

УТИЦАЈ ГЕНЕТИЧКОГ ПОЛИМОРФИЗМА ЦИТОХРОМА P-450 ИЗОФОРМИ 2C9 И 1A2 НА МЕТАБОЛИЗАМ ВАРФАРИНА

Филип Михајловић¹, Александар Милосављевић², Јагода Гавриловић^{1,2}
¹Универзитет у Крагујевцу, Факултет медицинских наука, Крагујевац
²Клинички центар Крагујевац, Клиника за инфективне болести, Крагујевац

THE IMPACT OF GENETIC POLYMORPHISM OF CYTOCHROME P-450 2C9 AND 1A2 ISOFORMS ON WARFARINE METABOLISM

Filip Mihajlovic¹, Aleksandar Milosavljevic², Jagoda Gavrilovic^{1,2}
¹University in Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, Serbia
²Clinical Centre Kragujevac, Clinic for Infectious Diseases, Kragujevac, Serbia

САЖЕТАК

Утицај генетичког полиморфизма на опсег метаболизма лекова данас је добро познат с обзиром на то да метаболизам лекова зависи од количине активног ензима у ткивима човека, пре свега у јетри. Циљ рада је обрада података у вези са генетичким полиморфизмом изоформи ензима цитохрома, који су важни за метаболизам и дозирање варфарина с обзиром на то да се озбиљна нежељена дејства неретко могу завршити смртним исходом. Осим наведеног, систематски прегледни чланак указао је на значај фармакогеномских испитивања пре увођења варфарина у терапију. Систематском претрагом литературе помоћу медицинске базе података Pub Med и Google Scholar пронађено је укупно 251 публикација. У резултате је укључено осам публикација које су задовољиле критеријуме за укључивање. Извршена је екстракција најважнијих података из свих радова који су неопходни за адекватну евалуацију и приказани кроз седам табела у којима се налазе општи подаци студија и фармакокинетички параметри који се односе на метаболизам варфарина. На терапијски ефекат кумаринског деривата варфарина утичу генетски фактори, али и друга својства пацијента. Честе мутације гена који кодирају цитохром P450 изоформу CYP2C9, али и витамин K-епоксида редуктазу с једном или више комбинација полиморфизма одговорне су за смањење потребне дозе варфарина или чак за резистенцију на варфарин. Иако подаци о генотипизацији побољшавају тачност предвиђања дозе, побољшање контроле антикоагулантног ефекта и метаболизма варфарина тек треба доказати у будућим проспективним клиничким студијама у смислу ефикасности и исплативости.

Кључне речи: полиморфизам, фармакогенетика, варфарин, цитохром P-450 2C9 и 1A2.

УВОД

Орални антикоагуланси су постали доступни као индиректан резултат промене аграрне политике у Америци 20-их година XX века. Слатка детелина заменила је кукуруз у сточној храни и уследила је

ABSTRACT

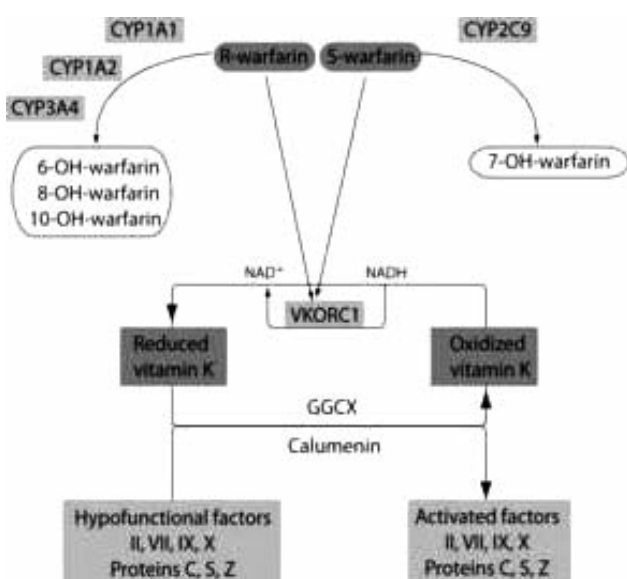
The influence of genetic polymorphism on the scope of drug metabolism is now well-known, since the metabolism of drugs depends on the amount of active enzyme in human tissues, primarily in the liver. The aim of the paper is to process data related to genetic polymorphism of isoforms of cytochrome enzymes that are important for metabolism and dosing of warfarin, considering that serious adverse effects can sometimes end with a fatal outcome. In addition, the systematic review article pointed to the importance of pharmacogenomic studies prior to the introduction of warfarin in therapy. A systematic research of literature using the medical databases "Pub Med" and "Google Scholar" found a total of 251 publications. The results included eight publications that met the criteria for inclusion. The extraction of the most important data from all works necessary for an adequate evaluation was performed and presented in seven tables containing general data of studies and pharmacokinetic parameters related to the metabolism of warfarin. The therapeutic effect of coumarin derivatives such as warfarin is influenced by genetic factors, but also other factors related to the patient. The frequent mutations of the gene encoding the cytochrome P450 isoform CYP2C9, but also the vitamin K-epoxide reductase with one or more polymorphic combinations, are responsible for reducing the required dose of warfarin or even for resistance to warfarin. Although genotyping data improves the accuracy of dose prediction, the improvement in controlling the anticoagulant effect and warfarin metabolism has yet to be proven in terms of effectiveness and cost-effectiveness in future prospective clinical studies.

Keywords: polymorphism, pharmacogenetics, warfarin, cytochrome p450 2C9 and 1A2

епидемија смртоносне хеморагије. У току истраге о овом случају, утврђено је да је смртност говеда била узрокована супстанцом под називом *бисхидроксикумарин*, пореклом из укварене слатке детелине. Ово откриће је, даље, довело до открића варфарина, који је тако назван по називу пројекта по

kojem je izolovan (*Wisconsin Alumni Research Foundation*). Jedna od prvih primena ove supstance bila je u trovanju pacova (1). Nakon slučajnog otkrića varfarina u Americi, izvršena su pretklinička i klinička ispitivanja na osnovu kojih je varfarin uveden u kliničku praksu širom sveta s obzirom na to da je normalna koagulabilnost neophodna za održanje krvi u krvnim sudovima i srcu (2, 3).

Varfarin (*рацематска смеша С- и Р- енантиомера*) vezuje se u visokom procentu za протеине плазме (више од 95%), што ствара могућност настанка интеракција већ на нивоу дистрибуције. У јетри се варфарин метаболише под дејством цитохрома *P-450*, и то *изоформи 2C9* и *1A2*, а његови метаболити се излучују преко жучи.



Слика 1. Фармакокинетски и фармакодинамски пут варфарина (3)

Преузето из референце број 3, дозволом ауторке Наде Б., Клинички центар Загреб, Република Хрватска.

С-енантиомер се метаболише преко CYP P-450 изоформе 2C9, док се Р-енантиомер метаболише преко изоформе CYP 1A2 преодминантно.

Фармаколошко дејство варфарина остварује се инхибицијом витамин К-епоксидне редуктазе комплекса 1 (VKORC1) што доводи до инхибиције витамин К зависних фактора коагулације (2, 7, 9 и 10) као и антикоагулантног витамина Ц.

Варфарин ступа у интеракције с великим бројем лекова који индукују или инхибирају активност поменутих форми цитохрома. Зато лекар при прописивању других лекова пацијентима који су на хроничној терапији оралним антикоагулансима треба увек да консултује референтну литературу, провери могућност интеракција и прилагоди дозе лекова. Поред интеракција, изазов за примену представља и уска терапијска ширина, као и озбиљни нежељени ефекти (појава крвављења у дигестивном тракту и

ЦНС-у, тромбоза поткожних вена са некрозом масног ткива у дојкама и глутеалном пределу због снижења активности протеина Ц, ретко оштећење јетре, као и дијареја, алопеција, некроза танког црева и ливидни прсти на стопалима) (2).

Варфарин се у клиничкој пракси користи орално. Налази се у облику таблете од 5 mg (Farin®). Уобичајена доза варфарина је 10 mg током два дана. У већини случајева је довољна почетна доза од 5 mg дневно. Ефекат оралних антикоагуланаса на протромбинско време изражава се кроз INR (International Normalized Ratio). Оптимално дејство оралних антикоагуланаса постиже се ако је INR у опсегу 2,5 до 3,5. То је однос протромбинског пацијента и контроле, при чему су оба времена добијена помоћу међународног референтног тромбoplastина направљеног из хуманог мозга, а не као раније, из мозга зеца (2, 4). У развијеним земљама, дозирање варфарина се све више врши на основу фармакогеномских испитивања, која подразумевају испитивање степена полиморфизма цитохрома, преко којих се варфарин метаболише, а која и те како могу имати удео на концентрацију и дејство лека. Управо је то предочила FDA (American Food and Drug Administration), Управа за храну и лекове још 2007. године, кад је објавила да ће велики удео у дозирању варфарина запасти управо фармакогенетици (4, 5).

Према смерницама FDA, дозе варфарина „треба разматрати код болесника са одређеним генетским варијацијама“. За успостављање алгоритма за дозирање варфарина препоручује се генотипизација *CYP2C9* и витамин К епоксидне редуктазе комплекса 1 (VKORC1). Ово је прва препорука FDA која говори о генетичком испитивању при започињању терапије, која је имала пресудан значај за будућу примену генских технологија у клиничкој пракси (4). Познато је да генетичке варијације ова два гена утичу на варијабилност дозе варфарина, али треба испитати и могућност осталих генетских варијација (6, 7).

Утицај генетичког полиморфизма на опсег метаболизма лекова данас је добро познат с обзиром на то да метаболизам лекова зависи од количине активног ензима у ткивима човека, пре свега у јетри. Услед сталних измена генетског материјала, у људској популацији обично постоје разлике у количини и активности ензима који метаболишу лекове. Тако се могу наћи особе које брзо метаболишу неки лек, али и особе које га споро метаболишу (јер је ензим одговоран за метаболизам, због измене гена који га кодира, мање активан). Изоформа цитохрома *CYP 2C9*, може бити код неких особа смањене активности, због генетски условљених измена у саставу аминокиселина. Код тих особа јако је успорен метаболизам лекова који се иначе одвија преко ове

изоформе. Клинички је посебно значајан успорен метаболизам варфарина, тако да особе са мутацијом гена *CYP 2C9*, која доводи до синтезе мање активности ензима, захтевају значајну редукцију дозе овог лека, у супротном долази до појаве крварења (2,8,9).

До сада описани генски полиморфизми цитохрома *CYP 2C9* и *IA2* говоре да је пронађено више од 34 алела. Алели *CYP 2C9* *1*2, *3, *4, *5 и *30 кодирају протеине са променама у аминокиселинском саставу за које је доказано да смањују каталитичку активност *in vivo/vitro* (10). У популацији постоје велике интериндивидуалне разлике у активности *CYP2C9* што доводи до разлике у одговору на лек. Учесталост фенотипа спорог метаболизера је 3–5% код белаца, док су фенотипске разлике процентуално више изражене код црне расе, нарочито оне с подручја Северне Африке. Посебно су занимљиви лекови – супстрати уске терапијске ширине попут варфарина, фенитоина, где поремећена метаболичка активност поменутих изоформи цитохрома P-450 може отежати прилагођавање дозе и узроковати токсичност (11,12).

Циљ овог системског прегледног чланка је обрада најваљиднијих података на горе поменутој тему који ће нам помоћи да схватимо колико је познавање генетичког полиморфизма изоформи ензима цитохрома важно за метаболизам и дозирање варфарина, с обзиром да се његова озбиљна нежељена дејства неретко могу завршити смртним исходом. Поред наведеног, системски прегледни чланак указаће на значај фармакогеномских испитивања пре увођења варфарина у терапију.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Дизајн студије

Рад је конципиран као систематски прегледни чланак, који се заснива на анализи студија према употреби одговарајућих кључних речи. У циљу прикупљања најрелевантнијих студија које ће се анализирати у наставку овог системског прегледног чланка, извршена је претрага медицинске базе података *Pub-Med* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) коришћењем одговарајућих кључних речи. Претрага је вршена и помоћу претраживача *Google Scholar* (<https://scholar.google.com/>), који је коришћен и у циљу проналазке студија у пуном тексту у колико су оне у поменутој медицинској бази података биле доступне само у облику апстракта.

Критеријуми за укључивање и искључивање студија

Критеријуми за укључивање студија у писање овог системског прегледног чланка приликом

претраживања *Pub-Med* медицинске базе података били су:

- радови на енглеском језику,
- студије извршене на људима (Humans),
- студије доступне у пуном тексту (Full text),
- радови у којима је описан метаболизам варфарина.

Критеријуми за искључивање били су следећи:

- студије другачије тематике од теме наведеног истраживања;
- студије које описују полиморфизам цитохрома, али за метаболизам других лекова;
- студије спроведене на животињама;
- радови типа прегледног чланка (*review*).

Резултати:

Резултати студија приказани су табеларно кроз седам табела у којима је извршена екстракција података из свих радова који су неопходни за адекватну евалуацију параметара који се односе на метаболизам варфарина.

Спроведена студија указује на значај фармакогенетичких испитивања код пацијената који су претрпели инфаркт миокарда која се спроводе ради постизања оптималне дозе варфарина. Однос између генетичког полиморфизма и инциденце настанка крварења тек треба испитати у будућим истраживањима.

Једна од обрађених студија указује на то да би расне разлике у повезаности генотипа и болесниковог одговора на лечење варфарином могле да буду резултат разлика у учесталости варијанти алела *CYP2C9* и *VKORC1* и/или утицаја негенетских фактора. Студија која се бавила испитивањем политерапије и присуства ко/полиморбидитета указује на значајност корекције дозе варфарина у зависности од примене других лекова. *CYP 2C9* генотип има три подврсте (споре, ултра брзе и брзе метаболизере варфарина) па би дозирање варфарина требало вршити на основу претходних фармакогенетичких испитивања.

Обрађене студије указују на варијацију фармакокинетичких параметара и судбину варфарина у организму полиморфних особа. Вредности фармакокинетичких параметара варирају у зависности од тога да ли одређени алел *CYP 2C9* метаболише варфарин брзо, ултра споро или споро.

Обрађена студија указује на то да присутност варијанти алела *CYP2C9**2 не захтева смањење, већ повећање дозе варфарина, јер је овај алелски тип *CYP2C9* тзв. брзи метаболизер варфарина.

Табела 1. Екстракција података из клиничких студија

Назив студије, година и аутори	Дизајн студије	Циљ студије	Студијска популација	Интервенција	Дужина праћења	Процент изгубљених пацијената	Исход
<i>Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype.</i> ¹³ 2004. Hillman M et al.	Кохортна, мултицентрична ретроспективна студија	Утврдити како генетски полиморфизам цитохрома П-450 (CYP2C9) утиче на дозирање и метаболизам варфарина	453 пацијента мушког и женског пола, након преложеног ИМ и уградње вештачких залистак	5 mg варфарина код пацијената са вештачким залисцима	1 г.	0%	Фреквенца варијабилности CYP 2C9 гена, t1/2, Cmin, Cmax
<i>Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction</i> ¹⁴ 2008. Tabrizi A et al.	Рандомизирана једноструко слепа студија	Утврдити дозу антикоагуланса у зависности од генске варијабилности CYP 2C9 и VKORC1	212 пацијената оба бола старости од 40 до 65 година	А група: n = 72, 160 mg аспирина Б група: n = 58, 5mg варфарина Ц група: комбинација аспирина и варфарина n = 57,	4 м.	16%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 и VKORC1 гена t1/2, Cmin, Cmax
<i>The frequency and effects of cytochrome P- 450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin</i> ¹⁵ 2002. Tabrizi A. et al.	Проспективна опсервациона студија	Утврђивање интеракције различитих генотипова на терапију варфарином	153 испитаника (оба бола (33 америчка африканца и 120 белаца)	А група: n = 33, амерички африканци 5 mg варфарина Б група: амерички белци, 5 mg варфарина, n = 129	11 м.	0%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 у зависности од генотипа t1/2, Cmin, Cmax

ДИСКУСИЈА

Чињеницу да је пажња лекара различитих специјалности и клиничких фармаколога усмерена ка варфарину, као најчешће прописиваном оралном антикоагулансу, оправдавају велике интериндивидуалне разлике (до 20 пута) у потребним дозама лека, што је резултат генетичких варијација и других мање важних фактора. Подаци добијени помоћу фармакогеномике, тј. испитивања интеракција које зависе од генотипа, могу помоћи у постизању оптималне ефикасности лека и свођењу нежељених реакција на најмањи могући ниво.

Утицај генетичког полиморфизма на опсег метаболизма варфарина је данас добро познат. Томе су допринели подаци добијени анализом два гена који

кодирају синтезу ензима одговорних за метаболизам варфарина. То су ензими: CYP2C9 и таргет ензим за деловање варфарина, тј. подјединица 1 витамин К зависне епоксидне редуктазе (VKORC1). Полиморфизам ова два ензима потврдио је њихову улогу у метаболизму варфарина, а самим тим и учинак на дозу одржавања варфарина. Овим системским прегледним чланком, нисмо пронашли студије које се баве испитивањем утицаја полиморфизма CYP1A2 на метаболизам варфарина. Разлог томе је вероватно што је Р-енантиомер варфарина који се метаболише преко CYP1A2 терапијски слабији, па је самим тим предоминантну улогу у метаболизму варфарина заузела изоформа CYP2C9 која метаболише С-енантиомер, а која је била мета аутора бројних студија (2, 22). Присутност варијанти алела CYP2C9*2 или

<i>Warfarin metabolism and anticoagulant effect: a prospective, observational study of the impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence of drug-disease and drug-drug interactions.</i> 16 2007. Muszkat M. et al.	Проспективна опсервациона студија, једноцентрична, једноструко слепа	Утицај генетичког полиморфизма на метаболизам варфарина уз различита коморбидитетна стања као и лекова који потенцијално могу довести до интеракција са варфарином на нивоу метаболизма	82 добровољна испитаника, оба пола, 45–65 година	А група: варфарин 5 mg + антибиотик n=18 Б група: варфарин 5 mg + индуктор CYP 2C9 n=64	3 м.	5%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 t1/2, Cmin, Cmax
<i>CYP 2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy.</i> 17 2004. Peyvandi F et al.	Једноцентрична ретроспективна, једноструко слепа студија	Утицај генетичког полиморфизма на метаболизам и дозирање оралних антикоагуланаса	125 пацијената, оба пола на стабилној дози варфарина и стабилним INR-ом	5 mg варфарина код пацијената са вештачким залисцима	24 д.	10%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 t1/2, Cmin, Cmax
<i>Pharmacogenetics of warfarin in a pediatric population: time and therapeutic range, intal and stable dosin and adverse effects.</i> 2014. 18 Hawccut et al.	Нема података	Утицај генетичког полиморфизма на метаболизам и дозирање оралних антикоагуланаса у педијатријској популацији	97 пацијената на стабилној дози варфарина	2–5 mg варфарина код пацијената са вештачким залисцима	2 м.	0%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 t1/2, Cmin, Cmax, CI
<i>The impact of CYP2C9/VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen.</i> 19 2005. Sconce A et al.	Нема података	Утицај генетског полиморфизма на метаболизам и дозирање варфарина	297 пацијената оба пола, старости од 20 до 90 година	Пацијенти су узимали 3–5 mg варфарина једном дневно	3 м.	10%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 и VKORC1 t1/2, Cmin, Cmax, CI

<i>Decreased warfarin clearance associated with the CYP 2C9 R150H (8) polymorphism.</i> 20 2012. LuY et al.	Компаративна студија, једноцентрична	Утврђивање брзине метаболизма варфарина и диклофена код особа са полиморфним цитохрома	38	Група А: n = 12, варфарин Група Б: n = 26, диклофен	3 м	0%	Фреквенца варијабилности CYP2C9 t1/2, Cmin, Cmax, Km, Vmax, Vmax/Km
---	--------------------------------------	--	----	--	-----	----	---

Cmax – максимална концентрација лека у плазми; **Cmin** – минимална концентрација лека у плазми; **t1/2** – време полуделиминације; **CI** – клиренс лека, **Km** – Михаелис-Ментенова константа, **Vmax** – максимална брзина ензимски катализоване реакције, **Vmax/Km** – брзина реакције у датом тренутку. **м** – месец дана, **г** – годину дана, **д** – време у данима.

Табела 4. Вредност исхода и варијабилност исхода фармакокинетичких параметара који се односе на метаболизам варфарина

<i>Warfarin dose and INR related to genotype of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infraction</i>			Интервенција у три терапијске комбинације					
			варфарин (n = 58)	MAF*	аспирин (n = 72)	MAF	варфарин + аспирин (n = 47)	MAF
Број пацијената студије према фреквенци варијабилности CYP 2C9 алела	*1/*1	147 (69,3%)	40 (69,0%)		48 (66,7%)		33 (70,7%)	-
	*1/*2	38 (27,9 %)	12 (20,7%)	11,2	10 (13,9%)	7,6	8 (17,0%)	17,0
	*2/*2	4 (1,9%)	-	-	-	-	4 (8,7%)	-
	*1/*3	20 (9,4%)	5 (8,6%)	5,2	12 (16,7%)	10,2	2 (4,4%)	2,1
	*3/*3	1 (0,7%)	-	-	1 (1,4%)	-	-	-
	*2/*3	2 (0,9%)	1 (1,7%)	-	1 (1,14%)	-	-	-

*MAF – вредност фреквенце полиморфизма алела коју поседују спори метаболизери варфарина CYP2D6*1/*2 и *1/*3 код којих је због тога потребно редукovati дозу варфарина.

*CYP2C9*3 (спори метаболизери варфарина), које резултирају смањеном ензимском активношћу, удружена је са значајним смањењем средње дозе варфарина!* Најчешће варијанте су: *CYP2C9*2 (rs4917639, p.R114C)* и *CYP2C9*3 (rs1057910, p.I359L)* алела који се ређе срећу код испитаника беле расе у односу на испитанике црне расе (афричких Американаца, нарочито пореклом из Северне Африке) (18). Резултати обрађене студије аутора Sconce A. et al., која се бавила испитивањем степена хеморагијских компликација код пацијената педијатријске популације с полиморфним *CYP 2C9* цитохромима на терапији варфарином, говоре да већи ризик за настанак крварења имају испитаници који имају *CYP2C9*2* ($p < 0,05$) при уобичајеној дози (21).

Супстрат за *CYP2C9* су и нестероидни антиинфламаторни лекови попут диклофена, чија је брзина метаболизма обрађена у поређењу са варфарином у резултатима студије аутора Lu Y. et al. Резултати су показали статистички значајну разлику ($p < 0,05$) у брзини метаболизма полиморфних цитохрома *P-450 2C9*. С тим у вези полиморфне изоформе *2C9*2/*3* бржи су метаболизатори својих

супстрата (у нашем случају варфарина и диклофенака) од полиморфне изоформе *2C9*1* ($p < 0,01$) (23). Једнонуклетидни полиморфизми *VKORC1* објашњавају велики удео интериндивидуалних разлика у метаболизму варфарина. Према ауторима неких од студија *VKORC1* има отприлике три пута јачи утицај на метаболизам и дозирање од *CYP2C9*. У поређењу са хомозиготним носиоцима *CYP2C9*1* процењено је да је болесницима хомозиготним носиоцима алела за *CYP2C9*3* потребна 3,3 пута нижа средња доза варфарина како би постигли исти INR, док су носиоци алела *2 и хетерозиготни пацијенти сврстани између тих вредности (25).

У студији Tabrizi A. et al., која се бавила ефектима варфарина у току првих дана лечења варфарином, удео болесника са INR-ом изнад 3 био је већи међу носиоцима алела *CYP2C9*2* или *3 него међу болесницима који нису носиоци ових алела (20). У студији на болесницима који су започињали лечење варфариним главни налаз указао је на то да је рани одговор на варфарин измењена генска варијација у *VKORC1*, а не у *CYP2C9* (27). Међутим и халотип *VKORC1* и генотип *CYP2C9* имају значајан утицај на

Табела 5. Вредност исхода и варијабилност исхода фармакокинетичких параметара који се односе на метаболизам варфарина

<i>The frequency and effects of cytochrome P-450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin</i>				
Популација	Број испитаника		Алели CYP 2C9 гена у обе популације испитаника	
			CYP 2C9 *1/*2 (полиморфни/укупни)	CYP 2C9 *1/*3 (полиморфни/укупни)
Афрички амерканци	5/33	15,2%	2/33	3/33
Белци	47/120	39,2%	24/120	23/120
Укупно испитаника:	153	54,4%	26/153	26/153
<i>Warfarin metabolism and anticoagulant effect: a prospective, observational study of the impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence of drug-disease and drug-drug interactions</i>				
	Концентрација варфарина у крви			
	повећава концентрацију		смањује концентрацију	
Интервенција	индуктор CYP-а		антибиотик	
Коморбидитет	-		срчана инсуфицијенција	
Полиморфизам CYP	*1/*2 и *1/*3		*1/*1	
<i>CYP 2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy</i>				
Период праћења	CYP 2C9 генотип			
	*1/*1	*1/*2		*1/*3
од 1 до 3 дана				
средња доза [mg/dan]	7,1 ± 2,4	7,2 ± 2,4		6,8 ± 2,6
% редуковане дозе	-	1,5		3,4
од 18 до 24 дана				
средња доза [mg/dan]	4,9 ± 1,9	4,1 ± 1,7		2,7 ± 1,1
% редуковане дозе	-	16,8		44,2
INR	2,2 ± 1,8	2,7 ± 1		2,2 ± 0,5

метаболизам варфарина након прва два дана. Утврђено је као генотип VKORC1 одређује и до 40% потребне дозе овог кумаринског деривата код појединих особа. Код белаца је полиморфизам 1173 C > T (VKORC1) био удружен с нижим потребним дозама варфарина; средња доза варфарина била је виша (6,2 mg/дан) код болесника са VKORC1

генотипом 1173 GG него код оних са GA генотипом (4,8 mg/дан) или AA генотипом (3,5 mg/дан). Комбинација генотипа и клиничких чиниоца објашњава отприлике 50–60% разлика у потребним дозама варфарина при лечењу белаца и Азијаца, али само 35–40% међу Афроамериканцима (22).

Табела 6. Вредност исхода и варијабилност исхода фармакокинетичких параметара који се односе на метаболизам варфарина***The impact of CYP2C9/VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen***

Број испитаника	66	42	10	13	1
МСУР 2С9 генотип	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Редукција дозе варфарина	3,65±1,82	2,7±1,38	1,92±1,12	1,58±2,22	1,58±2,22

Decreased warfarin clearance associated with the CYP 2C9 R1500H (8) polymorphism

СУР 2С9 генотип	*1/*1	*1/*2	*1/*3
варфарин			
V _{max} (pmol/min/nmol P-450)	310 ± 10	88 ± 16**	32 ± 4**
K _m (μM)	3,3 ± 0,1	2,0 ± 0,3**	9,1 ± 1,0**
V _{max} /K _m (μ/min/nmol P-450)	9,25 ± 1,3	4,8 ± 3,0**	3,6 ± 0,1**
диклофенак			
V _{max} (pmol/min/pmol P-450)	91 ± 12	44 ± 3**	41 ± 3**
K _m (μM)	11,1 ± 0,4	11,0 ± 2,4*	14,1 ± 1,4*
V _{max} /K _m (μ/min/pmol P-450)	8,2 ± 1,1	4,1 ± 0,8**	2,9 ± 0,4**

*p < 0,05 **p < 0,01 vs. СУР 2с9*1

Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype

СУР 2С9 генотип	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
Заступљеност у студији	65,1%	19,0%	12,1%	1,6%	1,8%	0,4%
Редукција дозе [%]	36,5	29,1	23,5	28,0	18,1	5,5

Табела 7. Вредност исхода и варијабилност исхода фармакокинетичких параметара који се односе на метаболизам варфарина***Pharmacogenetics of warfarin in a pediatric population: time and therapeutic range, intal and stable dosin and adverse effects***

Исход	СУР 2С9 генотип	Фактор ризика од крварења
INR (коригован за терапијску индикацију у циљној групи)	СУР 2С9*2	0,53
	СУР 2С9*3	0,95
INR (при стабилној дози варфарина)	СУР 2С9*2	0,008*
	СУР 2С9*3	0,049
Хеморагичне компликације	СУР 2С9*2	0,423
	СУР 2С9*3	0,428

*статистичка значајност (p < 0,05) која показује фактор ризика при стабилној дози варфарина код испитаника педијатријске популације

На основу свега наведеног у дискусији овог систематског прегледног чланка, јасно је да је метаболизам варфарина знатно успорен услед полиморфизма поменутих ензима цитохрома и ензима таргет рецептора за варфарин. Међутим, поставља се питање како на основу фармакогенетичких тестова за откривање степена полиморфизма титрирати дозу варфарина? Алгоритми засновани на фармакогенетичким подацима предлажу дозирање оралних антикоагуланаса. Већина модела узима у обзир старосну доб, пол, површину тела, истовремено коришћене лекове и коморбидитете. Једна од најчешће навођених једначина којом се процењује доза варфарина (mg/дан) јесте алгоритам за дозирање, утемељен на регресијском моделу:

$$[0,628 - 0,0135 \times (\text{године старости}) - 0,24 \times \text{CYP2C9}^*2 - 0,37 \times \text{CYP2C9}^*3 - 0,241 \times$$

у коме:

- износ вредности за *CYP2C9* креће се од 0,1 или 2 за број алела *1, *2, *3 у болесниковом генотипу;
- износ вредности за халотип *VKORC1* једнак је 1 за GG, 2 за GA и 3 за AA (29).

Пример:

Рачунање дневне дозе варфарина код пацијента из студије: *The impact of CYP2C9/VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen* (22) старости 62 године, телесне висине 177 cm. Фреквенца варијабилности ензима *CYP2C9**2/*3 оцењене су са 2, док је фреквенца варијабилности *VKORC1* узета за вредност пара GA, односно 2.

$$[0,628 - 0,0135 \times 62 - 0,24 \times 2 - 0,37 \times 2 - 0,241 \times 2 + 0,0062 \times 177]^2 = 4,08 \text{ (4) mg/дан}$$

Ако узмемо у обзир да је уобичајена дневна доза варфарина 5 mg, онда следи: $5 \text{ mg} : 100\% = 4 \text{ mg} : x\%$, $x = 80\%$,

Добијена вредност од 80%, говори да пацијенту чија је хипотетичка телесна висина 177 cm и старост 62 године дозу варфарина треба умањити за 20% (1 mg) уз претходну потврду о генетском полиморфизму ензима добијену фармакогенетичким тестовима, који указују на то да је овај испитаник спор метаболизер варфарина. Неколико обављених алгоритама за дозирање варфарина (Washington University, UCSF, Louisville and Newcastle) упоређено је према тачности предвиђања дозе варфарина у ретроспективној анализи мешане болесничке популације на дуготрајној стабилној терапији варфарином (29).

Оно што представља проблем при рутинском испитивању полиморфизма цитохрома, у резултатима овог системског чланка јесте исплативост. Наиме,

тестови за проверу INR-а се данас рутински користе и исплативи су, док је за фармакогенетско испитивање проблем његова цена. За фармакогенетичко испитивање алела за *CYP2C9/1A2* за дозирање варфарина према Америчком колегијуму за медицинску генетику засад не постоји рутинска примена ових тестова приликом дозирања варфарина, иако у неким ситуацијама може бити корисна и потребна како би се утврдио узрок неуобичајених терапијских одговора на варфарин (30). Eckman и сар., међутим закључују како је мало вероватно да би генотипизација за варфарин била исплатива код болесника са невалвуларном атријалном фибрилацијом, али би могло да буде исплатива код болесника са високим ризиком од крварења, који започињу лечење варфарином (27). Резултати које су добили Wadelius et al. генотипизацијом 183 полиморфизма у 29 гена код 1.266 болесника из Шведске који су започели лечење варфарином и испитали њихову удруженост са ситуацијом која за исход има крварење говоре у прилог увођењу терапије варфарином на основу фармакогенетичке анализе (28).

На валидност добијених резултата и изведених закључака овог систематског прегледа у значајној мери утичу резултати радова који се баве овом или сличном темом, а нису укључени у анализу, јер нису били доступни у целини бесплатно. Њихов број је 261.

Закључак

На терапијски ефекат кумаринског деривата варфарина утичу генетски фактори, али и други фактори у вези с пацијентом. Честе мутације гена који кодирају цитохром *P450* изоформу *CYP2C9*, али и витамин К епоксидну редуктазу, с једном или више комбинација њихових полиморфизама одговорне су за смањење потребне дозе варфарина или чак за резистенцију на варфарин. Запажене су расне разлике повезане с генотипом и болесниковим одговором на лечење варфарином. Генотипови утичу на време потребно да се постигне терапијски антикоагулантни ефекат, као и на ризик од прекомерне антикоагулације и крварења. Иако увођење података о генотипизацији побољшава тачност предвиђања дозе, контролу антикоагулантног ефекта и метаболизма варфарина, у будућим проспективним клиничким студијама тек треба доказати њихову ефективност и исплативост.

ЗАХВАЛНИЦА

Велику захвалност у току процеса публикације овог систематског прегледног чланка дугујем доц. др Виолети Младеновић, специјалисти интерне медицине – ендокринологу на корисним смерницама и сугестијама.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСА

Аутори рада изјављују да нема конфликта интереса.

СКРАЋЕНИЦЕ

Стах – максимална концентрација лека у плазми

С_{min} – минимална концентрација лека у плазми

СI – клиренс лека

FDA – American Food and Drug Administration

INR – International Normalized Ratio

K_m – Михаелис-Ментенова константа

MAF – вредност фреквенце полиморфизма алела коју поседују спори метаболизери варфарина CYP2D6*1/*2 и *1/*3 код којих је због тога потребно редуковати дозу варфарина

VKORC1 – витамин К епоксидна редуктаза комплекс I

V_{max} – максимална брзина ензимски катализоване реакције

V_{max}/K_m – брзина реакције у датом тренутку

t_{1/2} – време полуелиминације

LITERATURA

- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Farmakologija MPK. Beograd: Data status. 2005. 321.
- Јанковић МС. Фармакологија и токсикологија. Крагујевац. 2011. 42–3, 427–8.
- Božina N. Farmakogenomika varfarina u kliničkoj praksi. Biochemia medica 2010. 20: 33–44.
- FARIN® , 5 mg – tableta. Сажетак карактеристика лека. Агенција за лекове и медицинска средства Србије. Доступно на: http://www.galenika.rs/downloads/spc-pil/pil/farin_tableta_pil.pdf , виђено 27. 11. 2016. године.
- FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information. New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients. Available at: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/2007/ucm108967.htm> . Accessed: July 14, 2009.
- Drozda K, Wong S, Patel SR, et al. Poor warfarin dose prediction with pharmacogenetic algorithms that exclude genotypes important for African Americans. Pharmacogenet Genomics 2015; 25:73-81.
- Daneshjou R, Gamazon ER, Burkley B, et al. Genetic variant in folate homeostasis is associated with lower warfarin dose in African Americans. Blood 2014; 14:2298-305.
- Patel SR, Langae TY, Wong SS, Cavallari LH. Pyrosequencing of the CYP2C9 – 1766T>C polymorphism as a means of detecting the CYP2C9*8 allele. Pharmacogenomics 2014; 15:1717-22.
- Kumar V, Wahlstrom JL, Rock DA, Warren CJ, Gorman LA, Tracy TS. CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitro inhibition profiles. Drug Metab Dispos 2006; 34: 1966–75.
- Yamazaki H, Inoue K, Chiba K, et al. Comparative studies on the catalytic roles of cytochrome P450 2C9 and its Cys- and Leu-variants in the oxidation of warfarin, flurbiprofen, and diclofenac by human liver microsomes. Biochem Pharmacol 1998; 56: 243–51.
- García-Martín E, Martínez C, Ladero JM, Agúndez JA. Interethnic and intraethnic variability of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms in healthy individuals. Mol Diagn Ther 2006; 10: 29–40.
- Redman AR, Zheng J, Shamsi SA, et al. Variant CYP2C9 alleles and warfarin concentrations in patients receiving low-dose versus average-dose warfarin therapy. Clin Appl Thromb Haemost 2008; 14: 29–37.
- Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, Berg RL, Glurich I, Burmester JK. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. Pharmacogenetics 2004; 14:539-47.
- Haug KBF, Sharikabad MN, Kringen MK, et al. Warfarin dose and INR related to genotypes of CYP2C9 and VKORC1 in patients with myocardial infarction. Thromb J 2008; 6:7.
- Tabrizi AR, Zehnbaue BA, Borecki IB, McGrath SD, Buchman TG, Freeman BD. The frequency and effects of cytochrome P-450 (CYP) 2C9 polymorphisms in patients receiving warfarin. J Am Coll Surg. 2002; 194:267-73.
- Muszkat M, Blotnik S, Elami A, Krasilnikov I, Caraco Y. Warfarin metabolism and anticoagulant effect: a prospective, observational study of the impact of CYP2C9 genetic polymorphism in the presence of drug-disease and drug-drug interactions. Clin Ther 2007; 29: 427–37.
- Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM, Moia M, Mannucci PM. CYP 2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. Clin Pharmacol Ther 2004; 75:198-203..
- Hawcutt DB, Ghani AA, Sutton L, et al. Pharmacogenetics of warfarin in a pediatric population: time and therapeutic range, initial and stable dosing and adverse effects. Pharmacogenomics J 2014; 14: 542–8.

19. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106:2329–33.
20. Liu Y, Jeong H, Takahashi H, et al. Decreased warfarin clearance associated with the CYP 2C9 R150H (8) polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 91:660-5.
21. Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, Berg RL, Glurich I, Burmester JK. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 539–47.
22. Stehle S, Kirchheiner J, Lazar A, Fuhr U. Pharmacogenetics of oral anticoagulants: a basis for dose individualization. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47: 565–94.
23. Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 358: 999–1008.
24. D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, et al. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood* 2005; 105: 645–9.
25. Langley MR, Booker JK, Evans JP, McLeod HL, Weck KE. Validation of clinical testing for warfarin sensitivity: comparison of CYP2C9-VKORC1 genotyping assays and warfarin-dosing algorithms. *J Mol Diagn* 2009; 11: 216–25.
26. Flockhart DA, O'Kane D, Williams MS, et al. ACMG Working Group on Pharmacogenetic Testing of CYP2C9, VKORC1 Alleles for Warfarin Use. Pharmacogenetic testing of CYP2C9 and VKORC1 alleles for warfarin. *Genet Med* 2008; 10: 139–50.
27. Eckman MH, Rosand J, Greenberg SM, Gage BF. Cost-effectiveness of using pharmacogenetic information in warfarin dosing for patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2009; 150: 73–83.
28. Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009; 113; 784–92.