Polimorfizmi gena CYP2C9 i gena VKORC1 u individualizaciji liječenja Martefarinom

Armanda, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:739697

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

zir.nsk.hr

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Armanda

POLIMORFIZMI GENA *CYP2C9* I GENA *VKORC1* U INDIVIDUALIZACIJI LIJEČENJA MARTEFARINOM

Diplomski rad

Akademska godina:
2018./2019.

Mentor:

prof. dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
I
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Armanda

POLIMORFIZMI GENA *CYP2C9* I GENA *VKORC1* U INDIVIDUALIZACIJI LIJEČENJA MARTEFARINOM

Diplomski rad

Akademska godina:
2018./2019.

Mentor:

prof. dr.sc. Davorka Sutlović

Split, rujan 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno polje: Farmacija
Nastavni predmet: Farmaceutska toksikologija
Tema rada prihvaćena je na 60. sjednici Vijeća studija Farmacije te potvrđena na sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: prof. dr. sc. Davorka Sutlović

POLIMORFIZMI GENA *CYP2C9* I GENA *VKORC1* U INDIVIDUALIZACIJI LIJEČENJA MARTEFARINOM

Ivan Armanda, broj indeksa: 122

Sažetak:

Ciljevi istraživanja: Prikazati teorijske pretpostavke i genske polimorfizme *CYP2C9* i *VKORC1* gena u individualizaciji liječenja varfarinom te odrediti polimorfizme navedenih gena u zadanim uzorcima venske krvi.
Materijal i metode: Genomska DNA izolirana je iz bioloških uzoraka pune krvi prikupljenih od zdravih dobrovoljaca. Zatim je kvantificirana pomoću Qubit® 4.0 fluorometra kako bi ustanovili da je optimalna količina DNA za genotipizaciju izdvojena prethodnim postupkom. Genotipizacija alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T provedena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu na uređaju *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System* pri zadanim radnim uvjetima. DNA uzorci i negativna kontrola prethodno su pripremljeni koristeći *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays* čije ključne sastavnice, *TaqMan® MGB* probe, omogućavaju određivanje alelnih varijanti u uzorcima na temelju emitiranog fluorescentnog signala.
Rezultati: Uspješno je određen genotip ispitivanog uzorka broj 1 koji odgovara homozigotu divljeg (izvornog) tipa za svaki od ispitivanih genskih polimorfizama. Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće točno odrediti budući da jasan porast intenziteta fluorescencije *reporter* boja vidno nedostaje na pripadajućim *multicomponent* dijagramima.
Zaključci: Prema preporuci američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) početna doza i doza održavanja varfarina za ispitanika čiji genotip odgovara uzorku broj 1 iznosi 5-7mg. Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće utvrditi sa sigurnošću vjerojatno zbog razgradnje molekule DNA uslijed dugotrajne pohrane uzoraka za analizu. Potrebno je provesti daljnja prospektivna klinička ispitivanja kojima bi se dokazala učinkovitost i isplativost genotipizacije prije započinjanja terapije varfarinom.

Ključne riječi: varfarin, *CYP2C9*, *VKORC1*, genski polimorfizam, genotipizacija, *real-time* PCR
Rad sadrži: 70 stranica, 31 sliku, 6 tablica, 55 literaturnih referenci
Jezik izvornika: hrvatski
Sastav Povjerenstva za obranu:
1. prof. dr. sc. Marija Definis-Gojanović predsjednica Povjerenstva
2. doc. dr. sc. Daniela Šupe-Domić član
3. prof. dr. sc. Davorka Sutlović član-mentor

Datum obrane: 26. rujna 2019.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta Split, Šoltanska 2.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Republic of Croatia

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Pharmaceutical toxicology
Thesis subject was approved by the Council of Study of Pharmacy, session no. 60. as well as by the Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology and the Faculty Council of School of Medicine.
Mentor: Davorka Sutlović, PhD, full prof.

CYP2C9 AND *VKORC1* GENE POLYMORPHISMS IN THE INDIVIDUALIZATION OF MARTEFARIN THERAPY

Ivan Armanda, index number: 122

Summary:

Objectives: To present the theoretical assumptions and gene polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* genes in the individualization of warfarin treatment and to determine the polymorphisms of these genes in given venous blood samples.
Material and methods: Genomic DNA was isolated from whole blood biological samples collected from healthy volunteers. It was then quantified using a Qubit® 4.0 fluorometer in order to determine whether the optimal amount of DNA for genotyping had been isolated by the previous procedure. Genotyping of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* as well as *VKORC1 1173C>T* allelic variants was performed using a real-time polymerase chain reaction method on Applied Biosystems ™ 7500 Real-Time PCR System at assigned working conditions. DNA samples and negative control were previously prepared using TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays whose key components, the TaqMan® MGB probes, allow allelic variants to be determined in the samples based on the emitted fluorescence signal.
Results: The genotype of test sample no. 1 was successfully determined and it corresponds to the wild type homozygote for each of the gene polymorphisms examined. It was not possible to accurately determine the genotype of the other samples due to a clear lack of fluorescence intensity increase of the reporter dyes in the corresponding multicomponent plots.
Conclusions: As recommended by the US Food and Drug Administration (FDA), the starting dose and maintenance dose of warfarin for a subject whose genotype matches sample number 1 is 5-7mg. The genotype of other samples could not be determined with certainty, probably due to the DNA molecule degradation caused by the long-term storage of the samples for analysis. Further prospective clinical trials need to be conducted in order to determine the efficacy and cost-effectiveness of genotyping before initiating warfarin therapy.

Key words: warfarin, *CYP2C9*, *VKORC1*, gene polymorphism, genotyping, *real-time* PCR
Thesis contains: 70 pages, 31 figures, 6 tables, 55 literature references
Original in: Croatian
Defence committee:

1. Marija Definis-Gojanović, PhD, full professor Chair person
2. Daniela Šupe-Domić, PhD, assistant professor Member
3. Davorka Sutlović, PhD, full professor Supervisor

Defence date: September 26th 2019.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposed in Library of School of Medicine, Šoltanska 2

SADRŽAJ

1 UVOD.....1

1.1 Genska osnova interindividualne varijabilnosti u odgovoru na primijenjeni lijek.....2

1.2 Varfarin i oralna antikoagulantna terapija.....4

1.3 Farmakokinetika varfarina.....6

1.4 Farmakodinamika varfarina.....7

1.5 Farmakogenetika varfarina.....9

1.5.1 Polimorfizmi gena *CYP2C9*.....9

1.5.2 Polimorfizmi gena *VKORC1*.....11

1.5.3 Polimorfizmi ostalih gena s mogućim utjecajem na terapiju varfarinom.....12

1.6 Način primjene i doziranje varfarina.....13

1.7 Nuspojave i interakcije varfarina.....16

1.8 Novi oralni antikoagulansi i budućnost antikoagulantne terapije varfarinom.....19

2 CILJ ISTRAŽIVANJA.....20

3 MATERIJAL I METODE.....22

3.1 Prikupljanje uzoraka i izolacija DNA.....23

3.2 Kvantifikacija DNA.....24

3.3 Priprema za genotipizaciju.....26

3.4 Određivanje genskih polimorfizama lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu.....27

4 REZULTATI.....30

5 RASPRAVA.....47

6 ZAKLJUČCI.....50

7 POPIS CITIRANE LITERATURE.....52

8 SAŽETAK.....58

9 SUMMARY.....60

10 ŽIVOTOPIS.....62

Zahvala

Posebno se zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Davorki Sutlović na neizmjernom strpljenju, razumijevanju i pomoći tijekom pisanja ovog diplomskog rada. Hvala Vam na svakom savjetu, stručnom vodstvu i trudu koji ste uložili te znanju kojeg ste mi prenijeli.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na bezuvjetnoj ljubavi, nesebičnoj podršci i strpljivosti tijekom studija. Hvala na neizmjernoj vjeri u moj uspjeh i neophodnom osloncu kojeg ste mi pružili.

1 UVOD

1.1 Genska osnova interindividualne varijabilnosti u odgovoru na primijenjeni lijek

Varijabilnost u odgovoru na primijenjeni lijek definirana je interakcijom fizioloških, patofizioloških, okolišnih i genskih čimbenika. Iako se prilikom propisivanja lijekova pacijentova fiziologija, patofiziologija i utjecaj okoliša obično uzimaju u obzir, genske varijacije, koje mogu imati najznačajniji doprinos djelotvornosti i sigurnosti lijeka, često se zanemaruju (1). Neočekivani, kvantitativno ili kvalitativno izmijenjen učinak lijeka ili pojava toksičnih nuspojava pri standardnim dozama mogu biti signal za ispitivanje genske osnove varijabilnosti odgovora na lijek (2). Spoznaju da ista doza ne odgovara svim bolesnicima već odavno su prepoznali liječnici, ali je tek 1957. godine Arno Motulsky, koristeći prethodno objavljene radove o varijacijama u odgovoru na farmakoterapiju, predložio da nasljedni genski kontrolirani enzimatski čimbenici određuju zašto, s jednakom izloženošću, neki pojedinci reagiraju na terapiju, a drugi ne. Dvije godine kasnije, Vogel je skovao termin "farmakogenetika" kako bi opisao odnos između genskih čimbenika i pojedinačnih odgovora na lijekove (3). Farmakogenetika proučava kako interindividualne varijacije u DNA sekvenci specifičnih gena utječu na farmakoterapijski odgovor pojedinca (4). Širi pojam, farmakogenomika, proučava utjecaj čitavog genoma u odgovoru organizma na lijek (2,3). Osnovno načelo farmakogenetike relativno je jednostavno. Ono podrazumijeva da gensko naslijeđe neke osobe, fenotipski izraženo u obliku, količini ili strukturi proteina, može promijeniti djelovanje lijeka na više načina. Genske promjene rezultiraju određenim fenotipom koji utječe na farmakokinetiku (apsorpcija, raspodjela, metabolizam, izlučivanje lijeka) i farmakodinamiku (učinak lijeka na ciljnom receptorskom mjestu) primijenjenog lijeka. Za razliku od farmakokinetike, istraživanja genske osnove varijabilne farmakodinamike lijeka znatno su manjeg opsega, a sami rezultati ponekad su proturječni (2).

Tablica 1. Čimbenici koji utječu na farmakoterapijski odgovor pacijenta (1).

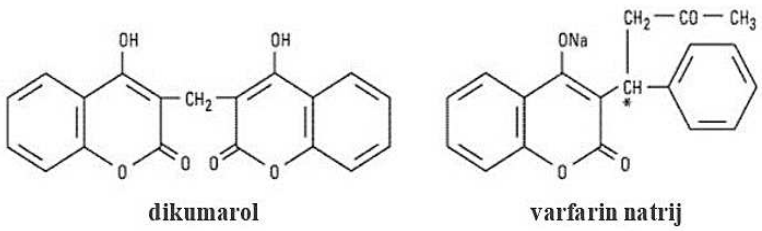
Fiziologija	Patofiziologija	Okolina	Genetika
Dob	Jetrena funkcija	Terapija lijekovima	Metabolički enzimi
Spol	Bubrežna funkcija	Pušački status	Transporteri lijekova
Masa	Srčanožilna funkcija	Konzumacija alkohola	Receptori lijekova
ITM	Plućna funkcija	Prehrana	Ionski kanali
	Ostale bolesti	Zagađenja	Ciljni enzimi
		Zanimanje	Prijenos signala

Genski utjecaj na farmakokinetiku lijekova najizraženiji je u njihovom metabolizmu, odnosno enzimima kojim se biotransformiraju. Razumijevanje genskih polimorfizama u kodirajućoj regiji i/ili regulatornim regijama gena koji kodiraju enzime što metaboliziraju lijekove objasnilo je velik dio interindividualnih varijacija u odgovoru na primijenjeni lijek (2,3). Genski polimorfizam definiran je kao monogensko svojstvo koje se u populaciji pojavljuje u najmanje dva fenotipa s učestalošću ne manjom od 1%. Riječ je o prisutnosti više od jednog alela na istom lokusu i više od jednog fenotipa u određenoj populaciji. Najčešće varijacije u slijedu DNA su zamjene jednog nukleotida drugim - jednonukeotidni polimorfizmi (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*). Genski polimorfizam enzima i ostalih proteina više je pravilo nego iznimka, a genska raznolikost veliko je izvorište interindividualnih, međuetničkih i rasnih razlika u odgovoru na lijek (2). Metabolizam, odnosno biotransformacija lijekova i ksenobiotika uključuje dvije faze; u reakcijama I. faze oni se prevode u polarniji metabolit (oksidacije, redukcije i hidrolize), a u reakcijama II. faze konjugiraju endogenim supstratom (metilacija, acilacija, acetilacija, sulfokonjugacija, glukuronidacija i konjugacija s glutationom) tvoreći najpogodniji produkt za izlučivanje (3,5). Iako većina tvari podliježe ovom slijedu reakcija, ova klasifikacija je povijesna i ne odnosi se nužno na redoslijed reakcija u metabolizmu pojedinog lijeka. Sve reakcije služe istoj svrsi - pretvaranje lipofilnih lijekova u hidrofilnije metabolite za izlučivanje (3,5). Većina reakcija I. faze katalizirana je superporodicom enzima citokrom P450 (CYP). Ova skupina hemoproteina katalizira oksido-redukcijski metabolizam raznih kenobiotika uključujući i lijekove (3). Smatra se da se oko 80% lijekova u praksi metabolizira ovim enzimima (4). Važna svojstva ovih enzima su podložnost indukciji i inhibiciji različitim tvarima (uključujući i lijekove) te izražen polimorfizam gena koji ih kodiraju (6). Genski polimorfizam određuje barem tri kategorije fenotipova obzirom na intenzitet metabolizma. Fenotip brzog metabolizatora (EM, od engl. *extensive metabolizer*) očekivani je fenotip populacije. Riječ je o homozigotu najrasprostranjenijeg alela u populaciji (homozigot divljeg, izvornog tipa). Fenotip sporog metabolizatora (PM, od engl. *poor metabolizer*) autosomno recesivno je svojstvo, aktivnost enzima je smanjena te dolazi do nakupljanja supstrata (lijeka) u organizmu. Prisutna su oba varijantna alela (varijantni homozigot). Fenotip vrlo brzog metabolizatora (UEM, od engl. *ultraextensive metabolizer*) posljedica je amplifikacije gena, nasljeđuje se autosomno dominantno, a metabolizam lijekova izrazito je ubrzan. Moguć je i fenotip srednjeg metabolizatora (IM, od engl. *intermediate metabolizer*). Nasljeđuje se autosomno recesivno, jedan alel je nepromijenjen, a drugi varijantan (riječ je o heterozigtu) te je aktivnost enzima normalna ili snižena. (2) Imajući na umu navedeno, pojedini lijek može imati odgovarajući terapijski učinak, učinak lijeka može

izostati ili pak biti toksičan za bolesnika (6). Iako najizučavaniji, metabolizam lijeka samo je jedan aspekt genske osnove interindividualne varijabilnosti u odgovoru na lijek. Genske varijacije u slijedu DNA koji kodira prijenosnike lijekova, tkivne i plazmatske bjelančevine, ciljne receptore i ostale makromolekule dokazano utječu na odgovor bolesnika na liječenje (3). Stoga, farmakogenetika u kontekstu personalizirane medicine pokušava dati odgovor na temeljna pitanja „koga liječiti kojim lijekom“ i „kako primijeniti to liječenje“ što bi rezultiralo pragmatičnim odabirom liječenja i idealnoj prilagodbi zdravstvene skrbi o pojedincu (6). Jedan od najboljih praktičnih primjera korištenja farmakogenetike za postizanje maksimalne učinkovitosti i minimalne toksičnosti lijeka je farmakoterapija oralnim antikoagulansom varfarinom (4). Uska terapijska širina, opasnost od smrtonosnih nuspojava, širok spektar interakcija, ali i neophodnost primjene u kliničkoj praksi čine ovaj lijek idealnim kandidatom farmakogenetičkih ispitivanja (2,6).

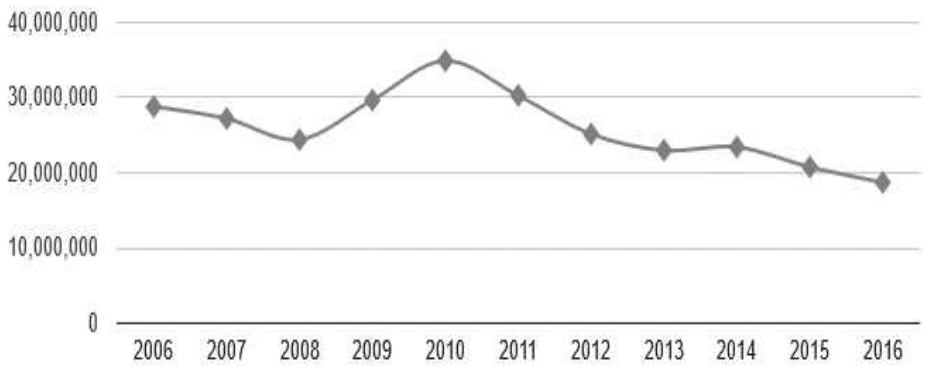
1.2 Varfarin i oralna antikoagulantna terapija

Medicinskoj primjeni kumarinskih antikoagulansa (varfarin i srodni spojevi) prethodilo je otkriće uzroka neuobičajenog pomora stoke dvadesetih godina prošlog stoljeća na sjeveru Sjedinjenih Američkih Država (Sjeverna Dakota) i u Kanadi (Alberta) (7,8). Nakon benignih zahvata poput skidanja rogova ili kastracije, goveda bi iskrvarila te uginula (7). Kasnije se dokazalo da je uzrok fatalnog krvarenja pljesnivo sijeno korišteno u ishrani životinja. Karl Link i suradnici sa Sveučilišta Wisconsin 1933. godine uspjeli su izolirati spoj iz žutog kokotca (*Melilotus officinalis*) koji je izazvao krvarenje (7,8). Bio je to antikoagulans bishidroksikumarin, nastao gljivičnim metabolizmom kumarina preko intermedijera 4-hidroksikumarina (kumarin je nađen u mnogim biljkama, ali sam po sebi nema antikoagulntno djelovanje). Sintetski oblik bishidroksikumarina trgovačkog naziva Dikumarol 1941. godine ušao je u kliničku primjenu kao antikoagulans (7). Daljnja istraživanja 1940–tih godina dovela su do sinteze mnogih spojeva sličnih Dikumarolu te je 1948. godine sintetiziran mnogo snažniji kumarinski spoj pod imenom 'broj 42'.



Slika 1. Kemijska struktura antikoagulansa antagonista vitamina K (8).

Spoj '42' nazvan je varfarin prema početnim slovima imena organizacije koja je financirala rad profesora Linka (**W**isconsin **A**lumni **R**esearch **F**oundation) uz nastavak 'arin' od kumarin (7,8). Varfarin se prvotno koristio kao otrov za štakore te postao vodeći rodenticid revolucionizirajući kontrolu ovih štetočina (7). Nakon otkrića da je vitamin K djelotvoran u liječenju krvarenja izazvanog pokušajima samoubojstva varfarinom, razmišlja se o terapijskoj primjeni ovog spoja (9). Tijekom 1950-ih godina varfarin se pod imenom Coumadin uvodi u humanu medicinu kao antikoagulantni lijek u liječenju i prevenciji raznih tromboembolijskih stanja. Od tada pa do danas, varfarin jest jedan od najpropisivanijih receptnih lijekova i najčešće korišten oralni antikoagulans u svijetu (8,9). S preko 30 milijuna liječničkih recepata 2004. godine (SAD) i više od 2 milijuna novih bolesnika godišnje kojima se propisuje, varfarin zauzima jako velik dio tržišta lijekova (10). 2016. godine nalazio na 41. mjestu najpropisivanijih lijekova u SAD-u s više od 18 milijuna recepata (11).



Slika 2. Broj propisanih recepata za varfarin po godini (SAD) (11).

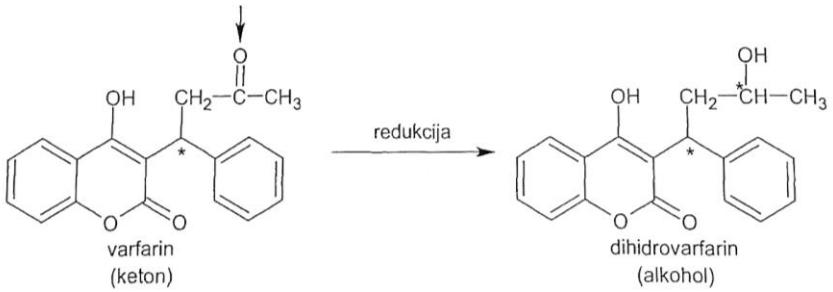
U Republici Hrvatskoj jedini oblik varfarina koji ima odobrenje za stavljanje gotovog lijeka u promet jest varfarin natrij pod trgovačkim nazivom Martefarin. Odobrene su dvije jačine lijeka, 3mg i 5 mg u obliku tableta za peroralnu primjenu. Indiciran je za liječenje i prevenciju duboke venske tromboze i plućne embolije, zatim u sekundarnoj prevenciji infarkta miokarda i prevenciji tromboembolijskih komplikacija (moždani udar ili sistemska embolija) nakon preboljenog infarkta miokarda te u prevenciji tromboembolijskih komplikacija (moždani udar ili sistemska embolija) u bolesnika s atrijskim fibrilacijama, s bolešću srčanih zalistaka ili s umjetnim srčanim zaliscima (12). Prema posljednjem Izvješću o potrošnji lijekova u Republici Hrvatskoj (za 2018. godinu) Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) varfarin je bio 28. najkorišteniji lijek s izvanbolničkom potrošnjom od 8,86 definirane dnevne

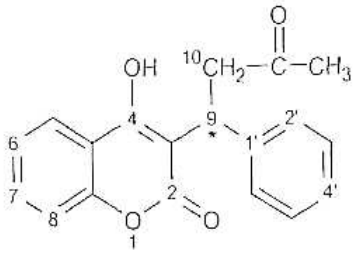
doze na 1000 stanovnika na dan (DDD/1000/dan), a bilježi stalni rast potrošnje iz godine u godinu (13).

1.3 Farmakokinetika varfarina

Komercijalni varfarin racemična je smjesa (omjer 1:1) dvaju enantiomera (*S*)-varfarina i (*R*)-varfarina. (*S*)-varfarin je 2-5 puta potentniji od (*R*)-varfarina s obzirom na antikoagulantni učinak (8,10,12). Nakon oralne primjene, varfarin se apsorbira brzo i potpuno uz bioraspoloživost veću od 90%. Varfarin se značajno veže za cirkulirajuće proteine. Oko 99% racemičnog varfarina vezano je za albumine krvne plazme što vjerojatno doprinosi njegovu malom volumenu distribucije (0,14 L/kg) i dugom poluvremenu eliminacije (između 37 i 89 sati za *R* te između 21 i 43 sata za *S* izomer) (8,12). Varfarin se gotovo potpuno eliminira u obliku inaktivnih metabolita, a zamijećene su izrazite razlike u metaboličkom profilu dvaju enantiomera (8,10). Dvije metaboličke reakcije značajne su za metabolizam varfarina u ljudi, redukcija keto-funkcijske skupine i hidroksilacija aromatskog prstena. Aktivniji (*S*) enantiomer podložniji je C7 aromatskoj hidroksilaciji, a (*R*) enantiomer redukciji keto-skupine (14). Redukcija keto-skupine (*R*)-varfarina katalizirana je karbonil reduktazama, a kao produkt preferirano nastaje alkohol (*R,S*)-dihidrovarfarin, glavni metabolit varfarina u plazmi (14). U ovom primjeru zastupljena je metabolička stereoselektivnost prema supstratu i prema produktu (uz postojeći asimetrični C9 atom stvara se novi kiralni centar). Pri višim koncentracijama supstrata također dolazi i do redukcije (*S*) enantiomera kao što je prikazano na slici 3. Iako je redukcija keto-skupine preferirana metabolička reakcija (*R*)-varfarina u ljudi, dijelom se metabolizira i putem CYP enzima (pretežito CYP1A2 i CYP3A4 izoformi) reakcijama hidroksilacije. (*S*)-varfarin gotovo se potpuno metabolizira putem izoenzima CYP2C9, a kao produkt nastaje (*S*)-7-hidroksivarfarin (14). Smatra se da aktivnost izoenzima CYP2C9 regulira djelovanje varfarina *in vivo*, a značajan polimorfizam gena koji ga kodira uzrokuje važne interindividualne razlike u sposobnosti metaboliziranja varfarina. (12) Ostali CYP enzimi malim su dijelom uključeni u metabolizam (*S*)-varfarina. U ovom slučaju riječ je o stereoselektivnosti metaboličke reakcije prema supstratu. (14) Ispitivanja radioaktivno označenog varfarina pokazala su da je do 90% oralne doze nađeno u mokraći, uglavnom u obliku metabolita (12). Ograničeni podaci za Martefarin ukazuju na to da farmakokinetika varfarina ne ovisi o dobi i dozi lijeka, da renalni klirens ne utječe na antikoagulanti učinak, stoga u bolesnika sa oštećenom funkcijom bubrega ne treba prilagoditi početnu dozu, za razliku

od bolesnika s oštećenom funkcijom jetre kada je moguć pojačan učinak varfarina zbog inhibicije sinteze čimbenika zgrušavanja ili smanjenog metabolizma lijeka (12).





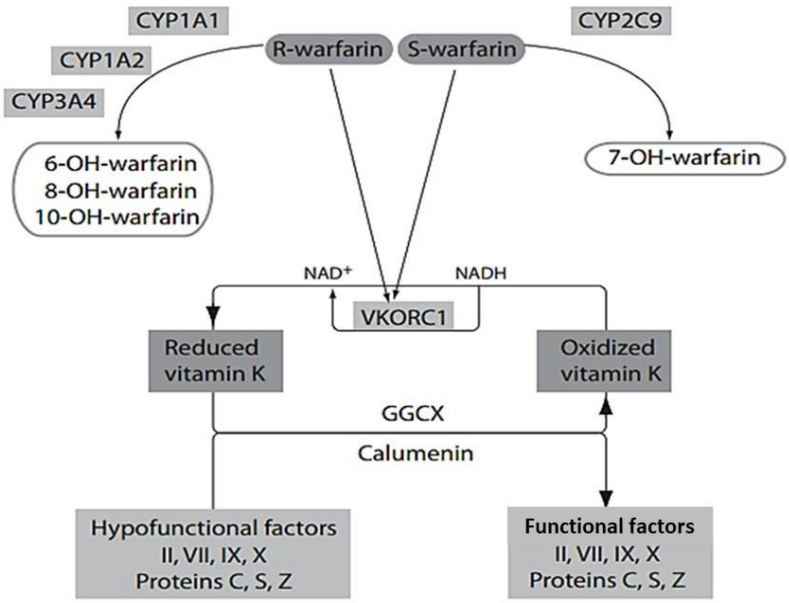
Hidroksilacija na položaju	*S*-enantiomer varfarina		*R*-enantiomer varfarina	
	pretežita	moguća	pretežita	moguća
6		CYP2C19	CYP1A2	CYP1A1 CYP2C19
7	CYP2C9		CYP1A2	CYP1A1 CYP3A4
8		CYP2C9 CYP2C19	CYP1A2	CYP1A1
10		CYP3A4	CYP3A4	
4'		CYP2C9 CYP2C18 CYP2C19		CYP2C8 CYP2C9 CYP2C18 CYP2C19

Slika 3. Stereoselektivnost metabolizma varfarina (14).

1.4 Farmakodinamika varfarina

Varfarin je sintetski kumarinski antikoagulans, antagonist vitamina K (ATK oznaka B01AA03). Varfarin natrij je lako topljiva sol i razlikuje se od drugih pripravaka u toj skupini po tome što se može davati oralno i parenteralno (12). Mehanizam djelovanja uključuje kompetitivnu inhibiciju vitamin K epoksid reduktaze kompleksa 1 (VKORC1), enzima koji konvertira vitamin K 2,3-epoksid (KO) u reduciriani vitamin K (KH2). Vitamin KH2

neophodan je koenzim u reakciji γ-karboksilacije nekolicine glutamatnih ostataka protrombina, prokonvertina, Christmasovog i Stuartovog čimbenika zgrušavanja krvi (faktori II, VII, IX i X) (10). Ova posttranslacijska modifikacija ključna je za stvaranje funkcionalnih čimbenika zgrušavanja koji onda mogu kelirati kalcijeve ione na površini aktiviranih trombocita sudjelujući u procesu sekundarne hemostaze (8). Antikoagulantni učinak varfarina može se primijetiti tek nakon eliminacije postojećih funkcionalnih čimbenika zgrušavanja. Učinak je vidljiv 8-12 sati nakon primjene, a djelotvorna prevencija tromboze uglavnom se postiže nakon pet dana liječenja. Jednako tako, terapijski učinak opada tijekom 4 do 5 dana nakon završetka liječenja varfarinom (12). Genski polimorfizmi *VKORC1* gena uzrok su značajnih interindividualnih razlika u odgovoru na terapiju varfarinom uključujući i rezistenciju na varfarin (10). Endogeni antikoagulansi, protein C i njegov kofaktor protein S, također su ovisni o vitaminu K zbog čega postoji određena opasnost od paradoksalnog prokoagulantnog učinka varfarina u prvim danima terapije (8). Pretjerani antikoagulantni učinak varfarina i posljedična krvarenja mogu se zaustaviti prekidom liječenja i primjenom oralnog ili intravenskog vitamina K_1 (fitonadion) ili primjenom svježe smrznute plazme, koncentrata protrombinskog kompleksa ili rekombinantnog faktora VIIa koji djeluju značajno brže (8). Varfarin se koristi u prevenciji i liječenju tromboembolije različitih uzroka te u sekundarnoj prevenciji srčanog udara (10,12).



Slika 4. Farmakokinetski i farmakodinamski put varfarina. NAD^+ oksidirani oblik nikotinamida adenin dinukleotida, NADH reducirani oblik nikotinamida adenin dinukleotida, GGCX γ-glutamil karboksilaza (10).

1.5 Farmakogenetika varfarina

Odgovor na terapiju varfarinom vrlo je varijabilan među pojedincima. Za to su odgovorni brojni genski i negenski čimbenici, dovodeći i do 20-ostrukih razlika u stabilnoj dozi varfarina (10). Postoje brojni dokazi da genski čimbenici objašnjavaju oko 40% varijabilnosti u doziranju varfarina (15). U kolovozu 2007. godine američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) dodaje uputi o lijeku i preporuku o doziranju varfarina na temelju genotipova *CYP2C9* i *VKORC1*. Bila je to prva preporuka FDA o genotipizaciji pri započinjanju terapije nekim lijekom (10,17). Iako je riječ samo o preporuci, ne i o rutinskom zahtjevu, predstavlja važan korak u personaliziranoj medicini. Nekoliko je razloga koji čine varfarin privlačnom temom farmakogenetike i personalizirane medicine. Osim što predstavlja najčešće propisivani i korišteni oralni antikoagulans na svijetu, često se rabi kao doživotna terapija u sprječavanju sustavne embolije u bolesnika s atrijskom fibrilacijom i bolešću srčanih zalistaka. Klinički tretman je zahtjevan zbog uskog terapijskog raspona, opasnosti od fatalnih nuspojava (prvenstveno krvarenje) i brojnih interakcija s hranom i drugim lijekovima (10). Rezultati genomskih studija udruženosti (GWAS, engl. *genome-wide association study*) otkrivaju značajnu povezanost polimorfizma gena *CYP2C9* i *VKORC1* sa stabilnom dozom varfarina (16,17). Dva uobičajena jednonukleotidna polimorfizma *CYP2C9* povezana su sa smanjenim metabolizmom varfarina, a *VKORC1* sa osjetljivošću i rezistencijom na varfarin. Identifikacija ovih definiranih alelskih mutacija metodama molekularne dijagnostike sa ciljem uspostave algoritma doziranja varfarina predstavlja jednu od najuspješnijih primjena farmakogenetike do sada (17).

1.5.1 Polimorfizmi gena *CYP2C9*

CYP2C9 izoenzim pretežito je eksprimiran u jetri, gdje čini oko 20% jetrenog sadržaja CYP. Metabolizira više od 20% svih lijekova, a među značajnijim su varfarin, fenitoin, nesteroidni protuupalni lijekovi, oralni antidijabetici (tolbutamid, glipizid), neki antibiotici te blokatori angiotenzinskih receptora (10). Pronađeno je više od 60 različitih alela što ga kodiraju čineći *CYP2C9* izrazito polimorfnim genom (18). Aleli *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* kodiraju proteine promijenjenog aminokiselinskog slijeda dovodeći do značajnog smanjenja katalitičke aktivnosti molekule CYP2C9 *in vitro* i *in vivo* (19,20). Ovi aleli prisutni su u 85% sporih metabolizatora značajno doprinoseći varijabilnom odgovoru na varfarin u populaciji (2).

*CYP2C9*1* najzastupljeniji je alel u populaciji i smatra se izvornim (divljim) tipom. Zamjenom dušikove baze citozina timinom (tranzicija C>T) na poziciji 430 u egzonu 3 nastaje varijantni alel *CYP2C9*2* (rs1799853) što dovodi do zamjene arginina cisteinom na aminokiselinskom ostatku broj 144 (R144C) CYP2C9 enzima (15,19). Ova promjena smanjuje enzimatsku aktivnost CYP2C9 i intrinzični klirens varfarina u odnosu na izvorni genotip. Kao rezultat, potrebna doza varfarina za *CYP2C9*2* heterozigote izosi 78%, a za homozigote 57% standardne doze varfarina određene za *CYP2C9*1/*1* genotip (15). Zamjenom dušikove baze adenina citozinom (transverzija A>C) na poziciji 1075 u egzonu 7 nastaje varijantni alel *CYP2C9*3* (rs1057910) što ujedno rezultira i zamjenom izoleucina leucinom na aminokiselinskom ostatku broj 359 (I359L) CYP2C9 enzima (15,19). Ovom promjenom smanjuje se afinitet CYP2C9 enzima za mnoge supstrate, a enzimska aktivnost opada za 95%. Posljedično, potrebna doza varfarina za *CYP2C9*3* heterozigote izosi 66%, a za homozigote samo 24% standardne doze varfarina određene za *CYP2C9*1/*1* genotip (15). Za genotip s oba varijantna alela *CYP2C9*2/*3* potrebna doza iznosi 47% standardne doze varfarina (15). Navedenim polimorfizmima objašnjava se 12% varijacije doze varfarina među pojedincima (17). Homozigoti **1/*1* odgovaraju fenotipu brzog metabolizatora, heterozigoti **1/*2* i **1/*3* fenotipu srednjeg metabolizatora, dok homozigoti varijantnih alela **2/*2* i **3/*3* te njihova kombinacija **2/*3* odgovaraju fenotipu sporog metabolizatora (21). Oba varijantna alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* različito su zastupljena u glavnim rasnim skupinama. Približno 1% populacije bijelaca je homozigotno za *CYP2C9*2* alel, a do 22% heterozigotno. Učestalost *CYP2C9*3* homozigota među bijelcima iznosi 0,4%, a heterozigota do 15% (3,22). Učestalost varijantnih alela *CYP2C9* u hrvatskoj populaciji u skladu je s navedenom distribucijom u bijeloj rasi. Frekvencije alela *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* bile su 14,5%, odnosno 7,6% (23). Ovi polimorfizmi rjeđe su zastupljeni u Afroamerikanaca (svega 1-2%) i u istočnoazijskoj populaciji gdje alel *CYP2C9*2* uopće nije pronađen, a *CYP2C9*3* je zastupljen u oko 2 % populacije (24,25). Polimorfizam *CYP2C9*8* povezan je s potrebnom nižom dozom varfarina u Afroamerikanaca i zapravo je najučestaliji alel te populacije (9,28).

Tablica 2. *CYP2C9* alelne varijante i fenotip metabolizma (21).

Genotip	Metabolizam	Nomenklatura
*1/*1	brzi	Divlji, izvorni tip
*1/*2	srednji	Heterozigot
*1/*3	srednji	Heterozigot
*2/*3	spori	Složeni heterozigot
*2/*2	spori	Homozigot
*3/*3	spori	Homozigot

1.5.2 Polimorfizmi gena *VKORC1*

Ciljno mjesto djelovanja varfarina je podjedinica 1 vitamin K ovisne epoksid reduktaze koju kodira istoimeni *VKORC1* gen (10). Polimorfizmi unutar *VKORC1* objašnjavaju oko 30% interindividualnih varijacija u potrebnoj dozi varfarina (17). Najviše proučavani polimorfizmi -1639G>A (rs9923231) i 1173C>T (rs9934438) u velikoj su veznoj neravnoteži - gotovo se isključivo uvijek javljaju zajedno (engl. *linkage disequilibrium*) i predisponiraju osjetljivost na varfarin kao i niže potrebne doze lijeka (10,15). Polimorfizam -1639 G>A ili G3673A (poznat i kao *VKORC1*2*) rezultat je zamjene dušikove baze gvanina adeninom (tranzicija G>A) u promotorskoj regiji *VKORC1* što dovodi do smanjene jetrene ekspresije ovog gena i količine VKORC1 poteina (26). Istraživanja su pokazala da se, u odnosu na heterozigote -1639 G/A, doza varfarina povećava 35% za -1639 G/G homozigote (izvorni, divlji tip) i smanjuje 32% za -1639 A/A homozigote (15). Ovaj SNP smatra se najvažnijim prediktorom početne doze varfarina rezultirajući visokom (genotip -1639 A/A), srednjom (genotip -1639 G/A) ili niskom osjetljivošću (genotip -1639 G/G) na varfarin (15). Polimorfizam 1173C>T ili C6484T rezultat je zamjene dušikove baze citozina timinom (tranzicija C>T) u prvom intronu *VKORC1* gena (26). Iako biološka važnost ovog polimorfizma koji leži unutar introna 1 i ne utječe na obradu mRNA nije u potpunosti poznata, uočeno je da pojedinci s ovim polimorfizmom trebaju niže doze varfarina (25). Bio je to prvi SNP *VKORC1* gena kod kojeg je primijećena povezanost s dozom varfarina (26). Velika vezna neravnoteža s -1639G>A polimorfizmom omogućava da se i ovaj polimorfizam koristi u procjeni statusa osjetljivosti na varfarin (Tablica 3.) (15). Navedeni varijantni aleli zapravo su većinski (oko 90%) u istočnoazijskoj populaciji i čini se da upravo to objašnjava potrebu za znatno manjim dozama varfarina za pojedince azijskog podrijetla u odnosu na bijelce (24,25). Ove varijante također su česte i u bijelaca, s učestalošću oko 40%, a najrijeđe u Afroamerikanaca (oko 14%) (10,21,26).

Tablica 3. *VKORC1* varijante i osjetljivost na varfarin. Haplotip A-niža doza varfarina, varijantni alel; haplotip B-viša doza varfarina, izvorni alel (prema Riederu) (27).

Genotip	Potrebna doza varfarina	Nomenklatura	Osjetljivost na varfarin
BB	viša	Izvorni, divlji tip	Niska
AB	srednja	Heterozigot	Srednja
AA	niža	Homozigot	Visoka

Otpornost na varfarin vrlo je rijetka pojava u ljudi, a povezuje se s nekoliko *missense* mutacija u *VKORC1* genu (10). Ove mutacije čine VKORC1 enzim manje podložnim inhibiciji varfarinom, što zahtijeva doze veće i od 80 mg po tjednu kako bi se održala prikladna antikoagulacija (15). Dodatna istraživanja su potrebna za bolje i potpunije razumijevanje mehanizama kojim ove mutacije posreduju rezistenciju na varfarin i potrebu za neuobičajeno visokim dozama lijeka (10,15). Važno je napomenuti da je utjecaj genskih polimorfizama *CYP2C9* i *VKORC1* na dozu održavanja varfarina neovisan i aditivan, ali ne i sinergijski. Dakle, prisutnost varijantnih alela oba gena ima veći utjecaj na dozu nego pojedinačno, ali ne postoji strogi aritmetički odnos (15).

1.5.3 Polimorfizmi ostalih gena s mogućim utjecajem na terapiju varfarinom

Budući da su polimorfizmi gena *CYP2C9* i *VKORC1* odgovorni za 30-50% varijabilnosti u doziranju, važno je proširiti znanje o ulozi ostalih genskih i negenskih čimbenika što utječu na farmakodinamiku i farmakokinetiku varfarina (15). Rezultati genomske studije udruženosti za česte genske varijante s većim utjecajem na dozu održavanja varfarina, što su je Cooper i suradnici proveli na otprilike 550 000 polimorfizama, pokazuju da je najznačajniji neovisan učinak udružen s polimorfizmima *VKORC1* (p=6,2x10^{-13}), dok su polimorfizmi *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* udruženi s dozom varfarina na razini umjerene značajnosti (p=10^{-4}) (16). Prvu genomsku studiju udruženosti dovoljne snage za otkrivanje genskih varijanti sa skromnijim utjecajem na terapijsku dozu varfarina proveli su Takeuchi i suradnici. Univarijatnom analizom gotovo 326 000 SNP-ova 1053 švedskih pacijenata identificirali su iznimno jaku povezanost *VKORC1* (p=10^{-78}) i *CYP2C9* (p=10^{-31}) polimorfizama s dozom varfarina, dok su primjenom multivarijatne regresije otkrili i genomsku značajnost na razini p=8,3 x 10^{-10} za *CYP4F2* (rs2108622) (17). Ovaj polimorfizam, odgovoran za otprilike 1-2% razlike u dozi, rezultira sniženom koncentracijom enzima CYP4F2 u jetri i smanjenim metabolizmom vitamina K, stoga nositelji varijantnog alela imaju potrebu za većom dozom varfarina. Autori zaključuju kako je malo vjerojatno da će se česti SNP-ovi s većim utjecajem na dozu varfarina naći izvan gena *CYP2C9* i *VKORC1* (10,17). Izgleda da je važnost genskih polimorfizama drugih gena što kodiraju ostale proteine uključene u ciklus vitamina K i učinak varfarina, zanemariva (10). Postoje naznake da polimorfizmi gena za γ-glutamil karboksilazu, apolipoprotein E i P-glikoprotein (uključeni u transport vitamina K), mikrosomalnu epoksid hidrolazu (stvara kompleks s VKORC1), protein C (endogeni

antikoagulans) te neke faktore zgrušavanja (faktor II, faktor VII) mogu utjecati na aspekte doziranja varfarina. Njihov stvaran doprinos i kliničku značajnost rasvijetlit će buduća istraživanja (15).

1.6 Način primjene i doziranje varfarina

Varfarin se najčešće primjenjuje kao oralna antikoagulantna terapija uz obvezno praćenje terapijskog učinka određivanjem protrombinskog vremena (PV) izraženog kao međunarodni normalizirani omjer INR (engl. *International Normalized Ratio*) (8,12). INR predstavlja omjer protrombinskog vremena pacijenta i referentne populacije, ispravljen za osjetljivost upotrijebljenog tromboplastinskog reagensa i uređaja u odnosu na referentni preparat tromboplastina Svjetske zdravstvene organizacije što omogućava standardizaciju rezultata (8,15). Iako se plazmatske vrijednosti varfarina i 7-hidroksivarfarina rutinski ne određuju, mogu biti od koristi pri diferenciranju varfarinske rezistencije od manjka suradljivosti pacijenta. U tu svrhu, razvijene su jednostavne, osjetljive i pouzdane metode određivanja koncentracije varfarina i metabolita u krvi tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (29). Ciljni raspon INR-a od 2,5 do 3,5 preporučuje se u profilaksi tromboembolijskih komplikacija za bolesnike s umjetnim srčanim zaliscima, a za ostale indikacije od 2,0 do 3,0 (8,12). Liječenje treba započeti standardnom dozom od 5 do 10 mg/dan, a ne udarnim dozama kako se prije prakticiralo (8). Bolesnici normalne tjelesne težine i spontanog INR-a ispod 1,2 započinju terapiju s 10 mg varfarina (abulantno liječeni i oni s nedostatkom proteina C i S započinju s 5 mg) tijekom tri uzastopna dana. Doziranje se nastavlja kako je navedeno u tablici 4. na temelju mjerenja INR-a četvrtog dana. Za starije bolesnike, bolesnike manjeg rasta, one koji imaju spontani INR iznad 1,2 ili za one koji imaju bolest ili primaju lijek što utječu na terapiju varfarinom, preporučuje se početna doza od 5 mg varfarina tijekom dva uzastopna dana, a doziranje se nastavlja kako je navedeno u tablici 4. na temelju mjerenja INR-a trećeg dana (12). INR vrijednosti određuju se svaki dan sve dok se ne postigne stabilna ciljna razina, za što je obično potrebno 5 do 6 dana od početka liječenja. Razmaci između mjerenja INR-a svaki se tjedan produljuju sve do željenog razmaka od 4 tjedna između dva mjerenja (12). Ukoliko bolesnik ima jetrenu bolest ili poremećenu apsorpciju vitamina K te velika kolebanja INR vrijednosti potrebno je češće praćenje unutar 4 tjedna. Jednako tako, ukoliko se novi lijek dodaje u terapiju ili se prekida stari potrebno je učestalije mjerenje INR vrijednosti (12). U slučaju da je potreban brzi antitrombotski učinak, liječenje se mora najprije započeti heparinom,

zatim se nastavlja zajedno s varfarinom tijekom najmanje 5 do 7 dana dok INR vrijednosti ne budu unutar ciljnog raspona tijekom najmanje dva dana (12).

Tablica 4. Raspon terapijskih doza Martefarina definiran INR vrijednostima (za odrasle) (12).

Dan	INR	Doza varfarina, mg/dan
1.	-	10 (5*)
2.	-	10 (5*)
3.	< 2,0 2,0 do 2,4 2,5 do 2,9 3,0 do 3,4 3,5 do 4,0 >4,0	10 (5*) 5 3 2,5 1,5 izostaviti jedan dan
4.-6.	< 1,4 1,4 do 1,9 2,0 do 2,4 2,5 do 2,9 3,0 do 3,9 4,0 do 4,5 > 4,5	10 7,5 5 4,5 3 izostaviti jedan dan, potom 1,5 izostaviti dva dana, potom 1,5
7.-	 1,1 do 1,4 1,5 do 1,9 2,0 do 3,0 3,1 do 4,5 > 4,5	Tjedna doza varfarina povećati za 20% povećati za 10% održavati dozu smanjiti za 10% izostaviti sve dok INR <4,5, nastaviti dozom smanjenom za 20%

Ovakav pristup fiksnom dozom varfarina zanemaruje utjecaj genske varijabilnosti na sposobnost pojedinca da reagira na početnu dozu i promjene doziranja lijeka (9). Za nositelje varijantnih alela *CYP2C9* ili *VKORC1* zabilježen je znatno brži odgovor na terapiju varfarinom te povećan rizik od nuspojava (prekomjerna antikoagulacija i krvarenje) u odnosu na izvorni genotip (30). INR vrijednosti iznad 3,0 dva puta su vjerojatnije među nositeljima *CYP2C9*2* ili *CYP2C9*3* varijantnih alela pogotovo u prvim tjednima terapije, a prvo se krvarenje pojavilo ranije i s većom učestalošću nego u pacijenata izvornog genotipa (31,32,33). Bolesnici s haplotipom *VKORC1*2* češće su dolazili na kontrole, imali viši koeficijent varijacije (CV) protrombinskog vremena te veći postotak INR vrijednosti izvan terapijskog raspona u odnosu na pacijente izvornog genotipa (34). Zbog jasno utemeljene povezanosti s farmakoterapijom varfarina, pokušalo se rezultate genotipizacije *CYP2C9* i *VKORC1* uključiti u procjenu početne i stabilne doze varfarina. Predloženi su brojni algoritmi doziranja varfarina zasnovani na farmakogenetici, a jedan od prvih je onaj Sconce i suradnika iz 2005. godine koji je objasnio 54% varijabilnosti doze odražavanja varfarina u izvedenoj skupini (35):

$$\sqrt{\text{Dnevna doza}} = 0{,}628 - 0.0135 \times \text{dob(godine)} - 0{,}240 \times (\textit{CYP2C9*2}) - 0.370 \times (\textit{CYP2C9*3}) - 0{,}241 \times (\textit{VKORC1}) + 0{,}0162 \times \text{visina(cm)}$$

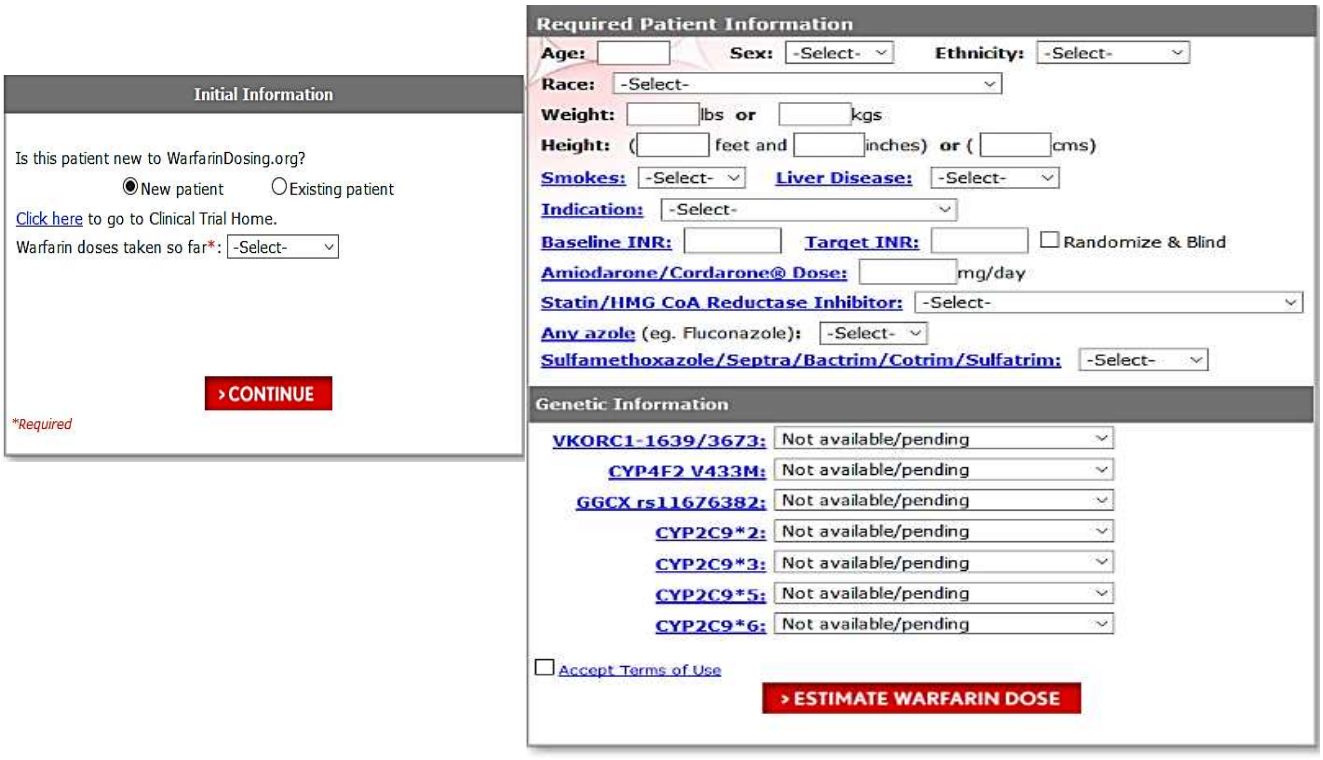
Uvrštava se 0, 1 ili 2 za broj alela *CYP2C9*2* i **3* te 1 za GG, 2 za GA i 3 za AA *VKORC1*. Nakon što je 2007. godine FDA dodala uputi o lijeku preporuku o doziranju varfarina na temelju

genskog profila, 2011. godine donosi i specifične upute kako koristiti poznati genotip u individualizaciji terapije prilagođavajući dozu održavanja (Tablica 5.) (36).

Tablica 5. Očekivane doze održavanja za Coumadin na temelju poznatog genotipa (36).

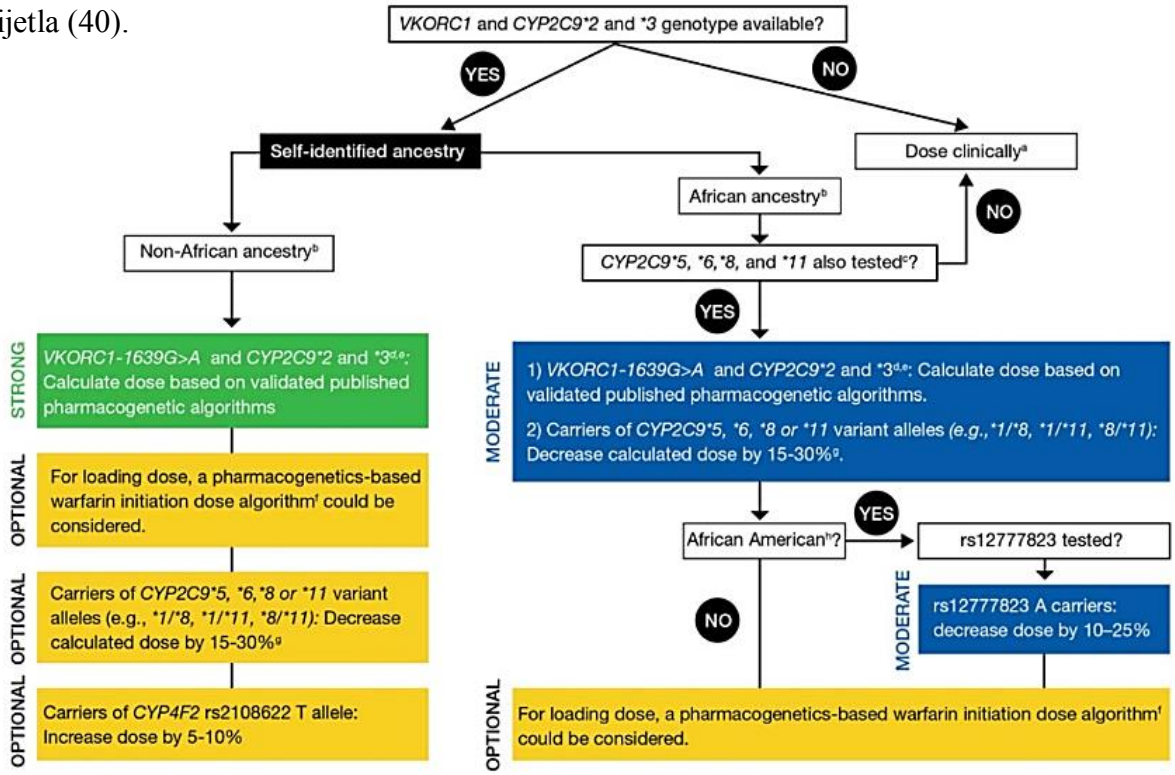
VKORC1	CYP2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

2008. godine Gage i suradnici razvili su i validirali farmakogenetički algoritam u skupini od 1015 sudionika koji je objasnio 53-54% varijabilnosti doze, a klinička jednadžba samo 17 do 22% (37). Autori su razvili neprofitnu internetsku stranicu WarfarinDosing.org kako bi olakšali primjenu farmakogenetičkih i kliničkih algoritama na početku i tijekom terapije varfarinom (38). Algoritam Međunarodnog konzorcija za farmakogenetiku varfarina (IWPC, od engl. *International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*) dostupan je na istoj mrežnoj stranici. U istraživanju što ga je 2009. godine proveo IWPC upotrijebljeni su podaci 4 043 pacijenta za izradu algoritama doziranja varfarina. Farmakogenetički algoritam pokazao se znatno boljim od metode fiksne doze i algoritma što uzima u obzir samo kliničke parametre bolesnika (39).



Slika 5. Prikaz parametara za algoritam doziranja WarfarinDosing.org (38).

Konzorcij za kliničku primjenu farmakogenetike (CPIC, od engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) daje snažnu preporuku za korištenje ovih algoritama (Gage et al. i IWPC algoritama) kad god je informacija o genotipu pacijenta dostupna. Međutim, ovi algoritmi izvedeni su koristeći podatke rasno jednolike supine pacijenata - većinom europski bijelci te se ne mogu primijeniti u ostalim popoulacijama s jednakom učinkovitošću (9). Kako bi prevladali navedena ograničenja, 2017. godine Arwood i suradnici predlažu novi nomogram doziranja varfarina prihvatljiv za etnički raznoliku skupinu pacijenata koji bi potencijalno mogao omogućiti učinkovito postizanje terapeutskog INR-a unutar jednog tjedna (9,30). Iste godine CPIC izdaje nove smjernice koje uključuju korekciju doze dobivene farmakogenetičkim algoritmima obzirom na rasnu pripadnost, stavljajući poseban naglasak na pacijente afričkog podrijetla (40).



Slika 6. Smjernice Konzorcija za kliničku primjenu farmakogenetike 2017. godine (40).

1.7 Nuspojave i interakcije varfarina

Najvažnija štetna i neželjena reakcija na varfarin je krvarenje kao posljedica prekomjernog antikoagulantnog učinka lijeka (8). Pojavljuje se u 1 do 10% pacijenata s ukupnom stopom od 8% godišnje (12). Krvarenja mogu biti blaga poput krvarenja desni, potkožnih krvarenja, epistakse, hemoptize ili hematurije, no teška i fatalna krvarenja također se

mogu pojaviti (intrakranijalno krvarenje). Povećanjem INR vrijednosti iznad ciljnog raspona znatno raste vjerojatnost krvarenja, dok pojava krvarenja pri stabilnim INR vrijednostima uglavnom ukazuje na drugi poremećaj u podlozi (12). Kumarinska nekroza kože rijetka je komplikacija (manje od 0,1% slučajeva) liječenja varfarinom. Javlja se rano u terapiji otprilike 3. do 10. dan liječenja uslijed relativnog nedostatka endogenih antikoagulansa proteina C i S. Karakterizira je pojava tamnih lezija na udovima i stražnjici koje kasnije postaju nekrotične, češće se javlja u žena (90%) nego muškaraca (12). Još rijeđa komplikacija liječenja varfarinom je sindrom ljubičastog stopala. Uglavnom pogađa muške pacijente s ateroskleorzom krvnih žila, a javljaju se simetrične ljubičaste lezije prstiju i stopala uz goruću bol (12). Ostale nuspojave koje se pojavljuju vrlo rijetko (<0,01%) uključuju vaskulitis, klacifikaciju traheja, reverzibilnu alopeciju, prijapizam, kolesterolsku emboliju, alergijske reakcije i povišenje jetrenih enzima te kolestatski hepatitis (12). Budući da varfarin slobodno prelazi placentalnu barijeru, može uzrokovati fetalna krvarenja (8). Kontraindiciran je tijekom prvog tromjesečja trudnoće zbog poznatog teratogenog djelovanja (fetalni varfarinski sindrom i malformacije središnjeg živčanog sustava). Fetalni varfarinski sindrom karakterizira nazalna hipoplazija, okoštavanje epifiznih regija, hipoplazija ekstremiteta, optička atrofija, mikrocefalija, mentalna retardacija i retardacija rasta kao i katarakta koja može dovesti do potpune ili djelomične sljepoće. Varfarin je povezan s povećanim rizikom krvarenja majke i fetusa te smrti fetusa osobito tijekom poroda zbog čega je kontraindiciran i tijekom zadnja četiri tjedna trudnoće. Iako prema uputi proizvođača liječenje trudnice Martefarinom može razmotriti specijalist kliničar, najbolje ga je izbjegavati tijekom cijele trudnoće (12). Budući da se varfarin ne izlučuje u majčino mlijeko, dojenje se može nastaviti tijekom liječenja (12).

Varfain stupa u mnoge interakcije s hranom, dodacima prehrani i drugim ljekovima. Općenito, te se interakcije mogu podijeliti na farmakokinetske i farmakodinamske (8). Glavni mehanizmi farmakokinetskih interakcija varfarina s drugim lijekovima uključuju otežanu apsorpciju, indukciju i inhibiciju metaboličkih enzima te kompeticiju za vezna mjesta na proteinima plazme. Kolestiramin i kolestipol su veliki neapsorbirajući polimeri koji primarno vežu žučne kiseline, ali dijelom vežu varfarin i nekolicinu drugih lijekova ometajući njihovu apsorpciju (12,41). Lijekovi koji induciraju CYP enzime (posebno CYP2C9, CYP1A2 i CYP3A4 kojima se *S* i *R* varfarin metaboliziraju) mogu sniziti koncentraciju lijeka u plazmi te smanjiti antikoagulantni učinak (10). Najznačajniji induktori su barbiturati, rifampicin, fenitoin, karbamazepin, nafcilin i glutetimid (8,41). Pušenje također može povećati klirens varfarina inducirajući CYP enzime pa u pušača mogu biti potrebne veće doze lijeka (5,12). Inhibitori navedenih izoenzima smanjuju klirens varfarina i povećavaju njegov antikoagulantni učinak za

danu dozu (10). Posebno se ističe intrakcija s fenilbutazonom i sulfinpirazonom koji stereoselektivno inhibiraju metabolizam (*S*)-varfarina, no inhibiraju i agregaciju trombocita te istiskuju varfarin s proteina plazme značajno povećavajući rizik od krvarenja. Metronidazol, flukonazol i kotrimoksazol također inhibiraju metabolizam (*S*)-varfarina dok amiodaron, cimetidin i disulfiram inhibiraju metabolizam oba enantiomera (8). Varfarin se može istisnuti iz veznog mjesta proteina plazme čime se povećava udio slobodne frakcije lijeka u plazmi. Uslijed toga, metabolizam i eliminacija varfarina se povećavaju što smanjuje njegov učinak (12). Glavni mehanizmi farmakodinamskih interakcija varfarina s drugim lijekovima uključuju sinergizam, kompetitivni antagonizam i utjecaj na čimbenike zgrušavanja krvi. Acetilsalicilna kiselina i ostali nesteroidni protuupalni lijekovi pojačavaju učinak varfarina i sklonost krvarenju inhibirajući agregaciju trombocita (8). Ukoliko je bolesniku potrebno privremeno ublažavanje boli tijekom primjene varfarina, lijekovi izbora su paracetamol (do 2g dnevno) ili opioidi (12). Ostali antitrombotici, poput klopidogrela, tiklopidina, dipiridamola i cilostazola, i antikoagulansi također povećavaju rizik od krvarenja uz istodobnu terapiju varfarinom (12). Na razini receptora, vitamin K smanjuje učinak varfarina kompetitivnim antagonizmom, a dovodi i do povećane sinteze čimbenika zgrušavanja (8,41). Diuretici klortalidon i spironolakton mogu smanjiti učinak varfarina jer povećavaju koncentraciju čimbenika zgrušavanja u krvi, a cefalosporini 3. generacije pojačati (uništavaju crijevne bakterije što proizvode vitamin K) (8). Anabolni steroidi mogu pojačati učinak varfarina smanjujući sintezu čimbenika zgrušavanja (12). Zbog smanjene sinteze ili povećane razgradnje čimbenika zgrušavanja, određena stanja (jetrena bolest, hipertireoza) pojačavaju farmakodinamske učinke varfarina, a druga smanjuju (hipotireoza) (8,12).

Posebna se pozornost pridaje biljnim lijekovima i dodacima prehrani koje bolesnik možda koristi. Ginkgo (*Ginkgo biloba*) i češnjak (*Allium sativum*) djeluju antitrombotski, anđelika (*Angelica sinensis*) sadrži kumarine, a crvena kadulja (*Salvia miltiorrhiza*) smanjuje eliminaciju varfarina (12). Ukoliko se primjenjuje istodobno s navedenim pripravcima, učinak varfarina je pojačan. Ginseng (*Panax spp.*) i biljni pripravci gospine trave (*Hypericum perforatum*) smanjuju učinak varfarina. Gospina trava poznat je snažni induktor CYP enzima, a istodobna primjena s varfarinom je kontraindicirana (12). Unos hrane koja sadržava vitamin K mora biti ustaljen, a drastične promjene prehrambenih navika moraju se izbjegavati tjekom terapije varfarinom (12).

1.8 Novi oralni antikoagulansi i budućnost antikoagulantne terapije varfarinom

Novi oralni antikoagulansi (NOAC, od engl. *Novel Oral Anticoagulants*) skupni je naziv za izravne inhibitore trombina (dabigatran) i faktora zgrušavanja Xa (rivaroksaban, apiksaban, edoksaban) (42). Svi navedeni lijekovi imaju odobrenje za stavljanje gotovog lijeka u promet u Republici Hrvatskoj (43). Velika klinička ispitivanja pokazuju da su ovi lijekovi jednako učinkoviti ili učinkovitiji od varfarina uz povoljniji omjer koristi i rizika (manje neželjenih krvarenja) (44). Za razliku od varfarina, ovi lijekovi ne zahtijevaju rutinsko laboratorijsko praćenje učinka, ne ulaze u brojne interakcije s hranom i lijekovima te imaju znatno brži nastup djelovanja (42). Iako bi se dalo zaključiti da će novi oralni antikoagulansi zamijeniti trapiju varfarinom, određeni ih nedostaci ne čine uvjerljivo superiornijim (45). Iako ne zahtijevaju laboratorijsko praćenje učinka, ono može biti od iznimne važnosti u slučajevima poput predoziranja, procjene suradljivosti, hitnih operacija, interakcija lijekova i kod pacijenata s jetrenim ili bubrežnim oštećenjem (45). Određivanje klasičnih parametara koagulacije PV, INR, APTV i TV nije primjenjivo u procjeni učinka NOAC, a specifična ispitivanja u tu svrhu ne postoje. Zato se razvijaju novi laboratorijski testovi (ECT, dRVVT) i modificiraju stari (razrijeđeno trombinsko vrijeme, izmijenjen Anti Xa test) kako bi se pronašla prikladna zamjena (45). Nadalje, dabigatran je kontraindiciran u pacijenata koji imaju ugrađene umjetne srčane zaliske, a ostali se NOAC u toj indikaciji ne preporučuju što ih čini neprimjenjivim u ovoj populaciji pacijenata (43). Nedavno su odobreni idarucizumab (specifični antidot dabigatrana) i andeksanet alfa (antidot inhibitora faktora Xa) eliminirajući nepostojanje antidota za NOAC što se navodilo kao njihov glavni nedostatak (43). Visoka cijena i nadoplata za NOAC predstavljaja temeljnu prepreku široj primjeni ovih lijekova u određenim socioekonomskim sredinama (bolesnici s nižim primanjima i oni bez privatnog osiguranja). Zbog svega navedenog, varfarin i dalje ostaje glavno uporište oralne antikoagulantne terapije za velik dio pacijenata, barem u predvidljivoj budućnosti (9).

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je:

-prikazati teoretske pretpostavke i polimorfizme *CYP2C9* i *VKORC1* gena u individualizaciji liječenja varfarinom

-odrediti polimorfizam gena *CYP2C9* i gena *VKORC1* u zadanim uzorcima venske krvi

Hipoteza ovog rada je:

-uključivanje rezultata genotipizacije *CYP2C9* i *VKORC1* u procjenu potrebne doze varfarina smanjuje rizik za razvoj nuspojava, skraćuje vrijeme do postizanja stabilne terapijske doze lijeka i rezultira boljom kontrolom INR vrijednosti

3 MATERIJAL I METODE

Ovo istraživanje provedeno je u kemijsko-toksikološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra u Splitu (KBC Split) u okviru Katedre za toksikologiju i farmakogenetiku studija Farmacije Sveučilišta u Splitu.

3.1 Prikupljanje uzoraka i izolacija DNA

Biološki uzorak pune krvi uzet je od zdravih dobrovoljaca venepunkcijom u epruvete s EDTA antikoagulansom volumena 4 mL (*BD Vacutainer® K_2EDTA REF 368861* epruvete). Prikupljeno je ukupno pet uzoraka pune krvi od čega su četiri bila dulje pohranjena prije analize, a jedan je uzet neposredno prije.

U svrhu izolacije genomske DNA korišten je komercijalni komplet za izolaciju nukleinskih kiselina (*High Pure PCR Template Preparation Kit Version: 23*, Roche Diagnostics®). Prema modificiranom protokolu proizvođača, DNA se izdvaja iz jezgre leukocita u uzorcima pune krvi sljedećim postupkom (46).

Priprema reagensa

Proteinaza K - služi za lizu uzorka i inaktivaciju endogene DNaze, a priprema se otapanjem liofilizata u 4,5 mL dvostruko destilirane vode. Otopinu alikvotirati i čuvati alikvote na -20°C najviše 12 mjeseci.

IRB (*Inhibitor Removal Buffer*) – u 33 mL koncentriranog pufera dodati 20 mL apsolutnog etanola (100% EtOH) čime se stvara otopina 5 M gvanidin-HCl i 20 mM Tris-HCl pH vrijednosti 6.6 i čuva na 15 do 25°C do roka valjanosti komercijanog kompleta.

WB (*Wash Buffer*) – u 20 mL koncentriranog pufera dodati 80 mL apsolutnog etanola (100% EtOH) čime se stvara otopina 20 mM NaCl i 2 mM Tris-HCl pH vrijednosti 7.5 i čuva kao **IRB**.

Priprema prije izolacije

Reagense i uzorke treba temperirati na sobnu temperatru te uključiti termoblok na 70°C (*Eppendorf® Thermomixer comfort*) i zagrijati manju količinu **EB** (*Elution Buffer*; 10 mM Tris-HCl, pH 8,5) u 1,5 mL *Eppendorf® DNA LoBind* tubicu.

Izolacija genomske DNA

1. U novu 1,5 mL *Eppendorf® DNA LoBind* tubicu dodati 350 µL uzorka, 350 µL **BB** (*Binding Buffer*; 6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20% Triton X-

100(v/v), pH 4.4) i 50 µL proteinaze K, u slučaju oskudnog uzorka dodaje se PBS do traženog volumena.

2. Kratko vorteksirati (*Cleaver Scientific® Vortexer*) i inkubirati 10 min na 70°C (*Eppendorf® Thermomixer comfort*).
3. Nakon inkubacije ohladiti i dodati 100 µL izopropanola (*Merck Darmstadt® Germany* 2-propanol) za precipitaciju DNA te vorteksirati.
4. Sav sadržaj prebaciti u *High Pure Filter* tubicu uklopljenu u *Collection* tubicu.
5. Centrifugirati (*mySPIN™ 12 Mini Centrifuge*) 1 min na 8000 RPM (okretaji/min).
6. Odbaciti staru *Collection* tubicu i postaviti novu, zatim dodati 500 µL **IRB.**
7. Centrifugirati 2 min na 14000 RPM (okretaji/min).
8. Odbaciti staru *Collection* tubicu i postaviti novu, zatim dodati 900 µL **WB.**
9. Centrifugirati 2 min na 14000 RPM (okretaji/min).
10. Odbaciti staru *Collection* tubicu i postaviti novu.
11. Centrifugirati 2 min na 14000 RPM (okretaji/min) kako bi odstranili bilo kakve ostatke **WB.**
12. *High Pure Filter* tubicu prebaciti u novu 1,5 mL *Eppendorf® DNA LoBind* tubicu i dodati 120 µL prethodno zagrijanog **EB** i ostaviti da odstoji 3-4 min.
13. Centrifugirati 2-3 min na 8000 RPM (okretaji/min).
14. Odbaciti *High Pure Filter* tubicu, začepiti 1,5 mL *Eppendorf® DNA LoBind* tubicu s eluiranom DNA te vorteksirati.
15. Pohraniti na 4°C ili na -20°C za dugotrajnu pohranu.

Ovaj postupak izolacije pogodan je za uzorke pune krvi ili *buffy coat* iz pune krvi uzete u epruvetu s EDTA antikoagulansom. *Buffy coat* se priprema centrifugiranjem pune krvi 15 min na 2600 RPM (okretaji/min) i predstavlja srednji sloj s koncentriranim leukocitima. U ovom radu korištene su *Eppendorf Research®* pipete i pripadajući *Eppendorf Dualfilter®* PCR clean/sterile nastavci.

3.2 Kvantifikacija DNA

Kvantifikacija DNA postupak je određivanja količine izolirane DNA iz uzorka. U ovom istraživanju provedena je kako bi ustanovili da je optimalna količina DNA potrebna za genotipizaciju uopće izolirana predhodnim postupkom. U tu svrhu korišten je komercijalni komplet za kvantifikaciju dvolančane DNA (*Qubit™ dsDNA BR Assay Kit, invitrogen by*

Thermo Fisher Scientific™) pomoću *Qubit*® 4.0 fluorometra. Prema protokolu proizvođača, izolirana dvolanačna DNA kvantificira se na sljedeći način (47).

Na samom početku rada pripremiti dvije *Qubit*™ *Assay* tubice za DNA standarde i po jednu za svaki od pet uzoraka.

Priprema Mix-a (radne otopine)

Pripremiti 200 µL Mix-a za svaki standard i uzorak otapajući *Qubit*™ *dsDNA BR* reagens u *Qubit*™ *dsDNA* BR puferu u omjeru 1:200 (1 µL *Qubit*™ *dsDNA BR* reagensa i 199 µL *Qubit*™ *dsDNA BR* pufera čine 200 µL radne otopine). Reagens sadržava specifičnu fluorescentnu probu koja intenzivno fluorescira nakon interkalacije u molekuli DNA. Pripremljeni Mix ne vorteksirati, već lagano promiješati.

Priprema standarda i uzoraka

Ovaj komercijalni komplet sadržava dva DNA standarda, *Qubit*™ *dsDNA BR standard 1* i *Qubit*™ *dsDNA BR standard 2*. Koncentracija DNA u standardu 1 iznosi 0 ng/µL, a u standardu 2 iznosi 100 ng/µL.

Standardi se pripremaju na način da se na ukupan volumen od 200 µL doda 190 µL Mix-a i 10 µL svakog od standarda te vorteksira 2-3 sekunde.

Uzorci se pripremaju na način da se na ukupan volumen od 200 µL doda 195 µL Mix-a i 5 µL svakog od uzoraka te vorteksira 2-3 sekunde, a zatim inkubira na sobnoj temperaturi 2 min. Volumen uzorka za pripremu može biti od 1 do 20 µL, ali ukupan volumen mora biti 200 µL.

Očitavanje standarda i uzoraka

Koristeći Qubit® 4.0 fluorometar kvantificira se DNA u uzorcima. Na početnom zaslonu uređaja odabere se *dsDNA Broad Range* kao tip analize te očitaju standardi 1 i 2 (kalibriracija uređaja). Zatim se očitaju uzorci uz obavezno navođenje volumena uzorka kojem određujemo koncentraciju DNA.



Slika 7. *Qubit*® 4.0 fluorometar (48).

3.3 Priprema za genotipizaciju

Genotipizacija alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T provedena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*) poznate i kao kvantitativni PCR (qPCR, od eng. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) na uređaju *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System.* U svrhu pripreme DNA uzoraka i negativne kontrole za genotipizaciju korišten je *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays* komercijalni komplet prema modificiranom protokolu kako slijedi (49,50).

Sastav reakcijskog Mix-a

TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix – sadržava dvije specifične početnice, uzvodnu početnicu (engl. *forward primer*) i nizvodnu početnicu (engl. *reverse primer*) koje služe umnažanju polimorfne sekvence od interesa te dvije *TaqMan® MGB* probe, jednu označenu *VIC®* bojom i drugu označenu *FAM™* bojom. *VIC®* i *FAM™* boje su kovalentno vezani fluorofori na 5'-kraju *TaqMan® MGB* probi, a služe detekciji alelnih varijanti. U općenitom prikazu nukleotidnog slijeda od interesa koji okružuje ispitivani SNP, primjerice XXXXX[A/B]XXXXX, *VIC®* boja uvijek predstavlja alel A, dok *FAM™* boja uvijek predstavlja alel B. Prije korištenja resuspendirati (vorteksirati) i kratko centrifugirati.

TaqMan® Genotyping Master Mix – sadržava *AmpliTaq Gold® UP (Ultra Pure)* DNA-polimerazu i deoksinukleozid-trifosfate (dNTP-ovi) u optimiziranom puferu te pasivnu, internu referentnu boju *ROX ™* koja poboljšava preciznost rezultata kompenzirajući manje fluktuacije fluorescentnog signala uzrokovane npr. mjehurićima zraka. Prije korištenja temeljito promiješati mućkanjem spremnika.

Ambion® Nuclease-Free Water – prvenstveno služi za pripremu negativne kontrole prema preporuci proizvođača.

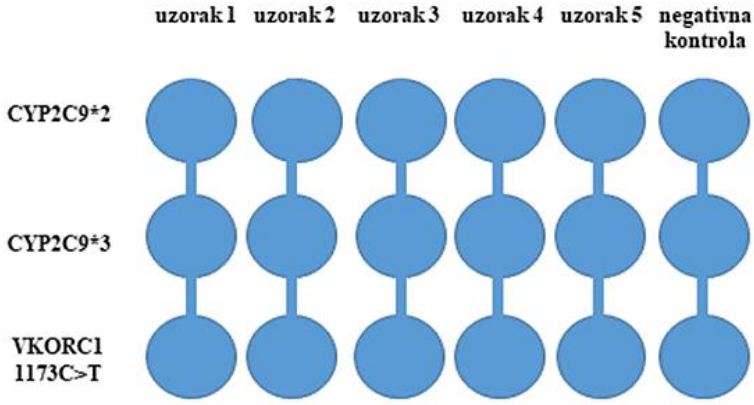
Priprema DNA uzoraka

Uzorke DNA potrebno je kratko vorteksirati. U svaku od tri optičke tubice *MicroAmp™ Optical 8-Cap* trakice (eng. *strip*) dodati 4 µL jednog DNA uzorka i 2,75 µL *Ambion® Nuclease-Free Water*, zatim 0,75 µL odgovarajućeg *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix-a* i 7,5 µL *TaqMan® Genotyping Master Mix-a*. Ukupni volumen iznosi 15 µL po optičkoj tubici. Odgovarajući *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix-ovi* dizajnirani su za svaki od

tri ispitivana SNP-a posebno i dodaju se u pripadajuću optičku tubcu što je prikazano na slici 8. Postupak se ponavlja za preostale uzorke koristeći nove *MicroAmp™ Optical 8-Cap* trakice.

Priprema negativne kontrole

U svaku od tri optičke tubice nove *MicroAmp™ Optical 8-Cap* trakice dodati 6,75 µL *Ambion® Nuclease-Free Water* i 0,75 µL odgovarajućeg *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay Mix-a* te 7,5 µL *TaqMan® Genotyping Master Mix-a*. Ukupni volumen u svakoj optičkoj tubici iznosi 15 µL.



Slika 8. Shematski prikaz reakcijskog panela.

3.4 Određivanje genskih polimorfizama lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu

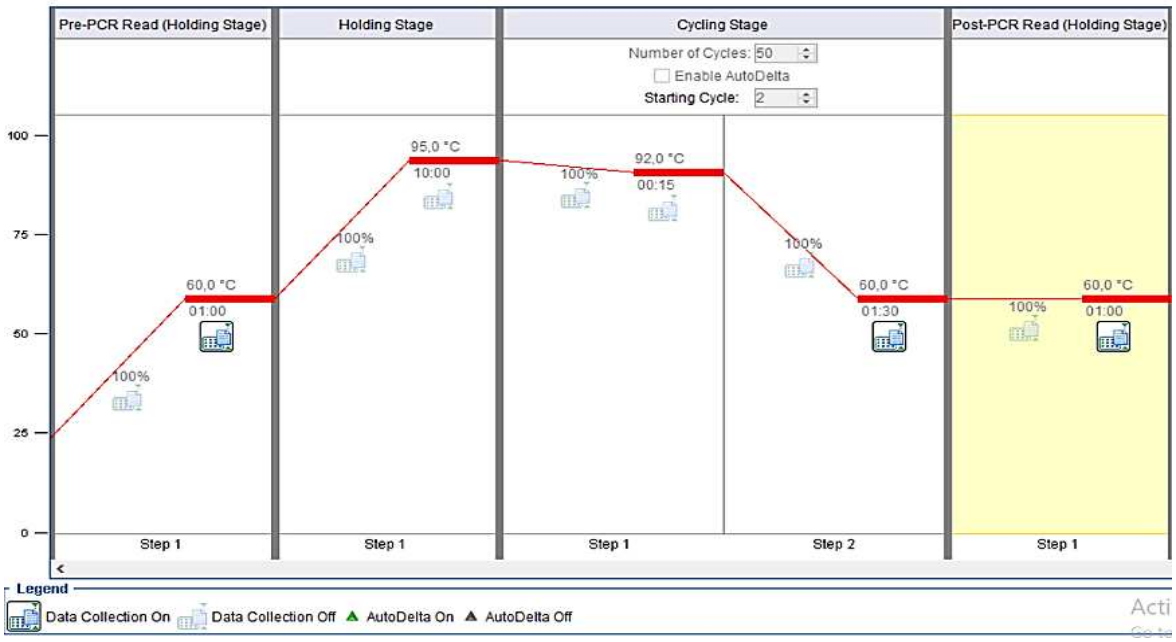
Genotipizacija podrazumijeva određivanje definiranih alelnih mutacija metodama molekularne dijagnostike koje se temelje na lanačanoj reakciji polimeraze te prepoznavanju homozigotnih ili heterozigotnih nositelja mutiranih alela (2). Pripremljeni prethodnim postupkom, DNA uzorci i negativna kontrola spremni su za genotipizaciju. Postavljaju se u *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System* uređaj kako bi započeli analizu pri zadanim radnim uvjetima:

Pre-PCR *Read* (faza zadržavanja) - 1 min na 60°C

Holding stage (denaturacija) - 10 min na 95°C

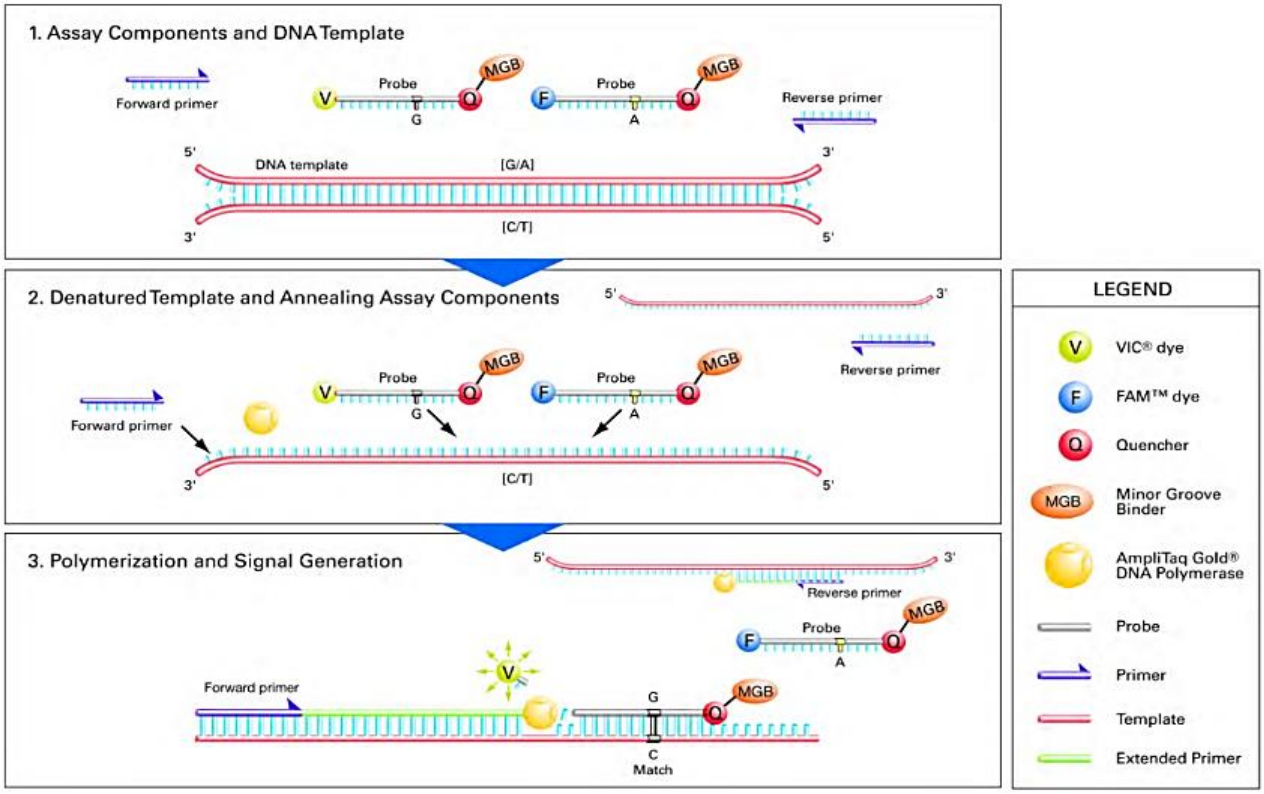
Cycling stage (amplifikacija) - 50 ciklusa 15 s na 92°C i 90s na 60°C

Post-PCR *Read* (faza zadržavanja) - 1 min na 60°C



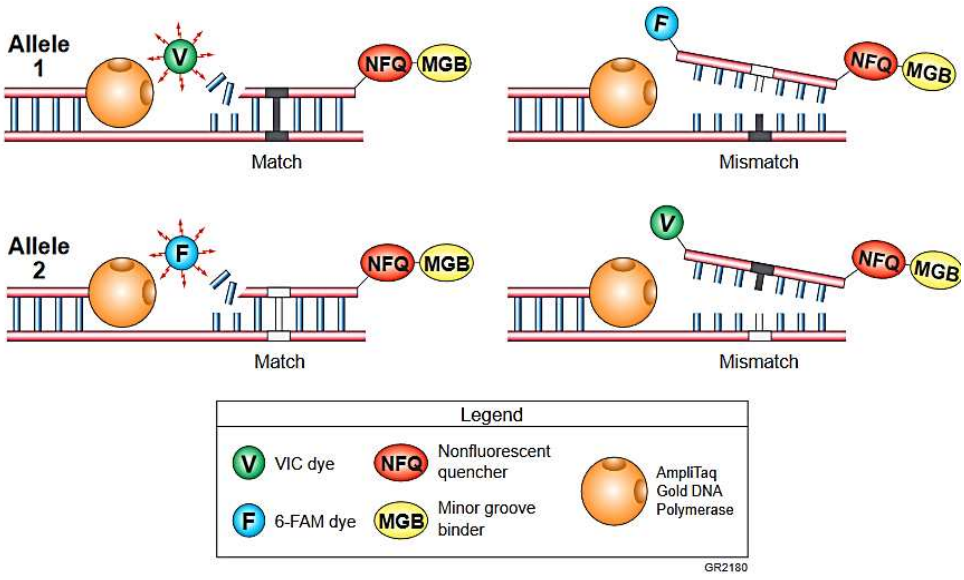
Slika 9. Radni uvjeti *real-time* PCR.

Određivanje genskih polimorfizama *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T provedeno je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu prema sljedećem principu prikazanom na slici 10 (49,50).



Slika 10. *TaqMan® Genotyping Assay real-time* PCR princip rada (49).

Genomska DNA uvedena je u reakcijsku smjesu koja se sastoji od *TaqMan®Genotyping Master Mix-a*, uzvodne i nizvodne početnice, dvije *TaqMan® MGB* probe i *Ambion® Nuclease-Free* vode. Nakon denaturacije DNA, svaka se *TaqMan® MGB* proba specifično veže na komplementarni slijed nukleotida između uzvodne i nizvodne početnice (ukoliko on postoji). Osim što sadržava jednu *reporter* boju (*VIC®* ili *FAM™*) kovalentno vezanu na 5'-kraju, svaka *TaqMan® MGB* proba sadržava i nefluorescirajući *quencher* (*NFQ*) na 3'-kraju uz *minor groove binder* (*MGB*) što je vidljivo na slici 11. *MGB* molekula poboljšava hibridizaciju probe i kalupa DNA što omogućuje korištenje kraćih proba i lakše razlikovanje krivo sparenih. Dok je *TaqMan® MGB* proba netaknuta, *quencher* molekula smanjuje intenzitet fluorescencije *reporter* boje *Förster resonance energy transfer* (*FRET*) mehanizmom zbog njihove neposredne blizine. Istovremeno se uzvodna i nizvodna početnica povezuju s komplementarnim sljedovima DNA. Zatim započinje umnažanje ciljnog segmenta *AmpliTaq Gold®* DNA-polimerazom čija 5'-3' egzonukleazna aktivnost omogućuje cijepanje *TaqMan® MGB* probe. Na taj se način odvaja *reporter* boja od *quencher* molekule i povećava intenzitet fluorescencije koji se prati kako reakcija napreduje, tj. u stvarnom vremenu što nije slučaj kod standardne PCR metode (51). Budući da se povećanje intenziteta fluorescencije događa samo ako je prisutan ciljani DNA segment komplementaran *TaqMan® MGB* probi, ovaj signal pokazuje koji su aleli prisutni u uzorku (Slika 11.).

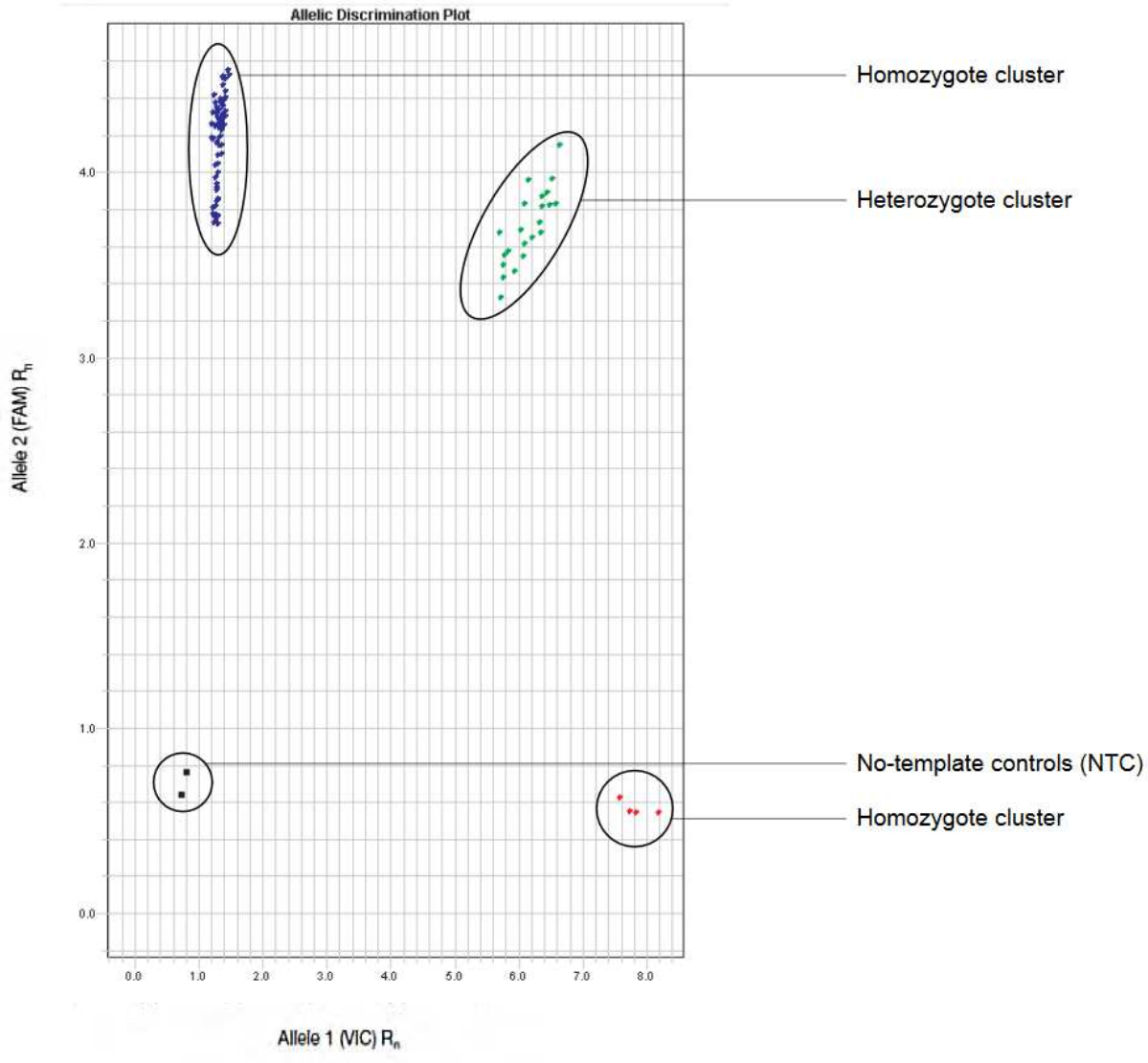


A substantial increase in...	Indicates...
VIC® dye fluorescence only	Homozygosity for Allele 1
FAM™ dye fluorescence only	Homozygosity for Allele 2
Both VIC and FAM fluorescence	Allele 1-Allele 2 heterozygosity

Slika 11. Shematski prikaz stvaranja fluorescentnog signala (50).

4 REZULTATI

Nakon *real-time* PCR umnažanja, rezultati se očitavaju pomoću *real-time* PCR softvera koji grupira R_n vrijednosti koristeći mjerenja fluorescentnog signala u svakoj optičkoj tubici zabilježena na kraju svakog ciklusa umnažanja (49). R_n vrijednost predstavlja omjer izmjerenog intenziteta fluorescencije *reporter* boje i onog pasivne *ROX*™ boje čiji se intenzitet fluorescencije ne mijenja tijekom PCR ciklusa, omogućujući preciznije rezultate otporne na manje varijacije (49). Rezultati se prikazuju kao dijagram raspršenja (*allelic discrimination scatter plot*) prvog alela (*VIC*® boja) naspram drugog alela (*FAM*™ boja). Svaka optička tubica reakcijskog panela prikazana je kao pojedinačna točka na dijagramu, a predstavlja pojedinačan uzorak za određeni SNP. Idealno, dijagram raspršenja prikazuje jednu, dvije ili tri skupine točaka (*clusters*) te negativnu kontrolu blizu ishodišta. Grupirane točke usko su povezane i svaka se skupina nalazi dosta dalje od druge (Slika 12.) (49).



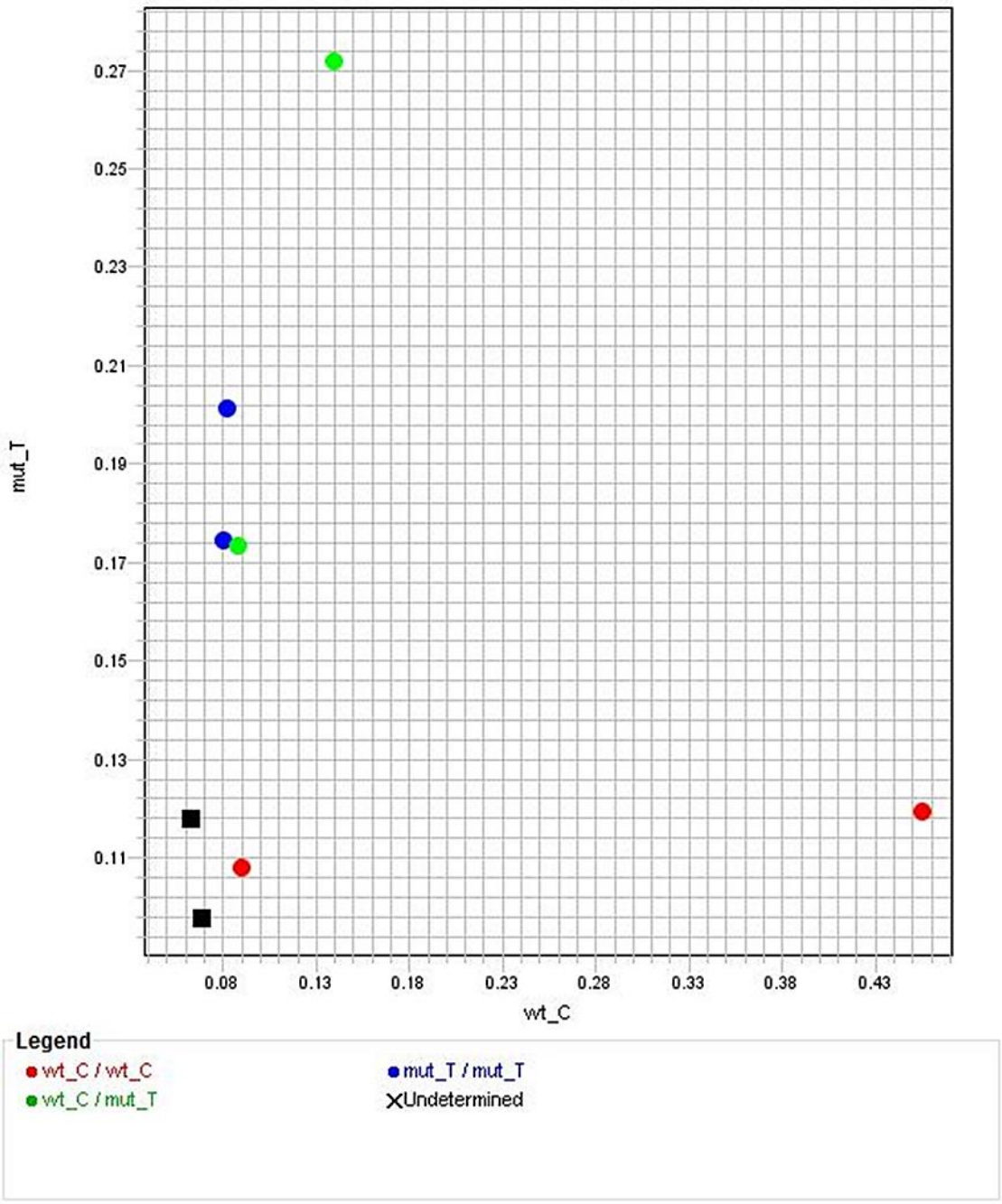
Slika 12. Primjer idealnog *allelic discrimination* dijagrama (49).

Interpretacija prikupljenih podataka, odnosno način na koji softver prepoznaje i određuje koji se alel nalazi u kojem uzorku, prikazano je pomoću tablice 6.

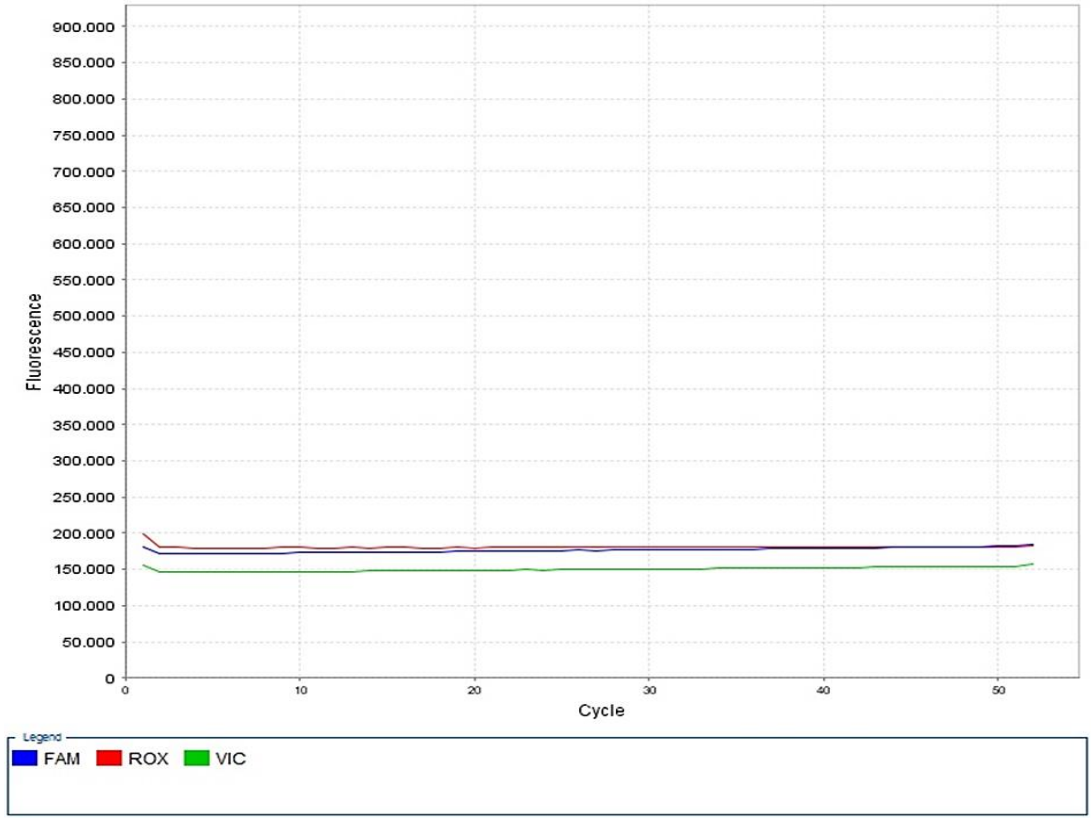
Tablica 6. Interpretacija *allelic discrimination* dijagrama (49).

Sadržaj uzorka	Položaj na dijagramu
Alel 1 (homozigot), označen VIC® bojom	Donji desni kut
Alel 2 (homozigot), označen FAM™ bojom	Gornji lijevi kut
Aleli 1 i 2 (heterozigot)	Otprilike na sredini između skupina što predstavljaju alel 1 i alel 2
Negativna kontrola	Donji lijevi kut
Neodređen	Bilo gdje izvan gore opisanih regija
Bez PCR umnažanja	Negativna kontrola u donjem lijevom kutu

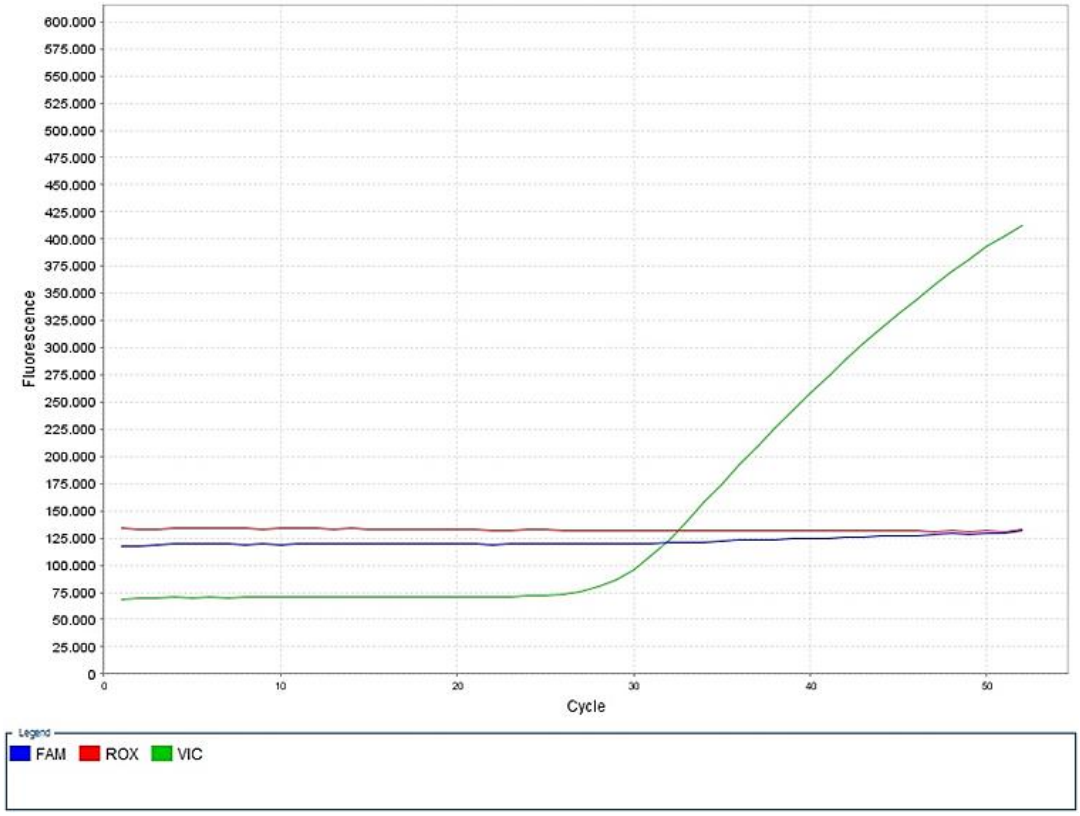
Rezultati se prikazuju i pomoću *multicomponent* dijagrama koji predstavlja grafički prikaz potpunog spektralnog doprinosa svake od boja (*VIC*®, *FAM*™ i *ROX*™) u odabranoj optičkoj tubici tijekom trajanja PCR ciklusa (52). To podrazumijeva da za svaku pojedinačnu točku *allelic discrimination* dijagrama postoji pripadajući *multicomponent* dijagram. U idealnom slučaju razina fluorescencije pasivne boje relativno je konstantna tijekom PCR ciklusa dok razina fluorescencije *reporter* boje pokazuje brzi porast kako reakcija napreduje ovisno o prisutnom alelu u uzorku (52). Svaka krivulja *multicomponent* dijagrama predstavlja po jednu boju i treba jasno prikazivati navedene promjene (52). *Multicomponent* dijagram za optičku tubicu s negativnom kontrolom ne smije prikazivati porast signala budući da nema umnažanja DNA molekule. Ovaj se dijagram redovito koristi kako bi se potvrdili dobiveni rezultati *allelic discrimination* dijagrama te razlikovali stvarni fluorescentni signali od pozadinskog šuma (52). Na sljedećim slikama prikazani su primjeri reprezentativnih *allelic discrimination* i *multicomponent* dijagrama dobiveni genotipizacijom alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T i *VKORC1* -1639G>A na jednak način kako je to opisano u ovom radu u kemijsko-toksikološkom laboratoriju Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog bolničkog centra u Splitu (KBC Split).



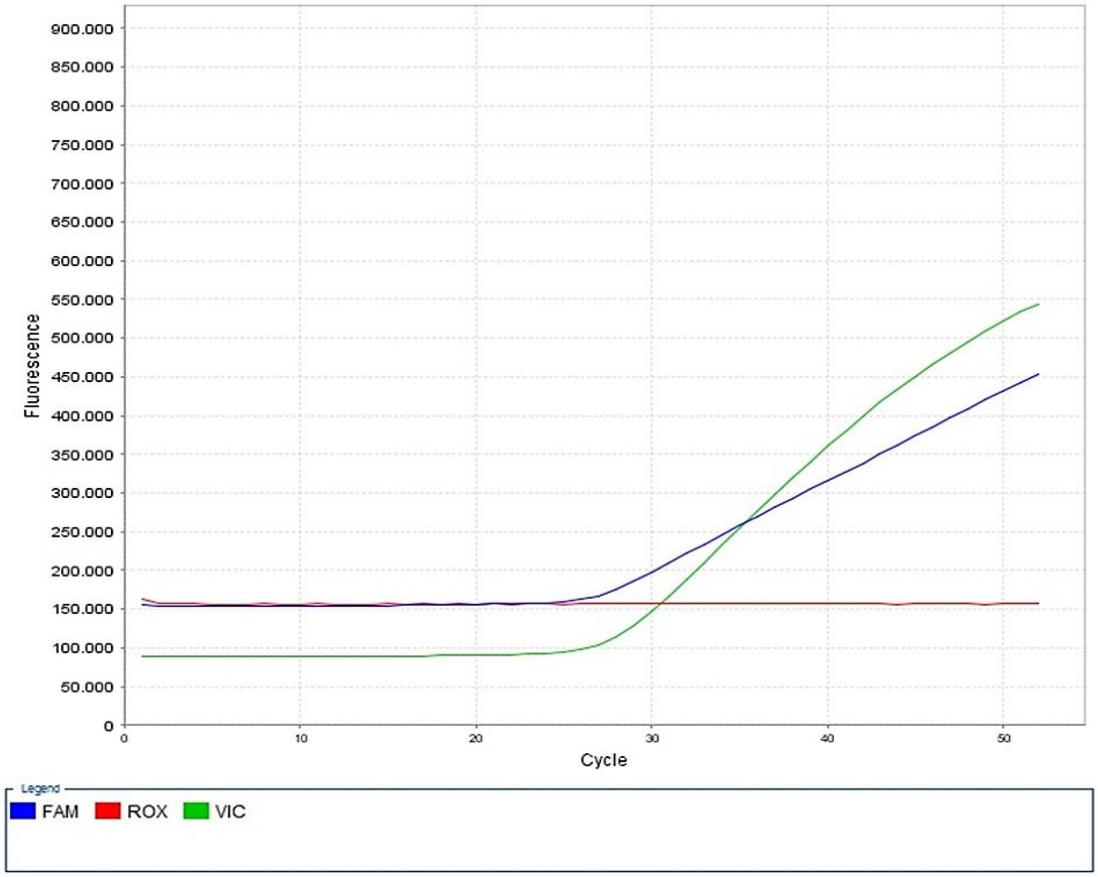
Slika 13. Primjer *allelic discrimination* dijagrama za *CYP2C9*2* genotipizaciju. Analizirano je šest različitih uzoraka (šest točaka na dijagramu) i dvije negativne kontrole (dva crna kvadrata). Rezultati pokazuju da su dva ispitanika nositelji divljeg (izvornog) genotipa, druga dva ispitanika su heterozigoti, a zadnja dva ispitanika su homozigoti varijantnog (mutiranog) alela. U ovom slučaju *reporter* boja *VIC*® predstavlja izvorni, a *reporter* boja *FAM*™ varijantni alel.



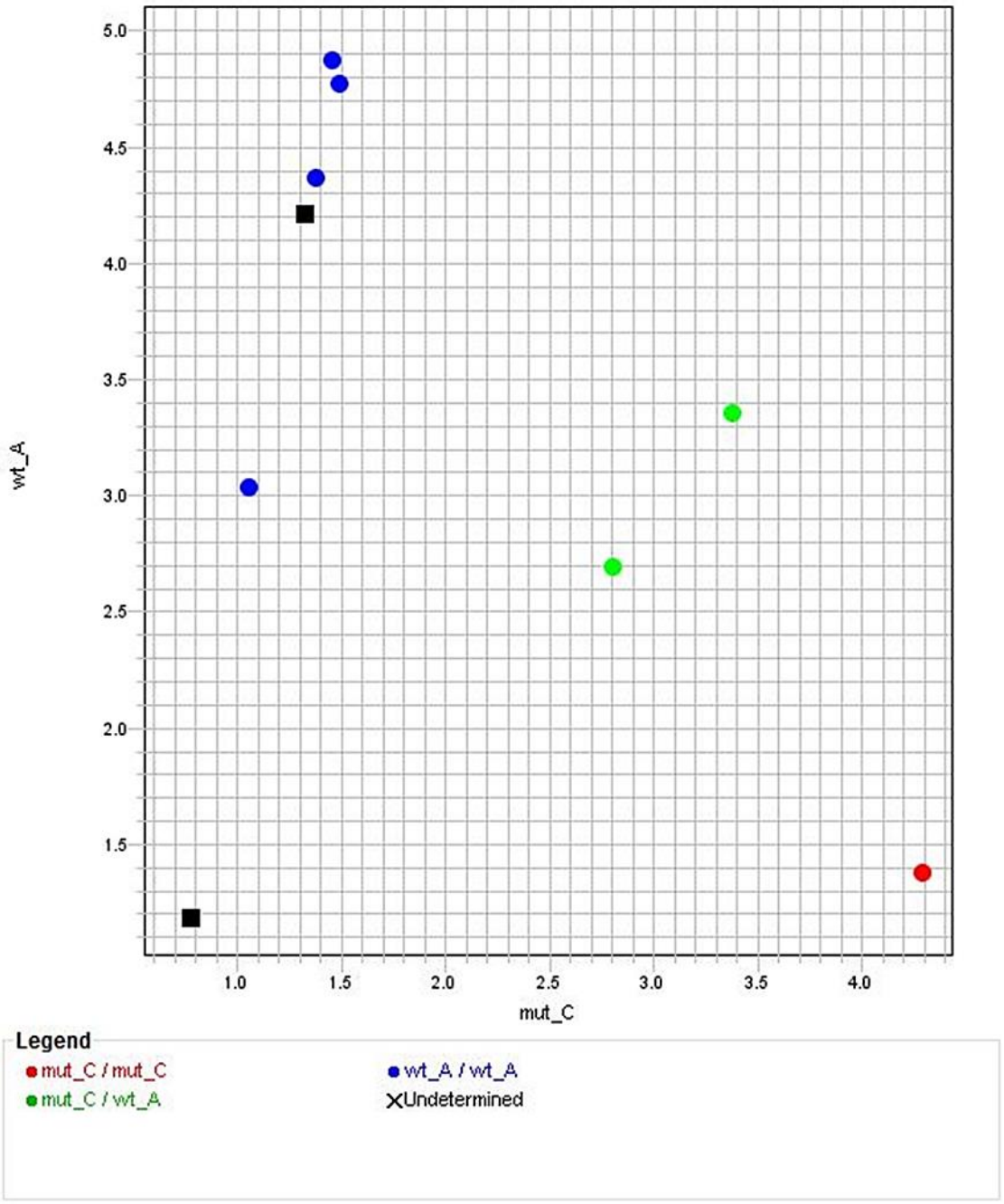
Slika 14. Primjer *multicomponent* dijagrama za negativnu kontrolu (nema porasta signala).



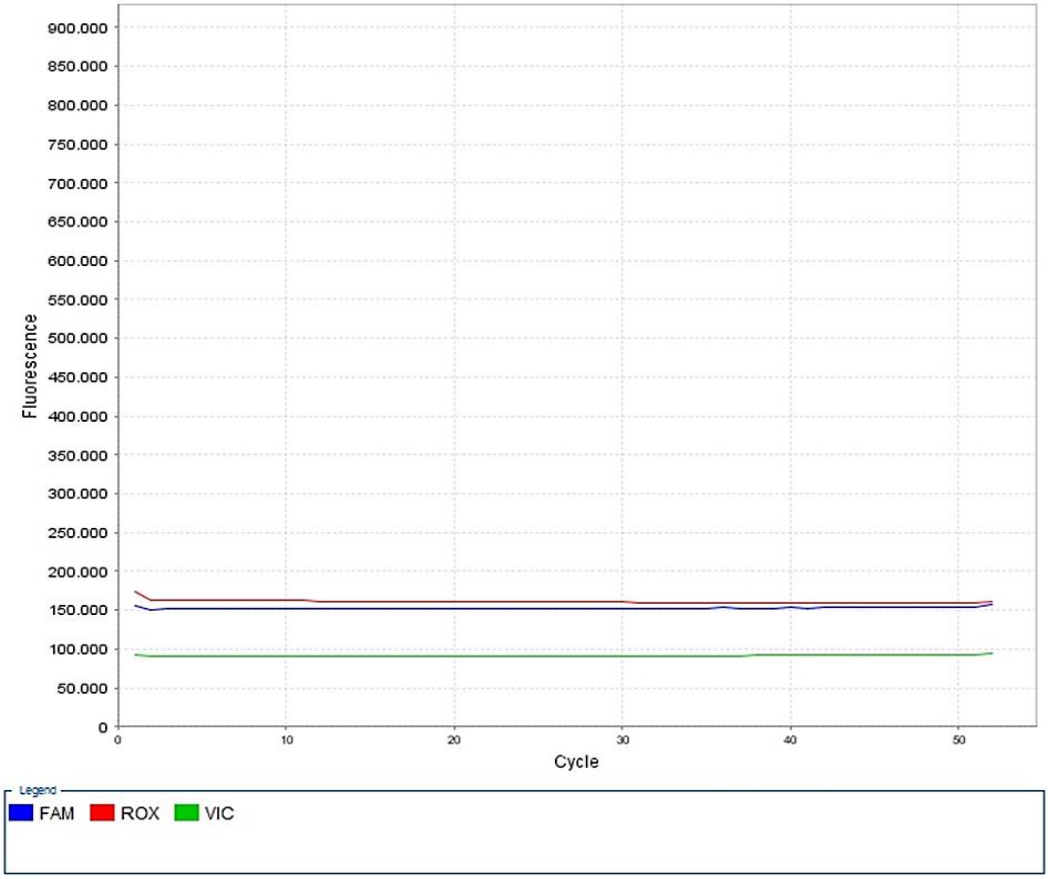
Slika 15. Primjer *multicomponent* dijagrama za izvorni, divlji genotip *CYP2C9*1/*1* (jasan porast intenziteta fluorescencije isključivo *VIC*® boje).



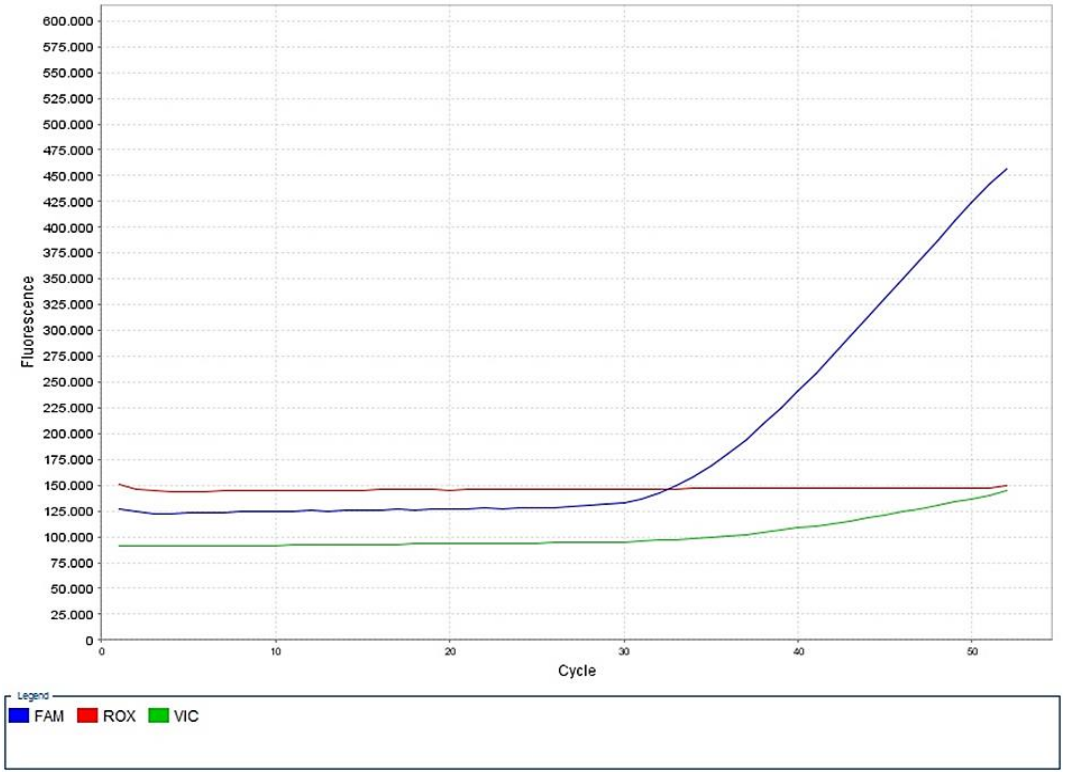
Slika 16. Primjer *multicomponent* dijagrama za heterozigotni genotip *CYP2C9*1/*2* (jasan porast intenziteta fluorescencije obje *reporter* boje).



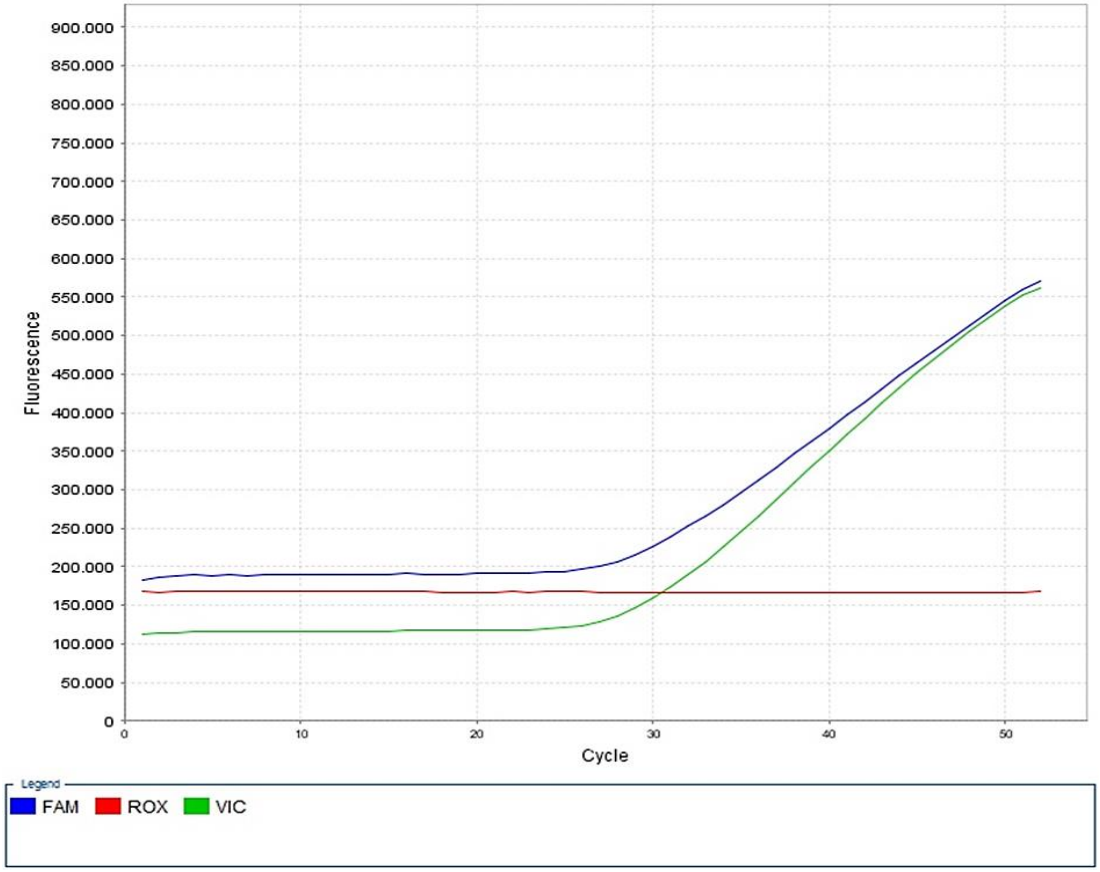
Slika 17. Primjer *allelic discrimination* dijagrama za *CYP2C9*3* genotipizaciju. Analizirano je sedam različitih uzoraka (sedam točaka na dijagramu) i dvije negativne kontrole (dva crna kvadrata). Rezultati pokazuju da su četiri ispitanika nositelji divljeg (izvornog) genotipa, dva ispitanika su heterozigoti, a jedan ispitanik je homozigot varijantnog (mutiranog) alela. U ovom slučaju *reporter* boja *VIC*® predstavlja varijantni, a *reporter* boja *FAM*™ izvorni alel.



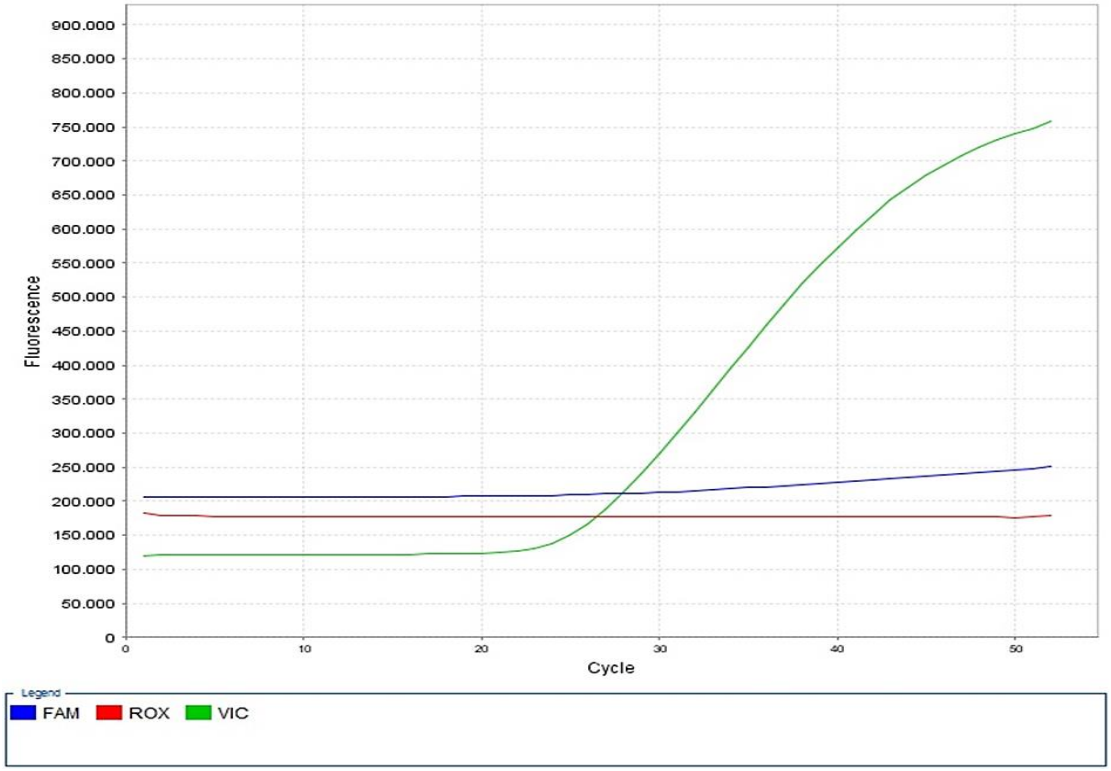
Slika 18. Primjer *multicomponent* dijagrama za negativnu kontrolu (nema porasta signala).



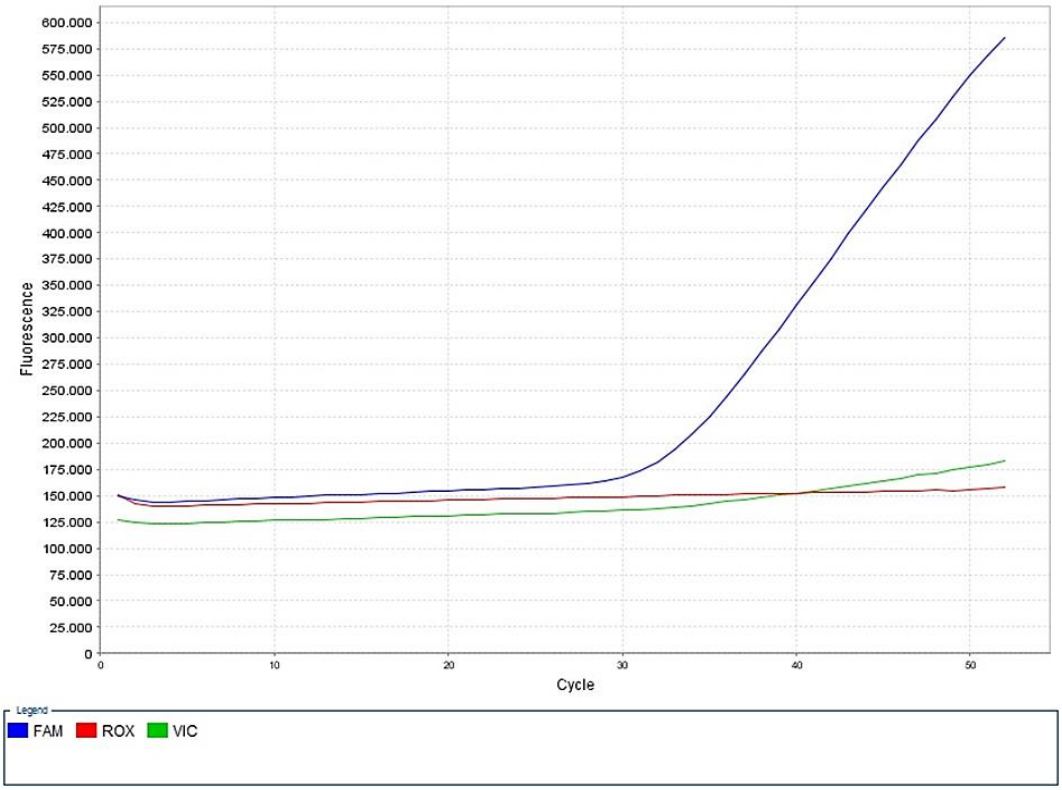
Slika 19. Primjer *multicomponent* dijagrama za izvorni, divlji genotip *CYP2C9*1/*1* (jasan porast intenziteta fluorescencije isključivo *FAM*™ boje).



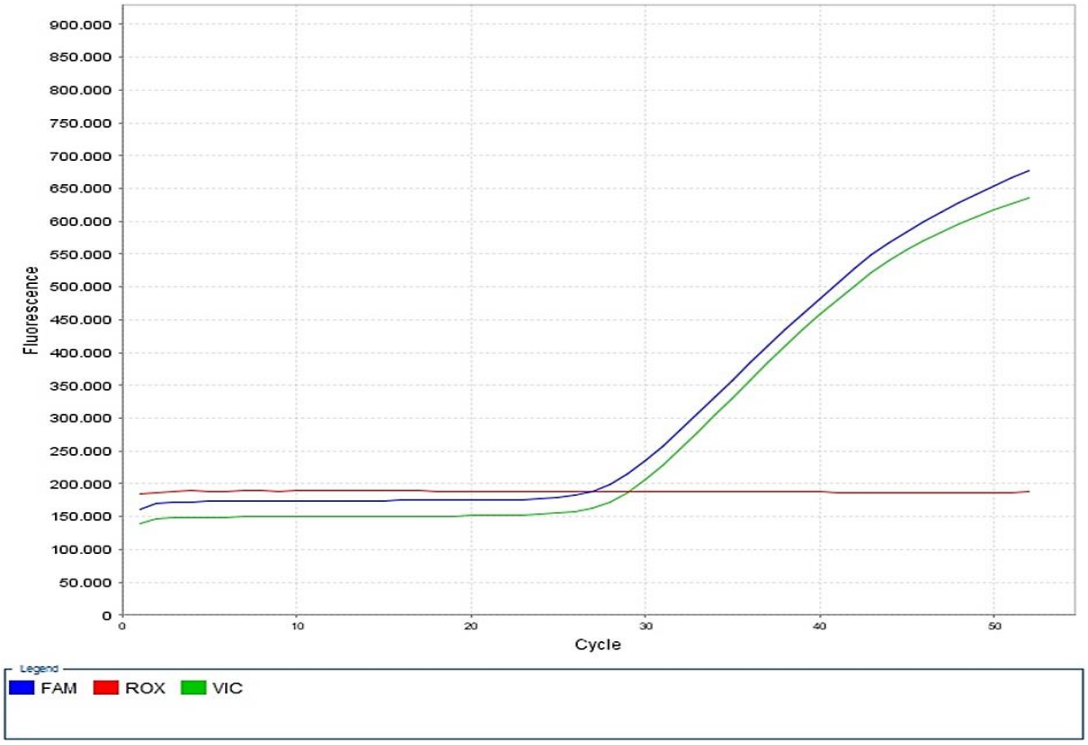
Slika 20. Primjer *multicomponent* dijagrama za heterozigotni genotip *CYP2C9*1/*3* (jasan porast intenziteta fluorescencije obje *reporter* boje).



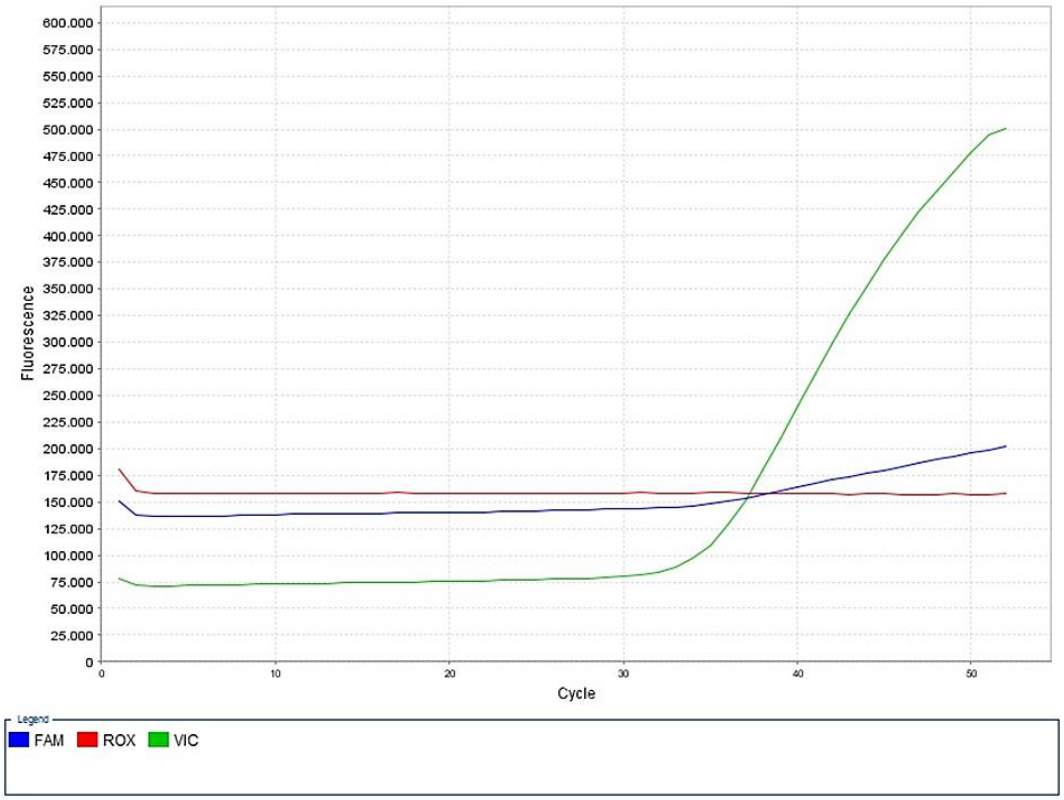
Slika 21. Primjer *multicomponent* dijagrama za genotip varijantnog homozigota *CYP2C9*3/*3* (jasan porast intenziteta fluorescencije isključivo *VIC*® boje).



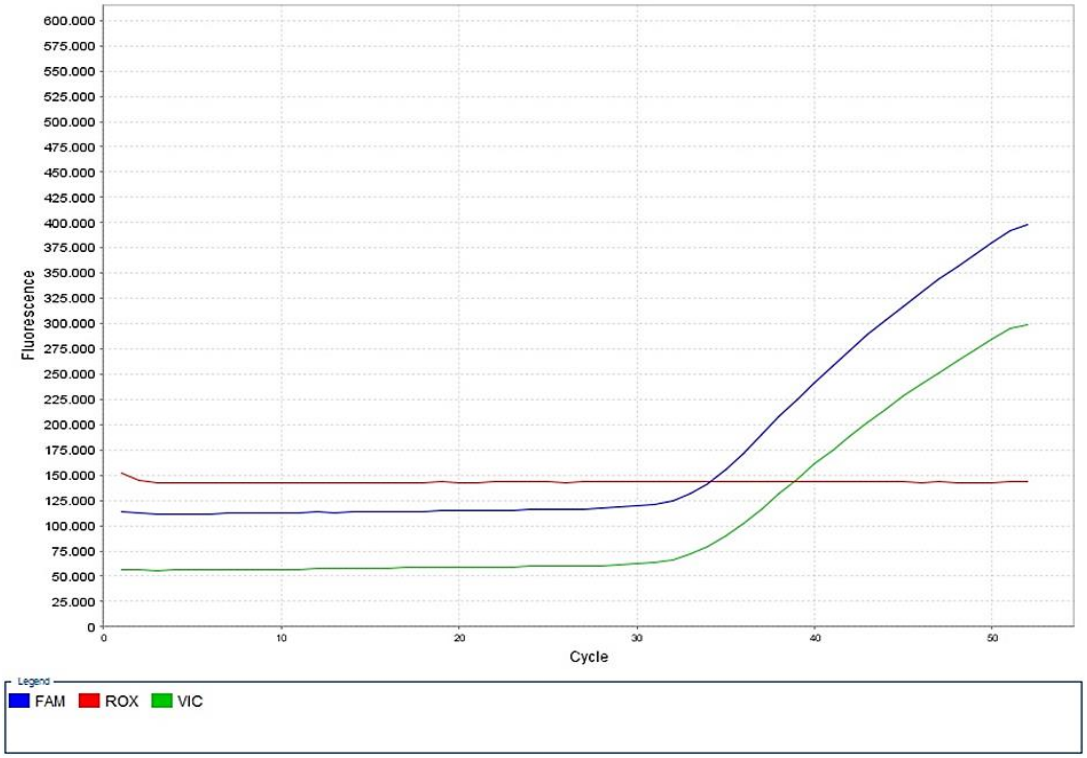
Slika 22. Primjer *multicomponent* dijagrama za izvorni, divlji genotip *VKORC1* 1173 C/C (jasan porast intenziteta fluorescencije isključivo *FAM*™ boje koja u ovom slučaju predstavlja izvorni alel).



Slika 23. Primjer *multicomponent* dijagrama za heterozigotni genotip *VKORC1* 1173 C/T (jasan porast intenziteta fluorescencije obje *reporter* boje).



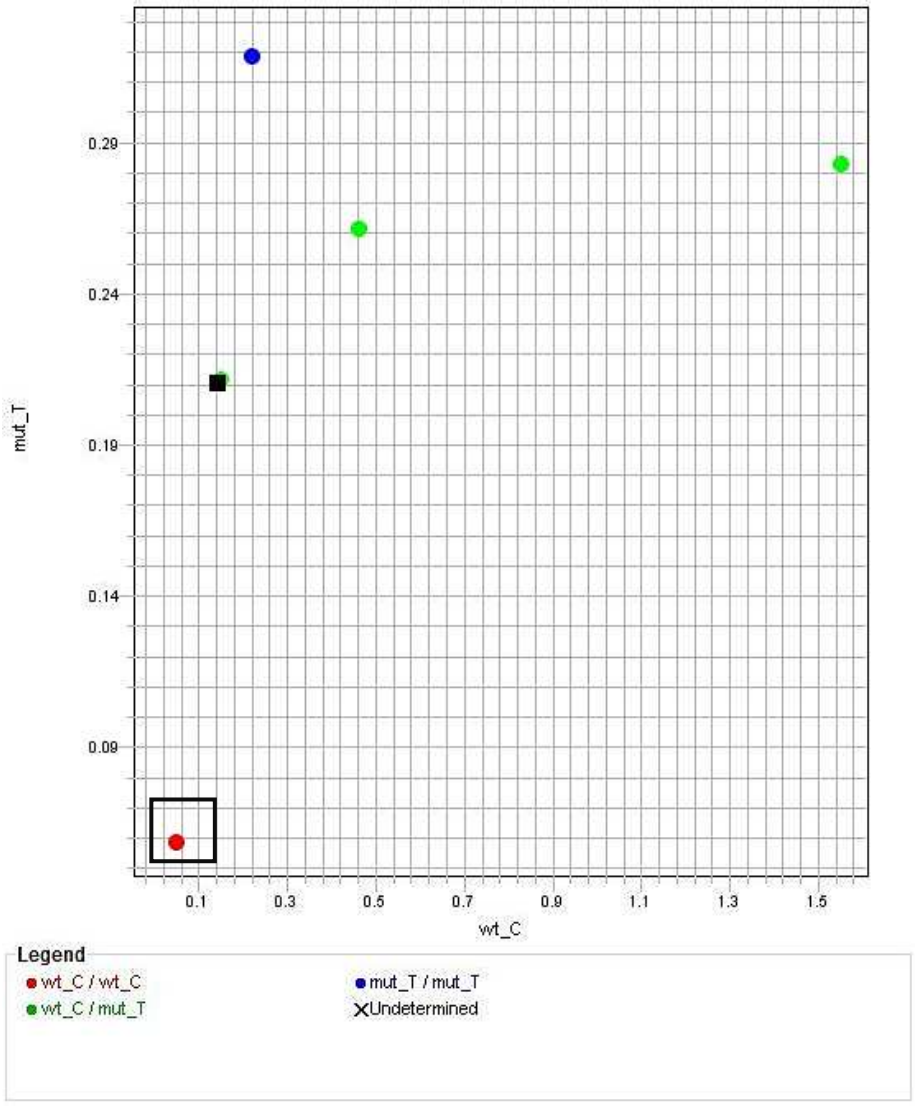
Slika 24. Primjer *multicomponent* dijagrama za izvorni, divlji genotip *VKORC1* -1639G/G (jasan porast intenziteta fluorescencije isključivo *VIC*® boje koja u ovom slučaju predstavlja izvorni alel).



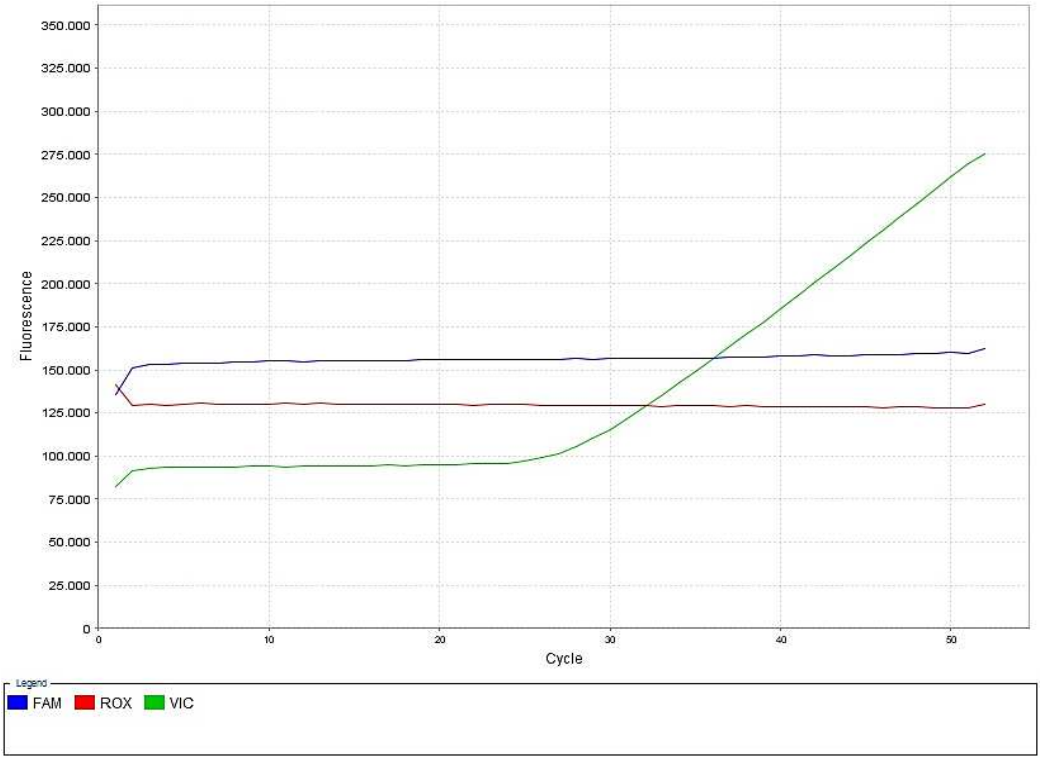
Slika 25. Primjer *multicomponent* dijagrama za heterozigotni genotip *VKORC1* -1639G/A (jasan porast intenziteta fluorescencije obje *reporter* boje).

Navedeni primjeri reprezentativnih grafičkih prikaza služe boljem razumijevanju i interpretaciji dobivenih rezultata farmakogenetičkog ispitivanja ovog rada koji su prikazani na sljedećim slikama. Za svaki od tri ispitivana genska polimorfizama prikazan je dobiveni *allelic discrimination* dijagram te pripadajući *multicomponent* dijagram kojim se potvrđuje rezultat za pojedini uzorak.

Na slici 26. prikazani su rezultati genotipizacije *CYP2C9*2* polimorfizma dobiveni analizom bioloških uzoraka venske krvi kako je to opisano u prethodnom poglavlju. Unatoč jasno dodijeljenim genotipovima pojedinom uzorku (vidljivo na *allelic discrimination* dijagramu) samo je za uzorak broj 1 navedeno i potvrđeno *multicomponent* dijagramom koji prikazuje jasan porast intenziteta fluorescencije *VIC*® boje (Slika 27.). Ovakav signal nedostaje na ostalim *multicomponent* dijagramima, stoga nije bilo moguće točno odrediti genotip ostalih uzoraka.



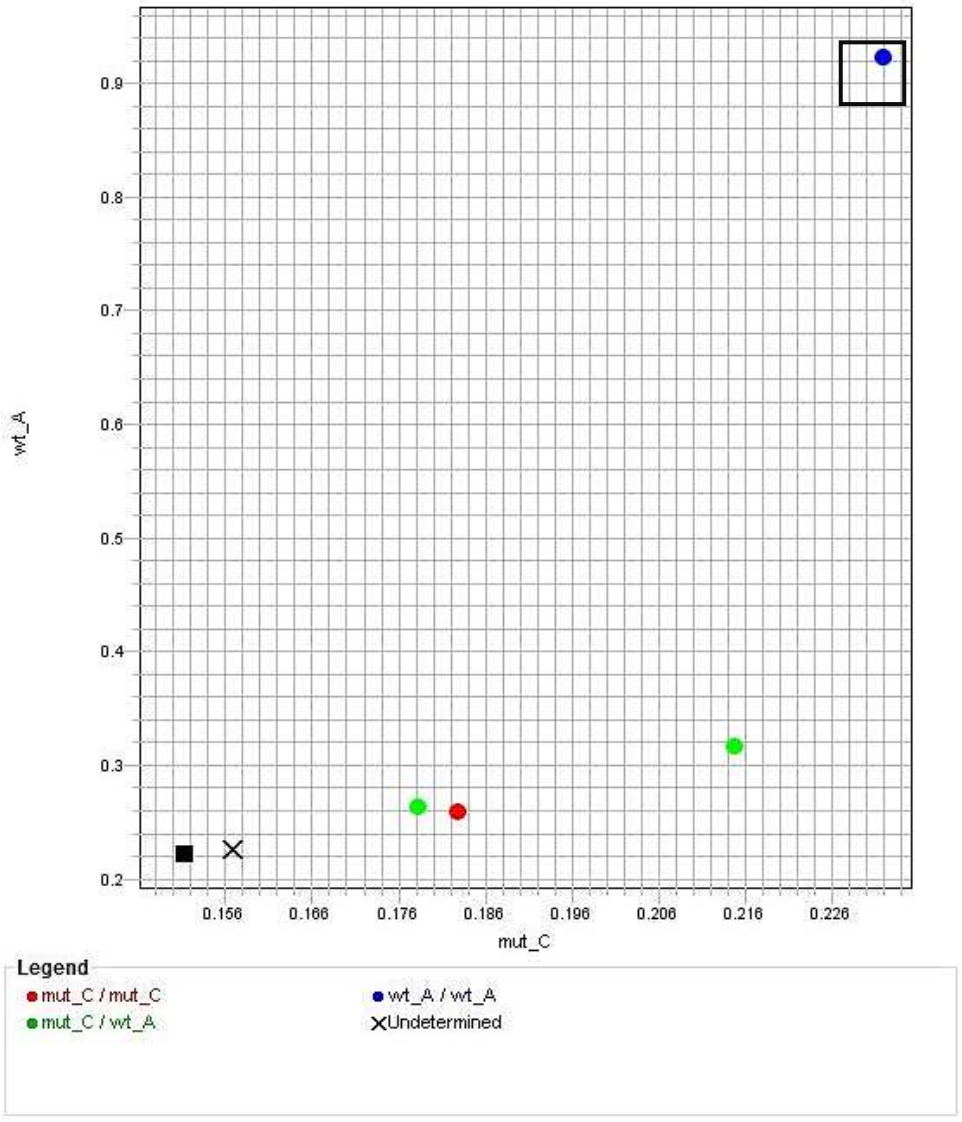
Slika 26. Dobiveni rezultati *CYP2C9*2* genotipizacije prikazani pomoću *allelic discrimination* dijagrama. Na slici je označen ispitivani uzorak broj 1.



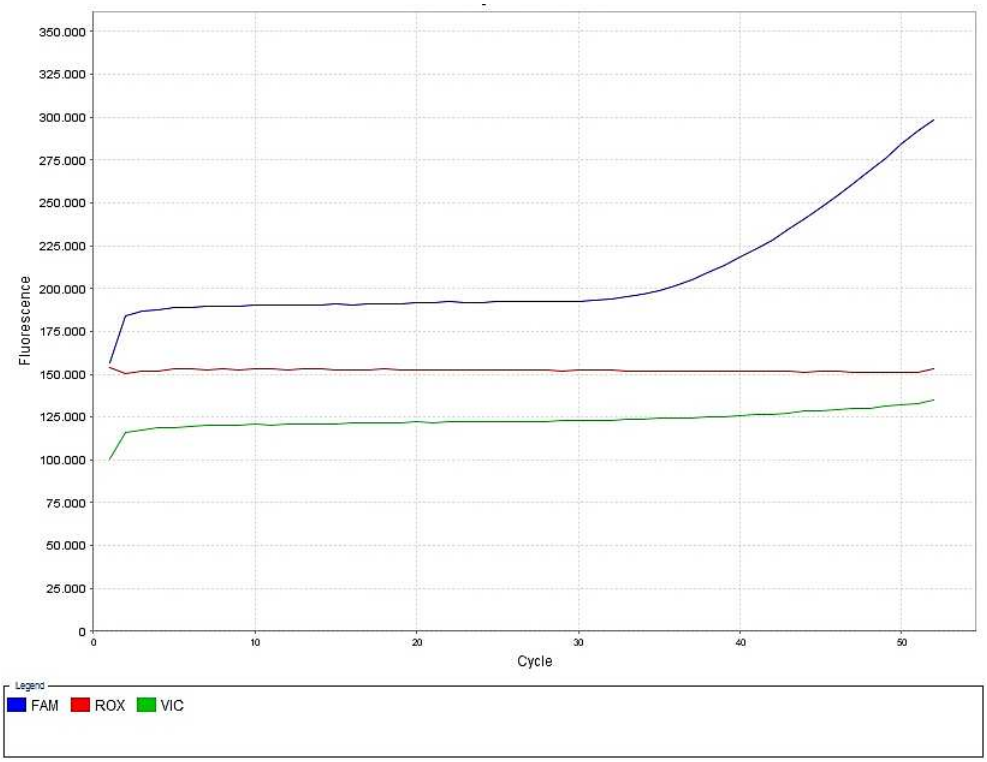
Slika 27. *Multicomponent* dijagram ispitivanog uzorka broj 1.

Budući da *VIC*® boja predstavlja izvorni alel, genotip ispitivanog uzorka broj 1 odgovara homozigotu izvornog, divljeg alela *CYP2C9*1/*1*.

Na slici 28. prikazani su rezultati genotipizacije *CYP2C9*3* polimorfizma dobiveni analizom bioloških uzoraka venske krvi kako je to opisano u prethodom poglavlju. Unatoč jasno dodijeljenim genotipovima za četiri uzorka (vidljivo na *allelic discrimination* dijagramu) samo je za uzorak broj 1 navedeno i potvrđeno *multicomponent* dijagramom koji prikazuje jasan porast intenziteta fluorescencije *FAM*™ boje (Slika 29.). Budući da ovakav signal nedostaje na ostalim *multicomponent* dijagramima, nije bilo moguće točno odrediti genotip ostalih uzoraka.



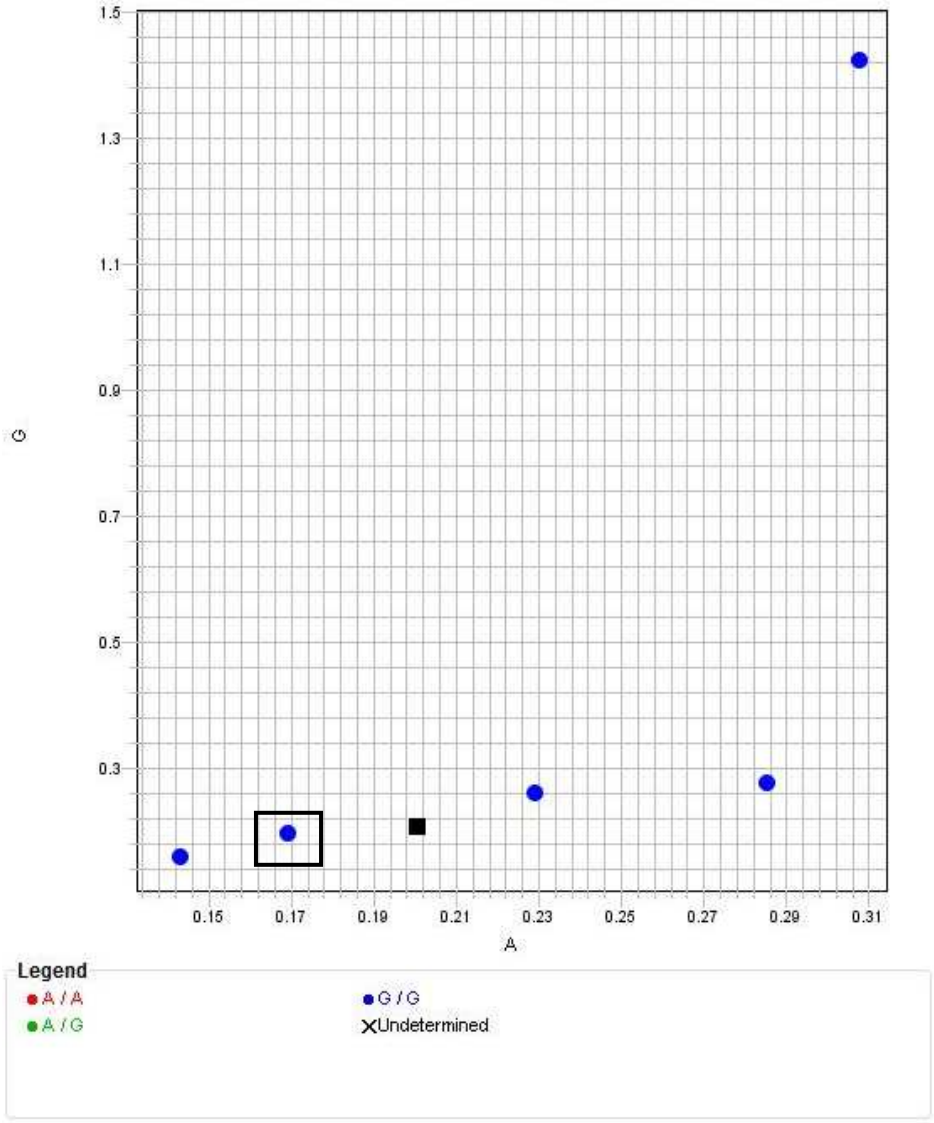
Slika 28. Dobiveni rezultati *CYP2C9*3* genotipizacije prikazani pomoću *allelic discrimination* dijagrama. Na slici je označen ispitivani uzorak broj 1.



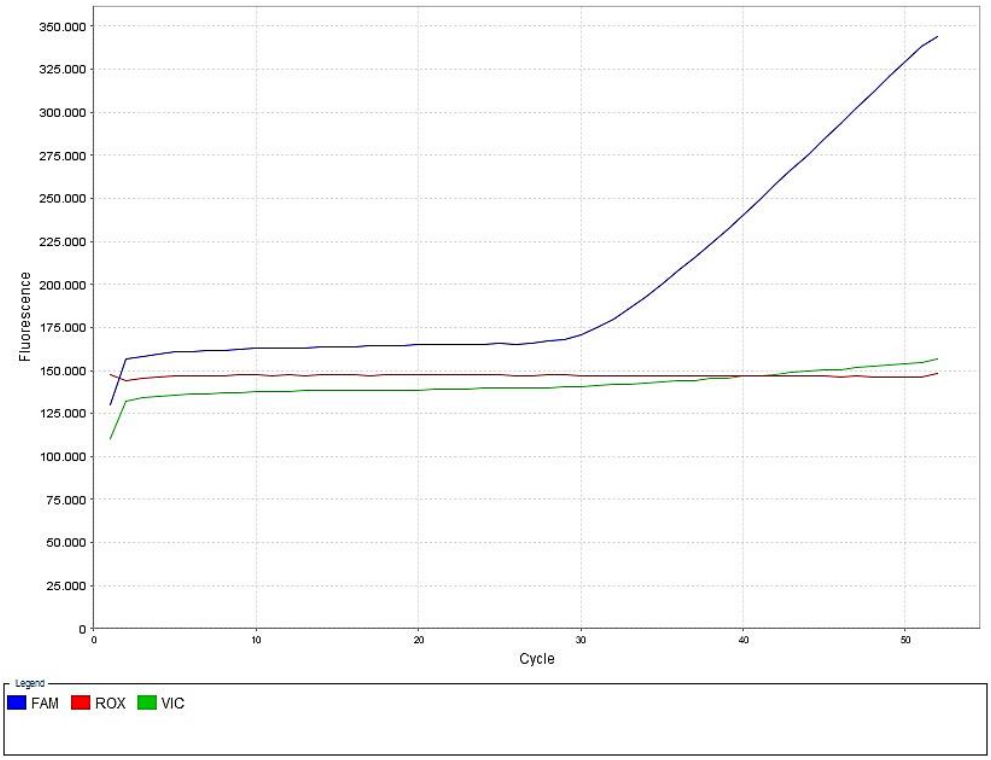
Slika 29. *Multicomponent* dijagram ispitivanog uzorka broj 1.

Budući da *FAM*™ boja predstavlja izvorni alel, genotip ispitivanog uzorka broj 1 odgovara homozigotu izvornog, divljeg alela *CYP2C9*1/*1*.

Na slici 30. prikazani su rezultati genotipizacije *VKORC1* 1173C>T polimorfizma dobiveni analizom bioloških uzoraka venske krvi kako je to opisano u prethodom poglavlju. Unatoč jasno dodijeljenim genotipovima pojedinom uzorku (vidljivo na *allelic discrimination* dijagramu) samo je za uzorak broj 1 navedeno i potvrđeno *multicomponent* dijagramom koji prikazuje jasan porast intenziteta fluorescencije *FAM*™ boje (Slika 31.). Ovakav signal nedostaje na ostalim *multicomponent* dijagramima, zato nije bilo moguće točno odrediti genotip ostalih uzoraka.



Slika 30. Dobiveni rezultati genotipizacije *VKORC1* 1173C>T prikazani pomoću *allelic discrimination* dijagrama. Na slici je označen ispitivani uzorak broj 1.



Slika 31. *Multicomponent* dijagram ispitivanog uzorka broj 1.

Budući da *FAM*™ boja predstavlja izvorni alel, genotip ispitivanog uzorka broj 1 odgovara homozigotu izvornog, divljeg alela *VKORC1* 1173C/C. Imajući na umu veliku veznu neravnotežu (engl. *linkage disequilibrium*) *VKORC1* 1173C>T i *VKORC1* -1639G>A alela, vrlo je vjerojatno da genotip ovog uzorka odgovara i homozigotu izvornog, divljeg alela *VKORC1* -1639G/G budući se spomenuti genski polimorfizmi gotovo isključivo uvijek javljaju zajedno.

5 RASPRAVA

U ovom je radu prikazana genotipizacija alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*). Analizom dobivenih rezultata uspješno je određen genotip ispitivanog uzorka broj 1 koji odgovara homozigotu divljeg (izvornog) alela za svaki od ispitivanih polimorfizama. Prema preporuci američke Agencije za hranu i lijekove (Tablica 5.) početna doza i doza održavanja varfarina za ovog ispitanika iznosi 5-7mg (36). Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće utvrditi sa sigurnošću jer fluoresentni signal vidno nedostaje na pripadajućim *multicomponent* dijagramima.

Više je uzroka kojima se mogu objasniti navedeni rezultati, a najvjerojatniji je razgradnja molekule DNA uslijed dugotrajne pohrane uzoraka za analizu (49). Razgradnja molekule DNA nastaje i uporabom DNA izdvojene iz formalinom fiksiranih uzoraka uklopljenih u parafin, uslijed ponavljanog zamrzavanja i odmrzavanja DNA uzoraka, ostavljanja DNA uzoraka na sobnoj temperaturi, izlaganja toplini ili fizičkom smicanju te uslijed nedovoljnog DNA pročišćavanja pri čemu dio nukleaza preostane u uzorku (49,53). Navedeni problem moguće je prevladati na način da se prije započinjanja genotipizacije provede postupak agarozne gel-elektroforeze i utvrdi je li DNA razgrađena (49). Osim razgradnje DNA molekule mogući su i ostali problemi prilikom pripreme uzoraka poput prisustva PCR inhibitora u uzorku te netočne kvantitacije DNA. Potencijalni PCR inhibitori mogu potjecati iz staničnog izvora DNA molekule (heparin i hem) te iz same metode pripreme DNA (fenol, proteaze, SDS i ostali detergenti te soli) (49,53). Ukoliko se inhibicija vidno smanjuje prilikom ponovljene analize razrijeđenih uzoraka vjerojatno je riječ o prisustvu PCR inhibitora i DNA uzorak je potrebno dodatno pročistiti (49). Izolirana količina genomske DNA iznimno je važna za uspješnost ispitivanja, a jednolična koncentracija DNA u uzorcima dovodi do točnih, robusnih i ponovljivih rezultata analize, stoga je vrlo važno prikladno kvantitacirati DNA u uzorcima (49,53). Iako manje vjerojatno, ne smije se podcijeniti utjecaj nehotičnih pogrješaka poput nedovoljnog miješanja ili centrifugiranja, grješki u pipetiranju, zamjene reagensa, isparavanja iz optičkih tubica ukoliko nisu pravilno zatvorene te neadekvatnog rukovanja reagensima i uzorcima općenito (49). Zbog navedenog važno se pridržavati pravila dobre laboratorijske prakse za PCR/RT-PCR (engl. *Good laboratory practices for* PCR/RT-PCR). Nadalje, neispravno odabrane postavke *real-time* PCR softvera mogu rezultirati neodređenim, dvosmislenim ili pogrješnim genotipovima, stoga je iznimno važno pravilno postaviti radne uvjete, a uređaj redovito održavati i umjeravati. Na taj se način osigurava optimalna izvedba *real-time* PCR metode te točnost i preciznost dobivenih rezultata (49,53).

Prednosti genotipizacije jesu male količine uzoraka krvi ili tkiva potrebne za analizu te dostupnost rezultata u kratkom roku. Na rezultate takve analize ne utječe zdravstveni status bolesnika ili hrana i drugi lijekovi kojima je izložen, a dobiveni rezultat (genotip) ostaje nepromijenjen cijeli život (2). Unatoč velikom broju koraka, posebice prilikom obrade i pripreme uzoraka, te potrebe za visokom tehničkom vještinom i podrškom ovom je metodom moguće brzo, pouzdano i cjenovno prihvatljivo odrediti genski profil uzorka. Visoku točnost, specifičnost i ponovljivost tako dobivenih rezultata osiguravaju *TaqMan® MGB* fluorescentne probe kao ključne sastavnice reakcijske smjese (54). Stoga, *Real-time* PCR predstavlja izrazito korisnu metodu genotipizacije, a njena klinička primjena u doziranju varfarina predstavlja jedan od najuspješnijih primjera farmakogenetike u praksi (17).

Osnovna pretpostavka šire, sigurnije i učinkovitije primjene varfarina u praksi jest mogućnost prilagodbe doziranja pojedinačnom bolesniku na temelju određivanja čimbenika koji utječu na varijabilnost odgovora na lijek. Jedan od najvažnijih čimbenika, utjecaj polimorfizma gena, moguće je laboratorijski odrediti prije započinjanja terapije te takvim pristupom smanjiti rizik razvoja nuspojava, skratiti vrijeme do postizanja stabilne doze te postići bolju kontrolu INR vrijednosti (9,10,15,55). Iako su navedeno pretpostavila brojna istraživanja te dokazala jasnu povezanost varijabilnosti potrebne doze varfarina i polimorfizama gena *CYP2C9* i *VKORC1*, rutinska genotipizacija ovih alelnih varijanti prije započinjanja terapije još uvijek se ne preporučuje (36,40). Mnogi autori navode potrebu za daljnim prospektivnim kliničkim ispitivanjima koja bi pružala izravne dokaze učinkovitosti i isplativosti farmakogentičkih algoritama doziranja varfarina (3,9,10,15). Ukoliko se budućim istraživnjima dokaže izravna korist genotipizacije te sigurnost primjene varfarina podigne na veću razinu, vrlo je vjerojatno da će ovaj lijek i dalje ostati temelj oralne antikoagulantne terapije godinama koje slijede.

6 ZAKLJUČCI

1. Prikazanom metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time Polymerase Chain Reaction*) uspješno je određen genotip ispitivanog uzorka broj 1.

2. Analizom dobivenih rezultata utvrđeno je da genotip ispitivanog uzorka broj 1 odgovara homozigotu divljeg (izvornog) alela za svaki od ispitivanih polimorfizama, *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T.

3. Prema preporuci američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) početna doza i doza održavanja varfarina za ovog ispitanika iznosi 5-7mg.

4. Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće utvrditi sa sigurnošću zbog razgradnje molekule DNA uslijed dugotrajne pohrane uzoraka za analizu.

5. Uzorke je poželjno obraditi i analizirati neposredno nakon prikupljanja.

6. Potrebno je provesti daljnja prospektivna klinička ispitivanja kojima bi se dokazala učinkovitost i isplativost genotipizacije prije započinjanja terapije varfarinom te prava korist farmakogentičkih algoritama doziranja.

7 POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Weber WW. Pharmacogenetics. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2008. 19str.
2. Božina N. Farmakogenomika-genski polimorfizam i primjena lijekova. U: Francetić I, Vitezić D. Klinička farmakologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 247-61.
3. Pinto N, Dolan ME. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. Curr Drug Metab. 2011 Jun;12(5):487-97.
4. Zhou SF, Di YM, Chan E, Du YM, Chow VD, Xue CC, i sur. Clinical pharmacogenetics and potential application in personalized medicine. Curr Drug Metab. 2008 Oct;9(8):738-84.
5. Correia MA. Biotransformacija lijeka. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 53-66.
6. Vitezić D. Individualizacija liječenja i personalizirana medicina. U: Francetić I, Vitezić D. Klinička farmakologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 228-30.
7. Link KP. The discovery of dicumarol and its sequels. Circulation. 1959 Jan;19(1):97-107.
8. Zehnder JL. Lijekovi za liječenje poremećaja koagulacije. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 594-7.
9. Deng J, Vozmediano V, Rodriguez M, Cavallari LH, Schmidt S. Genotype-guided dosing of warfarin through modeling and simulation. Eur J Pharm Sci. 2017 Nov 15;109S:S9-S14.
10. Božina N. The pharmacogenetics of warfarin in clinical practice. Biochemia Medica. 2010;20(1):33-44.
11. ClinCalc.com [Internet]. [citirano 2019 Jun 24]. Dostupno na: https://clincalc.com/DrugStats/Drugs/Warfarin.
12. Halmed: Agencija za lijekove i medicinske proizvode [Internet]. [citirano 2019 Jun 24]. Dostupno na: http://halmed.hr//upl/lijekovi/SPC/SPC_UP-I-530-09-14-01-130-131-14513.pdf.
13. Halmed: Agencija za lijekove i medicinske proizvode [Internet]. [citirano 2019 September 16]. Dostupno na: http://halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-potrosnji-lijekova/Izvjesce-o-potrosnji-lijekova-u-Republici-Hrvatskoj-u-2018/.
14. Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada; 2013. str. 259-61.
15. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, Watson MS, Flockhart DA, Gage B, i sur. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. Genet Med. 2008 Feb;10(2):139-50.

16. Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, i sur. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. Blood. 2008 Aug 15;112(4):1022-7.
17. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, i sur. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000433.
18. PharmVar: Pharmacogene Variation Consortiumhttps [Internet]. [citirano 2019 Jun 28]. Dostupno na: https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9.
19. Buzoianu AD, Trifa AP, Mureşanu DF Crişand S. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 -1639 G>A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe. J Cell Mol Med. 2012 Dec;16(12):2919–2924.
20. Lee CR, Goldstein JA, Pieper JA. Cytochrome P450 2C9 polymorphisms: a comprehensive review of the in-vitro and human data. Pharmacogenetics. 2002 Apr;12(3):251-63.
21. McClain MR, Palomaki GE, Piper M, Haddow JE. A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding. Genet Med. 2008 Feb;10(2):89-98.
22. Wang B, Wang J, Huang SQ, Su HH, Zhou SF. Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance. Curr Drug Metab. 2009 Sep;10(7):781-834.
23. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. Metab Pers Ther. 2017 Mar 1;32(1):11-21.
24. Li S, Zou Y, Wang X, Huang X, Sun Y, Wang Y, i sur. Warfarin dosage response related pharmacogenetics in Chinese population. PLoS One. 2015 Jan 16;10(1):e0116463.
25. Kosaki K, Yamaghishi C, Sato R, Semejima H, Fuijita H, Tamura K, i sur. 1173C>T polymorphism in VKORC1 modulates the required warfarin dose. Pediatr Cardiol. 2006 Nov-Dec;27(6):685-8.
26. Owen RP, Gong L, Sagreiya H, Klein TE, Altman RB. VKORC1 Pharmacogenomics Summary. Pharmacogenet Genomics. 2010 Oct;20(10):642–4.
27. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, i sur. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. N Engl J Med. 2005 Jun 2;352(22):2285-93.

28. Scott SA, Jaremko M, Lubitz SA, Kornreich R, Halperin JL, Desnick RJ. CYP2C9*8 is prevalent among African-Americans: implications for pharmacogenetic dosing. Pharmacogenomics. 2009 Aug;10(8):1243-55.
29. Krishna Kumar D, Gopal Shewade D, Parasuraman S, Rajan S, Balachander J, Sai Chandran BV, i sur. Estimation of plasma levels of warfarin and 7-hydroxy warfarin by high performance liquid chromatography in patients receiving warfarin therapy. J Young Pharm. 2013 Mar;5(1):13-7.
30. Arwood MJ, Deng J, Drozda K, Pugach O, Nutescu EA, Schmidt S, i sur. Anticoagulation endpoints with clinical implementation of warfarin pharmacogenetic dosing in a real-world setting: A proposal for a new pharmacogenetic dosing approach. Clin Pharmacol Ther. 2017 May;101(5):675-83.
31. Lindh JD, Lundgren S, Holm L, Alfredsson L, Rane A. Several-fold increase in risk of overanticoagulation by CYP2C9 mutations. Clin Pharmacol Ther. 2005 Nov;78(5):540-50.
32. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. Clin Pharmacol Ther. 2004 Mar;75(3):198-203.
33. 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 Feb;7(2):97-104.
34. Osman A, Enström C, Arbring K, Söderkvist P, Lindahl TL. Main haplotypes and mutational analysis of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records. J Thromb Haemost. 2006 Aug;4(8):1723-9.
35. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, i sur. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. Blood. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.
36. FDA: The Food and Drug Administration [Internet]. [citirano 2019 July 2]. Dostupno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/009218s107lbl.pdf.
37. Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, i sur. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. Clin Pharmacol Ther. 2008 Sep;84(3):326-31.
38. Washington University in St. Louis: WarfarinDosing [Internet]. [citirano 2019 July 2]. Dostupno na: http://www.warfarindosing.org/Source/Home.aspx.
39. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):753-64.

40. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein CM, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics Guided Warfarin dosing: 2017 Update. Clin Pharmacol Ther. 2017 Sep;102(3):397–404.
41. Francetić I, Huić M. Nuspojave i interakcije lijekova. U: Francetić I, Vitezić D. Klinička farmakologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 207-26.
42. Aušperger KM. Smjernice antiagregacijske i antikoagulantne terapije u konzervativnim strukama. U: Francetić I, Vitezić D. Klinička farmakologija. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. str. 346-57.
43. Halmed: Baza lijekova [Internet]. [citirano 2019 July 3]. Dostupno na: http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/#rezultati.
44. Ruff CT, Giugliano RP, Braunwald E, Hoffman EB, Deenadayalu N, Ezekowitz MD, i sur. Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. Lancet. 2014 Mar15;383(9921):955-62.
45. Favaloro EJ, Lippi G. The new oral anticoagulants and the future of haemostasis laboratory testing. Biochem Med (Zagreb). 2012;22(3):329-41.
46. Roche Life Science: High Pure *PCR* Template Preparation Kit [Internet]. [citirano 2019 August 3]. Dostupno na: https://pim-eservices.roche.com/LifeScience/Document/082ac34b-a020-e811-57a1-00215a9b3428.
47. Thermo Fisher Scientific: Qubit™ dsDNA BR Assay Kit REF Q32850 [Internet]. [citirano 2019 August 5]. Dostupno na: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf.
48. Thermo Fisher Scientific: Qubit® 4.0 Fluorometer [Internet]. [citirano 2019 August 5]. Dostupno na: https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q33238?SID=srch-srp-Q33238.
49. Thermo Fisher Scientific: TaqMan® SNP Genotyping Assays [Internet]. [citirano 2019 August 7]. Dostupno na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/TaqMan_SNP_Genotyping_Assays_man.pdf.
50. Thermo Fisher Scientific: TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays [Internet]. [citirano 2019 August 7]. Dostupno na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042058.pdf.

51. Cooper GM, Hausman RE. Stanica: molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 128-9.
52. Thermo Fisher Scientific: Applied Biosystems 7500/7500 FastReal-Time PCR System [Internet].[citirano 2019 September 12]. Dostupno na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4387783c.pdf.
53. Thermo Fisher Scientific: TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays Reference Guide [Internet]. [citirano 2019 September 15]. Dostupno na: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042798.pdf.
54. Thermo Fisher Scientific: TaqMan vs. SYBR Chemistry for Real-Time PCR [Internet]. [citirano 2019 September 15]. Dostupno na: https://www.thermofisher.com/hr/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html.
55. Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, i sur. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. N Engl J Med. 2013 Dec 12;369(24):2294-303.

8 SAŽETAK

NASLOV RADA

Polimorfizmi gena *CYP2C9* i gena *VKORC1* u individualizaciji liječenja Martefarinom

CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je prikazati teorijske pretpostavke i genske polimorfizme *CYP2C9* i *VKORC1* gena u individualizaciji liječenja varfarinom te odrediti polimorfizme navedenih gena u zadanim uzorcima venske krvi.

MATERIJAL I METODE

Genomska DNA izolirana je iz bioloških uzoraka pune krvi prikupljenih od zdravih dobrovoljaca. Zatim je kvantificirana pomoću Qubit® 4.0 fluorometra kako bi ustanovili da je optimalna količina DNA za genotipizaciju izdvojena prethodnim postupkom. Genotipizacija alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* te *VKORC1* 1173C>T provedena je metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu na uređaju *Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR System* pri zadanim radnim uvjetima. DNA uzorci i negativna kontrola prethodno su pripremljeni koristeći *TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays* čije ključne sastavnice, *TaqMan® MGB* probe, omogućavaju određivanje alelnih varijanti u uzorcima na temelju emitiranog fluorescentnog signala.

REZULTATI

Uspješno je određen genotip ispitivanog uzorka broj 1 koji odgovara homozigotu divljeg (izvornog) tipa za svaki od ispitivanih genskih polimorfizama. Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće točno odrediti budući da jasan porast intenziteta fluorescencije *reporter* boja vidno nedostaje na pripadajućim *multicomponent* dijagramima.

ZAKLJUČAK

Prema preporuci američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) početna doza i doza održavanja varfarina za ispitanika čiji genotip odgovara uzorku broj 1 iznosi 5-7mg. Genotip ostalih uzoraka nije bilo moguće utvditi sa sigurnošću vjerojatno zbog razgradnje molekule DNA uslijed dugotrajne pohrane uzoraka za analizu. Potrebno je provesti daljnja prospektivna klinička ispitivanja kojima bi se dokazala učinkovitost i isplativost genotipizacije prije započinjanja terapije varfarinom.

9 SUMMARY

DIPLOMA THESIS TITLE

CYP2C9 and *VKORC1* gene polymorphisms in the individualization of Martefarin therapy

OBJECTIVES

The objective of this study is to present the theoretical assumptions and gene polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* genes in the individualization of warfarin treatment and to determine the polymorphisms of these genes in given venous blood samples.

MATERIAL AND METHODS

Genomic DNA was isolated from whole blood biological samples collected from healthy volunteers. It was then quantified using a Qubit® 4.0 fluorometer in order to determine whether the optimal amount of DNA for genotyping had been isolated by the previous procedure. Genotyping of *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* as well as *VKORC1 1173C>T* allelic variants was performed using a real-time polymerase chain reaction method on Applied Biosystems ™ 7500 Real-Time PCR System at assigned working conditions. DNA samples and negative control were previously prepared using TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assays whose key components, the TaqMan® MGB probes, allow allelic variants to be determined in the samples based on the emitted fluorescence signal.

RESULTS

The genotype of test sample No. 1 was successfully determined and it corresponds to the wild type homozygote for each of the gene polymorphisms examined. It was not possible to accurately determine the genotype of the other samples due to a clear lack of fluorescence intensity increase of the reporter dyes in the corresponding multicomponent plots.

CONCLUSION

As recommended by the US Food and Drug Administration (FDA), the starting dose and maintenance dose of warfarin for a subject whose genotype matches sample number 1 is 5-7mg. The genotype of other samples could not be determined with certainty, probably due to the DNA molecule degradation caused by the long-term storage of the samples for analysis. Further prospective clinical trials need to be conducted in order to determine the efficacy and cost-effectiveness of genotyping before initiating warfarin therapy.

10 ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Ivan Armanda

Datum i mjesto rođenja: 31. listopada 1995. godine, Split

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa i mjesto stanovanja: Smiljanićeva ulica 10 A, Split

E-mail: ivanarmanda95@gmail.com

Mobilni telefon: 091 9187790

OBRAZOVANJE

- rujan 2002. – lipanj 2010. Osnovna škola „Bol“, Split
- rujan 2010. – lipanj 2014. Prirodoslovno-matematička III. gimnazija Split
- rujan 2014. – rujan 2019. Kemijsko-tehnološki i Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, integrirani preddiplomski i diplomski studij Farmacije

STRUČNO OSPOSOBLJAVANJE

25.2.2019. – 31.8.2019. Ljekarne Splitsko-dalmatinske županije, ljekarna „Bačvice“

PRIZNANJA I NAGRADE

- 30. lipnja 2010. Nagrada Učiteljskog vijeća Osnovne škole „Bol“ za odličan uspjeh i uzorno vladanje tijekom cijelog školovanja
- 19. lipnja 2012. Nagrada Nastavničkog vijeća III. gimnazije Split za najboljeg učenika u školskoj godini 2011./2012.
- 30. ožujka 2017. Dekanova nagrada Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu za akademsku godinu 2015./2016. u znak priznanja za izvanredne rezultate postignute tijekom studija.

POSEBNE VJEŠTINE

Strani jezik: engleski jezik (razina B2)

Rad na računalu: Microsoft Office programi (Word, Excel i PowerPoint), ESKULAP 2000, programski jezik C, uključujući C++ i C#

Vozačka dozvola: B kategorija