela u odnosu na homozigote wt prikazani su Tablici 34.

Tablica 33 - Omjer izgleda za primjenu terapije nuspojava liječenja varfarinom: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	OR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	0,97	0,22 - 4,17	0,965
CYP4F2 var *vs.* wt	1,20	0,28 - 5,16	0,808
GGCX var *vs.* wt	1,07	0,13 - 9,13	0,948
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,37	0,04 - 3,13	0,365
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt†	-	-	-

OR – omjer izgleda; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut –homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * χ^2 test; † nije bilo terapijskih postupaka

Tablica 34 - Omjer stopa incidencije primjena terapije za nuspojave liječenja varfarinom: nositelji varijantnih alela u odnosu na homozigote wt

polimorfizmi gena	IRR	95 % CI	P*
VKORC1 var *vs.* wt	0,90	0,27 - 3,41	0,847
CYP4F2 var *vs.* wt	1,49	0,43 - 6,51	0,496
GGCX var *vs.* wt	1,20	0,13 - 5,41	0,808
CYP2C9 heterozigoti (*1*2 i *1*3) *vs.* wt	0,39	0,04 - 1,76	0,205
CYP2C9 mut (*2*2, *2*3, *3*3) *vs.* wt†	-	-	-

IRR – omjer stopa incidencije; 95 % CI – 95 % interval pouzdanosti; P – razina značajnosti; wt – homozigoti alela divljeg tipa; var – nositelji varijantnog alela; mut –homozigoti varijantnog alela; *vs.* – u usporedbi s; * IRR; † nije bilo terapijskih postupaka

5. RASPRAVA

Varfarin je još uvijek u svijetu najčešće korišteni oralni antikoagulans u terapiji tromboembolijskih stanja različite etiologije. Iako su se zadnjih godina na tržištu pojavili neki novi lijekovi za oralnu antikoagulacijsku terapiju s naizgled puno boljim svojstvima od varfarina, on je još uvijek lijek izbora u mnogim zemljama, pa tako i u Hrvatskoj. Neki od najvažnijih razloga su cijena, relativno jednostavna i poznata primjena, dobro poznati nedostatci i nuspojave te lako dostupna i primjenjiva sredstva za terapiju nuspojava i prekomjernog doziranja. Značajna prepreka široj uporabi su određene značajke terapije varfarinom, koje uvođenje i održavanje stabilne terapije čine zahtjevnim, i za bolesnika i za kliničara. Jedna od njih je uzak terapijski raspon varfarina (obično između 2 i 3 jedinice INR-a), pri čemu kod vrijednosti ispod terapijskog raspona postoji povećani rizik od tromboze, dok kod vrijednosti iznad terapijskog raspona postoji opasnost od krvarenja. Nadalje, važna značajka terapije varfarinom je velika interindividualna i intraindividualna varijabilnost u terapijskoj dozi. Doza varfarina može unutar iste populacije varirati i nekoliko desetaka puta, što uvođenje terapije i određivanje početne doze, kao i održavanje stabilne terapije, čini vrlo zahtjevnim. Brojni čimbenici, kao što su interakcije lijekova, određene bolesti (prvenstveno jetre i bubrega), unos vitamina K te neke životne navike (pušenje, konzumacija alkohola, fizička aktivnost) mogu utjecati na stabilnu dozu varfarina. Najveći utjecaj od svih čimbenika na dozu varfarina pokazali su genski čimbenici, odnosno polimorfizmi određenih gena, prvenstveno *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* i *GGCX*. Kombinirani utjecaj svih tih čimbenika može rezultirati velikim varijacijama u stabilnoj dozi.

Osnovna pretpostavka šire i sigurnije primjene varfarina su bolje spoznaje o čimbenicima koji utječu na varijabilnost doze, čime bi se terapija mogla bolje prilagoditi bolesniku. Takav pristup bi u konačnici doveo do bržeg i lakšeg postizanja stabilne terapije, uz manji broj nuspojava.

5.1. GENOTIPIZACIJA

Genotipizacijom su određene učestalosti alela polimorfizama gena *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* i *GGCX* u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom, dok je u populaciji zdravih ispitanika određena učestalost alela polimorfizama gena *VKORC1*.

Nisu pronađena odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže niti kod jednog polimorfizma u istraživanju.

Posebno je određena učestalost alela za polimorfizme *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) i *VKORC1* 1173C>T (rs9934438) u zdravoj populaciji budući da su istraživanja povezanosti unutar genoma potvrdila najveći učinak polimorfizama *VKORC1* na terapiju varfarinom (51, 52). U vrijeme započinjanja istraživanja u populaciji Hrvatske još nije bila napravljena analiza učestalosti alela polimorfizama gena *VKORC1*, stoga je jedan od ciljeva istraživanja bio utvrditi postoji li statistički značajna razlika u odnosu na učestalosti ovih alela u drugim europskim populacijama. Utvrđeno je da nema statistički značajne razlike u učestalosti alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i *VKORC1* 1173C>T između populacije Hrvatske i drugih europskih populacija (Tablica 35) (83).

Tablica 35 - Učestalosti varijantnih alela *VKORC1* u nekim europskim populacijama

populacija	broj ispitanika	frekvencija varijantnog alela	P*
hrvatska	420	40,7	-
austrijska	206	43,0	0,605
danska	244	41,8	0,806
engleska	297	47,3	0,080
francuska	200	41,5	0,862
grčka	98	48,5	0,175
mađarska	510	39,0	0,638
nizozemska	1525	39,3	0,329
norveška	212	36,6	0,344
njemačka	115	41,3	0,915
rumunjska	332	42,2	0,710
slovenska	165	43,3	0,577
španjolska	175	41,4	0,927
talijanska	147	39,8	0,922
turska	292	40,4	0,938

P – razina značajnosti; * χ^2 test

5.2. STABILNA DOZA ODRŽAVANJA VARFARINA

Kao što je vidljivo iz slike 4-1, raspon stabilne doze varfarina u populaciji bolesnika je bio vrlo širok. Najveći dio bolesnika (66,2 %) je u skupini sa srednjom dozom varfarina, ali značajan dio bolesnika imao je višu (20,1 %) ili nižu (13,7 %) stabilnu dozu varfarina. S obzirom na uski terapijski raspon varfarina i vrlo veliku varijabilnost u stabilnoj dozi, jasna je potreba za ispitivanjem povezanosti različitih čimbenika sa stabilnom dozom radi boljeg prilagođavanja terapije bolesniku. U sklopu ovog istraživanja ispitana je povezanost različitih čimbenika sa stabilnom dozom varfarina.

Povezanost dobi i spola bolesnika sa stabilnom dozom varfarina ispitivana je i u drugim istraživanjima. Garcia i suradnici su u retrospektivnom istraživanju ispitivali povezanost

stabilne doze varfarina na 12202 bolesnika na stabilnoj terapiji varfarinom, te su utvrdili statistički značajnu povezanost dobi i spola s dozom varfarina (134). Povezanost je potvrđena i višestrukom linearnom regresijom gdje je uzet u obzir i mogući utjecaj nekih drugih čimbenika, kao što su npr. popratne bolesti ili interakcije lijekova. Procijenjeni utjecaj dobi na stabilnu dozu varfarina u tom istraživanju bio je smanjenje tjedne doze varfarina za 0,4 mg za svaku godinu života bolesnika. U istom istraživanju žene su imale 4,5 mg nižu tjednu dozu od muškaraca, neovisno o dobi i drugim čimbenicima. U istraživanju Gagea i suradnika utjecaj dobi na smanjenje doze varfarina iznosio je oko 7 % po dekadi (172). Inverzna povezanost dobi s dozom varfarina primijećena je i u istraživanjima Mazzaccara i suradnika (102), Khouryja i suradnika (173), velikom prospektivnom istraživanju Bourgeoisa i suradnika (173), randomizirnom kliničkom istraživanju Burmestera i suradnika (174) te u još nekim istraživanjima (165, 175). Povezanost stabilne doze sa spolom, odnosno niža doza lijeka kod ženskih bolesnika, dobivena je u istraživanjima Mazzaccara i Burmestera, ali ne i Khouryja i Bourgeoisa.

Slični rezultati dobiveni su i u ovom istraživanju: u univarijatnoj analizi dob je pokazala statistički značajnu (P = 0,011), ali praktički zanemarivu (r = -0,177) povezanost sa stabilnom dozom varfarina, dok je spol pokazao graničnu značajnost (P = 0,050). U multivarijatnoj analizi (MLR) dob bolesnika je zadržala statističku značajnost, odnosno ušla u RM1, iako s neznatnim učinkom (koeficijent -0,0059), dok u RM2 nije ušla.

Mehanizam povezanosti dobi sa stabilnom dozom nije do kraja razjašnjen. Neki od mogućih čimbenika koji bi mogli doprinijeti smanjenju doze kod starijih osoba su primjerice hipoalbuminemija (koja dovodi do smanjenog volumena distribucije varfarina), snižen unos vitamina K (iako je u ovom istraživanju taj čimbenik bio uključen u multivarijatnu analizu) i snižena apsorpcija vitamina K, te smanjeni jetreni metabolizam lijekova (27, 134).

Mehanizam povezanosti spola sa stabilnom dozom varfarina, odnosno smanjene doze kod ženskih bolesnika, bi se dijelom mogao objasniti razlikom u tjelesnoj površini, odnosno razlikama u metaboličkom potencijalu lijekova u jetri koji bi prema nekim istraživanjima mogao biti reguliran i spolnim hormonima (134).

Težina i visina bolesnika, kao i vrijednosti izvedene iz njih poput indeksa tjelesne mase (BMI) i tjelesne površine (BSA), su neki od čimbenika za koje je u prijašnjim istraživanjima također primijećena povezanost sa stabilnom dozom varfarina (63, 172, 176-180). U istraživanju objavljenom od strane Međunarodnog konzorcija za farmakogenetiku varfarina (IWPC, engl. *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*) primijećena je povezanost stabilne

doze s visinom i težinom (177). U istraživanju Perinija i suradnika pronađena je povezanost doze s težinom (179). U istraživanju Wellsa primijećena je povezanost doze s BMI-om (180). Povezanost doze s BSA-om primijećena je u najvećem broju istraživanja: u istraživanju Gagea i suradnika (172) učinak BSA na povećanje doze varfarina iznosio je oko 11 %, a u istraživanju Lenzinija i suradnika (178) oko 7 % po 0,25 m^2 tjelesne površine. Statistički značajna povezanost zabilježena je i u istraživanjima Hermana i suradnika (176), Jonasa i suradnika (181) te Zambona i suradnika (63).

U ovom istraživanju u univarijatnoj analizi primijećena je statistički značajna (iako praktički zanemarivog faktora korelacije rho) povezanost s dozom varfarina za težinu ($P = 0,020$), visinu ($P < 0,001$) i BSA ($P = 0,003$), dok za BMI nije primijećena povezanost s dozom ($P = 0,896$). U multivarijatnoj analizi (MLR), statističku značajnost zadržao je samo BSA (RM1 $P = 0,038$; RM2 $P < 0,001$).

Težina, visina, BMI i BSA se mogu koristiti u procjeni metaboličke mase, odnosno metaboličkog potencijala u terapiji lijekovima. BSA se najčešće koristi u klinici kao mjera volumena jetre, odnosno jetrene metaboličke sposobnosti. Veći BSA bi trebao biti povezan s većim jetrenim metabolizmom varfarina, tako da bi stoga bolesnici s većim BSA-om trebali i veću dozu lijeka.

Povezanost doze varfarina s BSA-om pruža moguće objašnjenje razloga zbog čega spol nije pokazao statistički značajnu povezanost u multivarijatnoj analizi. Žene su u prosjeku fizički manje od muškaraca, imaju manji BSA te shodno tome i manji volumen jetre i sniženi jetreni metabolizam lijeka u odnosu na muškarce. Upravo bi to mogao biti razlog zbog čega spol u kasnijoj multivarijatnoj analizi nije pokazao statističku značajnost, dok je BSA zadržao statističku značajnost. Gubitak statistički značajne povezanosti visine i težine u multivarijatnoj analizi nije toliko iznenađujući, budući da BSA puno bolje korelira s metaboličkim kapacitetom jetre (posebice u bolesnika s visokim BMI-om koji predstavljaju značajni dio ispitivane populacije bolesnika) nego visina ili težina bolesnika.

Povezanost indikacije za terapiju varfarinom sa stabilnom dozom varfarina primijećena je u nekoliko istraživanja (42, 179, 182-184). Posebno vrijedi istaći primijećenu povezanost dijagnoze duboke venske tromboze (DVT) kao indikacije za primjenu varfarina s dozom varfarina u smislu da su bolesnici u nekim istraživanjima imali znatno višu dozu varfarina u odnosu na druge indikacije za terapiju. U istraživanjima Gagea i suradnika (172) te Obayashija i suradnika (183) utjecaj DVT-a na dozu varfarina iznosio je oko 7 %.

U ovom istraživanju, u univarijatnoj analizi indikacija za terapiju varfarinom je također pokazala statističku značajnost (P = 0,003). U naknadnoj analizi, DVT kao indikacija za primjenu varfarina je pokazala statistički još veću povezanost s dozom varfarina u odnosu na ostale indikacije (P = 0,001). Konačno, u multivarijatnoj analizi (MLR), indikacija za terapiju i DVT kao zasebna varijabla nisu pokazali statistički značajnu povezanost s dozom, odnosno nisu ušli u konačni regresijski model.

Jedan od mogućih razloga zbog čega bolesnici s DVT-om imaju potrebe za višim dozama varfarina u odnosu na druge indikacije za terapiju je činjenica da su bolesnici s dijagnozom DVT-a u prosjeku mlađi od bolesnika s ostalim indikacijama (182). Analizom povezanosti dobi bolesnika s indikacijom za terapiju među bolesnicima u istraživanju dobivena je statistički značajna povezanost DVT-a kao indikacije za terapiju s dobi (medijan dobi za bolesnike s DVT je 51,5 godina, a za bolesnike s ostalim indikacijama 62 godine; P < 0,001, podatci nisu prikazani). Upravo ta činjenica bi mogla biti razlog zbog čega indikacija i DVT kao zasebne varijable nisu zadržali značajnost i u multivarijatnoj analizi (MLR), a dob bolesnika je zadržala statističku značajnost, odnosno ušla u RM1, iako s neznatnim učinkom (koeficijent -0,0059), dok u RM2 nije ušla.

Utjecaj lijekova na dozu varfarina je dobro poznat i dokumentiran, a interakcije lijekova su prepoznate kao važan čimbenik povezanosti s dozom u više istraživanja (77, 172, 177-180, 185-187). Utjecaj drugih lijekova koje bolesnik uzima na dozu varfarina može se ispoljiti kao smanjenje doze (zbog lijekova koji inhibiraju CYP2C9 te time smanjuju klirens varfarina) ili kao povećanje doze (zbog lijekova koji induciraju CYP2C9 te time povećavaju klirens varfarina). Lijekovi za koje je primijećen utjecaj na dozu u navedenim istraživanjima su amiodaron, azoli i statini (inhibitori CYP2C9), te karbamazepin, rifampicin i fenitoin (induktori CYP2C9). U istraživanju Gagea i suradnika (172), procijenjeni utjecaj amiodarona na smanjenje doze u bolesnika koji uzimaju varfarin je bio oko 22 %, dok je u istraživanju Lenzinija i suradnika (178) utjecaj amiodarona bio oko 12 %, a statina (fluvastatin) oko 17 %.

Bolesnici u istraživanju su od lijekova koji smanjuju stabilnu dozu varfarina uzimali amiodaron, lijekove iz skupine statina i lijekove iz skupine azola. Od lijekova koji povećavaju stabilnu dozu varfarina, bolesnici su uzimali samo karbamazepin. Rezultati univarijatne analize nisu pokazali povezanost s dozom varfarina (P = 0,075 za lijekove koji smanjuju klirens varfarina i P = 0,337 za lijekove koji povećavaju klirens varfarina). Nasuprot tome, u multivarijatnoj analizi (MLR) pronađena je povezanost sa stabilnom dozom varfarina u oba regresijska modela, i to s brojem

lijekova inhibitora (amiodaron, azoli i statini, RM1 P = 0,025; RM2 P = 0,001) ili induktora CYP2C9 (karbamazepin, RM1 P = 0,001; RM2 P = 0,007) koje bolesnik uzima.

Utjecaj lijekova na metabolizam varfarina, u smislu povišenja ili sniženja klirensa varfarina je već objašnjen u Uvodu. Ono što je zanimljivo za istaći je da je u regresijskim modelima koji su pokazala najveći R^2 u istraživanju pronađena povezanost doze varfarina s brojem lijekova koji induciraju i inhibiraju CYP2C9. Veći broj lijekova koji bolesnik istovremeno uzima s istim mehanizmom inhibicije ili indukcije trebao bi dati kumulativno veći učinak inhibicije ili indukcije enzima. Slični rezultati povezanosti doze s brojem lijekova induktora/inhibitora metabolizma varfarina u terapiji su zabilježeni i u istraživanjima Gagea i suradnika (132) te Wadelius i suradnika (77).

Povezanost pušenja s dozom varfarina vjerojatno je uzrokovano indukcijom jetrenih enzima, što za posljedicu ima povišen klirens varfarina i potrebu za većom dozom lijeka. U istraživanjima Gagea (172) i suradnika, Wua i suradnika (187), te Cini i suradnika (188) pušenje je pokazalo značajnu povezanost s dozom varfarina, a u istraživanju Bourgeoisa i suradnika pušenje je pokazalo povezanost s dozom ne samo u smislu statusa (pušač/nepušač), nego je doza varfarina pokazala statistički značajnu povezanost i s brojem cigareta koje bolesnik u prosjeku popuši dnevno (140). No, isto tako, u nekim drugim istraživanjima povezanosti pušenja s dozom varfarina nije pronađena (189, 190).

U istraživanju pušenje nije pokazalo statistički značajnu povezanost s dozom lijeka, niti u stratificiranom obliku (s obzirom na količinu dnevno popušenih cigareta), niti kao dihotomna varijabla (pušač/nepušač). Jedinu značajnu razliku u dozi je pokazala usporedba nepušača i osoba koji puše više od dvije kutije cigareta dnevno (P = 0,014, podatci nisu prikazani), ali broj tih bolesnika u istraživanju (n = 5), kao i u populaciji, je premalen da bi se mogao očekivati značajniji učinak na rezultate statističke obrade. U multivarijatnoj analizi (MLR) pušenje isto nije pokazalo povezanost s dozom varfarina, odnosno nije ušlo u konačni regresijski model.

Alkohol je još jedan induktor mikrosomalnih enzima jetre koji potencijalno može dovesti do povišenog klirensa varfarina i potrebe za većim dozama. Istraživanja utjecaja konzumacije alkohola na varfarin u zdravih dobrovoljaca su pokazala da konzumacija manjih količina alkohola nema statistički značajan utjecaj na dozu varfarina, ali kronični alkoholizam ipak može dovesti do povišenog klirensa varfarina (191). Većina istraživanja koja su konzumaciju alkohola uzimale kao moguću varijablu među čimbenicima utjecaja na dozu varfarina nisu dobili statistički značajnu povezanost. U istraživanju Bourgeoisa i suradnika u univarijatnoj

analizi kozumacija alkohola pokazala je statistički značajnu povezanost s dozom varfarina, no u multivarijatnoj analizi takva povezanost nije pronađena (140).

U ovom istraživanju, konzumacija alkohola je pokazala statistički značajnu povezanost s stabilnom dozom varfarina, i kao dihotomna varijabla (konzumira/ne konzumira alkohol, $P < 0,001$) ili stratificirano (Tablica 15) prema količini unesenog alkohola ($P = 0,004$). U naknadnoj multivarijatnoj analizi (MLR) povezanost nije potvrđena, odnosno alkohol kao varijabla nije ušla u konačni regresijski model.

Sam mehanizam mogućeg učinka alkohola na dozu varfarina nije do kraja objašnjen. Budući da alkohol prvenstveno inducira enzime CYP koji nemaju učinak na metabolizam varfarina, bilo bi očekivano da povezanosti s dozom niti ne bude. Kod kroničnog alkoholizma dolazi do indukcije jetrenih metaboličkih enzima, što može dovesti i do povišenog klirensa varfarina. Među bolesnicima nisu zabilježeni kronični alkoholičari (konzumacija više od dva pića dnevno), što je svakako jedan od razloga da u multivarijatnoj analizi alkohol ipak nije pokazao povezanost s dozom.

Povezanost razine fizičke aktivnosti bolesnika s dozom varfarina zabilježena je u nekoliko istraživanja (143, 180, 192). U istraživanju Shendre i suradnika fizički aktivniji bolesnici su imali oko 6,9 % veću dozu varfarina u odnosu na neaktivne bolesnike (192). U istraživanju Rouleau-Mailloux i suradnika na dvije velike populacije bolesnika na terapiji varfarinom fizička aktivnost je pokazala značajnu povezanost sa stabilnom dozom varfarina (143). U tom istraživanju varijabla fizičke aktivnosti je bila povezana s 5,4 odnosno 1,7 % varijacije u dozi varfarina u univarijatnoj analizi, te s 0,9 i 0,5 % u multivarijatnoj analizi.

Učinak povišene fizičke aktivnosti na dozu varfarina nije u potpunosti razjašnjen. Jedan od čimbenika koji moguće tome pridonose je indukcija mikrosomalnih jetrenih enzima koji metaboliziraju varfarin povišenom fizičkom aktivnošću, što je već pokazano u ispitivanjima na štakorima (143). Osim toga, moguć je i učinak povećane sinteze plazmatskih proteina koji vežu varfarin uslijed povišene fizičke aktivnosti, što može doprinijeti potrebama za većim dozama varfarina u terapiji (143).

U ovom istraživanju fizička aktivnost pokazala je statistički značajnu povezanost ($P = 0,005$) sa stabilnom dozom varfarina, i stratificirano prema učestalosti aktivnosti (Tablica 15) i kao dihotomna varijabla (slabo aktivan/aktivan, $P = 0,002$). Ta se povezanost pokazala i u multivarijatnoj analizi (MLR) u oba regresijska modela gdje je fizička aktivnost (kao dihotomna

varijabla) zadržala statističku značajnost (P = 0,003 u RM1 i P = 0,007 u RM2) u povezanosti s dozom varfarina (Tablica 19).

U stratificiranoj raspodjeli može se primijetiti da je medijan doze slabije aktivnih bolesnika (26,25 mg/tjedan) značajno različit (P = 0,001) od umjereno aktivnih bolesnika (36,00 mg/tjedan), ali nije značajno različit (P > 0,05) od bolesnika koji svakodnevno vježbaju (27,00 mg/tjedan). Vjerojatni uzrok tome je relativno mali broj takvih bolesnika (n = 9), te činjenica da su većina njih (osam od devet) nositelji varijantnih alela *VKORC1* koji pokazuju najveći učinak na dozu varfarina od svih ispitivanih varijabli, odnosno nositelji varijantnih alela imaju potrebe za puno manjim dozama varfarina. Nakon što su bolesnici podijeljeni na slabo aktivne i aktivne, učinak je bio jasno vidljiv i u univarijatnoj (P = 0,002) i u multivarijatnoj analizi (P = 0,003 u RM1 i P = 0,007 u RM2).

Zbog važnosti vitamina K za sintezu funkcionalnih koagulacijskih proteina, te zbog činjenice da su tjelesne zalihe vitamina K vrlo male, unos vitamina K u organizam potencijalno može imati vrlo veliki učinak na terapiju varfarinom. Doza varfarina dovoljna za terapijski učinak izravno bi trebala ovisiti o koncentraciji vitamina K u organizmu.

U istraživanjima utjecaja vitamina K na dozu varfarina u terapiji korištene su različite metode kao što su određivanje koncentracije vitamina K u krvi, određivanje nedovoljno karboksiliranog protrombina ili osteokalcina u krvi ili procjena unosa vitamina K prehranom putem upitnika (26). Svaka od tih metoda demonstrira dobre i loše strane. Određivanje koncentracije vitamina K pruža konkretan podatak o trenutnoj koncentraciji vitamina K u krvi, ali osim što je metoda analitički i tehnički vrlo zahtjevna, povezanost koncentracije vitamina K u krvi s koncentracijom vitamina K u jetri nije još u potpunosti razjašnjena (193). Osim toga, određivanje koncentracije u krvi daje sliku statusa vitamina K u zadnja 24 sata, što ne znači toliko puno u praćenju odnosa s dozom tijekom terapije. Određivanje proteina koji u organizmu nastaju uslijed manjka vitamina K (nedovoljno karboksilirani protrombin ili osteokalcin) daje informaciju o mogućem manjku vitamina K u nedavnom razdoblju (nekoliko dana), ali ne daje nekakvu prosječnu sliku statusa vitamina K u dužem razdoblju terapije niti druge podatke osim izraženog nedostatka vitamina K. Procjena statusa vitamina K, odnosno unosa vitamina K hranom pomoću upitnika, iako ima svoje nedostatke, predstavlja možda najjednostavniji način određivanja uloge vitamina K u terapiji varfarinom. Iako ne daje konkretne podatke o količini raspoloživog vitamina K u organizmu, praćenjem prosječnog unosa vitamina K putem hrane može se doći do podatka o dostatnosti i ravnomjernosti unosa vitamina K bez dodatnih troškova ili neugodnosti za bolesnika.

Custodio das Dores i suradnici su u svojem istraživanju usporedili određivanje statusa vitamina K mjerenjem koncentracije u krvi i pomoću upitnika o unosu vitamina K hranom (194). Prosječan unos vitamina K hranom (ali ne i koncentracija u krvi) je pokazao statistički značajnu povezanost (pozitivna korelacija) s dozom varfarina. Slične rezultate povezanosti unosa vitamina K hranom s dozom varfarina dobili su i You i suradnici (195) te Cini i suradnici (188) u svojim istraživanjima. Nasuprot tome, Khan i suradnici (196), Gage i suradnici (132), Kabagambe i suradnici (197) te Saito i suradnici (198) nisu pronašli povezanost s dozom varfarina, a Rasmussen i suradnici su čak pronašli negativnu korelaciju unosa vitamina K sa stabilnom dozom varfarina (168).

U ovom istraživanju unos vitamina K hranom nije pokazao statistički značajnu povezanost sa stabilnom dozom varfarina (P = 0,135).

Manjak povezanosti unosa vitamina K s dozom varfarina u ovom i drugim istraživanjima bi se dijelom mogao objasniti činjenicom da, iako je poznata količina vitamina K u različitim oblicima namirnica, što je temeljni podatak na osnovu kojega se procjenjuje unos hranom, sama bioraspoloživost vitamina K u hrani nije toliko dobro ispitana. Dostupni podatci govore da apsorpcija vitamina K može varirati i nekoliko puta u ovisnosti o načinu pripreme te ostalim sastojcima obroka (19). Osim toga, sama povezanost između količine vitamina K unesenog hranom i količine vitamina K raspoloživog u jetri nije do kraja objašnjena. Konačno, moguće je da je učinak unosa vitamina K u varijabilnosti doze varfarina primijećen u prethodnim istraživanjima ustvari posljedica učinka genotipa *VKORC1* (198).

5.2.1. OVISNOST DOZE VARFARINA O GENOTIPU

Velika varijabilnost u dozi varfarina koja nije mogla biti objašnjena kliničkim i drugim ne-farmakogenetičkim čimbenicima, te potencijalna povezanost doze varfarina s različitim varijantama gena koji sudjeluju u različitim segmentima farmakoterapije omogućila je istraživačima da na primjeru varfarina ukažu na korisnosti farmakogenetike u praksi. Utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku (*CYP2C9*) i farmakodinamiku (*VKORC1*) lijeka, te na metabolizam ključnog kofaktora (*CYP4F2*) i enzima koji sudjeluje u sintezi funkcionalnih faktora zgrušavanja (*GGCX*) pružaju potencijalno velike mogućnosti objašnjenja varijabilnosti u učinku varfarina i potrebnoj dozi.

Jedan od prvih primjera povezanosti polimorfizama gena s dozom varfarina uočen je za gen *CYP2C9*. Najveći utjecaj u populaciji europskog podrijetla pokazali su polimorfizmi 430C>T (*CYP2C9*2*; rs1799853) i 1075A>C (*CYP2C9*3*; rs1057910) gena *CYP2C9*. Brojna

istraživanja pokazala su utjecaj tih polimorfizama na dozu varfarina (32, 77, 82, 199-206). U Uvodu je objašnjen mehanizam učinka: snižena aktivnost enzima CYP2C9 te posljedično smanjen klirens varfarina i potreba za manjom dozom kako bi se ostvario željeni antikoagulacijski učinak.

U ovom istraživanju određeni su navedeni polimorfizmi *CYP2C9* gena u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom. Učestalosti alela i genotipova su bile u skladu s očekivanim vrijednostima u populaciji europskog podrijetla (204), kao i s vrijednostima dobivenim u populaciji Hrvatske (207-209).

S obzirom na stabilnu dozu varfarina, dobivena je statistički značajna razlika u dozi varfarina između različitih genotipova za ispitivane polimorfizme *CYP2C9* gena (P = 0,004) (Slika 4-2). Još jača povezanost (P < 0,001) je dobivena usporedbom stabilnih doza varfarina između homozigota wt alela, heterozigota wt i varijantnog alela (*CYP2C9*1*2* ili *CYP2C9*1*3*) i homozigota varijantnih alela (*CYP2C9*2*2*, *CYP2C9*2*3* ili *CYP2C9*3*3*) gdje su razlike u dozi još uočljivije (Slika 4-3). S obzirom da su navedene mutacije povezane sa smanjenom aktivnošću enzima CYP2C9 te nižim dozama, dobiveni rezultati u skupini bolesnika su očekivani: najviši medijan stabilne doze varfarina imali su homozigoti wt alela, niži medijan su imali heterozigoti wt i alela *CYP2C9*2* ili *CYP2C9*3*, a najniži medijan stabilne doze varfarina homozigoti varijantnih alela (Tablica 17 i Slika 4-3). Dakle, bolesnici s oba očuvana alela su imali uobičajene doze, oni s jednim wt i jednim varijantnim alelom niže, a najniže doze su imali bolesnici s oba varijantna alela. Osobe s varijantnim alelom *CYP2C9*3* imaju nižu aktivnost enzima od osoba s varijantnim alelom *CYP2C9*2*, što je također vidljivo u raspodjeli doza među genotipovima (Slika 4-2). Osim u univarijatnoj analizi (Tablica 17), genotipovi polimorfizama *CYP2C9*2 i *3* su pokazali statističku značajnost i u multivarijatoj (MLR) analizi, kao zajednička varijabla za *CYP2C9* u RM1 (Tablica 19) i kao zasebni genotipovi koji su pokazali najveći utjecaj na dozu varfarina u RM2 (Tablica 20). Očekivano, u RM2 su u regresijski model ušli genotipovi koji imaju najizraženiji učinak: *CYP2C9*1*1* (homozigot wt) kao najdominantniji genotip, te *CYP2C9*2*3* i *CYP2C9*3*3* (heterozigoti varijantnih alela) kao genotipovi s najvećim učinkom na dozu varfarina.

Slični rezultati su dobiveni i u drugim istraživanjima na populaciji europskog podrijetla (77, 82, 199-206) gdje je prisutnost alela *CYP2C9*2* ili *CYP2C9*3* u pravilu bila povezana s nižim stabilnim dozama varfarina u bolesnika. Stoga je zaključak ovog i drugih istraživanja da mutacije 430C>T (*CYP2C9*2*) i 1075A>C (*CYP2C9*3*) u CYP2C9 genu pokazuju vrlo značajan učinak na stabilnu dozu održavanja varfarina.

Gen *VKORC1* otkriven je 2004. godine u istraživanju koje je proučavalo rezistenciju na varfarin (67). Ubrzo nakon otkrića gena *VKORC1* postalo je jasno da bi polimorfizmi tog gena mogli imati značajan utjecaj na terapiju varfarinom, što se u kasnijim istraživanjima pokazalo točnim. Najveći utjecaj na dozu u populaciji europskog podrijetla pokazali su polimorfizmi *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) i 1173C>T (rs9934438) (51, 52, 62). Utjecaj tih polimorfizama na terapijsku dozu varfarina očituje se kao snižena doza održavanja varfarina u nositelja varijantnih alela u odnosu na nositelje wt alela.

U ovom istraživanju određivani su polimorfizmi *VKORC1* -1639G>A (rs9923231) i 1173C>T (rs9934438) u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom, ali i u zdravoj populaciji. Cilj određivanja u zdravoj populaciji je bio odrediti učestalost alela u reprezentativnom uzorku populacije Hrvatske radi usporedbe s postojećim podatcima u drugim populacijama, a što u vrijeme započinjanja istraživanja još nije bilo napravljeno.

Rezultati određivanja učestalosti alela *VKORC1* u 420 zdravih ispitanika pokazuju da je učestalost varijantnih alela u ispitivanoj populaciji (40,7 %) istovjetna učestalosti u drugim europskim populacijama (Tablica 35) (83). Isti rezultati su dobiveni i u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom (učestalost varijantnih alela 39,7 %). Kod svih ispitanika su dobiveni identični rezultati za alele polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T, odnosno polimorfizmi su u potpunoj veznoj neravnoteži, što je u skladu s rezultatima dobivenim u drugim istraživanjima (71, 79-82, 84, 210). S obzirom na dobivene rezultate može se zaključiti da su u populaciji Hrvatske polimorfizmi *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T u kliničkom smislu redundantni i da nema smisla određivati oba, nego je dovoljno određivati samo jedan od njih, budući da su u populaciji Hrvatske u savršenoj veznoj neravnoteži.

S obzirom na stabilnu dozu varfarina, dobivena je statistički značajna razlika ($P < 0,001$) u dozi varfarina između različitih genotipova za ispitivane polimorfizme *VKORC1* (Slika 4-4), kao i između nositelja varijantnih alela i homozigota wt ($P < 0,001$) (Slika 4-5). Budući da je prisutnost varijantnih alela povezana s nižom dozom varfarina, dobiveni rezultati su očekivani: najvišu dozu su imali homozigoti wt alela (medijan 42,00 mg/tjedan), heterozigoti su imali nižu dozu (medijan 33,00 mg/tjedan) a najnižu dozu su trebali homozigoti varijantnih alela (medijan 21,00 mg /tjedan), što je vidljivo na Slici 4-4. Isti rezultati (Slika 4-5) su dobiveni i u usporedbi nositelja varijantnih alela (medijan doze 30,00 mg/tjedan) i homozigota wt (medijan doze 42,00 mg/tjedan) (Tablica 17). Povezanost stabilne doze varfarina s polimorfizmima *VKORC1* je potvrđena i u multivarijatnoj (MLR) analizi ($P < 0,001$ za RM1 i RM2) (Tablice 19 i 20). U RM2 gdje su genotipovi *VKORC1* polimorfizama pokazali pojedinačni učinak na dozu,

heterozigoti i homozigoti varijantnog alela su očekivano pokazali najjači učinak na dozu varfarina (Tablica 20).

Slični rezultati povezanosti stabilne doze varfarina s polimorfizmima *VKORC1 -1639G>A* i *1173C>T* dobiveni su i u drugim istraživanjima (81, 164, 176, 200, 211, 212). Prisutnost varijantnog alela *VKORC1* je bila povezana s nižim stabilnim dozama u bolesnika na terapiji varfarinom. Zajednički zaključak ranije navedenih, pa tako i ovog istraživanja, je da su polimorfizmi *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T snažno povezani sa stabilnom dozom varfarina, a njihov utjecaj na dozu je najveći od svih dosada ispitivanih genskih i kliničkih čimbenika terapije.

Utjecaj polimorfizama gena *CYP4F2* na stabilnu dozu varfarina ispitivan je zbog utjecaja na dostupnu količinu vitamina K u organizmu, koja je izravno povezana s antikoagulacijskim učinkom varfarina. Najviše proučavani polimorfizam je *CYP4F2*3* (rs2108622). Povezanost navedenog polimorfizma sa stabilnom dozom varfarina zabilježena je u nekim istraživanjima (97, 102, 103, 140, 210), ali isto tako u drugim istraživanjima ta povezanost nije pronađena (115, 213). Uz to, u nekim istraživanjima u univarijatnoj analizi nije pronađena povezanost, a u multivarijatnoj je pronađena (122, 214, 215).

Učestalost varijantnog alela *CYP4F2*3* (Tablice 11 i 12) u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom je bila u skladu s podatcima drugih istraživanja provedenim na populaciji europskog podrijetla (97-99, 102, 103, 122, 210, 214, 215). U populaciji Hrvatske još nije napravljeno određivanje učestalosti polimorfizama gena *CYP4F2*, tako da su rezultati ovog istraživanja prvi koji potvrđuju da su učestalosti alela u populaciji Hrvatske u skladu s učestalosti alela u populacijama europskog podrijetla.

U univarijatnoj analizi nije pronađena povezanost stabilne doze varfarina s genotipovima ispitivanog polimorfizma *CYP4F2* (P = 0,767). Isto tako, u usporedbi stabilne doze varfarina između homozigota wt i nositelja varijantnog alela *CYP4F2*3* (Tablica 17) nije pronađena statistički značajna povezanost (P = 0,598). U naknadnoj analizi uspoređene su vrijednosti stabilne doze varfarina između homozigota wt i homozigota varijantnog alela *CYP4F2*3* gdje su očekivane veće razlike u dozi. Iako se činilo da postoji razlika u dozi (medijan doze homozigota wt je bio 33,00, a medijan doze homozigota varijantnog alela 37,50 mg/tjedan), nije dobivena statistički značajna povezanost (P = 0,480, podatci nisu prikazani).

U multivarijatnoj analizi (MLR) polimorfizam *CYP4F2*3* je pokazao statistički značajnu povezanost s dozom varfarina i u RM1 kao kategorička varijabla (Tablica 19) i u RM2 kao

binarna varijabla (Tablica 20), ali samo za *CYP4F2*3*3* (homozigot varijantnog alela), što je očekivano jer on pokazuje najveći utjecaj na dozu varfarina.

Pretpostavljeni mehanizam učinka na dozu kod nositelja alela *CYP4F2*3* je jednostavan: enzim CYP4F2 je oksidaza vitamina K i djeluje na smanjenje koncentracije vitamina K u organizmu. Nositelji varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju slabiju aktivnost tog enzima i veću koncentraciju vitamina K, što posljedično dovodi do potrebe za višim dozama varfarina da bi se ostvario antikoagulacijski učinak.

U istraživanju Wypaseka i suradnika dobivena je statistički značajna razlika u stabilnoj dozi varfarina između genotipova *CYP4F2*, kao i između nositelja alela *CYP4F2*3* i homozigota wt (97). Shendre i suradnici su u svom istraživanju na populaciji amerikanaca europskog podrijetla pronašli statistički značajnu povezanost sa stabilnom dozom varfarina između homozigota *CYP4F2*3* i homozigota wt, ali ne i između heterozigota i homozigota wt (216).

Rezultati slični onima dobivenim u ovom istraživanju dobiveni su i u istraživanjima Pautasa i suradnika (215), Perinija i suradnika (214) te Zhanga i suradnika (122). U svojim istraživanjima oni također u univarijatnoj analizi nisu dobili statistički značajnu povezanost s dozom varfarina, a u multivarijatnoj analizi, gdje su bili uključeni i drugi geni i klinički čimbenici, su dobili statistički značajnu povezanost s dozom varfarina.

Moguće objašnjenje dobivenih rezultata je da u univarijatnoj analizi povezanost varijantnih alela *CYP4F2*3* nije mogla doći do izražaja zbog puno snažnijih učinaka polimorfizama drugih gena (*VKORC1* i *CYP2C9*). Kao što je poznato, varijantni aleli gena *VKORC1* i *CYP2C9* pokazuju puno jaču povezanost s dozom varfarina od *CYP4F2*. Primjerice, u ovom istraživanju koeficijent varijable u RM2 za homozigot varijantnog alela *VKORC1* je iznosio -0,8231, a za *CYP2C9*3*3* -0,6498, što su daleko veće vrijednosti nego za genotip *CYP4F2*3*3* (koeficinet varijable 0,2184). Pretpostavka je da je u univarijatnoj analizi predominantni učinak gena *VKORC1* i *CYP2C9* prikrio postojeću, puno manju, povezanost polimorfizma *CYP4F2* sa stabilnom dozom varfarina. U multivarijatnoj analizi, gdje su se pojedinačni učinci drugih varijabli mogli odijeliti, učinak polimorfizma *CYP4F2* je bilo moguće detektirati.

Gen *GGCX* kodira γ-glutamil-karboksilazu, ključan enzim za sintezu funkcionalnih faktora zgrušavanja, zbog čega se smatra da bi potencijalno mogao imati učinak na antikoagulacijsku terapiju varfarinom. U smislu povezanosti s varfarinskom terapijom najviše je proučavan polimorfizam 12970C>G (rs11676382) *GGCX*.

Manji broj istraživanja je proučavao povezanost navedenog polimorfizma sa stabilnom dozom varfarina u populaciji europskog podrijetla (97, 112-115, 217). Rezultati su dosta oprečni. King i suradnici su dobili jasnu povezanost (P = 0,03) polimorfizma *GGCX* 12970C>G sa stabilnom dozom varfarina i prema njihovim rezultatima svaki varijantni alel je bio povezan sa sniženjem doze od 6,1 % (112). Rieder i suradnici su u svojem istraživanju u univarijatnoj analizi pronašli graničnu povezanost (P = 0,06), a u multivarijatnoj analizi statistički značajnu povezanost (P = 0,04) s dozom varfarina u nositelja varijantnog alela (114). Wypasek i suradnici nisu pronašli povezanost između stabilne doze varfarina i genotipova *GGCX* 12970C>G, ali su primijetili da nositelji varijantnog alela 12970G imaju potrebu za nižim dozama varfarina (35,0 mg/tjedan) u odnosu na homozigote 12970C (45,5 mg/tjedan, P = 0,03) (97). Nasuprot tome, u istraživanjima Lubitza i suradnika (115), Schellemana i suradnika (113) te Ramireza i suradnika (217) nije pronađena nikakva statistički značajna povezanost polimorfizma *GGCX* 12970C>G sa stabilnom dozom varfarina.

Učestalost varijantnog alela 12970G u ispitivanoj populaciji bolesnika na terapiji varfarinom (Tablica 13) je relativno niska (5,9 %) i ti rezultati su u skladu s rezultatima učestalosti varijantnog alela u populacijama europskog podrijetla (MAF 3,5 – 11 %) (97, 112-115). S obzirom na raspodjelu alela prema genotipovima (Tablica 14), u ispitivanoj populaciji bolesnika nije pronađen niti jedan homozigot varijantnog alela, ali ta činjenica s obzirom na relativno nisku učestalost varijantnog alela i relativno malen broj ispitanika i ne bi trebala biti previše neočekivana. Prema trenutnim spoznajama, ovo je prvo istraživanje koje je određivalo učestalost alela *GGCX* 12970G u populaciji Hrvatske, a dobiveni rezultati pokazuju da se značajno ne razlikuje od učestalosti tih alela u drugim populacijama europskog podrijetla.

Nije pronađena statistički značajna povezanost između stabilne doze varfarina i polimorfizma *GGCX* 12970C>G, niti u univarijatnoj analizi (P = 0,902) niti u multivarijatnoj analizi (MLR), gdje polimorfizam *GGCX* 12970C>G nije ušao u konačni regresijski model. To je u skladu s rezultatima istraživanja Lubitza (115), Schellemana (113) i Ramireza (217) koji isto tako nisu pronašli povezanost s dozom varfarina. Pretpostavka je da je mogući učinak polimorfizma *GGCX* 12970C>G na stabilnu dozu varfarina, jednako kao i učestalost varijantnog alela, premalen da bi se mogao uočiti (osim možda u vrlo velikim populacijama ispitanika) ili predstavljati značajan čimbenik u terapiji. Čak i u istraživanjima koja su pronašla povezanost s dozom, taj učinak je bio neznatan i uočljiv tek u multivarijatnoj analizi (Rieder i suradnici) ili u usporedbi nositelja varijantnih alela s homozigotima wt (Wypasek i suradnici), gdje je učinak pojačan u odnosu na povezanost genotipova s dozom (97, 114). Istraživanje King i suradnika

(112) do danas je jedino koje je pronašlo nedvosmislenu povezanost polimorfizma *GGCX* 12970C>G sa stabilnom dozom varfarina u populaciji europskoj podrijetla, ali je provedeno na relativno velikom broju ispitanika (n = 772). Kao potvrda da ni veliki broj ispitanika ne mora biti ključan za nalaženje povezanosti može poslužiti i istraživanje Ramirez i suradnika (217) na 1022 ispitanika europskog podrijetla koje nije pronašlo povezanost polimorfizma *GGCX* 12970C>G sa stabilnom dozom varfarina.

5.2.2. FENOTIP DOZE U OVISNOSTI O GENOTIPU

Kod određivanja doze varfarina, za bolesnika je najvažnije kojem fenotipu (jasno izraženoj kliničkoj karakteristici) metabolizma varfarina pripada, odnosno kojoj skupini prema veličini doze. Ukoliko pripada skupini srednje doze (odnosno zahtjevaju tjedna doza varfarina između 21 i 49 mg), tada se kod davanja uobičajenih fiksnih doza pri započinjanju terapije mogu očekivati najmanja odstupanja i prema tome najmanja mogućnost razvoja nuspojava kao što su prekomjerna antikoagulacija ili krvarenja. Kod bolesnika koji pripadaju skupini visoke doze (zahtjevaju doze više od 49 mg/tjedan) također postoji manja mogućnost od nuspojava u obliku prekomjerne antikoagulacije ili krvarenja, ali je zato veća vjerojatnost za sporijim postizanjem terapijske doze i prema tome je veća mogućnost od trombotskih komplikacija. Kod bolesnika koji pripadaju skupini niske doze (zahtjevaju doze manje od 21 mg/tjedan), pri davanju fiksnih početnih doza varfarina postoji najveća opasnost od nuspojava u obliku prekomjerne antikoagulacije i/ili krvarenja. Upravo zbog toga je vrlo važno odrediti čimbenike koji utječu na to hoće li bolesnik imati fenotip odnosno kliničku karakteristiku niske, srednje ili visoke doze varfarina. Statističkom analizom utvrđeno je da određeni genski polimorfizmi utječu na stabilnu dozu varfarina, a izračunom omjera izgleda pokušano je kvantificirati veličinu tih učinaka u smislu vjerojatnosti da će bolesnik imati određeni fenotip (koji zahtjeva nisku, srednju ili visoku dozu) s obzirom na to je li nositelj pojedinih varijantnih alela.

Kao što je razvidno iz Tablice 18, statistički značajnu povezanost su pokazali polimorfizmi gena *VKORC1* i *CYP2C9*. *CYP2C9* heterozigoti (*CYP2C9*1*2* i *CYP2C9*1*3*) imaju 3,22 puta veće izglede, a homozigoti varijantnih alela *CYP2C9* (*CYP2C9*2*2*, *CYP2C9*2*3* ili *CYP2C9*3*3*) čak 6,14 puta veće izglede da imaju dozu manju od 21 mg/tjedan u odnosu na homozigote wt (*CYP2C9*1*1*). Očekivano, još veću povezanost su pokazali polimorfizmi gena *VKORC1*. Nositelji varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T imaju 9,21 puta veće izglede da imaju dozu manju od 21 mg/tjedan u odnosu na homozigote wt. Isto tako, u nositelja varijantnih alela *VKORC1* omjer izgleda za visoku dozu je iznosio 0,22, odnosno

isti su imali 4,55 puta manje izglede da imaju visoku dozu varfarina u odnosu na homozigote wt.

Moguće je primijetiti trend prema višim dozama varfarina za nositelje varijantnog alela *CYP4F2*3* (OR = 2,01), ali bez statističke značajanosti (P = 0,058). Kako bi se utvrdila moguća povezanost *CYP4F2*3* alela s višim stabilnim dozama varfarina, uspoređeni su homozigoti za alel *CYP4F2*3* s homozigotima wt i dobivena je statistički značajna povezanost (OR = 2,95, 95 % CI 1,04 – 8,37, P = 0,042). Prema tim rezultatima, homozigoti *CYP4F2*3* alela imaju 2,95 puta veće izglede da će imati stabilnu dozu varfarina iznad 49 mg/tjedan, što je u suglasju s rezultatima multivarijatne regresijske analize koja je pokazala povezanost polimorfizma *CYP4F2* s višim dozama (Tablica 19).

Slični rezultati dobiveni su i u drugim istraživanjima. U istraživanju Aithala i suradnika bolesnici s jednim varijantnim alelom *CYP2C9*2* ili **3* (heterozigoti) su imali 2,68 puta veće izglede, a bolesnici s dva varijantna alela *CYP2C9*2* ili **3* (homozigoti varijantnog alela) 7,8 puta veće izglede da imaju da imaju nisku dozu varfarina (manje od 1,5 mg dnevno) u odnosu na homozigote wt (218). U istraživanju Redman i suradnika, bolesnici s niskim dozama (manje od 2,5 mg dnevno) su imali 3,75 puta veće izglede da su nositelji najmanje jednog varijantnog alela *CYP2C9* (219). U istraživanju Vecsler i suradnika, niska stabilna doza varfarina u bolesnika (manje od 3,2 mg dnevno) je bila značajno povezana s alelima *CYP2C9*2* ili **3* (OR = 1,5), dok je visoka doza varfarina (više od 7,5 mg dnevno) bila značajno povezana s polimorfizmom *VKORC1* 1173C>T (OR = 0,25). U istom istraživanju, izračunati zajednički učinak polimorfizama gena *CYP2C9* i *VKORC1* u multivarijatnoj analizi je pokazao da bolesnici s varijantnim alelima gena *CYP2C9* i *VKORC1* imaju 5,9 puta veće izglede za niskom dozom varfarina u odnosu na homozigote wt za oba gena (220).

Rezultati ovog istraživanja, zajedno s rezultatima drugih, ukazuju na to da su nositelji varijantnih alela *CYP2C9* i *VKORC1* skloniji nižim, a homozigoti te vjerojatno i heterozigoti za alel *CYP4F2*3* alela skloniji višim dozama varfarina u odnosu na homozigote wt tih gena, što podupire tezu o potencijalnoj koristi od analize tih polimorfizama prije početka terapije.

5.2.3. REGRESIJSKA ANALIZA – MODEL ZA PREDVIĐANJE DOZE VARFARINA

Određivanje povezanosti raznih čimbenika, između ostalih i farmakogenetičkih, sa stabilnom dozom varfarina daje vrlo korisne informacije o mogućim učincima na terapiju, ali kliničaru koji bolesniku uvodi lijek bi bilo najkorisnije kada bi se te spoznaje nekako pretočile u

konkretnu informaciju o približnoj dozi koju bi bolesnik trebao primiti, a da je ta doza kliničaru poznata prije početka terapije. Time bi se skratilo vrijeme postizanja stabilne doze i smanjila učestalost nuspojava terapije. Upravo zbog toga je pokušano iz dostupnih podataka (kliničkih, farmakogenetičkih i drugih) u populaciji bolesnika na terapiji varfarinom postaviti matematički model koji bi predvidio približnu početnu dozu varfarina koja bi bila što bliža stvarnoj stabilnoj dozi održavanja. Korištena je metoda višestruke linearne regresije koja se rabila i u drugim istraživanjima i koja je dala ponajbolje rezultate.

U regresijsku analizu su uvedene sve dostupne varijable, bez obzira jesu li pokazale statističku značajnost u univarijatnoj analizi ili ne, upravo zbog mogućeg otkrivanja određenih učinaka u multivarijatnoj analizi koji u univarijatnoj nisu bili vidljivi ili su bili prikriveni drugim, većim učincima. To se na kraju za određene varijable pokazalo točnim. Osim toga, u multivarijatnoj regresijskoj analizi dobiveni su podatci o stvarnom neovisnom učinku povezanosti s dozom, tako da se za neke varijable koje su u univarijatnoj analizi pokazale povezanost sa stabilnom dozom, u multivarijatnoj regresijskoj analizi pokazalo da je ta povezanost vjerojatno bila usljed utjecaja drugih kovarijabli.

Logaritamska transformacija doze prirodnim logaritmom (ln) prije višestruke linearne regresije dala je najbolje rezultate korelacije. Kako bi izbjegli mogući utjecaj uspoređivanja predviđenih rezultata stabilne doze s podatcima iz kojih su derivirani, bolesnici su podjeljeni u dvije skupine: derivacijsku (n = 180) i validacijsku (n = 24). Rezultati regresijske analize dobiveni na cijelom skupu podataka se neznatno razlikuju od onih dobivenih na derivacijskoj skupini, što pokazuje da nešto manji broj ispitanika u derivacijskoj skupini u odnosu na ukupan broj ispitanika nije imao utjecaj na rezultate regresijske analize.

Napravljena su dva regresijska modela s razlikama u uvođenju farmakogenetskih varijabli u model. U Regresijskom modelu 1 (RM1) genotipovi ispitivanih polimorfizama gena su u regresijski model uvršteni kao kategoričke varijable (1-6 za *CYP2C9* i 1-3 za ostale gene), dok su u Regresijskom modelu 2 (RM2) genotipovi u regresijski model uvedeni u obliku binarnih varijabli (1-0, odnosno za svaki genotip svakog ispitivanog polimorfizma dana je binarna varijabla koja označava je li prisutan ili ne). Iako statistički ne u potpunosti ispravno, budući da takvo jednostavno kategoriziranje ne ocrtava prave kliničke razlike među pojedinim dozama genotipova ispitivanih polimorfizama, uvođenjem genotipova kao kategoričkih varijabli za svaki SNP u RM1 pokušalo se obuhvatiti učinak kompletnog polimorfizma gena na dozu, budući da su svi genotipovi jednog polimorfizma zajedno obrađeni kroz jednu varijablu. Statistički je ispravniji način uvođenja genotipova u regresijski model kao zasebnih binarnih

varijabli, na način kako je to urađeno u RM2, budući da one definiraju samo prisutnost pojedinog genotipa ispitivanog polimorfizma, a ne prejudiciraju razlike u učinku genotipova na krajnji rezultat, odnosno dozu vafarina.

Varijable koje su ušle u završni model RM1 prikazane su u Tablici 19. RM1 je u stanju objasniti 46,6 % varijabilnosti doze (prilagođeni R^2 = 0,4659), Pomoću koeficijenata dobivenih na derivacijskoj skupini napravljeno je predviđanje doze na validacijskoj skupini, a korelacija predviđenih doza sa stvarnim je bila vrlo dobra (r = 0,7405, Slika 4-6).

Varijable koje su ušle u završni model RM2 prikazane su u Tablici 20. RM2 je u stanju objasniti 49,8 % varijabilnosti doze (prilagođeni R^2 = 0,4980), Pomoću koeficijenata dobivenih na derivacijskoj skupini napravljeno je predviđanje doze na validacijskoj skupini, a korelacija predviđenih doza sa stvarnim je bila vrlo dobra (r = 0,7542, Slika 4-7).

U istraživanjima na populacijama europskog podrijetla koja su imala za cilj izračun modela za predviđanje doze varfarina, dobiveni su slični rezultati. Koristeći kliničke i farmakogenetičke varijable (uglavnom polimorfizme gena *CYP2C9* i *VKORC1*) Sconce i suradnici su uspjeli objasniti 54,2 % varijabilnosti doze (82), Carlquist i suradnici 44,6 % (200), Anderson i suradnici 47,0 % (164), Gage i suradnici 54,0 % (172), Wadelius i suradnici 58,7 % (77), a Cini i suradnici 44,0 % varijabilnosti doze (188). Većina navedenih istraživanja poslužili su kao temelj Međunarodne suradnje o prilagođavanju doze varfarina (IWDRC, engl. *International Warfarin Dose Refinement Collaboration*), koja je u suradnji s IWPC potaknula izradu algoritma za predviđanje i prilagođavanje doze varfarina iz kliničkih i farmakogenetičkih podataka (177). Koristeći podatke 4043 bolesnika na terapiji varfarinom iz većeg broja istraživanja dobiven je matematički model za predviđanje doze varfarina kojim su uspjeli objasniti 47 % varijabilnosti doze. Algoritam je slobodno dostupan na web stranici (www.warfarindosing.org), smatra se najkompletnijim i u svijetu je najčešće korišten algoritam za predviđanje doze varfarina.

Kako bi dodatno procijenili rezultate dobivene regresijskim modelom, doze predviđene pomoću RM1 i RM2 uspoređene su s onima dobivenim algoritmom IWPC/IWDRC-a na validacijskoj skupini. Dobivena je vrlo visoka korelacija (RM1 r = 0,9033, P < 0,001; RM2 r = 0,8994, P < 0,001) između doza varfarina predviđenih navedenim algoritmima s onima dobivenim IWPC/IWDRC algoritmom kojega koristi najveći broj kliničara u svijetu i koji je korišten u najvećem broju istraživanja koja su proučavala farmakogenetičko predviđanje doze varfarina. Iako je RM2 pokazao nešto bolje rezultate regresijske analize (u stanju je objasniti 49,8 % varijabilnosti doze) u odnosu na RM1 (u stanju je objasniti 46,6 % varijabilnosti doze), općenito

su rezultati oba regresijska modela vrlo slični, što je vidljivo i kod usporedbe s rezultatima dobivenim IWPC/IWDRC algoritmom. Budući da je izračun prema RM2 statistički ispravniji, preporuka za daljnja istraživanja bi bila da se genotipovi polimorfizama u regresijski model uvode kao binarne varijable.

5.2.4. VRIJEME DO STABILNE DOZE VARFARINA

Vrijeme potrebno da bolesnik postigne stabilnu dozu varfarina je vrlo važan čimbenik terapije jer o njemu ovisi koliko će brzo bolesnik osjetiti učinkovitost terapije. Što je vrijeme do stabilne doze kraće, manje su mogućnosti od nastanka trombotskih komplikacija, čije sprječavanje predstavlja glavni smisao antikoagulacijske terapije.

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj polimorfizama gena *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* i *GGCX* na vrijeme potrebno za postizanje stabilne terapijske doze varfarina. Nije opažena statistički značajna razlika u vremenu do stabilne doze varfarina između nositelja varijantnog alela i homozigota wt za sve ispitivane polimorfizme, osim za nositelje alela *CYP4F2*3* (Tablica 21). Isti rezultati su dobiveni i log-rank analizom te Coxovom regresijskom analizom (Slika 4-8 i Tablica 22). Primijećeno da je nositeljima alela *CYP4F2*3* bilo potrebno duže vrijeme (medijan vremena 57 dana) za postizanje stabilne doze u odnosu na homozigote wt (medijan vremena 33 dana) (P = 0,019). Isto tako, nositelji alela *CYP4F2*3* su imali 28 % manju vjerojatnost za postizanje stabilne doze varfarina u odnosu na homozigote wt (HR 0,72, 95 % CI 0,53 - 0,98, P = 0,027).

Analize povezanosti vremena do stabilne doze s genskim polimorfizmima u drugim istraživanjima su rezultirale različitim zaključcima. Higashi i suradnici su primijetili da nositelji varijantnih alela *CYP2C9* trebaju duže vrijeme za postizanje stabilne doze u odnosu na homozigote wt (202). Nasuprot tome, Voora i suradnici (221) te Kealey i suradnici (222) nisu našli povezanost između polimorfizama *CYP2C9* i vremena do postizanja stabilne doze. Schelleman i suradnici su, između ostalog, proučavali povezanost polimorfizama *VKORC1* s vremenom do stabilne doze i nisu našli statistički značajnu povezanost (81). Povezanost između polimorfizama *CYP2C9* i *VKORC1* te vremena do stabilne doze proučavali su i Limdi (223), Meckley (206), Wadelius (77), Pautas (215), Gong (186), Nahar (105) i Finkelman (224) sa suradnicima, a niti u jednom od tih istraživanja nije nađena statistički značajna povezanost. Povezanost vremena do stabilne doze s polimorfizmom gena *CYP4F2* bila je predmet istraživanja Pautasa i suradnika (215) te Bejarano-Achache (106) koji nisu našli statistički značajnu povezanost. Za razliku od njih, Nahar i suradnici su u istraživanju na indijskoj

populaciji bolesnika na terapiji varfarinom i acenokumarolom dobili statistički značajnu povezanost polimorfizma *CYP4F2* s vremenom do stabilne doze (105). U njihovom istraživanju primijećena je statistički značajna razlika između nositelja varijantnog alela i homozigota wt (P = 0,02) na način da su nositelji alela *CYP4F2*3* trebali duže vrijeme za postizanje stabilne doze (medijan 66 dana) od homozigota wt (medijan 56 dana), ali, nažalost, autori nisu prikazali podatke za log-rank i Coxovu regresijsku analizu, tako da podatak o veličini učinka nije poznat niti jesu li napravljene korekcije za druge kovarijable.

Prema trenutnim spoznajama, ovo istraživanje je prvo koje je pokazalo statistički značajnu povezanost vremena do stabilne doze varfarina s polimorfizmom *CYP4F2* gena u europskoj populaciji. Budući da je u ovom istraživanju već potvrđena povezanost alela *CYP4F2*3* sa stabilnom dozom varfarina u multivarijatnoj analizi, ne iznenađuje povezanost s vremenom do stabilne doze. Ako je kod nositelja varijantnog alela *CYP4F2*3* povećana koncentracija vitamina K, koja zahtjeva veću dozu varfarina, može se očekivati da će uz postupno titriranje doze biti potrebno duže vrijeme da se postigne takva veća doza u terapiji. Izostanak povezanosti vremena do stabilne doze s drugim polimorfizmima (gena *CYP2C9*, *VKORC1* i *GGCX*) nije iznenađujući, budući da ni drugi istraživači, s izuzetkom Higashija, nisu uspjeli potvrditi ovu povezanost.

5.3. UDIO VREMENA PROVEDENOG U TERAPIJSKOM RASPONU

Udio vremena provedenog u terapijskom rasponu (TTR) je vrlo važan pokazatelj kvalitete antikoagulacijske terapije. On nam govori o udjelu vremena od ukupno provedenog u terapiji s pravim terapijskim učinkom. Primjerice, u bolesnika s fibrilacijom atrija INR vrijednosti ispod terapijskog raspona (INR < 2) su povezane s povišenim rizikom od moždanog udara, dok su vrijednosti INR-a iznad 3,5 – 4 povezane s povišenim rizikom od krvarenja (225). Te činjenice govore o potrebi postizanja što većeg TTR-a kod bolesnike na terapiji varfarinom radi postizanja što boljeg učinka terapije i smanjenja rizika od nuspojava.

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj polimorfizama *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* na TTR. Ispitana je povezanost s TTR-om stratificirano prema genotipu i usporedbom nositelja varijantnog alela s homozigotima wt (Tablica 23). Nije pronađena povezanost s polimorfizmima *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX*, ali je pronađena statistički značajna povezanost s polimorfizmima *VKORC1*.

Dobivena povezanost ($P < 0,001$) očitovala se i s obzirom na genotip *VKORC1* (Slika 4-9) i usporedbom nositelja varijantnog alela i homozigota wt (Slika 4-10).

Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Wadelius i suradnika (206). Oni su dobili značajnu povezanost polimorfizma *VKORC1* -1639G>A s TTR-om, gdje su homozigoti varijantnog alela imali najvišu vrijednost TTR-a, a homozigoti wt najnižu vrijednost TTR-a kroz ukupno vrijeme praćenja. U istom istraživanju nije nađena povezanost TTR-a s polimorfizmima *CYP2C9*.

U istraživanju Skov i suradnika isto tako je dobivena povezanost TTR-a s polimorfizmom *VKORC1* 1173C>T, dok za *CYP2C9* nije nađena povezanost (226). Zanimljivost vezana za povezanost TTR-a s genotipom polimorfizma *VKORC1* 1173C>T u istraživanju Skov i suradnika je podatak kako su najniži TTR imali heterozigoti, a ne, kako je očekivano, homozigoti wt (nije bilo statističke razlike u TTR-u između homozigota wt i homozigota varijantnih alela).

U istraživanju Meckleya i suradnika nije pronađena statistički značajna razlika u TTR-u s obzirom na polimorfizme *CYP2C9* i *VKORC1* gena (206).

Dobiveni rezultati, kao i rezultati istraživanja Wadelius i Skov, ukazuju na jasnu povezanost polimorfizama *VKORC1* s TTR-om. Mehanizam te povezanosti nije u potpunosti razjašnjen. Moguće je da tome doprinosi činjenica da nositelji varijantnih alela *VKORC1* imaju potrebe za nižim dozama te da kod pretjerano opreznog doziranja (koje je u kliničkoj praksi često zbog vrlo ozbiljnih nuspojava varfarina) brže postižu i održavaju terapijsko područje.

5.4. NUSPOJAVE TERAPIJE VARFARINOM

Nuspojava terapije predstavlja svaki neželjeni ili štetni događaj koji nastaje uz primjenu lijeka unutar ili izvan odobrenih uvjeta. Kako je navedeno u Uvodu, nuspojave antikoagulacijske terapije varfarinom mogu biti vrlo ozbiljne, pa čak i smrtonosne za bolesnika. U ovom istraživanju osobita pažnja posvećena je prekomjernoj antikoagulaciji ($INR > 4$) i krvarenjima.

5.4.1. PREKOMJERNA ANTIKOAGULACIJA ($INR > 4$)

Prekomjerna antikoagulacija (OA, engl. *overanticoagulation*) se javlja kada dolazi do prekomjernog učinka varfarina. To se očituje približavanjem granici održavanja funkcije hemostaze, a laboratorijski se može utvrditi mjerenjem PV-a koje je primjetno izvan terapijskog područja. Uglavnom se kao granica OA uzima vrijednost $PV > 4$ INR-a, iako se u nekim

istraživanjima mogu naći i druge vrijednosti (iznad 5 ili 6 INR-a ili čak i više). Premda je u brojnim istraživanjima OA povezana s povišenim rizikom od krvarenja, kratkotrajna (jednokratna) povišena vrijednost PV-a iznad terapijskog raspona ne mora nužno rezultirati krvarenjem (34).

Povezanost OA s polimorfizmima gena *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* ispitivana je na tri načina.

Izračunat je omjer izgleda da će se u bolesnika dogoditi OA ovisno o prisutnosti varijantnih alela za gene *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* (Tablica 24). Nije zabilježena statistički značajna razlika u broju bolesnika u kojih se pojavila OA između nositelja varijantnih alela i homozigota wt.

Zatim, izračunata je razlika u omjerima stopa incidencije OA između nositelja varijantnih alela za gene *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* i homozigota wt (Tablica 25) gdje isto tako nije zabilježena statistički značajna razlika.

Na kraju, određen je omjer ugroženosti za postizanje OA između nositelja varijantnih alela za gene *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* i homozigota wt (Tablica 26). Dobivena je statistički značajna razlika (P = 0,001) u vremenu potrebnom za postizanja prvog slučaja OA između nositelja varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T u odnosu na homozigote wt. Nositelji varijantnih alela imaju 2,99 puta veću vjerojatnost za postizanje OA u odnosu na homozigote wt. Na Kaplan-Meier krivulji vremena do prve pojave OA vidljivo je da se u nositelja varijantnih alela znatno ranije može očekivati OA u odnosu na homozigote wt (Slika 4-11).

I u drugim istraživanjima je proučavan utjecaj genskih polimorfizama na OA, a rezultati su oprečni. Quteineh i suradnici su prvi potvrdili povezanost SNP-ova gena *VKORC1* s OA (227). Kealey i suradnici su pronašli povezanost polimorfizama *CYP2C9* s OA prije postizanja stabilne doze, ali ne i u periodu poslije postizanja stabilne doze (222). Limdi i suradnici su pronašli povezanost polimorfizama *VKORC1*, ali ne i *CYP2C9* s OA (223). U istraživanju Meckleya i suradnika nije pronađena povezanost polimorfizama *CYP2C9* s OA, dok je za homozigote varijantnih alela *VKORC1* utvrđena statistički značajna povezanost s OA (INR > 5) u odnosu na heterozigote, ali samo za prvi mjesec terapije (206). Schwarz i suradnici su u svojem istraživanju pronašli povezanost prisutnosti varijantnih alela *VKORC1* s OA, ali ne i s alelima *CYP2C9* *2 ili *3 (91). Gong i suradnici (186) te Valentin i suradnici (228) nisu pronašli povezanost između polimorfizama *VKORC1* i *CYP2C9* s OA. Povezanost polimorfizma

CYP4F2 s OA su proučavali Gong (186), Zhang (213), Bejarano-Achache (106) i Shaw (229) sa suradnicima i nisu pronašli statistički značajnu povezanost. Polimorfizmi gena *GGCX* nisu proučavani za povezanost s OA u drugim istraživanjima.

U istraživanjima Andersona i suradnika (164) te Pautasa i suradnika (215) bolesnici s višestrukim varijantnim alelima *CYP2C9* i *VKORC1* su imali povišeni rizik od razvoja OA. U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u broju varijantnih alela gena *CYP2C9* i *VKORC1* između bolesnika kod kojih se razvio OA i onih koji nisu (P = 0,805, podatci nisu prikazani).

Izostanak povezanosti prisutnosti alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* u genotipu bolesnika s OA u ovom istraživanju dijelom se može objasniti malim brojem nositelja varijantnih alela u ispitivanoj populaciji, osobito alela *CYP2C9*3* koji imaju izraženiji utjecaj. Osim toga, ta povezanost nije potvrđena niti u drugim istraživanjima s puno većim brojem ispitanika (76, 91, 203).

Povezanost polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T s OA u obliku sklonosti ka ranijem razvoju OA za nositelje varijantnih alela zabilježena je i u nekim drugim istraživanjima. Dobiveni rezultati, slično kao i rezultati Limdi i suradnika (223) te Schwarza i suradnika (91), pokazuju da su nositelji varijantnih alela *VKORC1* skloniji ranijem razvoju OA u odnosu na homozigote wt.

Ispitivanje razlike u vremenu postizanja OA se pokazalo kao najosjetljiviji pokazatelj povezanosti polimorfizama gena s OA, budući da pokazuje razliku između nositelja varijantnih alela i homozigota wt ne samo u broju bolesnika ili incidenciji OA (koji u slučajevima slabije povezanosti i manjeg broja ispitanika ne moraju pokazati statistički značajnu razliku), nego i u vremenu postizanja događaja, što u terapiji može biti vrlo korisna informacija.

5.4.2. KRVARENJA

Krvarenja su najvažnija nuspojava terapije varfarinom, a ovisno o intenzitetu i lokaciji mogu predstavljati vrlo ozbiljan problem, a ponekad mogu čak završiti i smrtnim ishodom. Upravo zbog takvih vrlo ozbiljnih mogućih nuspojava neki liječnici nevoljko propisuju antikoagulacijsku terapiju varfarinom. U dobro kontroliranoj terapiji krvarenja nisu česta i uglavnom se svode na blaže oblike koji ne zahtijevaju terapijsku intervenciju.

Ukupno je zabilježeno 60 krvarenja kod 39 bolesnika u ukupno 359,85 bolesnik-godina, s ukupnom incidencijom od 16,7 krvarenja na 100 bolesnik-godina.

U ovom istraživanju korištena je klasifikacija krvarenja prema Fihnu (167), kod koje su krvarenja podijeljena na neznatna, kod kojih nisu bila potrebni dodatni medicinski postupci ili pregledi, te značajna, kod kojih su bili potrebni dodatni medicinski postupci ili pregledi. Značajna krvarenja uključuju ozbiljna, po život opasna i smrtonosna krvarenja. Najveći broj zabilježenih krvarenja predstavljala su neznatna krvarenja, s 12 ozbiljnih, jednim po život opasnim te bez zabilježenih krvarenja sa smrtnim ishodom.

Prvo je ispitana povezanost polimorfizama *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* s obzirom na broj bolesnika kod kojih je zabilježeno krvarenje u terapiji. Statistički značajna razlika u broju bolesnika s krvarenjem primijećena je za polimorfizme gena *VKORC1* i *CYP4F2*, dok za polimorfizme gena *CYP2C9* i *GGCX* nije pronađena povezanost s krvarenjem (Tablica 28).

Zabilježena je statistički značajna razlika u broju bolesnika s krvarenjima između nositelja varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T i homozigota wt te između homozigota varijantnih alela istih gena i homozigota wt. Nositelji varijantnih alela imaju 2,65 puta veće izglede, a homozigoti varijantnih alela 7,40 puta veće izglede da razviju krvarenje u terapiji u odnosu na homozigote wt.

Nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju 2,42 puta veće izglede da razviju krvarenje u odnosu na homozigote wt. Suprotno očekivanjima, nije pronađena statistički značajna razlika između homozigota varijantnih alela *CYP4F2*3* i homozigota wt u broju bolesnika s krvarenjima (P = 0,094).

Zatim je ispitana povezanost polimorfizama gena *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* s incidencijom krvarenja. Isto tako je primijećena povezanost polimorfizama *VKORC1* i *CYP4F2* s incidencijom krvarenja, dok za polimorfizme *CYP2C9* i *GGCX* nije pronađena povezanost (Tablica 29).

Homozigoti varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T imaju 2,91 puta veći rizik od krvarenja u odnosu na homozigote wt, a između nositelja varijantnih alela i homozigota wt nije pronađena statistički značajna razlika u incidenciji krvarenja.

Nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju 2,39 puta veći rizik da razviju krvarenje u odnosu na homozigote wt, dok, opet suprotno očekivanjima, nije pronađena statistički značajna razlika između homozigota varijantnih alela *CYP4F2*3* i homozigota wt u incidenciji krvarenja (P = 0,188).

S obzirom na intenzitet, odnosno klinički značaj krvarenja, ispitana je povezanost polimorfizama gena *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* s pojavom i incidencijom neznatnih

i značajnih krvarenja. Pronađena je povezanost s polimorfizmima *VKORC1* i *CYP4F2*, dok opet za polimorfizme *CYP2C9* i *GGCX* nije pronađena povezanost (Tablica 30).

Nije pronađena statistički značajna povezanost nositelja varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i 1173C>T s pojavom krvarenja, ali je primijećeno da homozigoti varijantnih alela tih gena imaju 6,91 puta veće izglede za nastanak neznatnih krvarenja te 8,89 puta veće izglede za razvoj značajnih krvarenja (Tablica 30). Isto je primijećeno i s obzirom na incidenciju neznatnih i značajnih krvarenja gdje su homozigoti varijantnih alela imali 2,49 puta veći rizik od neznatnih krvarenja u odnosu na homozigote wt, dok za nositelje varijantnih alela nije pronađena statistički značajna povezanost s incidencijom neznatnih i značajnih krvarenja (Tablica 31).

Nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju 2,92 puta veće izglede za nastanak neznatnih krvarenja, a homozigoti varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju 4,41 puta veće izglede za nastanak neznatnih krvarenja u odnosu na homozigote wt (Tablica 30). Slično je dobiveno i usporedbom stopa incidencija gdje nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju 2,91 puta veći rizik za nastanak neznatnih krvarenja u odnosu na homozigote wt (Tablica 31). Za homozigote alela *CYP4F2*3* nije zabilježena statistički značajna povezanost s incidencijom neznatnih krvarenja, a kod njih nije zabilježeno niti jedno značajno krvarenje.

Usporedbom vremena do pojave krvarenja s genotipovima za ispitivane polimorfizme *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* nije pronađena statistički značajna povezanost (Tablica 32).

Povezanost genskih polimorfizama s nuspojavama u obliku krvarenja proučavana je i u nekim drugim istraživanjima s oprečnim rezultatima.

U istraživanjima Teha (94) i Sridharan (230) bolesnici s varijantnim alelima gena *CYP2C9* i *VKORC1* su imali veći broj krvarenja u odnosu na homozigote wt. Slično tome, u istraživanjima Misasi (231) te Mega (232) nositelji jednog ili više varijantnih alela *CYP2C9* i *VKORC1* su imali veću sklonost štetnim događajima odnosno krvarenjima.

Povezanost varijantnih alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* s krvarenjem potvrđena je i u istraživanjima Margaglionea (205), Higashija (202), Limdi (212), Ma (233) i Tomeka (234), ali isto tako u nizu drugih istraživanja (76, 77, 91, 104, 206, 235) nije pronađena statistički značajna povezanost, kao i u ovom istraživanju. Mogući razlog zašto u ovom istraživanju nije pronađena povezanost polimorfizama *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* s krvarenjem bi mogao biti u relativno malom broju varijantnih alela s još manjim brojem zabilježenih krvarenja među nositeljima varijantnih alela. To osobito vrijedi za alel *CYP2C9*3* kod kojega je zabilježen

najveći učinak na krvarenja u drugim istraživanjima, dok je u ovom istraživanju zabilježeno svega pet neznatnih i jedno značajno krvarenje u nositelja *CYP2C9*3*.

Povezanost polimorfizama gena *VKORC1* s krvarenjem pronađena je u istraživanjima Lunda i suradnika u prvom mjesecu terapije (76), zatim u istraživanju Rietsme (236) te Jimenez-Varo (237) na populaciji bolesnika na terapiji fenprokumonom i acenokumarolom, kao i u istraživanju Hawcutta na pedijatrijskoj populaciji (238), dok u nekim drugim istraživanjima nije pronađena povezanost (77, 104, 151, 206, 233, 235). Gotovo identično kao i u ovom istraživanju, u istraživanju Sridharan i suradnika (230) nositelji varijantnog alela *VKORC1* -1639A su imali 2,7 puta veće izglede za krvarenje u odnosu na homozigote wt. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanjima Schwarza (91) (OR 2,61), Hauga (80) (OR 1,79), Ma (233) (OR 1,91), Ana (239) (OR 1,72) i Tomeka (234) (OR 1,84), ali bez zabilježene statističke značajnosti ($P > 0,05$).

Povezanost varijantnih alela *VKORC1* s intenzitetom krvarenja zabilježena je, osim u ovom istraživanju, i u istraživanju Hawcutta i suradnika (238) gdje su nositelji varijantnih alela imali 4,53 puta veće izglede za neznatno krvarenje u odnosu na homozigote wt, te u istraživanju Shawa i suradnika (229) gdje su nositelji varijantnih alela imali 4,75 puta veće izglede za neznatno krvarenje u odnosu na homozigote wt, ali bez statističke značajnosti ($P = 0,157$).

Iako u ovom istraživanju isprva nije dobivena statistički značajna razlika u broju i incidenciji neznatnog i značajnog krvarenja između nositelja varijantnih alela *VKORC1* i homozigota wt, nakon usporedbe homozigota varijantnog alela s homozigotima wt, očekivano je dobivena višestruko veća značajnost i potvrđena je povezanost varijantnih alela *VKORC1* -1639A i 1173T s pojavom i incidencijom krvarenja.

Mogući uzrok povećanoj sklonosti krvarenju kod nositelja varijantnih alela *VKORC1* -1639A i 1173T bi svakako mogla biti činjenica da su nositelji varijantnih alela, a pogotovo njihovi homozigoti, puno osjetljiviji na antikoagulacijski učinak varfarina od homozigota wt, što je već potvrđeno u ovom i drugim istraživanjima kao sklonost puno nižim dozama varfarina i sklonost ka prekomjernoj antikoagulaciji. Taj učinak je vrlo jasno pokazan u nedavno objavljenom istraživanju Mega i suradnika (232). U tom istraživanju bolesnici na terapiji varfarinom su, ovisno o broju varijantnih alela za polimorfizme *VKORC1* -1639G>A te za CYP2C9*2 i CYP2C9*3, podijeljeni na normalne, osjetljive i vrlo osjetljive. Rezultati su pokazali da su bolesnici u skupini „osjetljivih“ imali 1,67 puta veći rizik od nastanka krvarenja, a bolesnici u skupini „vrlo osjetljivih“ 3,39 puta veći rizik od krvarenja u odnosu na homozigote wt.

Povezanost krvarenja s alelima *CYP4F2*3* proučavana je u znatno manjem broju istraživanja, a rezultati su oprečni. U većini istraživanja nije pronađena povezanost alela *CYP4F2*3* s krvarenjem u terapiji (151, 229, 235, 237), dok su u istraživanju Rotha (104) nositelji alela *CYP4F2*3* imali manju sklonost krvarenju (OR 0,62) u odnosu na homozigote wt, slično kao i homozigoti *CYP4F2*3* u odnosu na homozigote wt (OR 0,54) u istraživanju Shendre (216) gdje ipak nije nađena statistički značajna povezanost (P = 0,240).

Rezultati ovog istraživanja (Tablice 30 i 31) ukazuju da nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju veće izglede (OR 2,42) odnosno rizik (IRR 2,39) za nastanak krvarenja bilo koje vrste u odnosu na homozigote wt. Isto tako, nositelji varijantnih alela *CYP4F2*3* imaju veće izglede (OR 2,92) odnosno rizik (IRR 2,91) za nastanak neznatnog krvarenja. Takvi rezultati nisu u skladu s rezultatima Rotha i Shendre koji su dobili suprotan učinak, a svakako nisu očekivani s obzirom na današnje spoznaje o povezanosti *CYP4F2*3* s terapijom varfarinom. Naime, budući da nositelji varijantnog alela *CYP4F2*3*, pogotovo homozigoti, imaju slabiju aktivnost enzima CYP4F2, te posljedično tome i veću količinu vitamina K u organizmu, bilo bi očekivano da oni budu manje skloni prekomjernoj antikoagulaciji i krvarenjima.

Iako neočekivani, rezultati povezanosti *CYP4F2*3* s krvarenjem u terapiji varfarinom nisu jedini takve vrste do sada objavljeni. U istraživanju Zhanga i suradnika (213) nositelji varijantnog alela *CYP4F2* imali su 1,43 puta veće izglede za razvoj značajnog krvarenja u odnosu na homozigote wt, ali bez dobivene statističke značajnosti. Slični rezultati dobiveni su i u istraživanju Ma i suradnika (233) gdje su nositelji varijantnog alela *CYP4F2*3* imali 1,48 puta veće izglede za nastanak krvarenja, odnosno 3,09 puta veće izglede za nastanak značajnog krvarenja u odnosu na homozigote wt, isto tako bez dobivene statističke značajnosti. Osim toga, budući da stvarni mehanizam povezanosti *CYP4F2*3* s antikoagulacijskom terapijom varfarinom još nije do kraja poznat, moguće je da je veća sklonost krvarenju kod nositelja alela *CYP4F2*3* posljedica nekih drugih učinaka koji nisu vezani za metabolizam vitamina K u organizmu.

Naknadnom analizom podataka vezanih za *CYP4F2*3* i krvarenja, pronađene su još neke nelogičnosti. Naime, kao što je vidljivo iz Tablica 28 i 29, statistički značajna razlike s obzirom na krvarenja je dobivena samo između nositelja varijantnih alela (heterozigoti i homozigoti *CYP4F2*3*) i homozigota wt (OR 2,42, P = 0,027 i IRR 2,39, P = 0,005), ali ne i između homozigota *CYP4F2*3* i homozigota wt (OR 2,65, P = 0,094 i IRR 1,81, P = 0,188), što je svakako neočekivano. U pravilu, ako postoji povezanost varijantnih alela s nekim učinkom, uvijek je očekivano da se u usporedbi homozigota wt s homozigotima varijantnih alela dobije puno jača i izraženija povezanost, odnosno jači učinak, nego u usporedbi s heterozigotima gdje

je taj učinak prigušen jer se u genotipu nalazi samo jedan varijantni alel. Takav slučaj se može vidjeti kod povezanosti varijantnih alela *VKORC1* gena s krvarenjima gdje je OR za krvarenja u usporedbi nositelja varijantnog alela s homozigotima wt manji nego OR u usporedbi homozigota varijantnog alela i homozigota wt (2,65 nasuprot 7,40). U Tablicama 29, 30 i 31 vidljivo je kako se zbog ublažavanja učinka u usporedbi nositelja varijantnog alela *VKORC1* gena s homozigotima wt ne dobiva statistička značajnost, dok je u usporedbi homozigota varijantnog alela i homozigota wt istog gena povezanost statistički značajna i vrlo jasno vidljiva. Prema tome, ako postoji određeni učinak kao posljedica prisutnosti varijantnog alela u genotipu, statistički značajna razlika između homozigota wt ili homozigota varijantnog alela i heterozigota ne mora uvijek biti vidljiva, ali zato bi trebala biti vidljiva značajna razlika između homozigota wt i homozigota varijantnog alela jer je u tom slučaju prisutna najveća razlika. Obrat takve situacije je vidljiv kod povezanosti *CYP4F2*3* s krvarenjem gdje postoji statistički značajna razlika između heterozigota i homozigota wt (OR 2,36, 95 % CI 1,05 - 5,31, P = 0,037), ali ne i između homozigota varijantnog alela i homozigota wt (OR 2,65, 95 % CI 0,85 - 8,28, P = 0,094) gdje bi se očekivala puno veća statistička značajnost, što je potvrđeno i rezultatima logističke regresijske analize u kojoj su bili uključeni svi ispitivani polimorfizmi gena. Ti su rezultati isto tako pokazali da postoji statistički značajna razlika u pojavi krvarenja između nositelja varijantnih alela ispitivanog polimorfizma *CYP4F2* i homozigota wt, ali ne i između homozigota varijantnog alela i homozigota wt. Kada se uzme u obzir i činjenica da je 75 % svih krvarenja zabilježenih među nositeljima *CYP4F2*3* u skupini heterozigota, što je daleko više nego što bi statistički bilo očekivano, s pravom se može pomisliti da je u pozadini dobivenih rezultata koji ukazuju na povećanu sklonosti nositelja alela *CYP4F2*3* krvarenjima možda neka statistička anomalija koju bi svakako valjalo ispitati na većoj skupini ispitanika.

5.4.3. TERAPIJA NUSPOJAVA LIJEČENJA VARFARINOM

Kod bolesnika koji su tijekom terapije imali teže oblike nuspojava primijenjeni su terapijski postupci za obrat prekomjerne antikoagulacije i ublažavanje posljedica krvarenja.

Kao što je vidljivo iz Tablica 33 i 34, nije pronađena statistički značajna povezanost između polimorfizama gena *CYP2C9*, *VKORC1, CYP4F2* i *GGCX* i primjene ili incidencije terapije za nuspojave nastale liječenjem varfarinom.

5.5. KORISNOST FARMAKOGENETIKE U ANTIKOAGULACIJSKOJ TERAPIJI VARFARINOM

Budući da je brojnim istraživanjima potvrđeno da nositelji varijantnih alela gena *VKORC1*, *CYP2C9* i *CYP4F2* predstavljaju posebno osjetljivu populaciju koja teško postiže stabilnu dozu, te koja je sklona nastanku nuspojava, pretpostavljalo se da će uvođenje farmakogenetički potpomognutog doziranja pomoći u smanjenju učestalosti nuspojava te bržem i sigurnijem uspostavljanju terapije. Objava rezultata dvaju velikih kliničkih ispitivanja (COAG i EU-PACT) 2013. godine s proturječnim rezultatima samo je potvrdila da je teško dati pravi sud o tome (157, 158). Četiri meta-analize objavljene 2015. godine, koje su uključivale 11 velikih kliničkih istraživanja, zaključile su da farmakogenetičko doziranje pomaže u skraćenju vremena do stabilne doze, povećanju TTR-a i smanjenju rizika od značajnih krvarenja u odnosu na fiksno doziranje, ali ne i u odnosu na kliničke algoritme, te da su potrebna daljnja istraživanja koja bi mogla rasvijetliti korisnost farmakogenetičkog doziranja varfarina u kliničkoj praksi.

Između ostalih, i ovo istraživanje pokazuje da je farmakogenetika važna ne samo kod optimizacije individualne doze u uvođenju oralne antikoagulacijske terapije varfarinom, nego i u odabiru posebno osjetljivih bolesnika koji su skloniji nastanku nuspojava terapije i kojima je zbog toga potrebna dodatna skrb i praćenje tijekom terapije.

5.6. OSVRT NA BUDUĆNOST ANTIKOAGULACIJSKE TERAPIJE VARFARINOM

Varfarin se u antikoagulacijskoj terapiji koristi već više od pola stoljeća i još uvijek je u mnogim zemljama i dalje temelj oralne antikoagulacijske terapije. Zadnjih godina su se na tržištu pojavili novi oralni antikoagulacijski lijekovi koji se ne baziraju na inhibiciji učinka vitamina K, već su to uglavnom direktni inhibitori trombina (dabigatran) ili aktiviranog faktora X (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban). Oni bi trebali imati brojne prednosti u odnosu na varfarin, kao što su npr. jednostavnije doziranje, brži nastup djelovanja, činjenica da ne zahtijevaju terapijsko praćenje i pretpostavka da imaju puno manje interakcija s drugim lijekovima i hranom i manji rizik od krvarenja ili tromboze. Zbog tih potencijalnih prednosti očekivalo se da će oni vrlo brzo u potpunosti zamijeniti varfarin. No, isto tako, određeni aspekti terapije novim oralnim antikoagulansima kao što su nepostojanje antidota za poništavanje antikoagulacijskog učinka kod predoziranja, nedostatak analitičkih metoda za kvantificiranje učinka lijeka (kao što je mjerenje INR kod varfarina) i manjak kvalitetnih istraživanja koja bi

se bavila proučavanjem učinka i sigurnosti novih oralnih antikoagulansa su nagnale kliničare na zabrinutost. U međuvremenu su se na tržištu pojavili antidoti, ali je njihova dostupnost i dalje vrlo ograničena, a za dostupne analitičke metode primijećeni su problemi s osjetljivošću na različite inhibitore faktora Xa. Konačno, jedan od većih problema je i cijena koja višestruko nadilazi cijenu terapije varfarinom. U brojnim istraživanjima uspoređivana je sigurnost novih oralnih antikoagulansa u odnosu na varfarin i procjenjivana je korist od prelaska bolesnika s varfarina na nove oralne antikoagulanse (240-246). Opći stav je da bi bolesnici na stabilnoj terapiji varfarinom trebali ostati na varfarinu, jer značajne koristi od prelaska na nove oralne antikoagulanse nema, a kod novih bolesnika procjena je da bi korist mogli imati „osjetljivi" bolesnici s većim brojem varijantnih alela relevantnih gena (*CYP2C9* i *VKORC1*) koji imaju veću sklonost nastanku nuspojava. Za homozigote wt alela varfarin i dalje ostaje približno jednako sigurna, a svakako jeftinija alternativa novim oralnim antikoagulansima (240, 243, 246, 247). U svakom slučaju, varfarin će još dugo vremena ostati oralni antikoagulans izbora za mnoge bolesnike, ako već zbog ničeg drugog, onda zbog cijene i pristupačnosti. Ukoliko se primjerice uvođenjem farmakogenetičkih ispitivanja sigurnost terapije varfarinom podigne na višu razinu, to će biti još jedan argument za daljnje korištenje varfarina u kliničkoj praksi.

6. ZAKLJUČCI

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost polimorfizmama gena *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2* i *GGCX* sa stabilnom dozom održavanja te s neželjenim učincima varfarina primijenjenog u oralnoj antikoagulacijskoj terapiji. Na temelju dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- Učestalost varijantnih alela polimorfizama *VKORC1* 1639G>A i 1173>T gena u populaciji Hrvatske u skladu je s učestalošću tih alela u europskim populacijama.
- Višestrukom linearnom regresijskom analizom statistički značajnu povezanost sa stabilnom dozom varfarina pokazali su sljedeći čimbenici: polimorfizmi *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* (prisutnost genotipova *CYP2C9*1*1*, *CYP2C9*2*3* i *CYP2C9*3*3*) *VKORC1* -1639G>A i/ili 1173C>T (heterozigoti ili homozigoti varijantnog alela), *CYP4F2*3* (genotip *CYP4F2*3*3*), fizička aktivnost, BSA, broj lijekova u popratnoj terapiji koji pojačavaju klirens varfarina te broj lijekova u popratnoj terapiji koji smanjuju klirens varfarina. Dobiveni algoritam za predviđanje doze u stanju je objasniti 49,8 % varijabilnosti doze varfarina.
- Utvrđena je statistički značajna povezanost vremena potrebnog za postizanje stabilne doze varfarina o polimorfizmu *CYP4F2*3* na način da nositelji alela *CYP4F2*3* trebaju duže vrijeme za postizanje stabilne doze u odnosu na homozigote wt.
- Utvrđena je statistički značajna povezanost udjela vremena provedenog unutar terapijskog raspona s polimorfizmima *VKORC1* -1639G>A i/ili 1173C>T na način da nositelji varijantnih alela provode više vremena unutar terapijskog raspona u odnosu na homozigote wt.
- Utvrđena je statistički značajna povezanost polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i/ili 1173C>T s nuspojavama terapije varfarinom u obliku prekomjerne antikoagulacije na način da nositelji varijantnih alela imaju veći rizik od nastanka prekomjerne antikoagulacije u odnosu na homozigote wt.
- Utvrđena je statistički značajna povezanost polimorfizama *VKORC1* -1639G>A i/ili 1173C>T te *CYP4F2*3* s nuspojavama terapije varfarinom u obliku krvarenja. Nositelji varijantnih alela *VKORC1* imaju veće izglede za pojavu krvarenja u odnosu na homozigote wt. Homozigoti varijantnih alela *VKORC1* imaju veće izglede i veći rizik za pojavu krvarenja, zatim veće izglede i rizik za nastanak neznatnih krvarenja i veće izglede za nastanak značajnih krvarenja u odnosu na homozigote wt. Nositelji

varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju veće izglede i veći rizik od pojave krvarenja te veće izglede i veći rizik za nastanak neznatnih krvarenja u odnosu na homozigote wt. Homozigoti varijantnog alela *CYP4F2*3* imaju veće izglede za nastanak neznatnih krvarenja u odnosu na homozigote wt.

7. PRILOZI

7.1. POPIS OZNAKA I KRATICA

ADR – nuspojava (engl. *adverse drug reaction*)

AF – atrijska fibrilacija

ApoE - apolipoprotein E

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

BSA – površina tijela (engl. *body surface area*)

CI – imterval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

CYP1A1 – natporodica citokroma P450, porodica 1, potporodica A, enzim 1

CYP1A2 – natporodica citokroma P450, porodica 1, potporodica A, enzim 2

CYP2C18 – natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 18

CYP2C19 – natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 19

CYP2C8 – natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 8

CYP2C9 – natporodica citokroma P450, porodica 2, potporodica C, enzim 9

CYP3A4 – natporodica citokroma P450, porodica 3, potporodica A, enzim 4

CYP4F2 – natporodica citokroma P450, porodica 4, potporodica F, enzim 2

DDD – dnevno definirana doza

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

DVT – duboka venska tromboza

EDTA – etilen diamino tetraoctena kiselina

EM – fenotip brzog metabolizma (engl. *extensive metabolizer*)

FIX – koagulacijski faktor IX

FRET – prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*)

FV – koagulacijski faktor V

FVII – koagulacijski faktor VII

FVIII – koagulacijski faktor VIII

FX – koagulacijski faktor X

FXI – koagulacijski faktor XI

FXII – koagulacijski faktor XII

FXIII – koagulacijski faktor XIII

GGCX – γ-glutamil karboksilaza

Gla – γ-karboksiglutaminska kiselina

Glu – glutamin

GWAS – istraživanje povezanosti unutar genoma (engl. *genome-wide association study*)

HK – kininogen velike molekulske mase

HR – omjer ugroženosti (engl. *hazard ratio*)

IM – fenotip srednjeg metabolizma (engl. *intermediate metabolizer*)

INR – međunarodni normalizirani omjer (engl. *international normalized ratio*)

IRR – omjer stopa incidencije (engl. *incidence rate ratio*)

ISI – međunarodni indeks osjetljivosti (engl. *international sensitivity index*)

IWDRC – međunarodna suradnja na prilagođavanju doze varfarina (engl. *International Warfarin Dose Refinement Collaboration*)

IWPC – međunarodni konzorcij za farmakogenetiku varfarina (engl. *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*)

LD – vezna neravnoteža (engl. *linkage disequilibrium*)

MAF – učestalost rjeđeg alela (engl. *minor allele frequency*)

MLR – višestruka linearna regresija (engl. *multiple linear regression*)

MNPT – srednje normalno protrombinsko vrijeme (engl. *mean normal prothrombin time*)

mut – homozigot varijantnog alela

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OA – prekomjerna antikoagulacija (engl. *overanticoagulation*)

OR – omjer izgleda (engl. *odds ratio*)

PE – plućna embolija

PK – prekalikrein

PM – fenotip sporog metabolizma (engl. *poor metabolizer*)

PV – protrombinsko vrijeme

RM1 - Regresijski model 1 (u multivarijatnoj analizi)

RM2 - Regresijski model 2 (u multivarijatnoj analizi)

RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*)

SNP – jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single nucleotide polymorphism*)

$t_{1/2}$ – poluvrijeme eliminacije, poluživot (engl. *half-life*)

TF – tkivni faktor

TFPI - inhibitor puta tkivnog faktora (engl. *tissue factor pathway inhibitor*)

TR – terapijski raspon (engl. *therapeutic range*)

TTR – vrijeme provedeno u terapijskom rasponu (engl. *time in therapeutic range*)

UEM – fenotip izrazito ubrzanog metabolizma (engl. *ultraextensive metabolizer*)

var – nositelj varijantnog alela

VK – vitamin K

VKH_2 – vitamin K hidrokinon

VKO – vitamin K 2,3-epoksid

VKOR – epoksid reduktaza ovisna o vitaminu K

VKORC1 – gen koji kodira podjedinicu 1 epoksid reduktaze ovisne o vitaminu K

VLDL – lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. *very low density lipoproteins*)

vs.- u usporedbi s (lat. i engl. *versus*)

VWF – von Wilebrand faktor

wt – alel divljeg tipa (engl. *wild type*)

ZPI – inhibitor proteaze ovisan o proteinu Z (engl. *Z-dependent protease inhibitor*)

7.2. LITERATURA

1. Weber W. Pharmacogenetics: Oxford University Press; 2008.
2. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. Br J Clin Pharmacol. 2001;52(4):345-7.
3. Hilal-Dandan R, Brunton L. Goodman and Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics, Second Edition: McGraw-Hill Education; 2013.
4. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale's Pharmacology. 8th ed: Elsevier Health Sciences UK; 2016.
5. Katzung B, Trevor A. Basic & Clinical Pharmacology. 13th ed: McGraw-Hill Education; 2014.
6. de Montellano PRO. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry: Springer International Publishing; 2015.
7. der Zee AHM, Daly AK. Pharmacogenetics and Individualized Therapy: Wiley; 2012.
8. Ingelman-Sundberg M. Drug-Metabolising Enzymes: Genetic Polymorphisms. eLS. 2011.
9. Licinio J, Wong ML. Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies: Wiley; 2009.
10. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. Circulation. 1959;19(1):97-107.
11. Oldenburg J, Marinova M, Muller-Reible C, Watzka M. The vitamin K cycle. Vitam Horm. 2008;78:35-62.
12. Yang J, Chen Y, Li X, Wei X, Chen X, Zhang L, et al. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes on the risk of hemorrhagic complications in warfarin-treated patients: A systematic review and meta-analysis. International journal of cardiology. 2013;168(4):4234-43.
13. Hoffbrand AV, Moss PAH. Hoffbrand's Essential Haematology: Wiley; 2015.
14. McKenzie SB. Clinical Laboratory Hematology: Pearson New International Edition: Pearson Education Limited; 2013.
15. Saba HI, Roberts HR. Hemostasis and thrombosis: practical guidelines in clinical management. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Inc.; 2014. p. p.
16. Keohane E, Smith L, Walenga J. Rodak's Hematology: Clinical Principles and Applications: Elsevier Health Sciences; 2015.
17. Marder VJ. Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013. xxiv, 1566 p. p.

18. Tie JK, Jin DY, Straight DL, Stafford DW. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. Blood. 2011;117(10):2967-74.
19. Suttie JW. Vitamin K in health and disease. Boca Raton: CRC Press; 2009. xi, 224 p. p.
20. Tie JK, Stafford DW. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. Vitam Horm. 2008;78:103-30.
21. Wallin R, Wajih N, Hutson SM. VKORC1: a warfarin-sensitive enzyme in vitamin K metabolism and biosynthesis of vitamin K-dependent blood coagulation factors. Vitam Horm. 2008;78:227-46.
22. Shearer MJ, Newman P. Metabolism and cell biology of vitamin K. Thromb Haemost. 2008;100(4):530-47.
23. McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. Mol Pharmacol. 2009;75(6):1337-46.
24. Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, et al. *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. Blood. 2008;111(8):4106-12.
25. Merli GJ, Fink J. Vitamin K and Thrombosis. 2008;78:265-79.
26. Lurie Y, Loebstein R, Kurnik D, Almog S, Halkin H. Warfarin and vitamin K intake in the era of pharmacogenetics. Br J Clin Pharmacol. 2010;70(2):164-70.
27. D'Andrea G, D'Ambrosio R, Margaglione M. Oral anticoagulants: Pharmacogenetics Relationship between genetic and non-genetic factors. Blood Rev. 2008;22(3):127-40.
28. Hammed A, Matagrin B, Spohn G, Prouillac C, Benoit E, Lattard V. VKORC1L1, an enzyme rescuing the vitamin K 2,3-epoxide reductase activity in some extrahepatic tissues during anticoagulation therapy. J Biol Chem. 2013;288(40):28733-42.
29. Tie JK, Stafford DW. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. J Thromb Haemost. 2016;14(2):236-47.
30. Wu S, Liu S, Davis CH, Stafford DW, Kulman JD, Pedersen LG. A hetero-dimer model for concerted action of vitamin K carboxylase and vitamin K reductase in vitamin K cycle. Journal of theoretical biology. 2011;279(1):143-9.
31. Božina N. The pharmacogenetics of warfarin in clinical practice. Biochemia Medica. 2010;20(1):33-44.
32. Supe S, Bozina N, Matijevic V, Bazina A, Mismas A, Ljevak J, et al. Prevalence of genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* - implications for warfarin management and

outcome in Croatian patients with acute stroke. Journal of the neurological sciences. 2014;343(1-2):30-5.

33. Moualla H, Garcia D. Vitamin K antagonists--current concepts and challenges. Thromb Res. 2011;128(3):210-5.

34. Ageno W, Gallus AS, Wittkowsky A, Crowther M, Hylek EM, Palareti G. Oral anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2012;141(2 Suppl):e44S-88S.

35. Verhoef TI, Redekop WK, Daly AK, van Schie RM, de Boer A, Maitland-van der Zee AH. Pharmacogenetic-guided dosing of coumarin anticoagulants: algorithms for warfarin, acenocoumarol and phenprocoumon. Br J Clin Pharmacol. 2014;77(4):626-41.

36. IMS Institute for Healthcare Informatics. The Use of Medicines in the United States: Review of 2011. QuintilesIMS Inc, Danbury, CT, SAD, 2012. [pristupljeno 24. 04. 2012.]

37. Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Ukupna potrošnja lijekova u 2015. godini. Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska, 2015. [pristupljeno 14. 10. 2016.]

38. Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, et al. ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for the management of patients with atrial fibrillation-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation). European heart journal. 2006;27(16):1979-2030.

39. Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. Ann Intern Med. 2007;146(12):857-67.

40. Hurlen M, Abdelnoor M, Smith P, Erikssen J, Arnesen H. Warfarin, aspirin, or both after myocardial infarction. N Engl J Med. 2002;347(13):969-74.

41. Kearon C, Gent M, Hirsh J, Weitz J, Kovacs MJ, Anderson DR, et al. A comparison of three months of anticoagulation with extended anticoagulation for a first episode of idiopathic venous thromboembolism. N Engl J Med. 1999;340(12):901-7.

42. Gage BF, Boechler M, Doggette AL, Fortune G, Flaker GC, Rich MW, et al. Adverse outcomes and predictors of underuse of antithrombotic therapy in medicare beneficiaries with chronic atrial fibrillation. Stroke; a journal of cerebral circulation. 2000;31(4):822-7.

43. Budincevic H, Bielen I. Anticoagulant therapy in stroke patients with atrial fibrillation: an assessment of routine clinical practice in parts of northwestern Croatia. Neurologia Croatica. 2005;54(Supplement 2).

44. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for *CYP2C9* and *VKORC1* genotypes and warfarin dosing. Clin Pharmacol Ther. 2011;90(4):625-9.

45. Klein K, Gueorguieva I, Aarons L. Population pharmacokinetic modelling of S-warfarin to evaluate the design of drug-drug interaction studies for CYP2C9. Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics. 2012;39(2):147-60.

46. Scaglione F. New oral anticoagulants: comparative pharmacology with vitamin K antagonists. Clin Pharmacokinet. 2013;52(2):69-82.

47. Ufer M. Comparative pharmacokinetics of vitamin K antagonists: warfarin, phenprocoumon and acenocoumarol. Clin Pharmacokinet. 2005;44(12):1227-46.

48. Maddison J, Somogyi AA, Jensen BP, James HM, Gentgall M, Rolan PE. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of single dose (R)- and (S)-warfarin administered separately and together: relationship to *VKORC1* genotype. Br J Clin Pharmacol. 2013;75(1):208-16.

49. Takahashi H, Echizen H. Pharmacogenetics of warfarin elimination and its clinical implications. Clin Pharmacokinet. 2001;40(8):587-603.

50. Levine M, Pizon AF, Padilla-Jones A, Ruha AM. Warfarin overdose: a 25-year experience. Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology. 2014;10(2):156-64.

51. Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, et al. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. Blood. 2008;112(4):1022-7.

52. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, et al. A genome-wide association study confirms *VKORC1*, *CYP2C9*, and *CYP4F2* as principal genetic determinants of warfarin dose. PLoS genetics. 2009;5(3):e1000433.

53. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, et al. Cytochrome P450 2C9-*CYP2C9*. Pharmacogenet Genomics. 2010;20(4):277-81.

54. Jarrar YB, Lee SJ. Molecular functionality of *CYP2C9* polymorphisms and their influence on drug therapy. Drug Metabol Drug Interact. 2014;29(4):211-20.

55. Zhou SF, Zhou ZW, Huang M. Polymorphisms of human cytochrome P450 2C9 and the functional relevance. Toxicology. 2010;278(2):165-88.

56. GeneCards - gen superobitelji citokroma P450, obitelji 2, podobitelji C, enzima 9 (*CYP2C9*), Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 2016 [pristupljeno 7. 11. 2016.].
57. The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database, The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee, 2016. [pristupljeno 4. 11. 2016.].
58. Reynolds KK, Valdes Jr R, Hartung BR, Linder MW. Individualizing warfarin therapy. Personalized Medicine. 2007;4(1):11-31.
59. Kadian-Dodov DL, van der Zee SA, Scott SA, Peter I, Martis S, Doheny DO, et al. Warfarin pharmacogenetics: a controlled dose-response study in healthy subjects. Vascular medicine. 2013;18(5):290-7.
60. Carlquist JF, Horne BD, Mower C, Park J, Huntinghouse J, McKinney JT, et al. An evaluation of nine genetic variants related to metabolism and mechanism of action of warfarin as applied to stable dose prediction. J Thromb Thrombolysis. 2010;30(3):358-64.
61. Jorgensen AL, Al-Zubiedi S, Zhang JE, Keniry A, Hanson A, Hughes DA, et al. Genetic and environmental factors determining clinical outcomes and cost of warfarin therapy: a prospective study. Pharmacogenet Genomics. 2009;19(10):800-12.
62. Jorgensen AL, FitzGerald RJ, Oyee J, Pirmohamed M, Williamson PR. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* on patient response to warfarin: a systematic review and meta-analysis. PloS one. 2012;7(8):e44064.
63. Zambon CF, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, et al. *VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP4F2* genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study. Pharmacogenomics. 2011;12(1):15-25.
64. 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.
65. GeneCards - gen podjedinice 1 kompleksa vitamin K ovisne epoksid reduktaze (*VKORC1*), Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 2016 [pristupljeno 7. 11. 2016.].
66. Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. Nature. 2004;427(6974):541-4.
67. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hortnagel K, Pelz HJ, et al. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. Nature. 2004;427(6974):537-41.
68. Oldenburg J, Watzka M, Bevans CG. VKORC1 and VKORC1L1: Why do Vertebrates Have Two Vitamin K 2,3-Epoxide Reductases? Nutrients. 2015;7(8):6250-80.

69. Geisen C, Watzka M, Sittinger K, Steffens M, Daugela L, Seifried E, et al. *VKORC1* haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnical variability of oral anticoagulation. Thromb Haemost. 2005;94(4):773-9.

70. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, et al. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. N Engl J Med. 2005;352(22):2285-93.

71. Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, et al. Common *VKORC1* and *GGCX* polymorphisms associated with warfarin dose. Pharmacogenomics J. 2005;5(4):262-70.

72. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghori J, Wadelius C, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. Hum Genet. 2007;121(1):23-34.

73. Becquemont L. Evidence for a pharmacogenetic adapted dose of oral anticoagulant in routine medical practice. Eur J Clin Pharmacol. 2008;64(10):953-60.

74. Oldenburg J, Watzka M, Rost S, Muller CR. VKORC1: molecular target of coumarins. J Thromb Haemost. 2007;5 Suppl 1:1-6.

75. Yin T, Miyata T. Warfarin dose and the pharmacogenomics of *CYP2C9* and *VKORC1* - rationale and perspectives. Thromb Res. 2007;120(1):1-10.

76. Lund K, Gaffney D, Spooner R, Etherington AM, Tansey P, Tait RC. Polymorphisms in *VKORC1* have more impact than *CYP2C9* polymorphisms on early warfarin International Normalized Ratio control and bleeding rates. Br J Haematol. 2012;158(2):256-61.

77. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. Blood. 2009;113(4):784-92.

78. Yang L, Ge W, Yu F, Zhu H. Impact of *VKORC1* gene polymorphism on interindividual and interethnic warfarin dosage requirement--a systematic review and meta analysis. Thromb Res. 2010;125(4):e159-66.

79. Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, et al. Warfarin pharmacogenetics: a single *VKORC1* polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups. Blood. 2010;115(18):3827-34.

80. Haug KB, Sharikabad MN, Kringen MK, Narum S, Sjaatil ST, Johansen PW, et al. Warfarin dose and INR related to genotypes of *CYP2C9* and *VKORC1* in patients with myocardial infarction. Thromb J. 2008;6:7.

81. Schelleman H, Chen Z, Kealey C, Whitehead AS, Christie J, Price M, et al. Warfarin response and vitamin K epoxide reductase complex 1 in African Americans and Caucasians. Clin Pharmacol Ther. 2007;81(5):742-7.

82. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, et al. The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. Blood. 2005;106(7):2329-33.

83. Mandic D, Mandic S, Horvat V, Samardzija M, Samardzija M. Vitamin K epoxide reductase complex 1 (*VKORC1*) gene polymorphisms in population of Eastern Croatia. Collegium antropologicum. 2013;37(4):1321-6.

84. Yuan HY, Chen JJ, Lee MT, Wung JC, Chen YF, Charng MJ, et al. A novel functional *VKORC1* promoter polymorphism is associated with inter-individual and inter-ethnic differences in warfarin sensitivity. Hum Mol Genet. 2005;14(13):1745-51.

85. Lee MT, Klein TE. Pharmacogenetics of warfarin: challenges and opportunities. J Hum Genet. 2013;58(6):334-8.

86. Wang D, Chen H, Momary KM, Cavallari LH, Johnson JA, Sadee W. Regulatory polymorphism in vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*VKORC1*) affects gene expression and warfarin dose requirement. Blood. 2008;112(4):1013-21.

87. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, et al. A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. Blood. 2005;105(2):645-9.

88. Moyer TP, O'Kane DJ, Baudhuin LM, Wiley CL, Fortini A, Fisher PK, et al. Warfarin sensitivity genotyping: a review of the literature and summary of patient experience. Mayo Clinic proceedings Mayo Clinic. 2009;84(12):1079-94.

89. Siguret V, Pautas E, Gouin-Thibault I. Warfarin therapy: influence of pharmacogenetic and environmental factors on the anticoagulant response to warfarin. Vitam Horm. 2008;78:247-64.

90. Zhu Y, Shennan M, Reynolds KK, Johnson NA, Herrnberger MR, Valdes R, Jr., et al. Estimation of warfarin maintenance dose based on *VKORC1* (-1639 G>A) and *CYP2C9* genotypes. Clin Chem. 2007;53(7):1199-205.

91. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. N Engl J Med. 2008;358(10):999-1008.

92. Ozer N, Cam N, Tangurek B, Ozer S, Uyarel H, Oz D, et al. The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements in an adult Turkish population. Heart and vessels. 2010;25(2):155-62.
93. Schalekamp T, Brasse BP, Roijers JF, van Meegen E, van der Meer FJ, van Wijk EM, et al. *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes and phenprocoumon anticoagulation status: interaction between both genotypes affects dose requirement. Clin Pharmacol Ther. 2007;81(2):185-93.
94. Teh LK, Langmia IM, Fazleen Haslinda MH, Ngow HA, Roziah MJ, Harun R, et al. Clinical relevance of *VKORC1* (G-1639A and C1173T) and *CYP2C9**3 among patients on warfarin. J Clin Pharm Ther. 2012;37(2):232-6.
95. GeneCards - gen superobitelji citokroma P450, obitelji 4, podobitelji F, enzima 2 (*CYP4F2*), Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 2016 [pristupljeno 7. 11. 2016.].
96. Edson KZ, Prasad B, Unadkat JD, Suhara Y, Okano T, Guengerich FP, et al. Cytochrome P450-dependent catabolism of vitamin K: omega-hydroxylation catalyzed by human *CYP4F2* and *CYP4F11*. Biochemistry. 2013;52(46):8276-85.
97. Wypasek E, Branicka A, Awsiuk M, Sadowski J, Undas A. Genetic determinants of acenocoumarol and warfarin maintenance dose requirements in Slavic population: a potential role of *CYP4F2* and *GGCX* polymorphisms. Thromb Res. 2014;134(3):604-9.
98. Liang R, Wang C, Zhao H, Huang J, Hu D, Sun Y. Influence of *CYP4F2* genotype on warfarin dose requirement-a systematic review and meta-analysis. Thromb Res. 2012;130(1):38-44.
99. Danese E, Montagnana M, Johnson JA, Rettie AE, Zambon CF, Lubitz SA, et al. Impact of the *CYP4F2* p.V433M polymorphism on coumarin dose requirement: systematic review and meta-analysis. Clin Pharmacol Ther. 2012;92(6):746-56.
100. Hirai K, Yamada Y, Hayashi H, Tanaka M, Izumiya K, Suzuki M, et al. Plasma vitamin K concentrations depend on *CYP4F2* polymorphism and influence on anticoagulation in Japanese patients with warfarin therapy. Thromb Res. 2015;135(5):861-6.
101. Dashti HS, Shea MK, Smith CE, Tanaka T, Hruby A, Richardson K, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies for circulating phylloquinone concentrations. Am J Clin Nutr. 2014;100(6):1462-9.
102. Mazzaccara C, Conti V, Liguori R, Simeon V, Toriello M, Severini A, et al. Warfarin anticoagulant therapy: a Southern Italy pharmacogenetics-based dosing model. PloS one. 2013;8(8):e71505.
103. Tatarunas V, Lesauskaite V, Veikutiene A, Grybauskas P, Jakuska P, Jankauskiene L, et al. The effect of *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* polymorphism and of clinical factors on

warfarin dosage during initiation and long-term treatment after heart valve surgery. J Thromb Thrombolysis. 2013.

104. Roth JA, Boudreau D, Fujii MM, Farin FM, Rettie AE, Thummel KE, et al. Genetic risk factors for major bleeding in patients treated with warfarin in a community setting. Clin Pharmacol Ther. 2014;95(6):636-43.

105. Nahar R, Saxena R, Deb R, Parakh R, Shad S, Sethi PK, et al. *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2*, *ABCB1* and F5 variants: influence on quality of long-term anticoagulation. Pharmacological reports : PR. 2014;66(2):243-9.

106. Bejarano-Achache I, Levy L, Mlynarsky L, Bialer M, Muszkat M, Caraco Y. Effects of *CYP4F2* polymorphism on response to warfarin during induction phase: a prospective, open-label, observational cohort study. Clin Ther. 2012;34(4):811-23.

107. Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ. Combined *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* frequencies among racial and ethnic groups. Pharmacogenomics. 2010;11(6):781-91.

108. GeneCards - gen gama glutamil karboksilaze (*GGCX*), Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, 2016 [pristupljeno 7. 11. 2016.].

109. Bandyopadhyay PK. Vitamin K-Dependent γ-Glutamylcarboxylation: An Ancient Posttranslational Modification. 2008;78:157-84.

110. Sun Y, Wu Z, Li S, Qin X, Li T, Xie L, et al. Impact of gamma-glutamyl carboxylase gene polymorphisms on warfarin dose requirement: a systematic review and meta-analysis. Thromb Res. 2015;135(4):739-47.

111. Suttie JW. Vitamin K-dependent carboxylase. Annual review of biochemistry. 1985;54:459-77.

112. King CR, Deych E, Milligan P, Eby C, Lenzini P, Grice G, et al. Gamma-glutamyl carboxylase and its influence on warfarin dose. Thromb Haemost. 2010;104(4):750-4.

113. Schelleman H, Brensinger CM, Chen J, Finkelman BS, Rieder MJ, Kimmel SE. New genetic variant that might improve warfarin dose prediction in African Americans. Br J Clin Pharmacol. 2010;70(3):393-9.

114. Rieder MJ, Reiner AP, Rettie AE. Gamma-glutamyl carboxylase (*GGCX*) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. J Thromb Haemost. 2007;5(11):2227-34.

115. Lubitz SA, Scott SA, Rothlauf EB, Agarwal A, Peter I, Doheny D, et al. Comparative performance of gene-based warfarin dosing algorithms in a multiethnic population. J Thromb Haemost. 2010;8(5):1018-26.

116. Krishna Kumar D, Shewade DG, Loriot MA, Beaune P, Balachander J, Sai Chandran BV, et al. Effect of *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* and *GGCX* genetic variants on warfarin maintenance dose and explicating a new pharmacogenetic algorithm in South Indian population. Eur J Clin Pharmacol. 2014;70(1):47-56.

117. Rathore SS, Agarwal SK, Pande S, Singh SK, Mittal T, Mittal B. *CYP4F2* 1347 G > A & *GGCX* 12970 C > G polymorphisms: frequency in north Indians & their effect on dosing of acenocoumarol oral anticoagulant. Indian J Med Res. 2014;139(4):572-8.

118. Voora D, Koboldt DC, King CR, Lenzini PA, Eby CS, Porche-Sorbet R, et al. A polymorphism in the *VKORC1* regulator calumenin predicts higher warfarin dose requirements in African Americans. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(4):445-51.

119. Daly AK. Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms. Arch Toxicol. 2013;87(3):407-20.

120. Kimmel SE, Christie J, Kealey C, Chen Z, Price M, Thorn CF, et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. Pharmacogenomics J. 2008;8(1):53-60.

121. Sconce EA, Daly AK, Khan TI, Wynne HA, Kamali F. APOE genotype makes a small contribution to warfarin dose requirements. Pharmacogenet Genomics. 2006;16(8):609-11.

122. Zhang X, Li L, Ding X, Kaminsky LS. Identification of cytochrome P450 oxidoreductase gene variants that are significantly associated with the interindividual variations in warfarin maintenance dose. Drug Metab Dispos. 2011;39(8):1433-9.

123. Pirmohamed M. Drug-drug interactions and adverse drug reactions: separating the wheat from the chaff. Wiener klinische Wochenschrift. 2010;122(3-4):62-4.

124. Pirmohamed M, James S, Meakin S, Green C, Scott AK, Walley TJ, et al. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. BMJ. 2004;329(7456):15-9.

125. Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M, et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. Arch Intern Med. 2005;165(10):1095-106.

126. Anthony M, Romero K, Malone DC, Hines LE, Higgins L, Woosley RL. Warfarin interactions with substances listed in drug information compendia and in the FDA-approved label for warfarin sodium. Clin Pharmacol Ther. 2009;86(4):425-9.

127. Greenblatt DJ, von Moltke LL. Interaction of warfarin with drugs, natural substances, and foods. J Clin Pharmacol. 2005;45(2):127-32.

128. Coumadin Full Prescribing Information, Bristol-Myers Squibb Company, Princeton, NJ, SAD, 2016 [pristupljeno 11. 11. 2016.].
129. Nutescu E, Chuatrisorn I, Hellenbart E. Drug and dietary interactions of warfarin and novel oral anticoagulants: an update. J Thromb Thrombolysis. 2011;31(3):326-43.
130. Martefarin - sažetak opisa svojstava lijeka, Agencija za lijekove i medicinske proizvode, Zagreb, Hrvatska, 2016 [pristupljeno 21. 10. 2016].
131. Jonas DE, McLeod HL. Genetic and clinical factors relating to warfarin dosing. Trends in pharmacological sciences. 2009;30(7):375-86.
132. Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. Thromb Haemost. 2004;91(1):87-94.
133. Wu AHB. Use of genetic and nongenetic factors in warfarin dosing algorithms. Pharmacogenomics. 2007;8(7):851-61.
134. Garcia D, Regan S, Crowther M, Hughes RA, Hylek EM. Warfarin maintenance dosing patterns in clinical practice: implications for safer anticoagulation in the elderly population. Chest. 2005;127(6):2049-56.
135. Rubboli A, Becattini C, Verheugt FW. Incidence, clinical impact and risk of bleeding during oral anticoagulation therapy. World journal of cardiology. 2011;3(11):351-8.
136. Rauch U. Gender differences in anticoagulation and antithrombotic therapy. Handbook of experimental pharmacology. 2012(214):523-42.
137. Mueller JA, Patel T, Halawa A, Dumitrascu A, Dawson NL. Warfarin dosing and body mass index. Ann Pharmacother. 2014;48(5):584-8.
138. Wallace JL, Reaves AB, Tolley EA, Oliphant CS, Hutchison L, Alabdan NA, et al. Comparison of initial warfarin response in obese patients versus non-obese patients. J Thromb Thrombolysis. 2013;36(1):96-101.
139. Nathisuwan S, Dilokthornsakul P, Chaiyakunapruk N, Morarai T, Yodting T, Piriyachananusorn N. Assessing evidence of interaction between smoking and warfarin: a systematic review and meta-analysis. Chest. 2011;139(5):1130-9.
140. Bourgeois S, Jorgensen A, Zhang EJ, Hanson A, Gillman MS, Bumpstead S, et al. A multi-factorial analysis of response to warfarin in a UK prospective cohort. Genome medicine. 2016;8(1):2.
141. Razouki Z, Ozonoff A, Zhao S, Rose AJ. Pathways to poor anticoagulation control. J Thromb Haemost. 2014;12(5):628-34.

142. Roth JA, Bradley K, Thummel KE, Veenstra DL, Boudreau D. Alcohol misuse, genetics, and major bleeding among warfarin therapy patients in a community setting. Pharmacoepidemiology and drug safety. 2015;24(6):619-27.
143. Rouleau-Mailloux E, Shahabi P, Dumas S, Feroz Zada Y, Provost S, Hu J, et al. Impact of regular physical activity on weekly warfarin dose requirement. J Thromb Thrombolysis. 2015.
144. Park JN, Lee JS, Noh MY, Sung MK. Association Between Usual Vitamin K Intake and Anticoagulation in Patients Under Warfarin Therapy. Clinical nutrition research. 2015;4(4):235-41.
145. Dentali F, Crowther M, Galli M, Pomero F, Garcia D, Clark N, et al. Effect of Vitamin K Intake on the Stability of Treatment with Vitamin K Antagonists: A Systematic Review of the Literature. Seminars in thrombosis and hemostasis. 2016;42(6):671-81.
146. Violi F, Lip GY, Pignatelli P, Pastori D. Interaction Between Dietary Vitamin K Intake and Anticoagulation by Vitamin K Antagonists: Is It Really True?: A Systematic Review. Medicine. 2016;95(10):e2895.
147. Bonar R, Favaloro EJ, Adcock DM. Quality in coagulation and haemostasis testing. Biochemia Medica. 2010;20(2):184-99.
148. Fihn SD, McDonell M, Martin D, Henikoff J, Vermes D, Kent D, et al. Risk factors for complications of chronic anticoagulation. A multicenter study. Warfarin Optimized Outpatient Follow-up Study Group. Ann Intern Med. 1993;118(7):511-20.
149. Mehran R, Rao SV, Bhatt DL, Gibson CM, Caixeta A, Eikelboom J, et al. Standardized bleeding definitions for cardiovascular clinical trials: a consensus report from the Bleeding Academic Research Consortium. Circulation. 2011;123(23):2736-47.
150. Schulman S, Kearon C, Subcommittee on Control of Anticoagulation of the S, Standardization Committee of the International Society on T, Haemostasis. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. J Thromb Haemost. 2005;3(4):692-4.
151. Kawai VK, Cunningham A, Vear SI, Van Driest SL, Oginni A, Xu H, et al. Genotype and risk of major bleeding during warfarin treatment. Pharmacogenomics. 2014;15(16):1973-83.
152. Nazarian RM, Van Cott EM, Zembowicz A, Duncan LM. Warfarin-induced skin necrosis. Journal of the American Academy of Dermatology. 2009;61(2):325-32.

153. Pathare A, Al Khabori M, Alkindi S, Al Zadjali S, Misquith R, Khan H, et al. Warfarin pharmacogenetics: development of a dosing algorithm for Omani patients. J Hum Genet. 2012;57(10):665-9.
154. Witt DM. Quality measures and benchmarking for warfarin therapy. J Thromb Thrombolysis. 2011;31(3):242-8.
155. Holbrook A, Schulman S, Witt DM, Vandvik PO, Fish J, Kovacs MJ, et al. Evidence-based management of anticoagulant therapy: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest. 2012;141(2 Suppl):e152S-84S.
156. Baker WL, Johnson SG. Pharmacogenetics and oral antithrombotic drugs. Current opinion in pharmacology. 2016;27:38-42.
157. Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, et al. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. N Engl J Med. 2013;369(24):2283-93.
158. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, et al. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. N Engl J Med. 2013;369(24):2294-303.
159. Schwarz UI. Genotype-guided dosing of vitamin K antagonists. N Engl J Med. 2014;370(18):1763-4.
160. Belley-Cote EP, Hanif H, D'Aragon F, Eikelboom JW, Anderson JL, Borgman M, et al. Genotype-guided versus standard vitamin K antagonist dosing algorithms in patients initiating anticoagulation. A systematic review and meta-analysis. Thromb Haemost. 2015;114(4):768-77.
161. Shi C, Yan W, Wang G, Wang F, Li Q, Lin N. Pharmacogenetics-Based versus Conventional Dosing of Warfarin: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. PloS one. 2015;10(12):e0144511.
162. Tang HL, Shi WL, Li XG, Zhang T, Zhai SD, Xie HG. Limited clinical utility of genotype-guided warfarin initiation dosing algorithms versus standard therapy: a meta-analysis and trial sequential analysis of 11 randomized controlled trials. Pharmacogenomics J. 2015;15(6):496-504.
163. Wang ZQ, Zhang R, Zhang PP, Liu XH, Sun J, Wang J, et al. Pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithm decreases time to stable anticoagulation and the risk of major hemorrhage: an updated meta-analysis of randomized controlled trials. Journal of cardiovascular pharmacology. 2015;65(4):364-70.

164. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. Circulation. 2007;116(22):2563-70.

165. Borgman MP, Pendleton RC, McMillin GA, Reynolds KK, Vazquez S, Freeman A, et al. Prospective pilot trial of PerMIT versus standard anticoagulation service management of patients initiating oral anticoagulation. Thromb Haemost. 2012;108(3):561-9.

166. Schmitt L, Speckman J, Ansell J. Quality assessment of anticoagulation dose management: comparative evaluation of measures of time-in-therapeutic range. J Thromb Thrombolysis. 2003;15(3):213-6.

167. Fihn SD, Callahan CM, Martin DC, McDonell MB, Henikoff JG, White RH. The risk for and severity of bleeding complications in elderly patients treated with warfarin. The National Consortium of Anticoagulation Clinics. Ann Intern Med. 1996;124(11):970-9.

168. Rasmussen MA, Skov J, Bladbjerg EM, Sidelmann JJ, Vamosi M, Jespersen J. Multivariate analysis of the relation between diet and warfarin dose. Eur J Clin Pharmacol. 2012;68(3):321-8.

169. Aquilante CL, Langaee TY, Lopez LM, Yarandi HN, Tromberg JS, Mohuczy D, et al. Influence of coagulation factor, vitamin K epoxide reductase complex subunit 1, and cytochrome P450 2C9 gene polymorphisms on warfarin dose requirements. Clin Pharmacol Ther. 2006;79(4):291-302.

170. Booth S, Sadowski J, Weihrauch J, Ferland G. Vitamin K1 (Phylloquinone) Content of Foods: A Provisional Table. Journal of Food Composition and Analysis. 1993;6:109-.

171. Morisky DE, Green LW, Levine DM. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication adherence. Medical care. 1986;24(1):67-74.

172. Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(3):326-31.

173. Khoury G, Sheikh-Taha M. Effect of age and sex on warfarin dosing. Clinical pharmacology : advances and applications. 2014;6:103-6.

174. Burmester JK, Berg RL, Yale SH, Rottscheit CM, Glurich IE, Schmelzer JR, et al. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. Genet Med. 2011;13(6):509-18.

175. Huang SW, Chen HS, Wang XQ, Huang L, Xu DL, Hu XJ, et 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.

176. Herman D, Peternel P, Stegnar M, Breskvar K, Dolzan V. The influence of sequence variations in factor VII, gamma-glutamyl carboxylase and vitamin K epoxide reductase complex genes on warfarin dose requirement. Thromb Haemost. 2006;95(5):782-7.
177. Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. N Engl J Med. 2009;360(8):753-64.
178. Lenzini P, Wadelius M, Kimmel S, Anderson JL, Jorgensen AL, Pirmohamed M, et al. Integration of genetic, clinical, and INR data to refine warfarin dosing. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(5):572-8.
179. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E, Santana IS, Rangel F, Ojopi EB, et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for brazilian patients. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(6):722-8.
180. Wells PS, Majeed H, Kassem S, Langlois N, Gin B, Clermont J, et al. A regression model to predict warfarin dose from clinical variables and polymorphisms in *CYP2C9*, *CYP4F2*, and *VKORC1*: Derivation in a sample with predominantly a history of venous thromboembolism. Thromb Res. 2010;125(6):e259-64.
181. Jonas DE, Evans JP, McLeod HL, Brode S, Lange LA, Young ML, et al. Impact of genotype-guided dosing on anticoagulation visits for adults starting warfarin: a randomized controlled trial. Pharmacogenomics. 2013;14(13):1593-603.
182. James AH, Britt RP, Raskino CL, Thompson SG. Factors affecting the maintenance dose of warfarin. Journal of clinical pathology. 1992;45(8):704-6.
183. Obayashi K, Nakamura K, Kawana J, Ogata H, Hanada K, Kurabayashi M, et al. *VKORC1* gene variations are the major contributors of variation in warfarin dose in Japanese patients. Clin Pharmacol Ther. 2006;80(2):169-78.
184. Wadelius M, Sorlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PKE, et al. Warfarin sensitivity related to *CYP2C9*, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. Pharmacogenomics J. 2004;4(1):40-8.
185. Avery PJ, Jorgensen A, Hamberg AK, Wadelius M, Pirmohamed M, Kamali F. A proposal for an individualized pharmacogenetics-based warfarin initiation dose regimen for patients commencing anticoagulation therapy. Clin Pharmacol Ther. 2011;90(5):701-6.
186. Gong IY, Tirona RG, Schwarz UI, Crown N, Dresser GK, Larue S, et al. Prospective evaluation of a pharmacogenetics-guided warfarin loading and maintenance dose regimen for initiation of therapy. Blood. 2011;118(11):3163-71.

187. Wu AHB, Wang P, Smith A, Haller C, Drake K, Linder M, et al. Dosing algorithm for warfarin using *CYP2C9* and *VKORC1* genotyping from a multi-ethnic population: comparison with other equations. Pharmacogenomics. 2008;9(2):169-78.

188. Cini M, Legnani C, Cosmi B, Guazzaloca G, Valdre L, Frascaro M, et al. A new warfarin dosing algorithm including *VKORC1* 3730 G > A polymorphism: comparison with results obtained by other published algorithms. Eur J Clin Pharmacol. 2012;68(8):1167-74.

189. Weiner B, Faraci PA, Fayad R, Swanson L. Warfarin dosage following prosthetic valve replacement: effect of smoking history. Drug intelligence & clinical pharmacy. 1984;18(11):904-6.

190. Whitley HP, Fermo JD, Chumney EC, Brzezinski WA. Effect of patient-specific factors on weekly warfarin dose. Therapeutics and clinical risk management. 2007;3(3):499-504.

191. Cropp JS, Bussey HI. A review of enzyme induction of warfarin metabolism with recommendations for patient management. Pharmacotherapy. 1997;17(5):917-28.

192. Shendre A, Beasley TM, Brown TM, Hill CE, Arnett DK, Limdi NA. Influence of regular physical activity on warfarin dose and risk of hemorrhagic complications. Pharmacotherapy. 2014;34(6):545-54.

193. Kim YE, Woo HI, On YK, Kim JS, Lee SY. High intra- and inter-individual variability of plasma vitamin K concentrations in patients with atrial fibrillation under warfarin therapy. European journal of clinical nutrition. 2015;69(6):703-6.

194. Custodio das Dores SM, Booth SL, Martini LA, de Carvalho Gouvea VH, Padovani CR, de Abreu Maffei FH, et al. Relationship between diet and anticoagulant response to warfarin: a factor analysis. Eur J Nutr. 2007;46(3):147-54.

195. You JH, Wong RS, Waye MM, Mu Y, Lim CK, Choi KC, et al. Warfarin dosing algorithm using clinical, demographic and pharmacogenetic data from Chinese patients. J Thromb Thrombolysis. 2011;31(1):113-8.

196. Khan T, Wynne H, Wood P, Torrance A, Hankey C, Avery P, et al. Dietary vitamin K influences intra-individual variability in anticoagulant response to warfarin. Br J Haematol. 2004;124(3):348-54.

197. Kabagambe EK, Beasley TM, Limdi NA. Vitamin K intake, body mass index and warfarin maintenance dose. Cardiology. 2013;126(4):214-8.

198. Saito R, Takeda K, Yamamoto K, Nakagawa A, Aoki H, Fujibayashi K, et al. Nutri-pharmacogenomics of warfarin anticoagulation therapy: *VKORC1* genotype-dependent influence of dietary vitamin K intake. J Thromb Thrombolysis. 2013.

199. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. Lancet. 1999;353(9154):717-9.

200. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappe DL, Whiting BM, Kolek MJ, et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, *CYP2C9*, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. J Thromb Thrombolysis. 2006;22(3):191-7.

201. Gaikwad T, Ghosh K, Kulkarni B, Kulkarni V, Ross C, Shetty S. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* gene polymorphisms on warfarin dosage, over anticoagulation and other adverse outcomes in Indian population. European journal of pharmacology. 2013;710(1-3):80-4.

202. Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanh SL, Farin FM, et al. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. Jama. 2002;287(13):1690-8.

203. Limdi NA, Wiener H, Goldstein JA, Acton RT, Beasley TM. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* on warfarin response during initiation of therapy. Blood cells, molecules & diseases. 2009;43(1):119-28.

204. 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;65(4):365-75.

205. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. Thromb Haemost. 2000;84(5):775-8.

206. Meckley LM, Wittkowsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. An analysis of the relative effects of *VKORC1* and *CYP2C9* variants on anticoagulation related outcomes in warfarin-treated patients. Thromb Haemost. 2008;100(2):229-39.

207. Bozina N, Granic P, Lalic Z, Tramisak I, Lovric M, Stavljenic-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: *CYP2C9*, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. Croat Med J. 2003;44(4):425-8.

208. Topic E, Stefanovic M, Samardzija M. Association between the *CYP2C9* polymorphism and the drug metabolism phenotype. Clin Chem Lab Med. 2004;42(1):72-8.

209. Samardzija M, Topic E, Stefanovic M, Zibar L, Samardzija G, Balen S, et al. Association of *CYP2C9* gene polymorphism with bleeding as a complication of warfarin therapy. Collegium antropologicum. 2008;32(2):557-64.

210. Krajciova L, Petrovic R, Deziova L, Chandoga J, Turcani P. Frequency of selected single nucleotide polymorphisms influencing the warfarin pharmacogenetics in Slovak population. Eur J Haematol. 2014;93(4):320-8.

211. Limdi NA, Beasley TM, Crowley MR, Goldstein JA, Rieder MJ, Flockhart DA, et al. *VKORC1* polymorphisms, haplotypes and haplotype groups on warfarin dose among African-Americans and European-Americans. Pharmacogenomics. 2008;9(10):1445-58.

212. Limdi NA, McGwin G, Goldstein JA, Beasley TM, Arnett DK, Adler BK, et al. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. Clin Pharmacol Ther. 2008;83(2):312-21.

213. Zhang JE, Jorgensen AL, Alfirevic A, Williamson PR, Toh CH, Park BK, et al. Effects of *CYP4F2* genetic polymorphisms and haplotypes on clinical outcomes in patients initiated on warfarin therapy. Pharmacogenet Genomics. 2009;19(10):781-9.

214. Perini JA, Struchiner CJ, Silva-Assuncao E, Suarez-Kurtz G. Impact of *CYP4F2* rs2108622 on the stable warfarin dose in an admixed patient cohort. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(4):417-20.

215. Pautas E, Moreau C, Gouin-Thibault I, Golmard JL, Mahe I, Legendre C, et al. Genetic factors (*VKORC1*, *CYP2C9*, *EPHX1*, and *CYP4F2*) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. Clin Pharmacol Ther. 2010;87(1):57-64.

216. Shendre A, Brown TM, Liu N, Hill CE, Beasley TM, Nickerson DA, et al. Race-Specific Influence of *CYP4F2* on Dose and Risk of Hemorrhage Among Warfarin Users. Pharmacotherapy. 2016;36(3):263-72.

217. Ramirez AH, Shi Y, Schildcrout JS, Delaney JT, Xu H, Oetjens MT, et al. Predicting warfarin dosage in European-Americans and African-Americans using DNA samples linked to an electronic health record. Pharmacogenomics. 2012;13(4):407-18.

218. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 *CYP2C9* polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. Blood. 2000;96(5):1816-9.

219. Redman AR, Zheng J, Shamsi SA, Huo J, Kelly EJ, Ho RJY, et al. Variant *CYP2C9* alleles and warfarin concentrations in patients receiving low-dose versus average-dose warfarin therapy. Clin Appl Thromb Hemost. 2008;14(1):29-37.

220. Vecsler M, Loebstein R, Almog S, Kurnik D, Goldman B, Halkin H, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-

carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. Thromb Haemost. 2006;95(2):205-11.

221. Voora D, Eby C, Linder MW, Milligan PE, Bukaveckas BL, McLeod HL, et al. Prospective dosing of warfarin based on cytochrome P-450 2C9 genotype. Thromb Haemost. 2005;93(4):700-5.

222. Kealey C, Chen Z, Christie J, Thorn CF, Whitehead AS, Price M, et al. Warfarin and cytochrome P450 2C9 genotype: possible ethnic variation in warfarin sensitivity. Pharmacogenomics. 2007;8(3):217-25.

223. Limdi NA, Arnett DK, Goldstein JA, Beasley TM, McGwin G, Adler BK, et al. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* on warfarin dose, anticoagulation attainment and maintenance among European-Americans and African-Americans. Pharmacogenomics. 2008;9(5):511-26.

224. Finkelman BS, French B, Bershaw L, Kimmel SE. Factors affecting time to maintenance dose in patients initiating warfarin. Pharmacoepidemiology and drug safety. 2015;24(3):228-36.

225. Hylek EM. Vitamin K antagonists and time in the therapeutic range: implications, challenges, and strategies for improvement. J Thromb Thrombolysis. 2013;35(3):333-5.

226. Skov J, Bladbjerg EM, Leppin A, Jespersen J. The influence of *VKORC1* and *CYP2C9* gene sequence variants on the stability of maintenance phase warfarin treatment. Thromb Res. 2013;131(2):125-9.

227. Quteineh L, Verstuyft C, Descot C, Dubert L, Robert A, Jaillon P, et al. Vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) genetic polymorphism is associated to oral anticoagulant overdose. Thromb Haemost. 2005;94(3):690-1.

228. Valentin, II, Rivera G, Nieves-Plaza M, Cruz I, Renta JY, Cadilla CL, et al. Pharmacogenetic association study of warfarin safety endpoints in Puerto Ricans. Puerto Rico health sciences journal. 2014;33(3):97-104.

229. Shaw K, Amstutz U, Hildebrand C, Rassekh SR, Hosking M, Neville K, et al. *VKORC1* and *CYP2C9* genotypes are predictors of warfarin-related outcomes in children. Pediatr Blood Cancer. 2014;61(6):1055-62.

230. Sridharan K, Modi T, Bendkhale S, Kulkarni D, Gogtay NJ, Thatte UM. Association of Genetic Polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* with Bleeding Following Warfarin: A Case-Control Study. Curr Clin Pharmacol. 2016;11(1):62-8.

231. Misasi S, Martini G, Paoletti O, Calza S, Scovoli G, Marengoni A, et al. *VKORC1* and *CYP2C9* polymorphisms related to adverse events in case-control cohort of anticoagulated patients. Medicine. 2016;95(52):e5451.

232. Mega JL, Walker JR, Ruff CT, Vandell AG, Nordio F, Deenadayalu N, et al. Genetics and the clinical response to warfarin and edoxaban: findings from the randomised, double-blind ENGAGE AF-TIMI 48 trial. The Lancet. 2015;385(9984):2280-7.

233. Ma C, Zhang Y, Xu Q, Yang J, Zhang Y, Gao L, et al. Influence of warfarin dose-associated genotypes on the risk of hemorrhagic complications in Chinese patients on warfarin. Int J Hematol. 2012;96(6):719-28.

234. Tomek A, Matoska V, Kolarova T, Neumann J, Sramek M, Sarbochova I, et al. The bleeding risk during warfarin therapy is associated with the number of variant alleles of *CYP2C9* and *VKORC1* genes. Cardiology. 2013;125(3):182-91.

235. Eriksson N, Wallentin L, Berglund L, Axelsson T, Connolly S, Eikelboom J, et al. Genetic determinants of warfarin maintenance dose and time in therapeutic treatment range: a RE-LY genomics substudy. Pharmacogenomics. 2016;17(13):1425-39.

236. Reitsma PH, van der Heijden JF, Groot AP, Rosendaal FR, Buller HR. A C1173T dimorphism in the *VKORC1* gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk. PLoS Med. 2005;2(10):e312.

237. Jimenez-Varo E, Canadas-Garre M, Henriques CI, Pinheiro AM, Gutierrez-Pimentel MJ, Calleja-Hernandez MA. Pharmacogenetics role in the safety of acenocoumarol therapy. Thromb Haemost. 2014;112(3):522-36.

238. Hawcutt DB, Ghani AA, Sutton L, Jorgensen A, Zhang E, Murray M, et al. Pharmacogenetics of warfarin in a paediatric population: time in therapeutic range, initial and stable dosing and adverse effects. Pharmacogenomics J. 2014;14(6):542-8.

239. An SH, Lee KE, Chang BC, Gwak HS. Association of gene polymorphisms with the risk of warfarin bleeding complications at therapeutic INR in patients with mechanical cardiac valves. J Clin Pharm Ther. 2014;39(3):314-8.

240. Witt DM, Clark NP, Kaatz S, Schnurr T, Ansell JE. Guidance for the practical management of warfarin therapy in the treatment of venous thromboembolism. J Thromb Thrombolysis. 2016;41(1):187-205.

241. Reiffel JA, Weitz JI, Reilly P, Kaminskas E, Sarich T, Sager P, et al. NOAC monitoring, reversal agents, and post-approval safety and effectiveness evaluation: A cardiac safety research consortium think tank. American heart journal. 2016;177:74-86.

242. Ezekowitz MD, Nagarakanti R, Noack H, Brueckmann M, Litherland C, Jacobs M, et al. Comparison of Dabigatran and Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation and Valvular Heart Disease: The RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulant Therapy). Circulation. 2016;134(8):589-98.
243. Skaistis J, Tagami T. Risk of Fatal Bleeding in Episodes of Major Bleeding with New Oral Anticoagulants and Vitamin K Antagonists: A Systematic Review and Meta-Analysis. PloS one. 2015;10(9):e0137444.
244. Lin L, Lim WS, Zhou HJ, Khoo AL, Tan KT, Chew AP, et al. Clinical and Safety Outcomes of Oral Antithrombotics for Stroke Prevention in Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Network Meta-analysis. Journal of the American Medical Directors Association. 2015.
245. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, et al. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. The Lancet. 2014;383(9921):955-62.
246. Garcia DA. Patients with stable, therapeutic INR values should remain on warfarin. J Thromb Thrombolysis. 2013;35(3):336-8.
247. Wu AHB. Pharmacogenomic testing and response to warfarin. The Lancet. 2015;385(9984):2231-2.

ŽIVOTOPIS AUTORA

Dario Mandić rođen je 15. srpnja 1972. godine u Osijeku. Osnovnu školu pohađa u Orahovici. U Osijeku 1991. godine završava srednjoškolsko obrazovanje u Školskom centru „Ruđer Bošković“ i stječe zvanje zdravstveno laboratorijskog tehničara. Iste godine upisuje Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje diplomira 1998. godine i stječe naslov diplomiranog inženjera medicinske biokemije (izjednačeno s magistrom medicinske biokemije). Pripravnički staž odrađuje u razdoblju 1999. - 2000. godine na Odjelu za medicinsku biokemiju Kliničke bolnice Osijek. Stručni ispit za magistre medicinske biokemije polaže 2000. godine i dobiva odobrenje za samostalan rad. Specijalizaciju iz analitičke toksikologije započinje 2004. godine, a 2007. godine polaže specijalistički ispit. Poslijediplomski studij na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2005. godine.

Od 2000. do 2007. godine radi u Zavodu za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije na Službi za zdravstvenu ekologiju kao stručni suradnik - analitičar. Od 2007. do 2014. godine radi u istoj ustanovi kao analitičar - specijalist, a od 2014. godine voditelj je Odjela za humanu analitičku toksikologiju. Od 2016. godine zaposlen je u KBC Osijek u Zavodu za kliničku laboratorijsku dijagnostiku.

Od 2009. godine kao vanjski suradnik sudjeluje u edukaciji za siguran rad s kemikalijama u organizaciji Hrvatskog zavoda za toksikologiju i antidoping, a od 2012. je ispitivač na stručnom ispitu za magistre medicinske biokemije iz ispitnog predmeta analitička toksikologija kojega organizira Ministarstvo zdravstva. 2016. godine izabran je u naslovno suradničko zvanje asistenta iz znanstvenog područja Biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja kliničke medicinske znanosti, znanstvene grane klinička biokemija u Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Član je Hrvatske komore medicinskih biokemičara, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu i Hrvatskog toksikološkog društva.

Autor je i koautor više znanstvenih i stručnih radova, te kongresnih priopćenja prikazanih na međunarodnim skupovima.

Oženjen je i otac dvoje djece.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

***Radovi objavljeni u časopisima koji su indeksirani u Current Contents* bazi:**

1. Mandić D, Mandić S, Horvat V, Samardžija M, Samardžija M. Vitamin K Epoxide Reductase Complex 1 (*VKORC1*) Gene Polymorphisms in Population of Eastern Croatia. Collegium Antropologicum, 37 (2013) 4: 1321-1326.
2. Mandić D, Božina N, Mandić S, Samardžija M, Milostić-Srb A, Rumora L. *VKORC1* gene polymorphisms and adverse events in Croatian patients on warfarin therapy. International journal of clinical pharmacology and therapeutics, 2015; 11: 905-913.
3. Arambašić J, Mandić S, Debeljak Ž, Mandić D, Horvat V, Šerić V. Differentiation of acute pyelonephritis from from other febrile states in children using urinary neutrophil gelatinase-assciated lipocalin (uNGAL). Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2016; 54 (1): 55-61.
4. Mandic S , Kratzsch J, Mandic D, Debeljak Ž , Lukic I , Horvat V, Gaudl A, Seric V. Falsely elevated serum oestradiol due to exemestane therapy. Annals of Clinical Biochemistry, 2017; 54 (3): 402-405

Kongresna priopćenja i sažeci objavljeni u časopisima indeksiranim u Current Contents bazi:

1. Mandić S, Horvat V, Mandić D, Debeljak Ž, Majetić- Cetina N. Validation of GC/MS method for analysis of methadone in human urine. Toxicology Letters, 164S(2006)S95. Abstracts of The EUROTOX 2006/6 CTDC Congress, Cavtat, 2006.
2. Horvat V, Mandić S, Mandić D, Bojanić K, Majetić-Cetina N. Verification of tramadol abuse in patients on methadone substitution therapy. Toxicology Letters, 164S(2006)S70. Abstracts of The EUROTOX 2006/6 CTDC Congress, Cavtat, 2006.
3. Horvat V, Mandić S, Dzumhur A, Mandić D, Seric V, Majetić-Cetina N. Time-courseof BNP and NT-proBNP in myocardial infarction. Clinical chemistry and laboratory medicine. 45(2007)T070. Abstracts of The 17th IFCC-FESCC European Congressof Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and 60th National Congress of the Netherlands Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Amsterdam, 2007.
4. Mandić S, Horvat V, Mandić D, Dzumhur A, Seric V, Majetić-Cetina N. The role of cardiac markers in acute coronary syndrome. Clinical chemistry and laboratory medicine. 45(2007)T084. Abstracts of The 17th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine and 60th National Congress of the

Netherlands Society for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Amsterdam, 2007.

5. Mandić S, Horvat V, Mandić D, Jonjić J, Majetić-Cetina N. Clinical usefulness of holotranscobalamin measurement. Clinical chemistry and laboratory medicine. 46 (2008). Abstracts: 3rd Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, 2008.
6. Horvat V, Mandić S, Mandić D, Nestić M, Jonjić J, Majetić-Cetina N. Comparison of enzymeimmunoassay and gas chromatography method for determination of whole blood and urine alcohol levels. Clinical chemistry and laboratory medicine. 46(2008). Abstracts: 3rd Slovenian Congress of Clinical Chemistry, Ljubljana, 2008.
7. Mandić D, Mandić S, Horvat V, Majetić-Cetina N. Influence of extraction techniques on GC-MS screening results. Toxicology Letters 180(2008)S136. Abstracts of The EUROTOX 2008 Congress, Rhodes, 2008.
8. Horvat V, Mandic S, Mandic D, Debeljak Z, Majetic-Cetina N. Calcium, magnesium and zinc in human seminal plasma. Clinical chemistry and laboratory medicine. 47(2009). Abstracts: EUROMEDLAB Innsbruck 2009.
9. Mandic S, Horvat V, Mandic D, Debeljak Z, Majetic-Cetina N. Cobalamin and holotranscobalamin in human seminal fluid. Clinical chemistry and laboratory medicine. 47(2009). Abstracts: EUROMEDLAB Innsbruck 2009.
10. Mandić S, Arambašić J, Horvat V, Mandić D, Šerić V. Diagnostic value of urine NGAL in acute pyelonefritis of children. Clinical chemistry and laboratory medicine. 49(2011). Abstracts: IFCC-WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011.
11. Horvat V, Debeljak Ž, Mandić S, Mandić D, Šerić V. Fraction excretion of sodium as a marker of tubular injury – is it sensitive enough?. Clinical chemistry and laboratory medicine. 49(2011). Abstracts: IFCC-WorldLab-EuroMedLab Berlin 2011.
12. Mandic S, Omazic J, Mandic D, Horvat V, Šerić V. Comparison of different specimens for FT4 and FT3 verification: commercial controls vs. patient sample. Abstracts: 15th EFLM Continous Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Zagreb 2015.
13. Mandić S, Pavošević T, Šahinović I, Horvat V, Mandić D, Lukić I, Šerić I. Fatal intoxication with quetiapine and nitrazepam. 21st IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Paris 2015.
14. Lukić I, Horvat V, Mandić S, Ivić D, Mandić D, Lukić M, Šerić V. Gamma-hydroxybutiric acid (GBH) intoxication – a case report. 4th Join EFLM-UEMS Congress „ Laboratory Medicine at the Clinical Interface“ , Warsaw, Poland 2017.

Kongresna priopćenja i sažeci objavljeni u časopisima indeksiranim u Science Citation Indeks, MEDLINE i EMBASE:

1. Mandić S, Horvat V, Bačun T, Mandić D, Pavela J, Majetić-Cetina N. Biljezi koštane pregradnje u terapiji osteoporoze selektivnim modulatorima estrogenskih receptora. Biochemia Medica god. 16, br. 1; 129. 2006. Sažeci 5. hrvatskog kongresa medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 2006.
2. Mandić D, Bačun T, Venžera Z, Horvat V, Mandić S, Majetić-Cetina N. Oksidativni status u osteoporozi. Biochemia Medica god. 16, br. 1; 132. 2006. Sažeci 5. hrvatskog kongresa medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 2006.
3. Horvat V, Mandić S, Bačun T, Mandić D, Pavela J, Majetić-Cetina N. Uloga biokemijskih biljega u dijagnostici osteoporoze. Biochemia Medica god. 16, br. 1; 134. 2006. Sažeci 5. hrvatskog kongresa medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Poreč, 2006.
4. Mandic S, Nestic M, Mandic D, Horvat V, Debeljak Z. Influence of extraction on GC/MS analysis of drugs. 6. Hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Supetar, 2009.
5. Horvat V, Juric S, Butkovic-Soldo S, Mandic D, Mandic S. Value of protein S-100 determination in acute ICV. 6. Hrvatski kongres medicinskih biokemičara s međunarodnim sudjelovanjem, Supetar, 2009.
6. Mandić S, Arambašić J, Horvat V, Mandić D, Šerić V. Sensitivity and specificity of NGAL in acute pyelonephritis. 2nd European Joint Congress of EFLM and UEMS, Dubrovnik, 2012.
7. Mandić S, Debeljak Z, Horvat V, Saric I, Mandic D, Seric V. Application of benzodiazepine immunoassay in acute poisoning. Biochimica Clinica. 37(2013) Abstracts: IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Milan 2013.

Kongresna priopćenja i sažeci objavljeni u ostalim časopisima i zbornicima skupova:

1. Horvat V, Mendler S, Šerić V, Mandić D, Wagner J. Myoglobin: Comparision of Qualitative and Quantitative Method. Biochemica Medica god. 10, br. 1-2., 98-99. 2000. Abstracts of the 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Opatija 2000.
2. Mendler S, Horvat V, Šerić V, Mandić D, Wagner J. Comparison of Qualitative Rapid Bedside Assay for CardiacTroponin I with Quantitative Measurment. Biochemica

Medica god. 10, br. 1-2., 98. 2000. Abstracts of the 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Opatija 2000.

3. Šerić V, Mandić D, Mendler S, Wagner J. Urinary Glycosaminoglican Excretion in Diabetic Patients. Biochemica Medica god. 10, br. 1-2., 96. 2000. Abstracts of the 6th Alps-Adria Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Opatija 2000.
4. Horvat V, Mendler S, Šerić V, Mandić D, Wagner J. Myoglobin: Comparision of Qualitative and Quantitative Method. 1. Kongres Hrvatskog Društva fiziologa, Osijek 14-16. 09.2000.
5. Mendler S, Horvat V, Šerić V, Mandić D, Wagner J. Comparison of Qualitative Rapid Bedside Assay for Cardiac Troponin I with Quantitative Measurment. 1. Kongres Hrvatskog Društva fiziologa, Osijek 14-16. 09.2000.
6. Šerić V, Mandić D, Mendler S, Wagner J. Urinary Glycosaminoglican Excretion in Diabetic Patients. 1. Kongres Hrvatskog Društva fiziologa, Osijek 14-16. 09.2000.
7. Mandic S, Horvat V, Mandic D, Majetic-Cetina N. Immunoassays in acute poisoning: benefit or harm? Advances in alcohol, drug and driving research and free topics. Abstracts: 17. International Meeting on Forensic Medicine Alpe–Adria-Pannonia, Portorož,2008.
8. Mandić D, Mandić S. Usporedba metoda određivanja natrija u urinu. Lokus (Simpozij HDMBLM i Abbott Laboratories) Osijek 2014.
9. A fatal fall due to the multiple drug overdose. Šahinović I, Mandić S, Horvat V, Mandić D, Marcikić M, Šerić V. The 3rd Annual European Congress of The Association for Mass Spectrometry: Application to the clinical Lab, Austria, Salzburg 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorska disertacija**

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

ULOGA GENSKIH POLIMORFIZAMA U ANTIKOAGULACIJSKOJ TERAPIJI VARFARINOM

DARIO MANDIĆ
Zavod za kliničku laboratorijsku dijagnostiku, Klinička bolnica Osijek, Osijek

SAŽETAK

Oralni antikoagulans varfarin se već desetljećima koristi u terapiji i/ili prevenciji tromboembolijskih stanja različite etiologije. Varfarin ima uzak terapijski raspon i pokazuje veliku interindividualnu varijabilnost u odgovoru na terapiju, što može potencijalno rezultirati i po život opasnim komplikacijama uslijed prekomjernog antikoagulacijskog učinka i krvarenja.

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati utjecaj polimorfizama *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2*3* i *GGCX* 12970C>G te kliničkih i okolišnih čimbenika na stabilnu dozu održavanja i nuspojave terapije varfarinom. U istraživanju su sudjelovala 204 bolesnika na terapiji varfarinom i 420 zdravih ispitanika. Rezultati genotipizacije na zdravim ispitanicima pokazuju kako je učestalost polimorfizama *VKORC1* 1639G>A i *VKORC1* 1173>T u populaciji Hrvatske u skladu s učestalošću u europskim populacijama. Rezultati istraživanja na skupini bolesnika na terapiji varfarinom ukazuju na statistički značajnu povezanost stabilne doze održavanja varfarina sa sljedećim čimbenicima: genotipovima *CYP2C9*, *VKORC1* i *CYP4F2*, zatim s fizičkom aktivnošću, tjelesnom površinom, te uzimanjem lijekova koji utječu na metabolizam varfarina. Algoritam za predviđanje doze dobiven višestrukom linearnom regresijom u stanju je objasniti 49,8 % varijabilnosti doze varfarina. Dokazana je statistički značajna povezanost vremena potrebnog za postizanje stabilne doze varfarina s polimorfizmom *CYP4F2*3* te povezanost udjela vremena provedenog unutar terapijskog raspona i pojave nuspojava terapije varfarinom u obliku prekomjerne antikoagulacije s polimorfizmima *VKORC1* -1639G>A i/ili *VKORC1* 1173C>T. Isto tako, utvrđena je statistički značajna povezanost *VKORC1* -1639G>A i/ili *VKORC1* 1173C>T te *CYP4F2*3* s nuspojavama terapije varfarinom u obliku krvarenja.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 137 stranica, 27 grafičkih prikaza, 35 tablica i 247 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: varfarin, antikoagulacijska terapija, genski polimorfizmi, *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2*, *GGCX*

Mentor: **Dr. sc. Lada Rumora**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Nada Božina, dr. med., *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Vesna Bačić Vrca, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*
Dr. sc. Mario Štefanović, *naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: 28. lipnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **Doctoral thesis**

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

THE ROLE OF GENETIC POLYMORPHISMS IN WARFARIN ANTICOAGULANT THERAPY

DARIO MANDIĆ
Institute of Clinical Laboratory Diagnostics, Osijek University Hospital, Osijek, Croatia

SUMMARY

Warfarin is the most commonly used oral anticoagulant worldwide. It is used for over a half of century for prevention of thromboembolic disorders. Dosage of warfarin is difficult due to a very narrow therapeutic index (with life-threatening overdose complications) and wide interindividual variability.

Aim of this study was to investigate association of *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T, *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP4F2*3* and *GGCX* 12970C>G genetic polymorphisms, along with some clinical and environmental factors, on warfarin maintenance dose and adverse effects of warfarin therapy. This study included 204 patients on warfarin therapy and 420 healthy volunteers. Results of genotyping study on healthy population confirms that allele frequencies for *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T polymorphisms in Croatian population are in good agreement with other populations of European ancestry. Results obtained on warfarin patient population indicate that warfarin maintenance dose was significantly associated with following variables: *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* genotype, physical activity, body surface area and concomitant usage of drugs that influence warfarin metabolism. Dosage prediction algorithm obtained with multiple regression could explain 49,8 % of dose variability. Time to warfarin stable dose was significantly associated with *CYP4F2*3* genetic polymorphism. Time in therapeutic range was significantly associated with *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T polymorphisms. *VKORC1* -1639G>A and *VKORC1* 1173C>T polymorphisms were also significantly associated with time to first overanticoagulation in warfarin therapy. *VKORC1* -1639G>A, *VKORC1* 1173C>T and *CYP4F2*3* polymorphisms were significantly associated with bleedings encountered during warfarin therapy.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 137 pages, 27 figures, 35 tables and 247 references. Original is in Croatian language.

Keywords: warfarin, anticoagulation therapy, genetic polymorphisms, *VKORC1*, *CYP2C9*, *CYP4F2*, *GGCX*

Mentor: **Lada Rumora**, **Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Nada Božina, **MD, Ph.D.** *Full Professor,* University of Zagreb School of Medicine

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D**, *Full Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Vesna Bačić Vrca, Ph.D, *Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Mario Štefanović, Ph.D, *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 28, 2017