

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Studijní program: **Molekulární a buněčná biologie, genetik a virologie**



MUDr. Aleš Tomek

Farmakogenetika warfarinu

Pharmacogenetics of warfarin

Disertační práce

Školitel: **prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.**

Praha, 2014

V Praze 24. února 2014,

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

Aleš Tomek

Identifikační záznam

TOMEK, Aleš. *Farmakogenetika warfarinu. [Pharmacogenetics of warfarin]*. Praha, 2014. 129 stran, 11 příloh. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta, Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol. Školitel GOETZ, Petr.

Poděkování

Na tomto místě bych rád vyjádřil své poděkování všem, kteří mi v psaní této práce a vůbec s celým projektem zavedení farmakogenetiky warfarinu do klinické praxe pomohli.

V první řadě bych poděkoval svému školiteli prof. Goetzovi, dále všem svým učitelům a později kolegům, ať už v medicíně laboratorní, nebo v medicíně klinické - jmenovitě dr. Maťoškovi, vedoucímu Laboratoře molekulární diagnostiky OKBHI Nemocnice Na Homolce, doc. Bojarovi, bývalému přednostovi Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol a prof. Serebruanymu z John Hopkins University v Baltimoru.

Rád bych vyjádřil velké poděkování všem pacientům, kteří se projektu zúčastnili, svým kolegům z naší skupiny zabývající se farmakogenetikou warfarinu - Mgr. Kolářové, Mgr. Martínkové, Mgr. Lacinové, Mgr. Kaplanovi, dr. Šrámkovi, dr. Růžičkové, dr. Šarbochové, dr. Magerové, dr. Urbanové, dr. Matouškové, dr. Kovářovi, prim. Neumannovi, dr. Hadačové a mnoha dalším včetně prim. Táborského a doc. Marusiče, kteří projekt podporovali z pozice vedoucích. Velký dík patří všem laborantkám Laboratoře molekulární genetiky OKBHI Nemocnice Na Homolce i dalším lékařkám, lékařům a zdravotním sestřám Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol, kteří mi pomohli s dokončením tohoto projektu.

V neposlední řadě patří největší dík mojí ženě Jiřině, dětem a rodičům, kteří mne po celá léta maximálně podporují a tolerují mou vědeckou činnost.

Aleš Tomek

Seznam použitých zkratk

CI - confidence interval, konfidenční interval

CMP - cévní mozková příhoda

CYP2C9 - Cytochrome P450 2C9 gene, gen pro izoenzym 2C9 cytochromu P450

CYP2C9 - Cytochrome P450 2C9 enzyme, izoenzym 2C9 cytochromu P450

DNA - kyselina deoxyribonukleová

dsDNA - double stranded DNA

EM - extensive metabolizer, extenzivní metabolizátor

FDA - Food and Drug Administration, Federální úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FD - farmakodynamika

FG - farmakogenetika, farmakogenetický

FK - farmakokinetika

HR - hazard ratio, poměr rizik

HRM - high resolution melting, analýza křivek tání s vysokým rozlišením

NOAC - new oral anticoagulants, nová perorální antikoagulancia

INR - international normalized ratio, mezinárodní normalizovaný poměr

IWPC - International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Mezinárodní
kozorcium pro farmakogenetiku warfarinu

PM - poor metabolizer, pomalý metabolizátor

SD - standard deviation, směrodatná odchylka

SNP - single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus

SÚKL - Státní ústav pro kontrolu léčiv

sy. - syndrom

TTR - time in therapeutic range, čas v terapeutickém rozmezí

VA - variantní alela

VKORC1 - Vitamin K Epoxide Reductase Complex, Subunit 1 gene

VKOR1 - Vitamin K Epoxide Reductase enzyme

wt - wild type

Souhrn

Úvod: Warfarin je celosvětově nejužívanějším antikoagulans ze skupiny antagonistů vitamínu K s vysokou klinickou efektivitou v prevenci a léčbě tromboembolických komplikací. Použití warfarinu je nejvíce limitováno jeho nízkým terapeutickým indexem a významnou interindividuální variabilitou velikosti účinné denní dávky. Zásadním faktorem určujícím denní dávku je individuální genetická výbava - variantní polymorfizmy genů *CYP2C9* (metabolizace warfarinu) a *VKORC1* (senzitivita na warfarin). Nosiči variantního genotypu - alel *CYP2C9**2 a *3 a haplotypu *A/A* genu *VKORC1* mají významně nižší denní dávku warfarinu a zároveň vyšší riziko nadměrné antikoagulace a krvácivých komplikací. Právě pro zásadní vliv genotypu na velikost dávky, nízký terapeutický index a následné riziko krvácení, je warfarin ideálním cílem pro farmakogenetické vyšetření.

Cíl práce: Zavést a ověřit klinickou využitelnost farmakogenetiky při léčbě warfarinem v rutinní klinické praxi. A to: 1) výpočtem denní dávky warfarinu podle farmakogenetického algoritmu ještě před zahájením terapie; 2) stanovením rizika výskytu závažných krvácivých komplikací během léčby podle individuálního genotypu.

Metodika: Pro zhodnocení přesnosti predikce denní dávky warfarinu podle farmakogenetiky byl vytvořen soubor pacientů se známou stabilní denní dávkou warfarinu a detailními klinickými daty, u kterých byla provedena genotypizace variantních polymorfizmů genů *CYP2C9* a *VKORC1* s použitím HRM analýzy. Na části souboru pak byla porovnána přesnost publikovaných algoritmů ($n = 280$), dále byla vytvořena derivační skupina pro tvorbu vlastního algoritmu ($n = 175$), který byl následně ověřen na validační skupině ($n = 223$). Pro stanovení rizika krvácení byla sebrána skupina se závažnými krvácivými komplikacemi ($n = 51$) a skupina kontrol bez krvácivých komplikací ($n = 143$).

Výsledky: Nejvyšší přesnost predikce z posuzovaných publikovaných algoritmů dosáhl u naší české populace algoritmus podle Sconceové (koeficient determinace, $R^2 = 58,4\%$), další porovnávané algoritmy měly jasně nižší přesnost predikce - podle Andersona ($R^2 = 21,9\%$) a podle Gage ($R^2 = 23,8\%$). Námi vytvořený algoritmus

dosáhl u validační skupiny vysoké hodnoty přesnosti predikce ($R^2 = 62,3\%$), vyšší než algoritmus podle Sconceové ($R^2 = 55,3\%$). Prokázali jsme statisticky významně vyšší riziko závažného krvácení při léčbě warfarinem pro nosiče nejméně jedné variantní alely *CYP2C9* (*2 a/nebo *3). Nejzajímavějším původním zjištěním této práce bylo popsání aditivního rizika krvácení podle celkového počtu variantních alel v genech *CYP2C9* a *VKORC1*, kdy riziko závažného krvácení bylo nejvyšší pro nosiče 3 variantních alel. Toto riziko je navíc statisticky významné během celého časového průběhu léčby warfarinem, tj. ve fázi nasazení, ale i během léčby udržovací. Naopak pro wild type pacienty (genotyp *1/*1) v genu *CYP2C9* jsme prokázali významně nižší riziko závažných krvácivých komplikací.

Závěr: Farmakogenetika warfarinu má díky přesnosti predikce denní dávky své místo v rutinní klinické praxi specializovaných antikoagulačních center.

Pacienti s rizikovým genetickým profilem (3 nebo 4 variantní alely, homozygoti pro variantní alely *CYP2C9*) jsou vhodnými kandidáty na léčbu novými antikoagulancii (xabany, gatrany) jako lékem první volby, nebo v případě již nastavené léčby jako kandidáti výměny léku. Warfarin s využitím farmakogenetiky zůstává bezpečným a použitelným perorálním antikoagulanciem i ve srovnání s novými antikoagulancii.

Summary

Background: Warfarin is the most commonly used Vitamin K antagonist worldwide for treatment and prevention of arterial and venous thromboembolic events. Its use is limited by a low therapeutic index and significant interindividual variability in daily dose. The individual genetic profile explains the majority of warfarin dose response variability. Carriers of variant alleles *2 and *3 in *CYP2C9* gene and low dose haplotype A/A in gene *VKORC1* have a significantly lower dose of warfarin resulting in a higher risk of overcoagulation with an increased risk of major bleeding complications. Due to its low therapeutic index and significant influence of individual genotype on clinical outcome warfarin is ideal for pharmacogenetic testing.

Aim: To assess clinical utility of warfarin pharmacogenetic dosing algorithm in routine clinical practice and to evaluate an association between *CYP2C9* and *VKORC1* variant genotype and the occurrence of major bleeding complications in a warfarin-treated cohort.

Methods: Detailed clinical data were acquired from consenting study subjects with a known and stable warfarin daily dose. All participants were genotyped for variant polymorphisms in genes *CYP2C9* and *VKORC1* using HRM analysis. Accuracy of prediction was assessed in a cohort of 280 subjects. Our own algorithm was developed based on derivation cohort (n = 175) and subsequently validated in validation cohort (n = 223). For risk estimation of major bleeding complications was collected cohort of patients with major bleeding while on the warfarin therapy (n = 51) and its control group (n = 143).

Results: The highest accuracy in predicting the warfarin daily dose in our cohort of Czech patients showed the algorithm by Sconce et al (coefficient of determination, $R^2 = 58,4\%$), other compared algorithms had significantly lower accuracy (by Anderson $R^2 = 21,9\%$ and by Gage $R^2 = 23,8\%$). Algorithm developed by our group had good accuracy in the validation cohort with the coefficient of determination 62,3% - higher than previously published algorithms in general and also in our validation cohort (Sconce 55,3%). Regarding bleeding risk according individual

genotype we proved a higher risk in carriers of at least one variant allele in the gene *CYP2C9*. Patients who are carriers of 3 variant alleles of the genes *CYP2C9* and *VKORC1* exhibited a significantly higher risk of major bleeding events during both the initiation and the maintenance phases of warfarin therapy. On the other hand we observed a significantly lower risk of bleeding in carriers of *CYP2C9* wild type genotype (*1/*1).

Conclusion: Warfarin pharmacogenetics has a potential thanks to its accuracy in predicting daily dose of warfarin in routine clinical practice of specialized anticoagulation clinics. Vigilant and careful management of patients with a higher variant allele count or *CYP2C9* variant homozygotes, including switching to newer anticoagulants, could be considered in this high-risk cohort. Warfarin with usage of pharmacogenetic testing remains an effective and safe alternative to new oral anticoagulants.

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Literární úvod a přehled dané problematiky | 12 |
| 1.1 | Farmakogenetika, farmakogenomika a personalizovaná medicína | 12 |
| 1.2 | Charakteristika warfarinu..... | 16 |
| 1.2.1 | Warfarin - struktura..... | 16 |
| 1.2.2 | Warfarin - historie objevu..... | 16 |
| 1.2.3 | Klinické indikace warfarinu..... | 20 |
| 1.3 | Farmakologické parametry warfarinu | 23 |
| 1.3.1 | Farmakokinetika warfarinu | 23 |
| 1.3.2 | Farmakodynamika warfarinu..... | 24 |
| 1.4 | CYP2C9 | 26 |
| 1.4.1 | Cytochrom P450 | 26 |
| 1.4.2 | Gen CYP2C9 | 27 |
| 1.4.3 | Struktura proteinu CYP2C9..... | 31 |
| 1.5 | VKORC1 | 34 |
| 1.5.1 | Gen VKORC1 | 34 |
| 1.5.2 | Struktura proteinu VKOR1 | 38 |
| 1.6 | Ostatní geny zkoumané v souvislosti s FG warfarinu | 39 |
| 1.6.1 | CYP4F2..... | 39 |
| 1.6.2 | Další izoenzymy cytochromu P450 | 40 |
| 1.6.3 | Geny mimo systém cytochromu P450 | 40 |
| 1.6.4 | Význam dalšího rozšíření farmakogenetického panelu pro léčbu warfarinem | 40 |
| 1.7 | Negenetické faktory ovlivňující dávku warfarinu | 41 |
| 1.7.1 | Ovlivnění dávky ostatními užívanými léčivy | 42 |
| 1.8 | Farmakogenetika a klinické parametry | 44 |
| 1.8.1 | CYP2C9 | 44 |
| 1.8.2 | VKORC1 | 44 |
| 1.8.3 | CYP2C9 versus VKORC1..... | 45 |
| 1.9 | Klinické aplikace farmakogenetiky | 45 |
| 1.9.1 | Výpočet denní dávky před zahájením terapie..... | 45 |
| 1.9.2 | Odhad rizika krvácení během léčby warfarinem..... | 54 |
| 2 | Cíl práce | 56 |
| 3 | Popis použitých experimentálních metod včetně statistických..... | 57 |
| 3.1 | Soubor pacientů..... | 57 |
| 3.1.1 | Tvorba databáze klinických a genetických dat..... | 58 |
| 3.1.2 | Nábor pacientů do souboru..... | 62 |
| 3.1.3 | Sběr klinických dat..... | 62 |
| 3.2 | Metodika DNA diagnostiky | 62 |
| 3.2.1 | Odběr vzorků a izolace DNA | 63 |
| 3.2.2 | PCR amplifikace a High Resolution Melting analýza..... | 63 |
| 3.3 | Metodika farmakogenetického vyhodnocení..... | 65 |
| 3.3.1 | Zavedení farmakogenetického algoritmu..... | 65 |
| 3.3.2 | Posouzení vztahu genotypu a krvácivých komplikací při léčbě warfarinem | 70 |
| 3.4 | Financování projektu | 76 |
| 4 | Přehled dosažených, náležitě dokumentovaných a adekvátně statisticky zhodnocených vlastních výsledků | 77 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.1 | Genotypy <i>CYP2C9</i> a <i>VKORC1</i> v české populaci..... | 77 |
| 4.2 | Selekce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu..... | 79 |
| 4.2.1 | <i>Klinické parametry souboru pro selekci farmakogenetického algoritmu.....</i> | 79 |
| 4.3 | Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu | 84 |
| 4.3.1 | <i>Klinické a genetické charakteristiky souboru pro tvorbu a validaci algoritmu</i> | 84 |
| 4.3.2 | <i>Vlastní tvorba algoritmu</i> | 85 |
| 4.3.3 | <i>Definitivní algoritmus.....</i> | 88 |
| 4.3.4 | <i>Validace vlastního algoritmu</i> | 88 |
| 4.4 | Riziko závažného krvácení podle genotypu <i>CYP2C9</i> a <i>VKORC1</i> | 91 |
| 4.4.1 | <i>Klinická charakteristika souboru</i> | 91 |
| 4.4.2 | <i>Krvácivé komplikace</i> | 94 |
| 4.4.3 | <i>Genetická charakteristika souboru.....</i> | 95 |
| 4.4.4 | <i>Coxovy modely proporčního rizika.....</i> | 96 |
| 4.4.5 | <i>Kaplan-Meierova analýza</i> | 103 |
| 5 | Diskuse metodických postupů a výsledků, včetně srovnání s literaturou | 104 |
| 5.1 | Přesnost výpočtu podle farmakogenetického algoritmu..... | 104 |
| 5.2 | Vlastní vytvořený algoritmus | 105 |
| 5.3 | Krvácivé komplikace a farmakogenetika..... | 107 |
| 5.4 | Warfarin s využitím farmakogenetiky ve srovnání s novými perorálními antikoagulancii..... | 110 |
| 6 | Závěry a zhodnocení cílů práce | 117 |
| 6.1 | Přesnost výpočtu podle publikovaných farmakogenetických algoritmů | 117 |
| 6.2 | Vlastní farmakogenetický algoritmus | 117 |
| 6.3 | Krvácivé komplikace a farmakogenetika..... | 118 |
| 6.4 | Zhodnocení významu farmakogenetiky warfarinu..... | 118 |
| 7 | Seznam použité literatury | 120 |
| 8 | Seznam příloh - publikace k tématu disertační práce | 128 |
| 8.1 | Články, které jsou podkladem této práce | 128 |
| 8.2 | Vybrané přednášky nebo postery na základě této disertační práce s publikovaným abstraktem..... | 129 |

1 Literární úvod a přehled dané problematiky

1.1 Farmakogenetika, farmakogenomika a personalizovaná medicína

Po podání léčiva dochází v lidském organismu k celé řadě pochodů, které určují výsledný léčebný efekt. Tyto pochody mohou mít myriádu farmakokinetických a farmakodynamických proměnných, které určují individuální variabilitu odpovědi na podané léčivo. Variabilita lékové odpovědi je dána faktory vnějšího prostředí, stravou, kondicí jedince, věkem, pohlavím, komorbiditami, lékovými interakcemi a dědičností. Charakterizace a léčebné využití interindividuálních odlišností v reakci na podaný lék je náplní konceptu **personalizované medicíny**. Cílem je optimalizace aplikace léku se snahou o maximální možný léčebný efekt a zároveň minimalizace nežádoucích účinků. Koncept personalizované medicíny je poměrně dlouho znám, jeho kořeny sahají až do starověku. Kolem roku 550 před naším letopočtem Pythagoras pozoroval odlišný efekt požití favových bobů, kdy někteří jedinci vyvinuli závažnou otravu (hemolytickou anémii, favismus), někteří zas neměli žádné příznaky. Originální vysvětlení tohoto jevu přinesl Aristoteles, který příčinu nacházel v podobnosti plodů s genitáliemi nebo branami Hádu. Teprve ve 20. století byla objevena podstata tohoto rozdílu, geneticky podmíněný defekt glukóza-6-fosfát dehydrogenázy.

Významná část variability výsledného terapeutického efektu je podmíněna genotypem jedince, individuálním zastoupením polymorfismů v genech, jejichž produkty se podílí na účinku daného léčiva. Genetické odlišnosti mezi pacienty se mohou projevit na všech stupních cesty léčiva organizmem. Lišit se mohou jednotlivé farmakokinetické veličiny léčiva: absorpce, distribuce, metabolizace (biotransformace) a eliminace. Odlišná farmakodynamika znamená odlišnosti v účinku léku dané rozdílnou senzitivitou či reakcí cílového proteinu léku. Geny a jejich polymorfismy se dají rámcově rozdělit podle jejich role v rámci cesty léčiva lidským tělem na:

- Polymorfismy v genech kódujících enzymy lékového metabolismu
- Polymorfismy v genech kódujících membránové transportní přenašeče

- Polymorfismy v genech kódujících receptorové proteiny
- Polymorfismy v genech kódujících proteiny iontových kanálů

Právě tímto vztahem mezi genotypem jedince a odpovědí na léčivo se zabývá vědní disciplína **farmakogenetika**, která je dominantní disciplínou konceptu personalizované medicíny. První literární zmínkou o vlivu dědičnosti na účinek léku byla práce Archibalda Garroda z roku 1931, termín farmakogenetika je pak prvně použit Friedrichem Voglem v roce 1959 (Flockhart et al, 2009).

Farmakogenetika se uplatňuje u **léků již užívaných** v klinické praxi, kde je náplní genotypizace a analýza exprese genomu a jejich vliv na farmakokinetiku a farmakodynamiku léčiva, identifikace nebo úprava dávky či případná změna terapie rizikových pacientů. Doporučení k využití farmakogenetiky se dokonce v posledních letech stávají součástí příbalových informací jednotlivých léků (Tabulka 1.1.1). Na rozdíl od dalších biotechnologií stanovujících hladiny léčiv nebo jejich metabolitů, jako je zejména hmotnostní spektrometrie, je hlavním cílem farmakogenetiky predikce. Takto může genetický screening již v předstihu před možným poškozením pacienta optimalizovat výběr farmak a jejich dávkování.

Je třeba zdůraznit, že genů účastnících se cesty léčiv lidským tělem je ohromné množství. Z těchto kandidátních genů a jejich polymorfismů je zatím jenom zlomek v praxi „upotřebitelných“, neboli „interpretovatelných“. O praktickém využití lze uvažovat jenom u polymorfismů, které splňují následující předpoklady (viz tabulka 1.1.2.):

- efekt polymorfismu má dramatický dopad na koncentraci léčiva a jeho aktivních metabolitů
- existuje jednoznačný vztah mezi koncentrací léčiva a kýženým efektem
- jsou přítomné koncentračně závislé závažné nežádoucí účinky
- nízký terapeutický index léčiva

Právě všechny tyto předpoklady jsou splněny v případě warfarinu.

Farmakogenetické postupy se dále rapidně rozvíjejí a uplatňují se významně i ve **vývoji nových léků**, kde pomáhají s identifikací léčebného cíle, určením optimálního poměru účinku a toxicity, profilováním ideálního pacienta, selekcí pacientů do klinických studií a zpětnou selekcí rizikového genotypu po rozvoji nežádoucích účinků nového léčiva (viz tabulka 1.1.2.). Řada národních lékových regulačních ústavů vydala přesná odborná doporučení pro aplikaci farmakogenetiky při klinickém testování nových léčiv (Maliepaard et al, 2013).

Pojem **farmakogenomika** je používán v odborné literatuře nejčastěji jako zaměnitelné synonymum k pojmu farmakogenetika, není jasně konsenzuálně definována odlišnost těchto pojmů (NCBI). Většina autorů používá termín farmakogenomika pro rozsáhlejší aplikace celogenomových technologií při studování vztahu genomu a léčebného efektu.

Tabulka 1.1.1: Přehled vybraných léčiv, kde je FDA požadováno, doporučováno nebo zmíněno využití farmakogenetiky s ohledem na úpravu dávkování, selekci pacientů nebo možnost nežádoucích účinků. Celkově je využití doporučeno u 111 léčiv (zdroj: www.fda.gov, staženo červen 2013).

| Lék | Vyšetřovaný gen |
|--|--------------------------------------|
| 5-Fluorouracil | <i>DPYD</i> |
| Azathioprin, 6-Merkaptopurin, Cisplatina | <i>TPMT</i> |
| Celecoxib | <i>CYP2C9</i> |
| Citalopram | <i>CYP2C19, CYP2D6</i> |
| Irinotecan | <i>UGT1A1*28</i> |
| Panitumumab, Cetuximab | <i>EGFR, KRAS</i> |
| Kodein | <i>CYP2D6</i> |
| Klopidogrel | <i>CYP2C19</i> |
| Lansoprazol, Omeprazol, Pantoprazol, Esomeprazol | <i>CYP2C19</i> |
| Tamoxifen, Tetrabenazin | <i>CYP2D6</i> |
| Karbamazepin, Fenytoin | <i>HLA-B*1502</i> |
| Kyselina valproová | <i>NAGS, CPS, ASS, OTC, ASL, ARG</i> |
| Klozapin | <i>HLA-DQB1</i> |
| Warfarin | <i>CYP2C9, VKORC1</i> |

Tabulka 1.1.2: Argumenty pro a proti využití farmakogenetiky (FG), volně podle (Weinshilboum 2003, Gardiner and Begg 2006, Maliepaard et al, 2013); EM - extenzivní metabolizátor, PM - pomalý metabolizátor, NÚ - nežádoucí účinek.

| PRO | PROTI |
|---|--|
| Lék rutinně užívaný v klinické praxi | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Výrazný rozdíl mezi FG kohortami v dávkování nebo toxicitě • Lék s existující alternativou • Zásadní, častá či chronická nemoc • Významný rozdíl plazmatické koncentrace léku mezi nosičem variantního a wildtype genotypu • Významná vazba sledovaného jevu na koncentraci (toxicita, účinek) • Genotyp VA významně predikuje sledovaný jev • Nízký terapeutický index • Není efekt autofenokopizace = konverze EM na PM inhibicí enzymu lékem (zmenšení rozdílu v koncentraci mezi EM a PM při dlouhodobém užívání léku) | <ul style="list-style-type: none"> • Multifaktorialita léčebného účinku • Nedostatečná klinická data, chybění prospektivních studií • Ekonomika FG - poměr mezi úsporami a cenou testování • Méně metodicky či finančně náročná alternativa genotypizace (biochemická atp.) • Obtížná uchopitelnost pro kliniky - příliš složité použití výsledku FG v rutinní klinické praxi |
| Vývoj nových léčiv | |
| <ul style="list-style-type: none"> • Léky na míru (pacientovi i nemoci) • Snížení výskytu NÚ – správné dávkování a selekce rizikových pacientů ještě před zahájením terapie • Zvýšení efektivity | <ul style="list-style-type: none"> • Zvýšené náklady na vývoj léku • Potenciální zúžení trhu vyloučením rizikových genotypů • Chybění nových léků pro početně malé etnické skupiny |

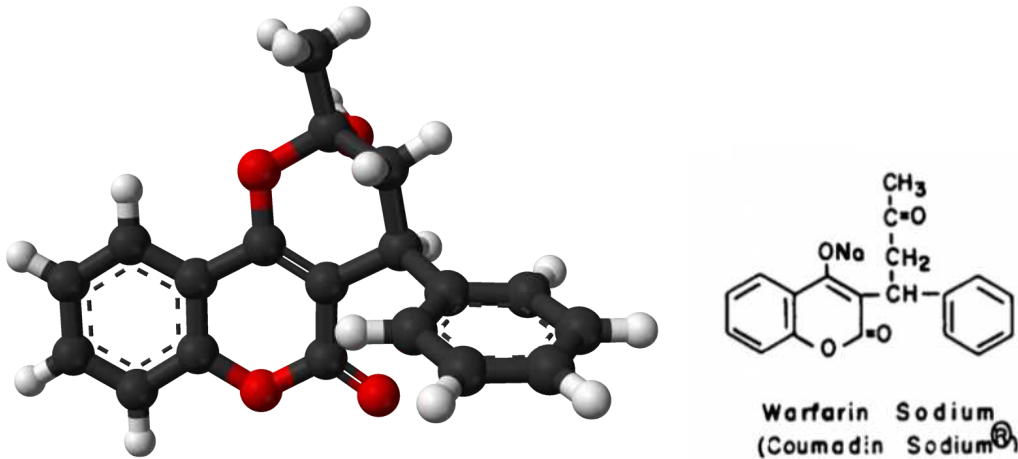
1.2 Charakteristika warfarinu

1.2.1 Warfarin - struktura

Warfarin je syntetický derivát dikumarolu - 3,3'-metylenbis-(4-hydroxykumarin). Přesný chemický název substance podle IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) názvosloví je (RS)-4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-chromen-2-one (obrázek 1.2.1).

V lékařství je využívána ve formě sodné soli jeho racemická směs (R-warfarin a S-warfarin) v poměru zhruba 1:1. Oba enantiomery mají stejnou biodostupnost po podání, ale vykazují odlišné farmakokinetické (odlišná clearance) i farmakodynamické parametry (odlišná síla interakce s cílovým enzymem VKOR) (viz dále).

Obrázek 1.2.1: Vlevo: 3D-model molekuly warfarinu (zdroj - B. Mills, v programu CrystalMaker 8.1., podle (Valente et al, 1975)); **Vpravo: Vzorec warfarinu** převzatý z článku jeho objevitele prof. Linka (Link 1959).

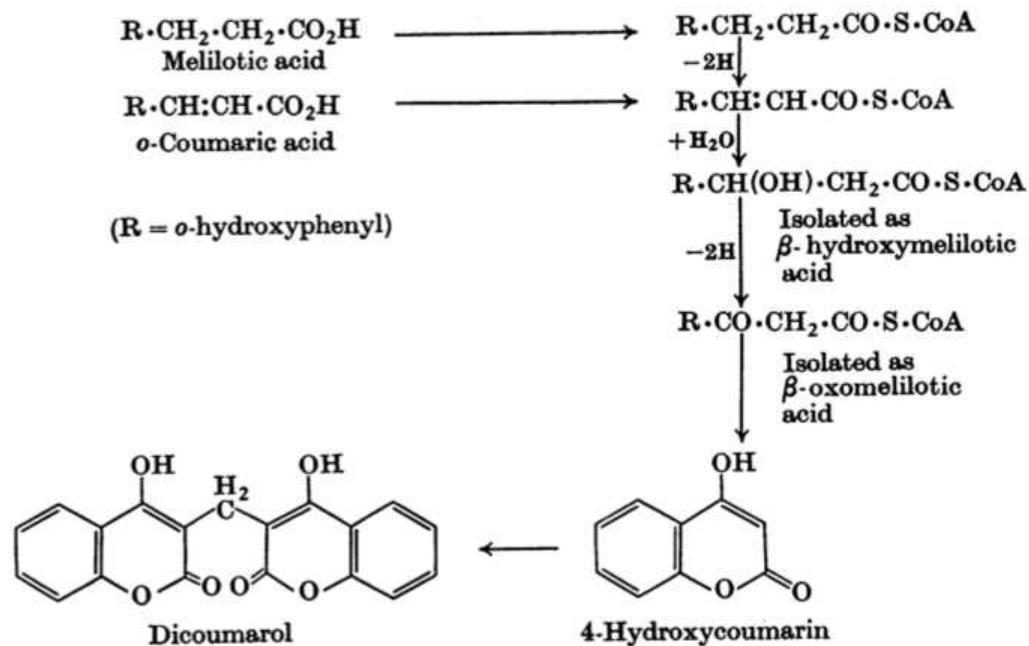


1.2.2 Warfarin - historie objevu

Počátkem 20. let 20. století vypukla na severu USA a v Kanadě dosud neznámá epidemie postihující hovězí dobytek. Postižená zvířata závažně a nezastavitelně krvácela z minimálních poranění a po běžných zákrocích (odstraňování rohů, kastrace u býků) nebo i hynula pro závažná spontánní krvácení. V roce 1921 veterinář Frank Schofield určil jako příčinu krvácení otravu senem,

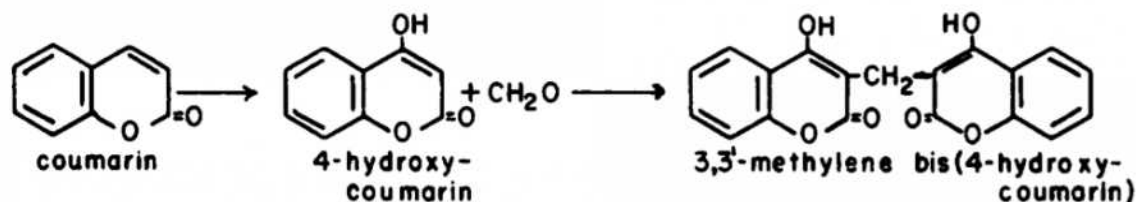
které obsahovalo Komonici (*Mellilotus* sp., sweet clover). V pokusech, kdy krmil skupiny králků zkaženou (špatně silážovanou) a dobře silážovanou komonicí, prokázal, že otrava je vázaná na plesnivé rostliny. V roce 1929 další veterinář - Lee M. Roderick, určil příčinu krvácivých projevů, jako nedostatečnou hladinu funkčního protrombinu (Roderick 1931). Rostliny komonice (a mnohé další - např. mařinka vonná *Galium odoratum*) obsahují kumarin. Kumarin je látka se silnou vůní čerstvě posečeného sena, pro kterou je využíván k výrobě parfému již od 19. století. Kumarin se přeměňuje až působením plísní na derivát dikumarol, který je tak považován za mykotoxin. Na přeměnu je zapotřebí řada postupných reakcí a současná přítomnost přírodně vzniklého formaldehydu, podrobné schéma z práce Bye a Kinga (Bye and King 1970) viz obr. 1.2.2.

Obrázek 1.2.2: Postup přeměny 3-(2-Hydroxyphenyl)propionové kyseliny (Melilotic acid) a o-kumarinové kyseliny na 4-hydroxykumarin a finálně dikumarol. Převzato z Bye, King (Bye and King 1970).



Vlastní toxin - dikumarol - byl izolován a následně syntetizován až po šest let trvajícím výzkumu skupiny Karla Linka z Wisconsinské univerzity v roce 1940 (viz obrázek č. 1.2.3). Dikumarol byl patentován Linkem v roce 1941 a byl také prvním derivátem kumarinu využívaným v lékařství.

Obrázek 1.2.3: Postup syntézy dikumarolu - převzato z článku Karla Linka (Link 1959).



Prvním doloženým použitím dikumarolu jako antikoagulantia u lidí je studie autorů Butta, Allena a Bollmana z roku 1941 (Butt 1941). Po objevu a syntéze dikumarolu pokračoval Karl Link na vývoji dalších derivátů kumarinu, které by měly silnější antikoagulační účinek k účinnějšímu hubení hlodavců. Jen mezi roky 1941 a 1944 syntetizoval více než 100 derivátů kumarinu. Po detailních testech efektivity na pokusných zvířatech vybral jako nejúčinnější derivát č. 42, který v roce 1948 registroval jako warfarin (viz obr. 1.2.4). Název warfarin pochází ze zkratky jména instituce, která sponzorovala výzkumný tým, který warfarin syntetizoval na University of Wisconsin (WARF, Wisconsin Alumni Research Foundation) a koncovky -arin, která pochází ze jména výchozí substance kumarinu (Link 1959).

Obrázek 1.2.4: První veřejné představení warfarinu jako rodenticidu.

Fotografie stánku prof. Linka ze zemědělské výstavy z konce 40. let, kdy ještě jediným inzerovaným využitím warfarinu bylo hubení hlodavců (fotografie převzata z <http://discovery.wisc.edu/home/discovery/facility/wisconsin-scientist-profiles/karl-paul-link/>).



Warfarin byl iniciálně využíván jen jako rodenticid, pro svůj silný účinek (5-10x více než dikumarol) a lepší biologickou dostupnost se rychle stal nejpoužívanějším kumarinovým rodenticidem.

Zajímavá je i cesta warfarinu do medicíny. Prvním doloženým "pacientem" je rekrut U.S. Navy, který se snažil spáchat sebevraždu pomocí kukuřičného škrobu otráveného warfarinem, který byl na lodích využíván k hubení potkanů. Během 5 dnů požil postupně celkem 567 mg warfarinu, nicméně při projevech krvácení, které se postupně zhoršovaly, vyhledal lékařské ošetření a byl vyléčen vysokými dávkami vitamínu K bez dalších následků. Tento "klinický pokus" inspiroval Linka k rozhodnutí, že zejména farmakokinetické vlastnosti má warfarin výhodnější, než tehdy používaný dikumarol a že jeho násobně vyšší efekt lze v případě předávkování zvrátit bezpečně vitamínem K i u lidí. Použití v medicíně pak rychle následovalo, v roce 1954 byl warfarin definitivně schválen FDA pro použití v lékařství. V roce 1955 byl léčen warfarinem po prodělaném srdečním infarktu

dokonce i prezident USA Dwight D. Eisenhower (Link 1959). Dalším neméně slavným, i když nechvalně proslulým, "pacientem" by mohl být i Josip Vissarionovič Stalin. Podle dobře argumentované teorie publikované r. 2003 autory Jonathanem Brentem a Vladimírem Naumovem v knize " Stalin's last crime: the plot against the Jewish doctors, 1948–1953" mohl být Stalin otráven, právě objeveným a v Rusku tehdy dosud neznámým lékem, warfarinem, který je bez chuti a zápachu. Warfarin mohl způsobit intracerebrální krvácení, na které Stalin pravděpodobně zemřel (Brent and Naumov 2003).

1.2.3 Klinické indikace warfarinu

Warfarin je antikoagulační lék, ze skupiny antagonistů vitamínu K, který blokuje tvorbu plazmatických koagulačních faktorů závislých na vitamínu K. Jeho klinická efektivita v prevenci tromboembolických komplikací byla prokázána mnoha klinickými studii (Hankey and Warlow 1999, Stam et al, 2002, Hart et al, 2007, Ringleb et al, 2008). I po šedesáti letech klinického využití je stále celosvětově nejužívanějším perorálním antikoagulanciem.

Používá se v indikacích, kde je výhodný jeho účinek inhibice pokračujícího nárůstu trombózy v cévním řečišti zabraňující embolizaci trombu, zejména v pomaleji tekoucím žilním řečišti a v oblastech arteriálního řečiště s pomalejší rychlostí toku, stázou (dilatovaná levá síň srdeční, pahýly distálně za arteriální okluzí, ektaticky změněné tepny - zejména megadolichobasilaris) a u mechanických chlopenních náhrad.

Antikoagulační terapie je indikována vzhledem k celkovému stárnutí naší populace u stále většího množství pacientů. Podle údajů SÚKL z roku 2010 bylo jen v ČR spotřebováno celkem 40 miliónů denních dávek warfarinu. Majoritními indikacemi jsou prevence tromboembolických komplikací - zejména kardioembolické cévní mozkové příhody - u pacientů se srdeční arytmií (fibrilace a flutter síní), se srdečním selháváním, s ateromatózou aorty, s mechanickými chlopenními náhradami, po ortopedických operacích, u pacientů s hlubokou žilní

trombózou a/nebo po prodělané plicní embolizaci. Detailní skladba indikací ve kterých je warfarin používán v ČR je uvedena v tabulce č. 1.2.1.

Tabulka 1.2.1: Přehled vykázaných léčebných indikací warfarinu v ČR. Data 10/2012 - 3/2013 podle indikační diagnózy uvedené pod kódem MKN - 10, Mezinárodní statistická klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů, 10. vydání (zdroj SÚKL).

| kód MKN - 10 - indikační diagnóza | Počet pacientů |
|--|-----------------------|
| I25 Chronická ischemická choroba | 118 186 |
| I48 Fibrilace a flutter síní | 112 678 |
| I49 Jiné srdeční arytmie | 40 479 |
| I80 Zánět žil - flebitida a tromboflebitida | 32 096 |
| I26 Plicní embolie | 15 101 |
| Z92 Lékařská léčba v osobní anamnéze - dlouhodobé užívání antikoagulancií v osobní anamnéze | 13 189 |
| I82 Jiná žilní embolie a trombóza (Budův-Chiariho sy., embolie a trombóza dolní duté žíly, renální žíly a jiných neurčených žil) | 9 475 |
| Z95 Pacient se srdečním a cévním implantátem a transplantátem | 7 257 |
| I67 Jiné cévní onemocnění mozku (disekce mozkových tepen, nehnisavá trombóza nitrolebního žilního systému aj.) | 3 723 |
| I87 Jiné onemocnění žil (posttrombotický sy., venózní insuficience aj.) | 3 558 |
| Z09 Následné vyšetření po léčbě pro stavy jiné než zhoubné novotvary (po radioterapii, operačním výkonu, léčbě zlomeniny aj.) | 3 399 |
| I20 Angina pectoris | 3 265 |

| | |
|--|----------------|
| I83 Žilní městky (varices) dolních končetin | 2 355 |
| I10 Esenciální hypertenze | 2 223 |
| I21 Akutní infarkt myokardu | 2 139 |
| I35 Nerevmatická onemocnění aortální chlopně | 2 030 |
| I64 Cévní příhoda mozková neurčená jako krvácení nebo infarkt | 1 759 |
| C56 Zhoubný novotvar vaječníku | 1 633 |
| G08 Flebitida a tromboflebitida intrakraniální a intraspinální | 1 633 |
| I70 Ateroskleróza | 1 633 |
| S82 Zlomenina bérce, včetně kotníku | 1 633 |
| C50 Zhoubný novotvar prsu | 1 553 |
| I34 Nerevmatické onemocnění dvojčípé (mitrální) chlopně | 1 444 |
| I42 Kardiomyopatie | 1 309 |
| I74 Arteriální embolie a trombóza | 1 308 |
| I08 Mnohočetná onemocnění chlopní | 1 124 |
| I66 Uzávěr a zúžení mozkových tepen nekončící mozkovým infarktem | 722 |
| H34 Sítnicové cévní uzávěry | 670 |
| I09 Jiné revmatické nemoci srdce | 537 |
| Celkem | 387 574 |

1.3 Farmakologické parametry warfarinu

1.3.1 Farmakokinetika warfarinu

1.3.1.1 Absorpce

Warfarin je podáván perorálně, následně je dobře vstřebán z trávicího systému, jeho biodostupnost je udávána mezi 90 až 100% (SÚKL).

1.3.1.2 Distribuce

Maximální koncentrace dosáhne v plazmě v rozmezí 1 až 4 hodin. Asi 97 až 99,3% warfarinu je vázáno na plazmatický albumin. Warfarin se kumuluje v játrech, slezině, plicích a ledvinách, distribuční objem je udáván 0,13 - 0,14 l/kg (SÚKL, FDA).

1.3.1.3 Metabolizace

Metabolizace warfarinu se liší mezi oběma enantiomery. Dominantní je metabolizace enzymy I. fáze biotransformace xenobiotik (cytochromového systému). II. fáze se účastní ve významně menší míře (konjugace se sulfátovými a glukuronylovými skupinami) a nebyla příliš studována (Whirl-Carrillo et al, 2012).

1.3.1.3.1 S-warfarin

S-warfarin je více než z 85% hydroxylován izoenzymem CYP2C9 cytochromového systému P450 na S-7-hydroxywarfarin jako dominantní produkt, který jen v menší míře katalyzuje přeměnu na S-6-hydroxywarfarin (Maddison et al, 2012, Whirl-Carrillo et al, 2012).

1.3.1.3.2 R-warfarin

Metabolizace R-enantiomeru je komplikovanější, je rozdělena mezi více enzymů cytochromového systému (CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19). Nejvýznamnější je CYP3A4 zodpovědný za 10-hydroxylaci. CYP1A2 a CYP1A1 katalyzují přeměnu R-warfarinu na R-6-hydroxywarfarin a minoritně i na R-7- a R-8-hydroxywarfarin. CYP2C19 katalyzuje zejména 8-hydroxylaci a méně i 6- a 7-hydroxylaci R-warfarinu. Posledními udávanými jsou izoenzymy CYP2C8 (R-7-

hydroxywarfarin) a CYP2C18 (R-4-hydroxywarfarin) (Maddison et al, 2012, Whirl-Carrillo et al, 2012).

1.3.1.4 Exkrece

Exkrece je predominantně renální, jen v menší míře interagují hydroxymetabolity warfarinu s ABCB1 membránovým transportním systémem v hepatocytech (Wadelius et al, 2004). Terminální poločas racemické směsi warfarinu po jediné dávce je udáván přibližně 7 dnů. Efektivní poločas racemické směsi je udáván v rozmezí od 20 do 60 hodin s průměrnou hodnotou 40 hodin. Plazmatický poločas R-warfarinu je od 37 do 89 hodin, zatímco poločas S-warfarinu je udáván v rozmezí od 21 do 43 hodin (příbalová informace FDA).

1.3.2 Farmakodynamika warfarinu

1.3.2.1 Mechanismus účinku warfarinu

Mechanismus účinku warfarinu blokádou protrombinu je znám od 30. let. Přesný mechanismus - vlastní cílový enzym, který warfarin blokuje, byl ale popsán až v roce 1978. Whitlon et al popsal mechanismus inhibice enzymu vitamín K-epoxidreduktázy warfarinem, kdy dochází k narušení cyklu vitamínu K a tak i k poklesu tvorby aktivovaných koagulačních faktorů závislých na vitamínu K (Whitlon et al, 1978).

1.3.2.2 Cyklus vitamínu K

Proces koagulace vyžaduje aktivované koagulační faktory. Posttranslační modifikace glutamátu na gama-karboxyglutamát je nezbytná pro aktivaci tzv. K-dependentních koagulačních faktorů. Modifikace glutamátu na gama-karboxyglutamát umožňuje aktivovaným faktorům vázat vápenaté ionty (Ca^{2+}), které se podílejí na aktivaci koagulační kaskády. Mezi K dependentní faktory patří: faktor II, VII, IX, X, protein C, S a Z. Tato modifikace je katalyzována enzymem gama-glutamylkarboxylázou (gamma glutamyl carboxylase, GGcX), která vyžaduje mimo substrátu (propeptid - neaktivovaný koagulační faktor) tři kosubstráty (redukováný vitamín K, CO_2 a O_2). Hladina redukováného vitamínu K určuje rychlost reakce a

reguluje tak rychlost tvorby aktivovaných koagulačních faktorů (Stafford 2005). Karboxylace katalyzovaná GGCX vyžaduje přenos protonu ze 4-C glutamátu na vitamín K, který se tak mění na vitamín K epoxid. Vitamín K epoxid je pak "recyklován" zpět na "aktivní" redukovaný vitamín K pomocí enzymu vitamín K epoxidreduktázy (VKOR1).

Právě enzym vitamín K epoxidreduktáza je cílovým enzymem warfarinu, je jím blokována, čímž se narušuje cyklus vitamínu K a nedochází k další aktivaci koagulačních faktorů závislých na vitamínu K. Hladina aktivovaných faktorů postupně klesá s jejich postupující přirozenou biodegradací a během 3-7 dnů v závislosti na účinnosti blokády podaným warfarinem postupně klesá úroveň koagulace. Poločas jednotlivých faktorů blokových warfarinem je přibližně následující: faktor II 60 hodin, faktor VII 4 až 6 hodin, faktor IX 24 hodin, faktor X 48 až 72 hodin, protein C 8 hodin a protein S 30 hodin (příbalová informace FDA).

1.3.2.3 Rozdíly ve farmakodynamice S- a R-enantiomeru

První zmínky o rozdílném účinku R-warfarinu a S-warfarinu vyšly z experimentální práce O'Reillyho, který podal přečištěné enantiomery zdravým dobrovolníkům. S-warfarin vykázal 1,8x větší hypotrombinemický efekt než R-warfarin, navíc S-warfarin vykázal nižší clearance, tedy celkový eudismický poměr (poměr účinku mezi dvěma enantiomery ve směsi) 3,4:1 pro S-warfarinu (O'Reilly 1974). Tento poměr byl v literatuře později zpochybňován v ještě vyšší poměr ve prospěch S-warfarinu a nevýznamnost účinku R-warfarinu, nicméně i R-warfarin vykazuje klinický efekt na koagulaci - léky interagující jen s enzymy cytochromu P450 metabolizujícími R-warfarin vykazují významné klinické interakce. Zajímavý je průkaz efektu R a S enantiomeru u pacientů s odlišným genotypem genu *VKORC1* - kdy nosiči jednoho z variantních polymorfismů pro nízkou dávku warfarinu (1173C>T, rs 9934438), vykázali vyšší senzitivitu na podaný S-warfarin i R-Warfarin, která byla významná jen pro S-warfarin (1,21x vyšší síla účinku, 95% CI 1.05, 1.41, P < 0.02) (Maddison et al, 2012).

1.4 CYP2C9

1.4.1 Cytochrom P450

Cytochrom P450 označuje nadrodinu (superfamily) hemoproteinových enzymů zodpovědných za metabolizaci endogenních i exogenních substrátů - včetně většiny léčiv.

Enzymy cytochromu P450 jsou nespecifické, membránově vázané monooxygenázy, které katalyzují oxidaci substrátu se zvýšením jeho hydrofility a tak usnadní jeho exkreci z těla. Chemicky jde o monooxygenaci, kdy při změně mocenství atomu železa hemu ($\text{Fe}^{3+} - \text{Fe}^{2+}$), je jeden atom z kyslíku O_2 navázán na substrát a druhý je redukován na vodu H_2O . Donor elektronu pro reakci se liší podle lokalizace daného cytochromu P450. U cytochromů navázaných na membráně endoplazmatického retikula (včetně rodin 1 až 4 metabolizujících léčiva) je donorem NADPH cytochrom P450 reduktáza (NADPH cytochrome P450 reductase), která získává 2 elektrony z NADPH (redukováný nikotinamidadeninukleotidfosfát) (Nelson 2009).

Genomová variabilita cytochromového systému je značná, aktuální nomenklatura genů pro enzymy cytochromu P450 je vedena v online databázi: <http://drnelson.uthsc.edu/CytochromeP450.html>, u člověka je aktuálně (červenec 2013) popsáno celkem 147 genů a pseudogenů (Nelson 2009).

Princip pojmenování genů pro jednotlivé izoenzymy je následující:

např. *CYP2C9*:

CYP = cytochrom P450 nadrodina (superfamily)

2 = genová rodina 2 (family)

C = genová podrodina C (sub-family)

9 = specifický gen 9

Alely jsou pak označovány následovně:

*CYP2C9*1*

**1* = alela 1

Dříve používaný klasifikační systém subalel (sub-alleles) = podle přítomnosti dalších polymorfizmů bez funkce (funkcí je rozuměno ovlivnění transkripce,

sestřihu, translace, posttranskripčních či posttranslačních změn nebo změna nejméně jedné aminokyseliny produktu), byl zavrhnut a již není používán. Byl označován písmenem za jménem alely (např. *CYP2C9*1B*). Enzym vzniklý přepisem dané alely se označuje jménem alely s tečkou před jménem alely (místo *) např. protein CYP2C9.2 pro alelu *CYP2C9*2*. Klasifikační podmínkou pro zařazení enzymů do jedné rodiny je 40% shoda v aminokyselinové sekvenci, u podrodiny se jedná o shodu 55%. Aktualizovaný přehled alel jednotlivých genů pro enzymy cytochromu P450, které pořádá "The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee" jsou dostupné online: <http://www.cypalleles.ki.se/>.

Geneticky podmíněné odchylky v aktivitě systému cytochromu P450 tedy predisponují jedince k odlišnostem v metabolismu léčiva a tedy i v jeho eliminaci, a mohou vést k rozlišné vnímavosti a nepředvídatelné odpovědi na léčbu.

1.4.2 Gen *CYP2C9*

Izoenzym CYP2C9 patří mezi nejvýznamnější enzymy cytochromového systému hepatocytů. Je druhým nejvíce exprimovaným izoenzymem po CYP3A4 (Soars et al, 2003) a je odhadováno, že 15 - 20% metabolismu léčiv u lidí je katalyzováno právě via CYP2C9 (Van Booven et al, 2010).

Gen kódující CYP2C9 protein je lokalizován na chromosomu 10 (10q23.33) a má 9 exonů. Gen *CYP2C9* je vysoce geneticky polymorfní, aktuálně (červenec 2013) je popsáno a v nomenklatuře zahrnuto 64 alel genu *CYP2C9* (<http://www.cypalleles.ki.se/>) s významnými funkčními farmakokinetickými rozdíly v metabolizaci léčiv (detaily viz tabulka 1.4.1 a 1.4.2).

Tabulka 1.4.1: Významné alely genu *CYP2C9* - jejich označení podle databáze vedené komisí pro nomenklaturu alel cytochromu P450 <http://www.cypalleles.ki.se> s číslem polymorfizmu (podle dbSNP <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>), relevantní nukleotidová změna v cDNA a genu a následná změna proteinu.

| Alela | dbSNP | Nukleotidová změna - cDNA | Nukleotidová změna - gen | Změna proteinu |
|------------------|---------------------------------------|---------------------------------|--|-------------------|
| <i>CYP2C9*1</i> | x | žádná, referenční | žádná, referenční | žádná, referenční |
| <i>CYP2C9*2</i> | rs1799853 | 430C>T | -1188T>C | R144C |
| <i>CYP2C9*3</i> | rs1057910 | 1075A>C | 42614A>C | I359L |
| <i>CYP2C9*4</i> | rs56165452 | 1076T>C | 42615T>C | I359T |
| <i>CYP2C9*5</i> | rs28371686 | 1080C>G | 42619C>G | D360E |
| <i>CYP2C9*6</i> | rs9332131 | 818delA | 10601delA | 273Frame shift |
| <i>CYP2C9*7</i> | rs67807361 | 55C>A | 55C>A | L19I |
| <i>CYP2C9*8</i> | rs7900194 | 449G>A | 3627G>A | R150H |
| <i>CYP2C9*9</i> | rs2256871 | 752G>A | 10535A>G | H251R |
| <i>CYP2C9*10</i> | rs9332130 | 815A>G | 10598A>G | E272G |
| <i>CYP2C9*11</i> | rs28371685 | 1003C>T | 42542C>T | R335W |
| <i>CYP2C9*12</i> | rs9332239 | 1465C>T | 50338C>T | P489S |
| <i>CYP2C9*13</i> | rs72558187 | 269T>C | 3276T>C | L90P |
| <i>CYP2C9*14</i> | rs72558189 | 374G>A | 3552G>A | R125H |
| <i>CYP2C9*15</i> | rs72558190 | 485C>A | 9100C>A | S162X |
| <i>CYP2C9*16</i> | rs72558192 | 895A>G | -1188T>C; 33497A>G | T299A |
| <i>CYP2C9*18</i> | rs1057910, rs7255819, rs1057911 | 1075A>C; 1190A>C; 1425A>T | -1911T>C; -1885C>G; -1537G>A; -1188T>C; -981G>A; 42614A>C; 47391A>C; 50298A>T | I359L; D397A |
| <i>CYP2C9*25</i> | rs72558188 | 353_362delAG AAATGGAA | 3531_3540delAGAAAT GGAA | 118Frameshift |
| <i>CYP2C9*33</i> | rs72558184 | 395G>A | 3573G>A | R132Q |

Tabulka 1.4.2: Významné alely genu *CYP2C9* - jejich relativní metabolická aktivita a populační frekvence. Podle databáze vedené komisí pro nomenklaturu alel cytochromu P450 (<http://www.cypalleles.ki.se/>) a dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>).

| Alela | aktivita enzymu in vivo | aktivita enzymu in vitro | Populační frekvence (dbSNP) |
|------------------|-------------------------|---------------------------|---|
| <i>CYP2C9*1</i> | normální, referenční | normální, referenční | |
| <i>CYP2C9*2</i> | snížená | snížená | kavkazská 10,4-17%, mongoloidní 0-0,1%, černošská 0-2% |
| <i>CYP2C9*3</i> | snížená | snížená | kavkazská 5,8-10%, mongoloidní 2-4,7%, černošská 0-0,8% |
| <i>CYP2C9*4</i> | snížená | snížená | Křováci - 1 osoba (jinak neudávána) |
| <i>CYP2C9*5</i> | snížená | snížená | černoši 0,1-3,4%, kavkazská 0% |
| <i>CYP2C9*6</i> | nefunkční | | 0-0,6% |
| <i>CYP2C9*7</i> | | | 2,1% černoši, jinak 0 |
| <i>CYP2C9*8</i> | snížená | popsána snížená i zvýšená | Bantu a Křováci 50%, jinak nedetekována |
| <i>CYP2C9*9</i> | | | černoši 7,5-13%, kavkazská 0-3,5%, mongoloidní 0 |
| <i>CYP2C9*10</i> | | | kavkazská 0-0,9% |
| <i>CYP2C9*11</i> | snížená | snížená | kavkazská 0,5-2,3 |
| <i>CYP2C9*12</i> | | snížená | kavkazská 0-0,8% |
| <i>CYP2C9*13</i> | snížená | snížená | Nejsou frekvenční data |
| <i>CYP2C9*14</i> | | snížená | Nejsou frekvenční data |
| <i>CYP2C9*15</i> | | nefunkční | Nejsou frekvenční data |
| <i>CYP2C9*16</i> | | snížená | Nejsou frekvenční data |
| <i>CYP2C9*18</i> | | snížená | kavkazská, hispánská 5,8-10% |
| <i>CYP2C9*25</i> | | nefunkční | nejsou frekvenční data |
| <i>CYP2C9*33</i> | | snížená | nejsou frekvenční data |

Většinou alelou v kavkazské populaci je referenční alela *CYP2C9*1* - u zhruba 60 až 70% osob kavkazského původu v homozygotní formě. Enzym vzniklý přepisem alely **1* je považován za referenční stran farmakokinetických parametrů a jeho nosič je označován jako normální metabolizátor.

Klinicky nejvíce využitelné z pohledu farmakogenetiky warfarinu jsou alely *CYP2C9*2* (záměna argininu za cystein na pozici 144 (R144C)) a *CYP2C9*3* (substituce isoleucinu za leucin na pozici 359 (I359L)). V rámci alel *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* byly popsáno historicky několik subalel (dnes již neužívaná nomenklaturní kategorie bez funkčního projevu, viz výše). Šlo o subalely *CYP2C9*2A, -2B -2C, -3A a -3B*.

Katalytická aktivita enzymu vzniklého přepisem alel *CYP2C9*2* a *CYP2C9*3* je významně snížena - snížení clearance a prodloužení plazmatického poločasu daného léčiva v porovnání s referenční alelou *CYP2C9*1*. Nomenklaturně pak lze označit pacienty homozygotní pro variantní alelu jako pomalé metabolizátory a nosiče v heterozygotní formě, pak jako intermediární metabolizátory. Druhá, méně používaná nomenklatura označuje nosiče alely **2* jako intermediální metabolizátory a nosiče alely **3* jako pomalé metabolizátory. U nosičů variantních alel se sníženou úrovní metabolizace pak hrozí významné riziko předávkování lékem a klinických komplikací spojených s vyšší hladinou léku. Vliv jednotlivých alel na denní dávku warfarinu a jejich populační frekvence u jednotlivých etnik jsou udány v tabulkách 1.4.2. a 1.4.3.

Klinicky využitelné u jiných (nekavkazských) populací jsou ještě alely *CYP2C9*4* (I359T) - u asijských populací (Ieiri et al, 2000) a *CYP2C9*5* (D360E) - popsána u afroameričanů (Dickmann et al, 2001), které jsou farmakokineticky podobné alele **3* - vysoká K_m a nízká clearance.

Tabulka 1.4.3: Vliv jednotlivých alel genu *CYP2C9* na denní dávku warfarinu a jejich populační frekvence u jednotlivých etnik.

| Vliv na dávku warfarinu | Genotyp | Změna dávky warfarinu v mg (%) | Populační frekvence u jednotlivých etnik |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------------------|---|
| Wild type, normální metabolizátor | <i>CYP2C9*1</i> | Referenční alela | kavkazská 61-81% (Gage et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní 90-91% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši 90-94% (Gage et al, 2008, Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008) |
| Intermediární metabolizátor | <i>CYP2C9*2</i> | 17% | kavkazská 13-26% (Gage et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní <1% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši 2-9% (Gage et al, 2008, Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008) |
| | <i>CYP2C9*1/*2</i> | 19,6% | |
| | <i>CYP2C9*2/*2</i> | 36,0% | |
| Pomalý metabolizátor | <i>CYP2C9*3</i> | 37% | kavkazská 6-13% (Gage et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní 9-10% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši <1-3% (Gage et al, 2008, Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008) |
| | <i>CYP2C9*1/*3</i> | 33,7% | |
| | <i>CYP2C9*2/*3</i> | 56,7% | |
| | <i>CYP2C9*3/*3</i> | 78,1% | |

1.4.3 Struktura proteinu CYP2C9

Protein CYP2C9 je složen ze 490 aminokyselin a má molekulární hmotnost 55,6 kDa. Jde strukturálně o homodimer, každá ze dvou domén je tvořena alfa helixem, 3 až 10 helixy, beta skládaným listem, neuspořádanými strukturami (random coils) a hemovou skupinou. Alfa helixy jsou pojmenovány v abecedním pořadí podle práce Williamse (Williams et al, 2003) od N do C-konce (viz obr. 1.4.1). CYP2C9 je ukotvený na membránu endoplazmatického retikula jednou transmembranózní doménou a jeho katalytická doména je vystavena do cytosolu (Cojocar et al, 2011). Na proteinu je rozpoznáváno 6 substrát rozpoznávajících

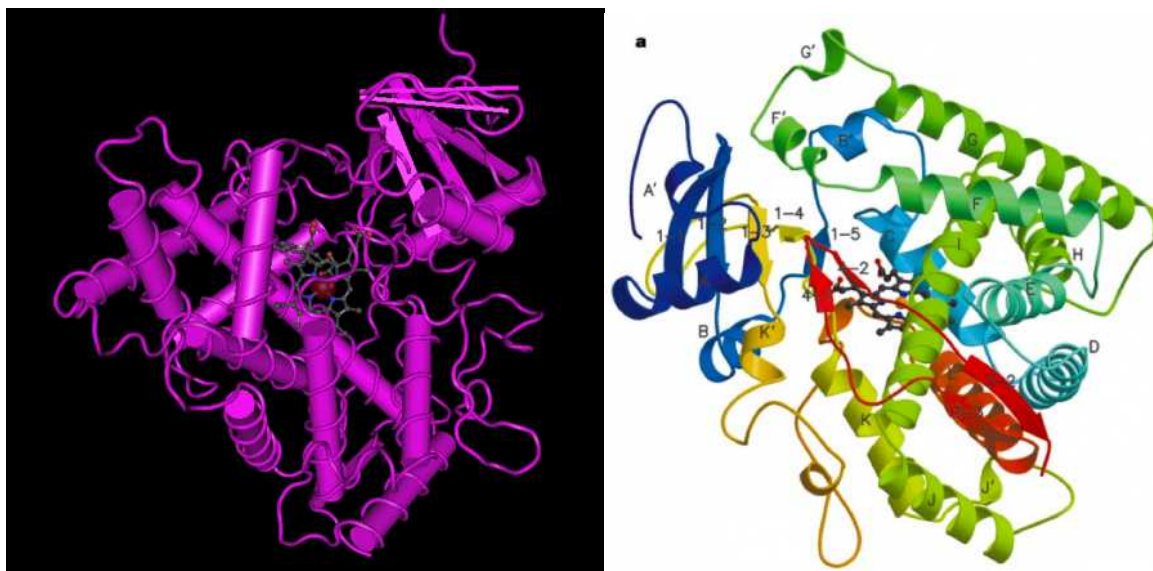
míst (substrate recognition sites, SRS), které vykazují větší variabilitu ve svém aminokyselinovém složení než ostatní oblasti proteinu - pozice 96-117, 198-205, 233-240, 286-304, 359-369 a 470-477 (Miners and Birkett 1998). Aktivní místo CYP2C9 je tvořeno hydrofobními zbytky (Phe-69, Phe-100, Phe-476, Leu-102, Leu-208, Leu-362 a Leu-366), které umožňují navázání substrátu van der Waalsovými vazbami (Williams et al, 2003), viz obr. č. 1.4.2.

Typickým substrátem enzymu CYP2C9 je slabě kyselá (pK_a 3,8 až 8,1) lipofilní menší molekula (Miners and Birkett 1998). Substrátem je řada endogenních substancí - steroidy, melatonin, kyselina retinová a arachidonová - ale zejména více než 20% všech xenobiotik (celkově > 120 léčiv). Z hlediska farmakogenetiky jsou nejdůležitější léky s nízkým terapeutickým indexem, mimo S-warfarinu, také např. fenytoin, glipizid a tolbutamid (Van Booven et al, 2010), přehled substrátů CYP2C9 je uveden v tabulce 1.4.4.

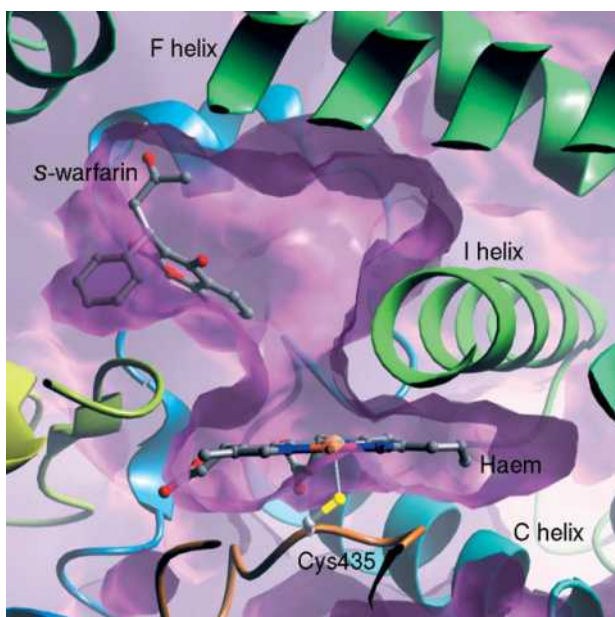
Tabulka 1.4.4: Přehled vybraných častěji používaných léčiv - substrátů metabolizovaných enzymem CYP2C9.

| | |
|---|--|
| Antagonisté vitamínu K | warfarin, acenokumarol, dikumarol, fenprokumon |
| Perorální antidiabetika | tolbutamid, glipizid, rosiglitazon |
| Inhibitory HMG-CoA reductázy (statiny) | fluvastatin, rosuvastatin, simvastatin |
| Antihypertenziva | losartan, irbesartan, kandesartan, torasemid |
| Nesteroidní antirevmatika | diklofenak, ibuprofen, indometacin, piroxicam, celecoxib |
| Antagonista receptoru pro estrogen | tamoxifen |
| Antidepresiva | fluoxetin, amitriptylin, sertralin |
| Antiepileptika | fenytoin |

Obrázek 1.4.1: 3D struktura izoenzymu cytochromu P450 - CYP2C9. Vlevo podle Molecular Modeling Database, MMDB www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB. Vpravo s označením domén podle práce Williamse (Williams et al, 2003).



Obrázek 1.4.2: 3D ilustrace vazebného místa enzymu CYP2C9 s navázanou molekulou S-warfarinu. Převzato z práce Williams et al. (Williams et al, 2003).



1.5 VKORC1

1.5.1 Gen VKORC1

VKORC1 (Vitamin K Epoxide Reductase Complex, Subunit 1) je gen pro enzym vitamín K epoxid reduktázu (VKOR1), který se podílí na recyklaci vitamínu K v jeho cyklu (viz výše) a jeho blokáda je podkladem antikoagulačního efektu warfarinu. Gen je lokalizován na 16. chromozómu (16p11.2), je dlouhý 5 139 bp a má 3 exony (Owen et al, 2010).

1.5.1.1 Mutace genu VKORC1

Také gen VKORC1 vykazuje významnou genetickou variabilitu s klinickými implikacemi. V genu VKORC1 jsou popsány jednak vzácné mutace vedoucí buď k rezistenci na podaný warfarin nebo k závažným krvácivým stavům spojeným s deficitem K-dependentních koagulačních faktorů. Bodové mutace v několika kodonech (29, 45, 36, 58, 66 a 128) vedou k farmakodynamické rezistenci na warfarin, která je většinou definována jako denní dávka vyšší než 25 mg s vysokou plazmatickou koncentrací warfarinu bez odezvy v koagulačním systému (OMIM 122700). Populační frekvence je velmi nízká, nebyla přesně stanovena pro větší populace a v literatuře jsou uvedeny pouze jednotlivé kazuistiky (Rost et al, 2004, Oldenburg et al, 2007). Jediná populační studie byla provedena u židovské populace, kde byla frekvence alely pro rezistenci (ASP36TYR, rs61742245) dokonce 15% (etiopští židé), 4,3% (aškenázští židé) a 0,6% (jemenští a afričtí židé) (Loebstein et al, 2007). Mutace genu VKORC1 (ARG98TRP, rs72547528) v homozygotní formě byla popsána dále jako kauzální pro vzácnou autozomálně recesivně dědičnou vrozenou koagulační poruchu: Kombinovaná deficiencie Vitamín K dependentních koagulačních faktorů, typ 2 (VKCFD, typ 2, OMIM 607473) u dvou rodin (Rost et al, 2004).

1.5.1.2 Polymorfizmy genu VKORC1

VKORC1 dále obsahuje populačně běžné polymorfizmy ovlivňující senzitivitu na podaný warfarin.

Nejvýznamnějším SNP je G3673A (nazýván historicky 1639 G>A), rs9923231 v promotoru genu *VKORC1* (vazebné místo pro transkripční faktor) a je považován za klinicky nejdůležitější polymorfismus z hlediska snížené senzitivity na podaný warfarin, který vysvětlí zhruba 25% variability v denní dávce warfarinu (Gage et al, 2008). Bylo prokázáno, že nosiči variantní alely mají menší počet kopií mRNA genu *VKORC1* a tedy i exprimovaného enzymu VKOR1 s následnou sníženou potřebou dávky warfarinu (Rieder et al, 2005).

Dalším významným - často vyšetřovaným - polymorfizmem je C6484T (historicky 1173 C>T), rs9934438, který silně koreluje s polymorfizmem G3673A (linkage disequilibrium $r^2 \geq 0,9$). Historicky byl objeven jako první SNP pro nízkou dávku warfarinu (D'Andrea et al, 2005) a i když je zřejmě funkčně inertní, je často vyšetřován jako marker haplotypu pro nízkou dávku warfarinu (Owen et al, 2010).

Posledním jednotlivým významným polymorfizmem je G9041A (historicky 3730 G>A), rs7294, který je asociován s vyšší dávkou warfarinu a většinou se nevyskytuje u stejných haplotypů jako G3673A nebo C6484T (Owen et al, 2010).

Byly popsány dva systémy vyhodnocení haplotypů genu *VKORC1* podle jednotlivých detekovaných polymorfizmů genu *VKORC1* a jejich vztahu k dávce warfarinu:

1) **Haplotypy H1 až H9** (Tabulka 1.5.1), seskupené podle citlivosti na podaný warfarin na kombinace haplotypů: *A* (nízká dávka, low dose) - *H1* a *H2*, *B* (*H7-9*) (vysoká dávka, high dose). Haplotypy *H3* až *H6* popsané v původní publikaci nejsou v praxi používány pro jejich nízkou populační frekvenci (< 5%). Existují pak tedy v populaci následující kombinace: *A/A* (nízká dávka), *A/B* (intermediální dávka) a *B/B* (vysoká dávka) podle Riedera et al (Rieder et al, 2005). V klinické praxi nemá význam rozlišovat mezi jednotlivými *H* haplotypy, tj. zda je pacient *H1* nebo *H2* haplotyp, ale je plně dostatečné identifikovat haplotypy se stejnou velikostí potřebné dávky warfarinu - *A/A*, *A/B* a *B/B*. V klinické praxi, pak lze rozlišit jednotlivé *A/A*, *A/B* a *B/B* haplotypy díky vyšetření pouze jednoho z pěti klíčových polymorfizmů (pozice - 381, 3673, 6484, 6853, 7566), jak je uvedeno na schématu

převzatém z původní Riederovy publikace (obrázek 1.5.1).

2) "Hvězdičkové" (star) haplotypy *1 až *4 (Tabulka 1.5.2) podle Geisena et al (Geisen et al, 2005). Dávka warfarinu je pak následující: *1/*1 (průměrná), *1/*2 (intermediální nízká), *2/*2 (nízká), *3/*3 (lehce vyšší), *4/*4 (vyšší) - u zbylých kombinací nebyla dávka udána.

Tabulka 1.5.1: Haplotypy genu *VKORC1* podle Riedera (Rieder et al, 2005).

Kombinace haplotypů podle velikosti dávky warfarinu: A (nízká dávka) = H1, H2; B (vysoká dávka) = H7, H8, H9.

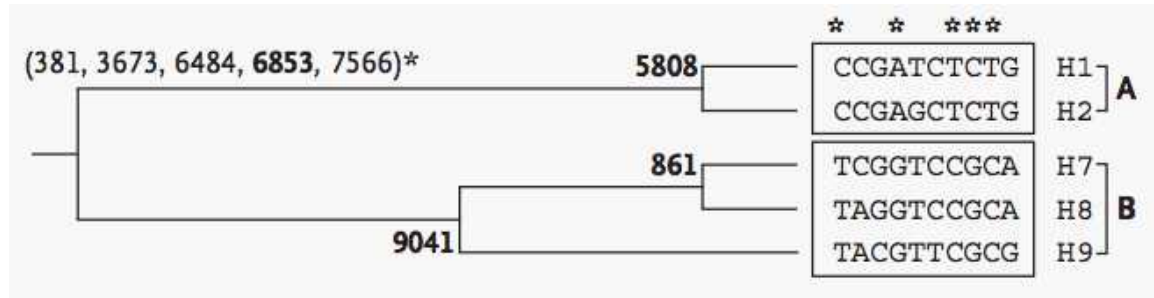
| <i>VKORC1</i> haplotyp | rs7196161 | rs17880887 | rs17881535 | rs9923231 | rs2884737 | rs17708472 | rs9934438 | rs8050894 | rs2359612 | rs7294 |
|---------------------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|--------|
| H1 | G | G | C | T | A | G | A | G | A | C |
| H2 | G | G | C | T | C | G | A | G | A | C |
| H3 | G | G | C | C | A | G | G | G | G | C |
| H4 | G | G | C | C | A | G | G | C | A | C |
| H5 | A | G | C | T | C | G | A | G | A | C |
| H6 | A | G | C | C | A | G | G | C | G | C |
| H7 | A | G | C | C | A | G | G | C | G | T |
| H8 | A | T | C | C | A | G | G | C | G | T |
| H9 | A | T | G | C | A | A | G | C | G | C |

Tabulka 1.5.2: *VKORC1* - "hvězdičkové haplotypy" (star haplotype) podle Geisena (Geisen et al, 2005).

| <i>VKORC1</i> | rs9923231 | rs17708472 | rs9934438 | rs2359612 | rs7294 |
|---------------|-----------|------------|-----------|-----------|--------|
| *1 | C | G | G | G | C |
| *2 | T | G | A | A | C |
| *3 | C | G | G | G | T |
| *4 | C | A | G | G | C |

Obrázek 1.5.1: Schéma k rozlišení mezi jednotlivými haplotypy podle Riedera.

Zobrazeny haplotypy *H1*, *H2*, *H7*, *H8* a *H9*, které tvoří dvě větší haplotypové skupiny s popsaným vlivem na výslednou senzitivitu na podaný warfarin - A (nízká dávka) a B (vysoká dávka). 8 jednotlivých SNP, podle kterých je možné rozlišit mezi haplotypy, je označeno číslem - pozicí nad větvením schématu. Hvězdičkou jsou označeny SNP s významnou prokázanou korelací s denní dávkou warfarinu (Rieder et al, 2005).



Celkově lze vliv jednotlivých haplotypů na výslednou užívanou denní dávku warfarinu zhodnotit podle průměrné denní dávky jedinců s daným haplotypem. V práci Riedera to bylo $2,7 \pm 0,2$ mg denně pro haplotyp *A/A*, $4,9 \pm 0,2$ mg pro haplotyp *A/B* a $6,2 \pm 0,3$ mg pro haplotyp *B/B* ($p < 0,001$) (Rieder et al, 2005).
 Detaily viz tabulka 1.5.3.

Tabulka 1.5.3: Vliv jednotlivých haplotypů genu *VKORC1* na denní dávku warfarinu a jejich populační frekvence u jednotlivých etnik.

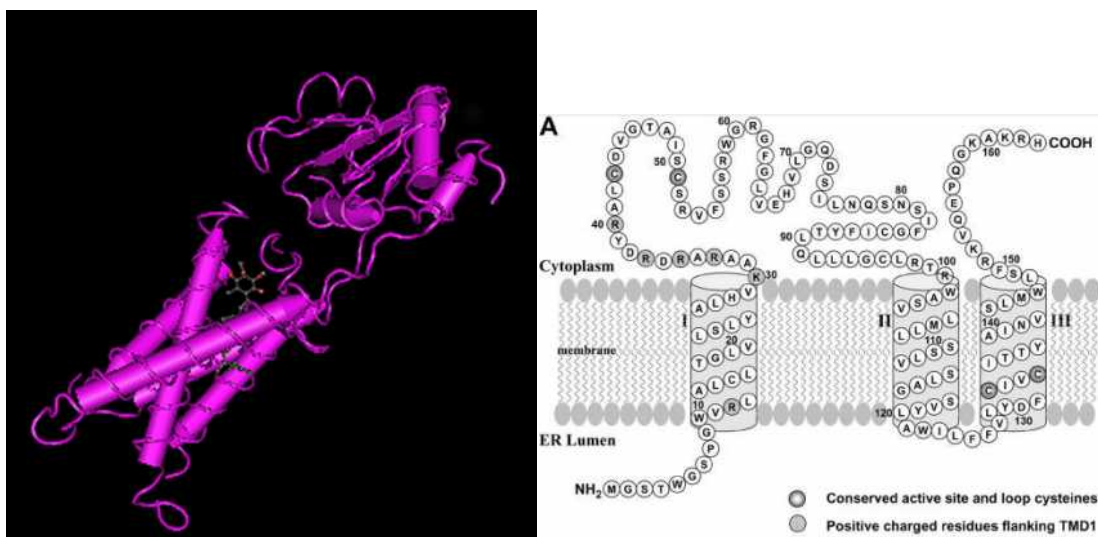
| Vliv na dávku warfarinu | Haplotyp podle Riedera | Změna denní dávky warfarinu v mg (%) | Populační frekvence u jednotlivých etnik |
|---------------------------|------------------------|---|--|
| Vysoká senzitivita | A/A | 27,3% (~3,2mg/den) | kavkazská 9-15% (Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní 77-84% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši <1% (Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008) |
| Intermediální senzitivita | A/B | Referenční haplotyp pro kavkazskou populaci (~4,4mg/den) | kavkazská 45-50% (Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní 16-21% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši 14-28% (Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008) |
| Nízká senzitivita | B/B | +38,6% (~6,1mg/den) | kavkazská 36-43% (Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008, Wadelius et al, 2009) mongoloidní <1,5% (Miao et al, 2007, Huang et al, 2009) černoši 72-85% (Limdi et al, 2008, Schelleman et al, 2008, Schwarz et al, 2008) |

1.5.2 Struktura proteinu *VKOR1*

Enzym vitamín K epoxid reduktáza je v literatuře rovněž (a méně často) nazýván korektněji jako podjednotka 1 komplexu vitamín K epoxidreduktázy (Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1), nicméně u lidí se nevyskytují další podjednotky tohoto komplexu. Jde o membránový protein, který 3x prochází třemi svými doménami membránou endoplazmatického retikula (viz obr. 1.5.2). Je složen ze 163 aminokyselin a má relativní molekulovou hmotnost 18235 Daltonů (Owen et al, 2010). Čtyři cysteinové zbytky (pozice 43, 51, 132 a 135), které jsou evolučně vysoce konzervovány byly potvrzeny jako vlastní aktivní místo enzymu,

které katalyzuje redukci vitamínu K epoxidu na jeho hydrochinonovou formu (Oldenburg et al, 2007).

Obrázek 1.5.2: 3D struktura proteinu VKOR1. Vlevo podle Molecular Modeling Database, MMDB, www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/MMDB. Vpravo schematicky podle (Tie et al, 2012).



1.6 Ostatní geny zkoumané v souvislosti s FG warfarinu

1.6.1 CYP4F2

Nejvíce relevantních údajů o ovlivnění dávky warfarinu máme, mimo genů *CYP2C9* a *VKORC1*, pro gen dalšího z izoenzymů cytochromového systému - *CYP4F2*. Nepodílí se na metabolizaci warfarinu, ale má funkci přímo v cyklu vitamínu K. To prokázala experimentální práce McDonald et al, která detekovala funkci izoenzymu *CYP4F2* jako monooxygenaci vitamínu K1 na ω -hydroxyvitamin K1, který je tak odstraňován z cyklu vitamínu K. Nosiči variantního polymorfizmu V433M (rs2108622) v genu *CYP4F2* mají sníženou metabolizaci vitamínu K1 a je předpokládáno, že mají vyšší hladinu vitamínu K v hepatocytech. Vyšší hladina vitamínu K1 pak vyžaduje pro účinnou antikoagulaci vyšší dávky warfarinu (McDonald et al, 2009). Efekt polymorfizmu se odráží na dávce warfarinu jen v menší míře, koeficient determinace R^2 je udáván od 2 do 7% oproti 30 až 54% pro geny *VKORC1* a *CYP2C9*

(Caldwell et al, 2008, Borgiani et al, 2009, Takeuchi et al, 2009).

1.6.2 Další izoenzymy cytochromu P450

Oba enantiomery warfarinu jsou metabolizovány stereoselektivně odlišnými izoenzymy cytochromu P450. Účinnější enantiomer (S-warfarin) je metabolizován izoenzymem CYP2C9. Méně účinný enantiomer (R-warfarin) je metabolizován izoenzymy CYP3A4, CYP1A1, CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 a CYP2C19. Zřejmě vzhledem k nižšímu účinku R-warfarinu na celkové koagulační parametry nebyl jejich účinek na výslednou velikost dávky warfarinu dosud u pacientů prokázán jako významný: CYP1A2, CYP2C8, CYP2C18 a CYP2C19 (Wadelius et al, 2007); CYP1A1, CYP2C18 a CYP3A4 (Wadelius et al, 2009).

1.6.3 Geny mimo systém cytochromu P450

Vzhledem k neúplnému vysvětlení velikosti denní dávky warfarinu s využitím výše uvedených genů bylo provedeno několik studií, které testovaly další geny se vztahem k metabolismu warfarinu. Žádný z následujících testovaných genů a jejich polymorfizmy nedosáhly v dosud provedených studiích signifikantních výsledků: *EPHX1* (gen pro mikrosomální epoxidhydrolázu 1), *F10* (gen pro koagulační faktor X), *ORM1* (gen pro orosomukoid 1), *ORM2* (gen pro orosomukoid 1), *PROS1* (gen pro protein S), *GGCX* (gen pro gama-glutamyl karboxylázu), *APOE* (gen pro apolipoprotein E), *PROC* (gen pro protein C) a počáteční slibné výsledky nebyly potvrzeny nebo postrádají klinickou validizaci (Rieder et al, 2007, Wadelius et al, 2007, Kimmel et al, 2008, Wang et al, 2008).

1.6.4 Význam dalšího rozšíření farmakogenetického panelu pro léčbu warfarinem

Na základě výše uvedeného se zdá pravděpodobné, že využitím rozšířeného panelu lze dosáhnout vysvětlení dalších zhruba 5 - 10 % variability denní dávky warfarinu. Nejvýznamnějším genem se pak jeví u kavkazské populace gen *CYP2F4*, pro což svědčí i nejrozsáhlejší klinické důkazy. Vezmeme-li však v úvahu jeho maximálně 5% podíl na koeficientu determinace, pak u pacienta s průměrnou dávkou warfarinu (5 mg) dojdeme ke změně výpočtu o 0,1 mg, což není klinicky příliš významné, proto

nebyl tento gen zařazen do většiny dosud používaných farmakogenetických algoritmů.

1.7 Negenetické faktory ovlivňující dávku warfarinu

Dávka warfarinu potřebná k dosažení účinné antikoagulace má velmi významnou intraindividuální, ale zejména interindividuální variabilitu. Užívaná denní dávka se může pohybovat od 0,5 mg do 25 mg denně. Velikost dávky je závislá na genetické dispozici a na negenetických faktorech. Genetická dispozice vysvětluje 45 – 60% interindividuální variability v dávkování warfarinu.

Negenetické faktory jsou zodpovědné zhruba za 40 až 55% **interindividuální** variability v odpovědi na warfarin v jednotlivých studiích. Pro účely farmakogenetických výpočtů je můžeme rozdělit na **relativně kvantifikovatelné** a stabilní (věk, pohlaví, váha a výška pacienta, zhruba 10 až 20% celkové variability dávky) a **hůře kvantifikovatelné** a více proměnné (aktuální obsah vitamínu K v potravě, stav jaterního a renálního metabolismu a jeho ovlivnění dalšími léky a složkami potravy, aktuální stav poměru anabolismus a katabolismus, celkový stav hemostázy, compliance pacienta a v neposlední řadě adherence k vedení léčby lékařem), které zodpovídají až za 30-40% variability.

Podíl variability jednotlivých klinických faktorů na celkové denní dávce warfarinu je obtížně kvantifikovatelný a velmi se v literatuře liší mezi jednotlivými studii podle vlastností jejich souboru. Celkem reprezentativní data poskytla kohorta studie provedené IWPC, kdy celkový koeficient determinace R^2 - tj. podíl daného faktoru na výsledné denní dávce byl pro věk 7,8%, pro tělesnou hmotnost 16,9% a pro tělesnou výšku 10,4% (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009). Vliv léčiv ovlivňujících významně denní dávku warfarinu je detailně popsán dále.

Intraindividuální variabilita se projevuje jednak klesající dávkou se stoupajícím věkem, ovlivněním jaterního metabolismu při změně medikace nebo po stimulaci přechodným pitím alkoholu (typicky kolem životního jubilea při protražovaných oslavách - iniciálně nutná vyšší dávka, která následně může být příliš vysoká), podle aktuálního obsahu vitamínu K v potravě (sezónní zvýšení

dávky v letních měsících se zvýšeným příjmem zeleniny), při septických stavech apod. U daného pacienta tak může v rámci dnů dojít ke změně optimální dávky až o desítky procent - např. u pacienta dlouhodobě užívajícího 5 mg dojde při přeléčení infektu (interakce s nasazenými antimikrobiálními léky) a celkově propadu do katabolizmu při septickém stavu ke změně potřebné dávky na 2mg denně, tj. klinicky dojde k významnému předávkování warfarinem s výraznou elevací INR nad terapeutické rozmezí s rizikem závažných krvácivých komplikací.

1.7.1 Ovlivnění dávky ostatními užívanými léčivy

Jednou z nejčastějších příčin variability v dávce je interakce s ostatními léčivy. Vzhledem k dominantní hepatální metabolizaci a zároveň úzkému terapeutickému oknu je u warfarinu je popsáno více než 120 klinicky významných lékových interakcí, celkový počet uváděných interakcí s menší významností podle příbalových informací FDA je aktuálně 648 (Holbrook et al, 2005, Anthony et al, 2010). Většina závažných interakcí je působena inhibitory jaterního metabolismu, které zvyšují hladinu warfarinu pro jeho pomalejší metabolizaci a tedy vyšší riziko předávkování s následnými krvácivými komplikacemi (viz tabulka 1.7.1).

Tabulka 1.7.1: Vybraná léčiva s významnými interakcemi s warfarinem podle svého vlivu na jaterní enzymy.

| | Inhibitory | Induktory |
|---------------|---|--|
| Silné | flukonazol, miconazol, kyselina valproová, sulfafenazol | rifampicin, secobarbital, fenobarbital |
| Středně silné | amiodaron | |
| Méně významné | fenofibrát, fluvastatin, lovastatin, chloramfenikol, prometazin, izoniazid, sertralin, fenylobutazon, sulfametoxazol, simvastatin | |

Většina potentních inhibitorů a induktorů však naštěstí patří mezi léky s omezenými klinickými indikacemi a většinou i krátkou dobou podávání (antimykotika, antibiotika) u skupiny pacientů léčených warfarinem.

Lékem z největším potenciálem ovlivnit dávkování warfarinu je antiarytmikum **amiodaron**, který je indikován u významné části pacientů užívajících warfarin pro prevenci embolizace u fibrilace síní. Navíc je takřka výlučně používán u pacientů ve stejné indikaci jako warfarin, všichni pacienti léčení amiodaronem by měli být warfarinizováni. Efekt je závislý na užívané dávce, kdy při denní dávce 100mg amiodaronu je průměrná redukce denní dávky 25% (25% +/- 4,4%), při dávce 200mg - redukce denní dávky 30% (31% +/- 1,9%), při dávce 300mg - redukce denní dávky 35% (36% +/- 4,4%) a při dávce 400mg - redukce denní dávky 40% (38% +/- 1,7%). (Sanoski 2002). Literárně udávané hodnoty redukce denní dávky jsou výjimečně podobné, Gage a kolektiv prokázali redukcí denní dávky po zahrnutí více parametrů do regresního modelu 29% (16-40%), $p=0,0001$ (Gage et al, 2004).

Další klinicky významnou interakci mají statiny, které jsou opět indikovány u drtivé většiny pacientů užívajících warfarin. Nejvíce dat je u simvastatinu, kdy průměrná redukce dosáhla 12% (1 - 22%), $p=0,04$ denní dávky warfarinu (Gage et al, 2004)

U dalších léčiv ze skupiny statinů je předpokládána významnější inhibice u losuvastatinu, fluvastatinu a atorvastatinu, naopak minimální vliv je přisuzován rosuvastatinu s dominantně renální eliminací.

Další skupinou interakcí jsou interakce, které nejsou způsobeny ovlivněním hepatálního metabolismu warfarinu. Klinicky časté jsou interakce s nesteroidními antirevmatiky (ibuprofen, diklofenak, piroxikam, ketoprofen aj.), které vytěsňují warfarin z jeho vazby na plazmatické bílkoviny a současně blokují aktivitu trombocytů. Navíc tato skupina léků zvyšuje riziko krvácení do gastrointestinálního traktu. Obdobně zvyšují riziko krvácení při léčbě warfarinem léčiva s antiagregačním účinkem (kyselina acetylosalicylová, klopidogrel, dipyridamol, prasugrel, tikagrelor aj.) nebo dokonce podání jiných léků s antikoagulačním účinkem.

Z pohledu farmakogenetiky je zajímavý i různý vliv induktoru na různé variantní izoenzymy enzymu CYP2C9. V metodicky dobře provedené studii Vormfelda a kolektivu byly u 130 zdravých dobrovolníků měřeny farmakokinetické parametry tolbutamidu před a po indukci jaterních enzymů rifampicinem. Průměrná celková clearance byla změřena u osob s genotypem CYP2C9*1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*3 a *3/*3 před podáním rifampicinu jako 0,78, 0,74, 0,52, 0,40 a 0,13 l/h. Po podání rifampicinu došlo ke zvýšení clearance u všech genotypů 1,9x (1,1–4,8). Nicméně díky odlišné vstupní clearance vznikl vlastně významně větší (6x) rozdíl mezi pacienty s CYP2C9*1/*1 a *3/*3 (Vormfelde et al, 2009). Musíme tedy očekávat klinicky významně závažnější interakce u pacientů s variantním genotypem CYP2C9 než u pacientů s wild type genotypem.

1.8 Farmakogenetika a klinické parametry

1.8.1 CYP2C9

Variantní alely *2 a *3 genu CYP2C9 jsou signifikantně spojeny s nižší než obvyklou dávkou warfarinu (Higashi et al, 2002, International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009), častějším INR nad terapeutickým rozmezím, vyšší pravděpodobností předávkování (Higashi et al, 2002, Joffe et al, 2004), delším časem nad terapeutickým rozmezím (Meckley et al, 2008), delším časem k dosažení stabilizace dávky (Higashi et al, 2002) a vyšším rizikem krvácivých komplikací (Margaglione et al, 2000, Higashi et al, 2002).

1.8.2 VKORC1

Variantní haplotyp genu VKORC1 (haplotyp A, vysoká senzitivita na warfarin) je významně spojen s nižší dávkou warfarinu (Rieder et al, 2005, Sconce et al, 2005, Veenstra et al, 2005, Wadelius et al, 2005) a méně významně s kratším časem k dosažení terapeutického rozmezí s pravděpodobnějším předávkováním (Meckley et al, 2008, Schwarz et al, 2008). Riziko krvácivých komplikací pro nosiče haplotypu A je v různých studiích nevýznamně vyšší nebo shodné oproti nosičům nejčastějšího haplotypu indoevropské populace A/B (Limdi et al, 2008, Meckley et al, 2008, Schwarz et al, 2008). Vzácné bodové mutace v genu VKORC1 (kodony 29, 45, 58, 66,

128) jsou zodpovědné za farmakodynamický typ rezistence na warfarin, který je obvykle definován jako denní dávka vyšší než 25 mg a současně zvýšená sérová koncentrace warfarinu pro dosažení terapeutického rozmezí INR. (Rost et al, 2004, Oldenburg et al, 2007). Populační frekvence těchto mutací není přesně známá, ale jedná se o velmi vzácný stav popsáný jen v individuálních případech.

1.8.3 *CYP2C9* versus *VKORC1*

Je zajímavé, že vliv genu *VKORC1* na variabilitu dávky warfarinu je významnější než vliv genu *CYP2C9*, ale naopak nosičství variantních alel genu *CYP2C9* je významnějším vlivem na důležité sledované klinické parametry (předávkování, čas nad terapeutickým rozmezím, riziko krvácení). Jedním z možných vysvětlení tohoto faktu je významné prodloužení poločasu warfarinu u nosičů variantních alel *CYP2C9*2* a **3* (Linder et al, 2002) a z toho plynoucí a lékařem neočekávané reakce pacientů při změnách denní dávky (zvýšíme dávku jak je zvykem, protože pacient stále nedosahuje účinné léčby, nicméně následně dojde k předávkování po sečtení pozdního vlivu u pomalých metabolizátorů a nově a předčasně navýšené dávky). Rozdílná potřeba dávky warfarinu jednotlivými lidskými rasami je přičítána nejvíce rozdílnému zastoupení variantních polymorfismů genu *VKORC1* - nejčastější haplotyp A/A u mongoloidní rasy, A/B u kavkazské rasy a B/B u černochoů. Variantní polymorfismy genu *CYP2C9* jsou rovněž odlišně zastoupeny mezi jednotlivými rasami - nižší frekvence wild type alely *CYP2C9*1* u kavkazské rasy, relativně vyšší zastoupení *CYP2C9*3* u mongoloidní rasy a naopak relativně vyšší zastoupení alely *CYP2C9*2* u černochoů (viz tabulky 1.4.2 a 1.5.3).

1.9 Klinické aplikace farmakogenetiky

1.9.1 Výpočet denní dávky před zahájením terapie

Vzorce na výpočet denní dávky warfarinu, které byly dosud publikovány, jsou většinou vytvořeny na základě relativně malých kohort pacientů, používají

odlišné parametry pro vlastní výpočet a jejich validita a přesnost byla jen omezeně ověřována. Neexistuje tedy jeden univerzálně akceptovaný výpočet, ale celá řada různých vzorců. Přesnost predikce jednotlivých vzorců je nejčastěji vyjádřena hodnotou koeficientu determinace (R^2 , které nabývá hodnoty od 0 do 1 = 100%). Hodnota R^2 dosud publikovaných vzorců se pohybuje od 31% do 79%. Jednotlivé vzorce mají navíc různou přesnost podle etnického složení kohorty pacientů na kterou byly vytvořeny, a tak je důležité vybrat adekvátní vzorec pro vlastní pacienty. Dále existuje řada faktorů, které omezují přesnost predikce denní dávky podle výpočtů (viz tabulka 1.9.1).

Tabulka 1.9.1: Faktory limitující přesnost farmakogenetického výpočtu.

| Nezapočitatelné vlivy proměnné v čase u jednotlivého pacienta | |
|---|---|
| Vitamín K | Aktuální množství v potravě + stav produkce ve střevě |
| Naladění koagulačního systému | Počínající infekce, konzumpce a elevace koagulačních faktorů – závislých i nezávislých na warfarinu, kolísání sérových hladin albuminu, septický stav, katabolismus/anabolismus |
| Aktuální funkce jater a ledvin | Kolísání funkce zejména u pacientů s hraniční funkcí |
| Omezený distribuční prostor | Pacienti po amputacích dolních končetin |
| Chybné dávkování warfarinu | |
| Nemožnost nasadit přesně vypočtenou dávku | Omezená dostupnost síly tablet warfarinu i přes jejich půlení a čtvrcení: Warfarin PMCS (dříve Lawarin) 2 a 5 mg (Pro.Med.CS Praha a.s.), Warfarin Orion 3 a 5 mg (Orion Pharma) |
| Nestejný obsah dávky warfarinu při nepřesném půlení a čtvrcení tablet | Může se uplatnit u velmi malých dávek warfarinu a zejména u starších a rizikových pacientů |
| Chyby vzorců a laboratorních výsledků | |
| Významně horší přesnost výpočtu u pacientů mladších 40 let | Všechny publikované vzorce byly vytvořeny na kohortách obsahujících „typické warfarinované pacienty“ s jen minimálním zastoupením mladších jedinců a už vůbec ne dětí. Predikce je špatná oběma směry – výsledná dávka získaná empiricky je stejně často vyšší i nižší než vypočtená dávka. |
| Odchylka měření INR | Typická chyba +/- 0,2 a z toho plynoucí reakce lékaře na výsledek je-li mimo rozmezí 1,8 až 3,2 |

1.9.1.1 Typy používaných farmakogenetických algoritmů

Publikované vzorce můžeme rozdělit na dvě skupiny. První nám umožňuje stanovit denní dávku ještě před zahájením léčby warfarinem pouze stanovením genotypu s korekcí negenetickými faktory. Výhodou tohoto postupu je jeho

jednoduchost a rychlost, nutné je však rychlé vyhotovení DNA analýzy, aby léčba mohla být zahájena (přehled algoritmů s využitím jednostupňového postupu viz tabulka 1.9.2).

Druhý přístup je zahájení terapie warfarinem a následná korekce dávky podle prvních výsledků INR korigovaných podle genetických údajů, který eliminuje nutnou chybu při odhadu negenetických faktorů (např. vliv tělesné výšky a hmotnosti nebo aktuálního nastavení hemostázy na metabolismus a účinek warfarinu) a také zmenší nezapočitatelný vliv nevyšetřených nebo dosud neznámých genetických faktorů. Průkopníkem tohoto postupu byl kolektiv Millicana, který navrhnul specifický vzorec pro pacienty nasazované na warfarin po náhradě kyčelního kloubu a do výpočtu zařadil INR třetí den léčby (Millican et al, 2007). Recentněji byl tento postup využit ve studiích CoumaGen-II, EU-PACT a COAG (Anderson et al, 2012, Kimmel et al, 2013, Pirmohamed et al, 2013).

1.9.1.2 Klinické testování farmakogenetických algoritmů

1.9.1.2.1 Nerandomizované ověřování přesnosti farmakogenetických výpočtů

Největší studie, která použila údaje 4043 pacientů pro vývoj vzorce a 1009 pacientů jako validační kohortu byla provedena mezinárodním konsorciem (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium) (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009). Studie srovnávala nasazení warfarinu třemi taktikami: podle farmakogenetického výpočtu, podle klinického algoritmu bez znalosti genetiky (zahrnoval výpočet s negenetickými parametry) a nasazení s použitím fixní dávky (tj. standardní taktika klinické praxe). Závěrem studie konstatovala, že použití farmakogenetického výpočtu významně lépe predikovalo definitivní dávku warfarinu, které bylo dosaženo empiricky. Studie dále potvrdila jasný přínos farmakogenetiky pro takřka polovinu všech pacientů a to zejména pro pacienty, kteří potřebují netypicky nízkou nebo naopak vysokou dávku warfarinu. Výhody farmakogenetického výpočtu se logicky stírají u průměrných pacientům, kteří potřebují přesně denní dávku 5 mg, která je správně a podle odborných

doporučení podávána všem i bez výpočtu a nákladnější DNA analýzy (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009).

Tabulka 1.9.2: Přehled publikovaných farmakogenetických algoritmů.

Uveden počet a etnicita pacientů v derivační, způsob validace a přesnost predikce jednotlivých algoritmů (R^2 = koeficient determinace).

| Počet a (etnicita) pacientů derivační kohorty | Geny zahrnuté v algoritmu | negenetické faktory v algoritmu | Validace algoritmu | R^2 | Studie - citace |
|--|----------------------------------|---|---|-------|--|
| 369 (261 kavkazská, 108 afroamerická) | <i>CYP2C9</i> | Věk, rasa, pohlaví, povrch těla, lékové interakce | Bootstrap modelování ($R^2 = 38,6\%$) (Gage et al, 2004) | 39% | Gage et al 2004 (Gage et al, 2004) |
| 453 (etnicita definována jen jako většinou kavkazská") | <i>CYP2C9</i> | Věk, povrch těla, pohlaví, komorbidity, indikace warfarinu | Randomizovaná prospektivní, n = 38, R^2 neudáno (Hillman et al, 2005) | 33,7% | Hillman et al 2004 (Hillman et al, 2004) |
| 297 (kavkazská) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, výška | Retrospektivní nerandomizovaná: n = 38, ($R^2 80\%$) (Sconce et al, 2005) | 54,2% | Sconce et al 2005 (Sconce et al, 2005) |
| 213 (etnicita definována jen jako „většinou kavkazská“) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, váha, pohlaví | Prospektivní randomizovaná: n = 206 ($R^2 = 47\%$) (Anderson et al, 2007) | 44,6% | Carlquist et al 2006 (Carlquist et al, 2006) |
| 107 (čínská, malajská, indická) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, váha | Retrospektivní nerandomizovaná n = 108 ($R^2 73\%$) | 60,2% | Tham et al 2006 (Tham et al, 2006) |
| 92 (79 kavkazská, 13 afroamerická) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | INR před léčbou a 3. den léčby, kouření, ztráta krve | Nevalidováno | 79% | Millican et al 2007 (Millican et al, 2007) |
| 178 (čínská) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, váha | Nevalidováno | 62,8% | Miao et al 2007 (Miao et al, 2007) |
| 1015 (838 kavkazská, 153 afroamerická) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, rasa, pohlaví, povrch těla, lékové interakce, kouření, hluboká žilní trombóza nebo plicní embolizace | Prospektivní nerandomizovaná: n = 292 ($R^2 = 54$) (Gage et al, 2008) | 53,1% | Gage et al 2008 (Gage et al, 2008) |
| 132 (131 kavkazská) | <i>CYP2C9</i> , <i>VKORC1</i> | Věk, povrch těla, poměr S a R-warfarinu po 14 hod. nebo INR 4. den | Nevalidováno | 51% | Michaud et al 2008 (Michaud et al, 2008) |

| POKRAČOVÁNÍ Z PŘEDCHOZÍ STRANY: Počet a (etnicita) pacientů derivační kohorty | Geny zahrnuté v algoritmu | negenetické faktory v algoritmu | Validace algoritmu | R ² | Studie - citace |
|---|--|---|---|----------------|--|
| 390 (brazilská - 196 bílá brazilská, 76 černá brazilská) | <i>CYP2C9, VKORC1</i> | Věk, váha, lékové interakce, klinická indikace | Nevalidováno | 50,4% | Perini et al 2008 (Perini et al, 2008) |
| 259 (112 afroamerická, 147 kavkazská) | <i>CYP2C9, VKORC1, APOE, faktor VII (F7)</i> | Věk, BMI, příjem alkoholu, lékové interakce, hluboká žilní trombóza | Cross-validace v derivační kohortě (Schelleman et al, 2008) | 31% | Schelleman et al 2008 (Schelleman et al, 2008) |
| 1496 (etnicita neudána, majoritně švédská) | <i>CYP2C9, VKORC1</i> | Věk, pohlaví, lékové interakce | Retrospektivní nerandomizovaná n = 181 (R ² = 53%)(Wadelius et al, 2009) | 59% | Wadelius et al 2009 (Wadelius et al, 2009) |
| 266 (čínská) | <i>CYP2C9, VKORC1</i> | Věk, povrch těla | Prospektivní randomizovaná: n = 121 (R ² = 45,4%) (Huang et al, 2009) | 54,1% | Huang et al 2009 (Huang et al, 2009) |
| 4043 (2233 bílá, 1229 mongoloidní, 353 černošská, 228 jiná) | <i>CYP2C9, VKORC1</i> | Věk, rasa, pohlaví, výška, lékové interakce | Retrospektivní nerandomizovaná n = 1009 (R ² = 43%) (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009) | 47% | IWPGC, 2009 (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009) |

1.9.1.2.2 Randomizované studie zahájení léčby warfarinem podle farmakogenetiky ve srovnání s klasickým empirickým postupem

1.9.1.2.2.1 Studie publikované do roku 2012

Nejméně 5 prospektivních randomizovaných studií bylo dokončeno a publikováno na toto téma s nedostatečnou statistickou silou pro plánované cíle (38 až 230 pacientů) do roku 2012 (Hillman et al, 2005, Anderson et al, 2007, Caraco et al, 2008, Huang et al, 2009, Burmester et al, 2011). Vliv výpočtu denní dávky podle farmakogenetiky byl v provedených studiích menší, než se původně předpokládalo a tak jejich výsledky nebyly statisticky významné. Nicméně ve všech publikovaných studiích kohorty pacientů iniciované na warfarinu podle farmakogenetického výpočtu vykazovaly statisticky významně vyšší (Caraco et al, 2008, Huang et al, 2009) nebo alespoň jasný trend (Hillman et al, 2005, Anderson et al, 2007, Burmester et al, 2011) podílu času stráveného v terapeutickém rozmezí (TTR, time in the therapeutic INR range). Využití farmakogenetiky rovněž vedlo k snížení počtu krvácivých komplikací – a to významnou redukcí relativního rizika krvácení (Caraco

et al, 2008) nebo alespoň jasným pozitivním trendem v tomto parametru (Hillman et al, 2005, Anderson et al, 2007, Huang et al, 2009).

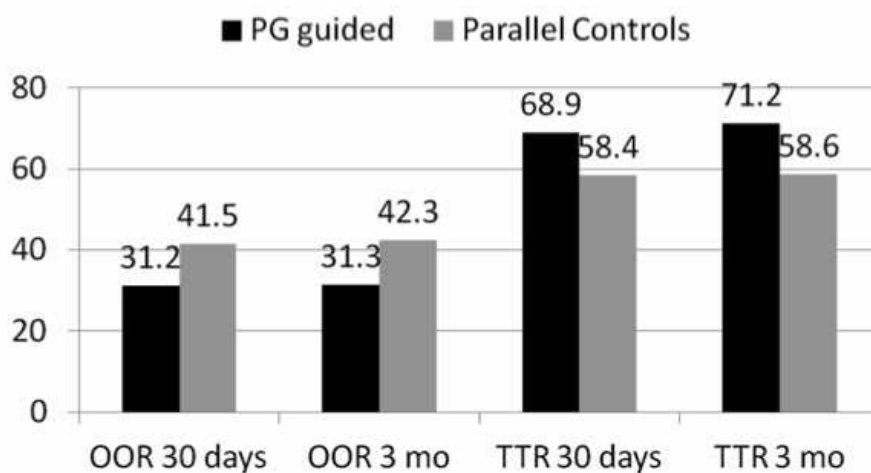
Pozitivní vliv farmakogeneticky vedeného dávkování warfarinu se jasně projevil u analýz zařazených pacientů podle jednotlivých variantních genotypů. Při srovnání nosičů variantních genotypů proti pacientům s wild type genotypem (bez variantních alel, tj. *CYP2C9*1* a *VKORC1* haplotyp A) farmakogenetický výpočet efektivně predikoval vyšší potřebnou dávku u wild type pacientů ($p=0,001$) a nižší potřebnou dávku u variantních pacientů ($p<0,001$) (Anderson et al, 2007). Variantní pacienti dosáhli stabilizace dávky warfarinu významně rychleji s využitím farmakogenetiky než bez ní ($p=0,003$ pro *VKORC1* a $p=0,199$ pro *CYP2C9*3*) (Huang et al, 2009). V neposlední řadě byla nevýhodou všech provedených studií skutečnost, že i pacienti nasazovaní podle standardního režimu byli léčeni v specializovaných antikoagulačních centrech s důrazem na rigorózní kontrolu INR s dobře propracovaným systémem vedení terapie narozdíl od běžné klinické praxe.

1.9.1.2.2 Studie CoumaGen-II

Po relativním neúspěchu studie CoumaGen navrhla a provedla Andersonova skupina studii CoumaGen-II (Randomized and Clinical Effectiveness Trial Comparing Two Pharmacogenetic Algorithms and Standard Care for Individualizing Warfarin Dosing) (Anderson et al, 2012). Tato práce hledala odpověď na dvě hlavní porovnání - 1) zaslepené randomizované porovnání dvou farmakogenetických algoritmů - jednostupňového (modifikovaný algoritmus podle IWPC doplněný o cílové INR a status kuřáka) a třístupňového algoritmu - kdy první výpočet před nasazením warfarinu neobsahoval údaje o polymorfizmech v genu *CYP2C9* a druhý opravný výpočet se započtením skutečného INR 4. nebo 5. den a 2) celkovou klinickou efektivitu farmakogenetického dávkování (obou algoritmů) v porovnání se standardní klinickou praxí bez využití genetiky. Do studie bylo zařazeno v první větvi celkem 504 pacientů a v druhé větvi celkem 1866 pacientů. Primární konečný cíl bylo procento měření INR mimo terapeutické rozmezí za 1 a 3 měsíce a celkový čas v terapeutickém rozmezí.

V závěrečné analýze byl jednostupňový algoritmus noninferiorní, ale ne superiorní oproti třístupňovému. Druhé porovnání vyšlo však jasně ve prospěch farmakogenetické kohorty (podle obou algoritmů). Procento výsledků INR mimo terapeutické rozmezí bylo po prvním měsíci 31% versus 42%; po třetím měsíci 30% versus 42%. Čas v terapeutickém rozmezí byl vyšší pro farmakogenetickou kohortu - v prvním měsíci 69% versus 58%, a 71% versus 59% za první tři měsíce (všechny porovnání $p < 0,001$) - detaily viz obr. 1.9.1. Tyto rozdíly zůstaly statisticky signifikantní i po započtení dalších proměnných (věk, pohlaví, klinické indikace warfarinu). U farmakogenetické kohorty bylo dále zaznamenáno významně méně INR > 4 , INR $< 1,5$ a celkových nežádoucích událostí v prvních třech měsících léčby (4,5% versus 9,4%, $p < 0.001$).

Obrázek 1.9.1: Výsledky studie CoumaGen-II. Porovnání farmakogenetické kohorty (PG guided) se standardně dávkovanou kohortou (parallel controls) ze studie CoumaGen-II. První dva sloupce porovnání INR mimo terapeutické rozmezí v % (OOR, out-of-range INR) - za 30 dnů a za 3 měsíce. Druhé dva sloupce celkový čas v terapeutickém rozmezí v % (TTR, time in therapeutic range) - za 30 dnů a za 3 měsíce, převzato z (Anderson et al, 2012).



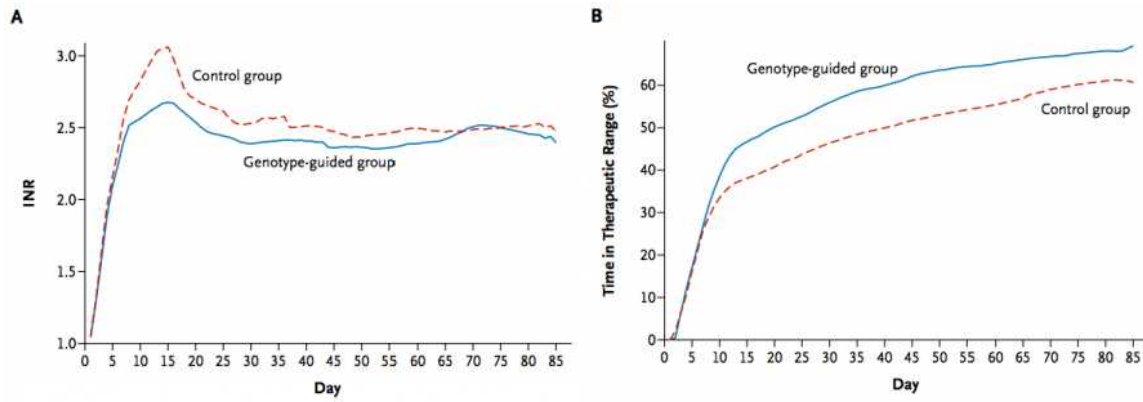
1.9.1.2.2.3 Studie EU-PACT

S vědomím relativního neúspěchu první vlny studií na téma porovnání farmakogenetického algoritmu a empirického dávkování byly navrženy dvě větší klinické studie: americká COAG (Kimmel et al, 2013) a evropská EU-PACT (Pirmohamed et al, 2013), jejichž výsledky byly publikovány v prosinci 2013 v časopise New England Journal of Medicine.

Studie EU-PACT porovnávala zahájení léčby warfarinem podle farmakogenetického algoritmu se standardním empirickým postupem. Skupina nasazovaná podle FG algoritmu (n = 227) dostávala první tři dny dávku vypočtenou na základě upraveného, dříve publikovaného algoritmu (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009), čtvrtý a pátý den byl použit algoritmus doplněný o hodnotu INR čtvrtý den léčby. Kontrolní skupina (n = 228) dostávala první tři dny loadovací dávku podle věku - pacienti mladší 75 let dostali 10 mg warfarinu první den, 2. a 3. den pak 5 mg, pacienti starší 75 let dostávali 5 mg první tři dny. Od 6. dne již bylo postupováno empiricky podle individuálních hodnot INR identicky u pacientů obou skupin. Hlavním cílem studie byl čas v terapeutickém rozmezí (TTR) během prvních 12 týdnů léčby warfarinem.

Průměrný čas v terapeutickém rozmezí byl 67,4% ve farmakogenetické kohortě oproti jen 60,3% v kontrolní skupině (rozdíl 7,0%, 95% konfidenční interval 3,3 až 10,6; $p < 0,001$). Farmakogenetická kohorta měla dále statisticky významně méně přesahů INR nad 4,0. Čas dosažení terapeutického INR byl poměrně dlouhý v obou kohortách, nicméně kratší u FG kohorty (21 dnů) proti 29 dnům u kontrolní skupiny ($p < 0,001$), viz obr. 1.9.2.

Obrázek 1.9.2: Porovnání kohort ve studii EU-PACT: A) podle aktuálního INR v daný den. B) podle procenta pacientů v terapeutickém rozmezí (Pirmohamed et al, 2013).



1.9.1.2.2.4 Studie COAG

Obdobná studie provedená v USA zařadila celkem 1015 pacientů. Ve studii COAG byl použit algoritmus podle prací publikovaných kolektivy Gage a Lenziniho (Gage et al, 2008, Lenzini et al, 2010). První tři dny léčby byl použit algoritmus pro iniciaci léčby, čtvrtý a pátý den algoritmus pro revizi dávky, který zahrnoval údaje o INR v prvních třech dnech a individuální dávce jednotlivých pacientů (podobný přístup jako ve studii CoumaGen-II, viz výše). U obou podskupin studie byl použit algoritmus zahrnující klinická data, u farmakogenetické skupiny navíc obsahoval údaje o genotypu (*CYP2C9* a *VKORC1*).

Primárního cíle, procenta dnů v terapeutickém rozmezí od 4. nebo 5. do 28. dne, dosáhlo 45,2% pacientů ve farmakogenetické skupině oproti 45,4% pacientům ve skupině kontrolní (rozdíl -0,2%; 95% konfidenční interval -3,4 až 3,1; $p = 0,91$).

Tato studie tak dopadla relativně nejhůře ze všech provedených studií, neprokázala žádný významný efekt zařazení farmakogenetických dat do léčby warfarinem. I přes její publikaci v jednom z nejprestižnějších klinických časopisů (New England Journal of Medicine) měla však řadu zásadních nedostatků. Asi nejpodstatnějším byla velká etnická různorodost, kdy v souboru bylo 27% afroameričanů a 6% hispánců mimo většinou kavkazskou populaci. Celková přesnost predikce farmakogenetického algoritmu (jen 21% u afroameričanů), pak

byla velmi nízká a nemohla být jasně lepší než algoritmus založený pouze na klinických datech - detaily viz obr. 1.9.3.

Obrázek 1.9.3: Tabulka udávající přesnost predikce farmakogenetického a klinického algoritmu ve studii COAG podle etnického původu zařazených pacientů - převzato z přílohy článku Kimmela et al (Kimmel et al, 2013).

| | Genotype-guided dosing | | |
|----------------------------------|------------------------|-------|----------|
| | All participants | Black | Nonblack |
| Achieved maintenance dose, n | 370 | 84 | 286 |
| Within 1 mg of 5 mg/day, % * | 33 | 27 | 35 |
| <i>Dose-initiation algorithm</i> | | | |
| Partial R ² † | 0.48 | 0.21 | 0.52 |
| Spearman rank correlation ‡ | 0.72 | 0.50 | 0.75 |
| Mean absolute difference, mg/d § | 1.3 | 1.6 | 1.2 |
| Predicted – observed dose, % ** | | | |
| ≥ 1 mg/d | 25 | 39 | 20 |
| Within 1 mg/d | 53 | 38 | 57 |
| ≤ -1 mg/d | 22 | 23 | 22 |

1.9.2 Odhad rizika krvácení během léčby warfarinem

První popis souvislosti variantního genotypu se zvýšeným rizikem krvácivých komplikací publikoval v časopise Lancet kolektiv Garuprasada Aithala již v roce 1999 (Aithal et al, 1999).

Jako nejvýznamnější farmakogenetický marker rizika závažného krvácení během léčby warfarinem je udáváno nosičství variantních alel *2 a *3 genu *CYP2C9*. Porovnání studií a přesné stanovení celkového rizika je však problematické, protože literární práce používají celou řadu klasifikací závažnosti krvácení, které se pak mohou lišit v zařazení konkrétní krvácivé komplikace do různých skupin (závažné x nezávažné). Nejčastěji je používána klasifikace podle Fihna et al (Fihn 1993), méně často vlastní klasifikace vytvořené pro danou studii a nejméně často, nyní však nejvíce akceptovaná, klasifikace podle Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (International Society for Thrombosis and Haemostasis, ISTH) (Schulman and Kearon 2005). Publikované odhady poměru rizika (hazard ratio, HR) pro závažné krvácení u nosiče variantních alel *CYP2C9* (*2 a *3) oproti wildtype genotypu (alela *1) se pohybují od 2,39 (95% CI, 1,18 - 4,86) (Higashi et al, 2002) do

3,18 (95% CI, 1,30 to 7,78) (Meckley et al, 2008). Metaanalýza Sandersona et al (Sanderson et al, 2005) udává relativní riziko (relative risk, RR) pro nosiče alely *2 jako 1,91 (95% CI, 1,16–3,17) a pro nosiče alely *3 jako 1,77 (95% CI, 1,07–2,91), pro nosiče jakékoliv variantní alely jako 2,26 (95% CI, 1,36–3,75).

U nezávažných krvácení (minor) nebyla nalezena spojitost z genotypem, jsou pravděpodobně významněji ovlivněna faktory zevního prostředí, jako např. drobná poranění (podkoží, sliznice). Studie, které by chtěly prokázat tento efekt jako častější ve spojitosti s variantním genotypem, by musely zřejmě mít o několik řádů větší velikost studovaného souboru (Higashi et al, 2002, Limdi et al, 2008, Meckley et al, 2008). Vzhledem k jejich relativní četnosti (asi 20 až 30% populace) jde o významný a dosud dosti klinicky přehlížený rizikový faktor pro léčbu warfarinem. Detailní přehled viz **tabulka 1.9.3**.

Tabulka 1.9.3: Riziko závažného krvácení při léčbě warfarinem podle individuálního genotypu - srovnání vybraných publikovaných dat. Použité definice krvácení: Meckley et al, Higashi et al - podle Fihn et al beze změny, Limdi et al upravená podle Fihn et al, kdy kategorie závažné, život ohrožující a fatální krvácení byly započteny do jedné kategorie (Fihn 1993); Margaglione et al vytvořil vlastní definici; Sanderson et al a Ogg et al neudali použitou definici.

| Studie | Celkový počet pacientů | Počet pacientů se závažným krvácením, pokud není udáno jinak | Průměrná délka sledování | Výsledek - riziko závažného krvácení podle genotypu | Riziko adjustováno podle těchto klinických parametrů |
|---|------------------------|--|-------------------------------------|--|---|
| Meckley et al. | 172 | 31 | 499,2 dnů | <i>CYP2C9</i> *2 nebo *3: HR 3,18 (1,3- 7,78) <i>VKORC1</i> : HR 1,21 (0,38- 3,82) | Indikace warfarinu, věk, pohlaví |
| Higashi et al. | 185 | 32 | 818 dnů, 414,49 pacientů -roků | <i>CYP2C9</i> *2 nebo *3: HR 2,39 (1,18- 4,86) | Všechny faktory nesignifikantní, nepoužita adjustace |
| Sanderson et al. (Meta-analýza prací Ogg et al, Margaglione et al, Higashi et al) | 598 | 134 | NA | <i>CYP2C9</i> *2: RR 1,91 (1,16-3,17) <i>CYP2C9</i> *3: RR 1,77 (1,07-2,91) <i>CYP2C9</i> *2,*3: RR 2,26 (1,36 -3,75) | NA |
| Margaglione et al. | 180 | 10 závažných 36 nezávažných | 18,7 krvácení na 100 pacientů -roků | <i>CYP2C9</i> *2,*3: OR 2,57 (1,16-5,73) | Věk, pohlaví, průměrné INR, počet kontrol u lékaře, počet konkomitantních léků |
| Ogg et al. | 233 | 92 | 6,8 roku | Neudáno | Nepoužita adjustace |
| Limdi et al. | 446 | 37 závažných 115 nezávažných | 2 roky, celkově 555 pacientů -roků | <i>CYP2C9</i> *2 nebo *3: všechny rasy: HR 3,0 (1,1-8,0) kavkazská: HR 3,9 (1,1-13,7) <i>VKORC1</i> : HR 1,7 (0,7-4,4) | Věk, pohlaví, rasa, BMI, příjem vit. K, alkohol, dávka warfarinu, konkomitantní léky, komorbidity, INR při krvácení |

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo zavést a ověřit klinickou využitelnost farmakogenetiky při léčbě warfarinem u pacientů s tromboembolickými komplikacemi v rutinní klinické praxi.

A to následujícím způsobem:

1) **Při zahájení léčby warfarinem:** Výpočtem denní dávky warfarinu podle farmakogenetických a klinických dat jednotlivých pacientů ještě před zahájením vlastní terapie

Selekce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu

- vytvoření první validační skupiny (skupina 1) pacientů stabilizovaných na warfarinu s detailními klinickými daty relevantními pro ovlivnění denní dávky warfarinu
- srovnání denní dávky warfarinu skutečně užívané jedinci první validační kohorty s denní dávkou predikovanou publikovanými farmakogenetickými algoritmy a selekce nejvhodnějšího farmakogenetického algoritmu pro první validační skupinu (českou populaci)

Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu

- vytvoření vlastního farmakogenetického algoritmu na podkladě klinických a genetických dat první validační skupiny
- validace námi vytvořeného farmakogenetického algoritmu a srovnání jeho přesnosti s publikovanými algoritmy na druhé validační skupině (skupina 2)

2) **Během již zavedené terapie warfarinem:** Stanovení vztahu individuálního genotypu a výskytu závažných krvácivých komplikací při léčbě warfarinem

- vytvoření skupiny pacientů se závažnými krvácivými komplikacemi (skupina 3) a kontrolní skupiny pacientů bez závažných krvácivých komplikací (skupina 4) s detailními klinickými daty relevantními pro výskyt krvácivých komplikací s následnou srovnávací analýzou významu jednotlivých rizikových faktorů krvácení

3 Popis použitých experimentálních metod včetně statistických

3.1 Soubor pacientů

Pro účely této práce byly vytvořeny postupně celkem čtyři částečně se překrývající skupiny pacientů:

- **skupina 1 = první validační skupina** pacientů stabilizovaných na warfarinu pro selekci optimálního publikovaného farmakogenetického algoritmu a pro tvorbu vlastního farmakogenetického algoritmu
- **skupina 2 = druhá validační skupina** pacientů stabilizovaných na warfarinu pro ověření přesnosti námi vytvořeného farmakogenetického algoritmu
- **skupina 3 = skupina pacientů se závažnými krvácivými komplikacemi** během léčby warfarinem
- **skupina 4 = kontrolní skupina pacientů bez závažných krvácivých komplikací** během léčby warfarinem pro stanovení rizika závažných krvácivých

3.1.1 Tvorba databáze klinických a genetických dat

Vzhledem k vysokému množství zadávaných parametrů (více než 150 parametrů pro individuálního pacienta) a trvale se navyšujícímu počtu subjektů v projektu farmakogenetiky warfarinu (aktuálně přes 2300 pacientů) jsme přistoupili k tvorbě komplexní databáze pro účely projektu. Mimo data potřebná pro cíle této práce (skupina 1 až 4) jsou v databázi obsažena datová pole pro potřeby dvou recentněji zahájených a teprve probíhajících projektů: 1) tvorba pokročilejšího farmakogenetického algoritmu se zahrnutím kvantifikovaných parametrů renálních (hladina kreatininu v séru), hepatálních (ALT, AST) a koagulačních (hladina koagulačních faktorů II, V, VII, VIII, IX, X, XI a proteinů C a S) a 2) Studie porovnávající nasazení warfarinu s a bez úvodní (loadovací) dávky podle farmakogenetického algoritmu.

Databáze byla vytvořena v programu Microsoft Access 2007 (Microsoft Corp., USA). Architektura databáze je tvořena pomocí jednotlivých vzájemně propojených polí, která jsou vyplňována odlišným způsobem pro jednotlivé kohorty pacientů zařazených do databáze - tabulka 3.1.1, obrázek 3.1.1.

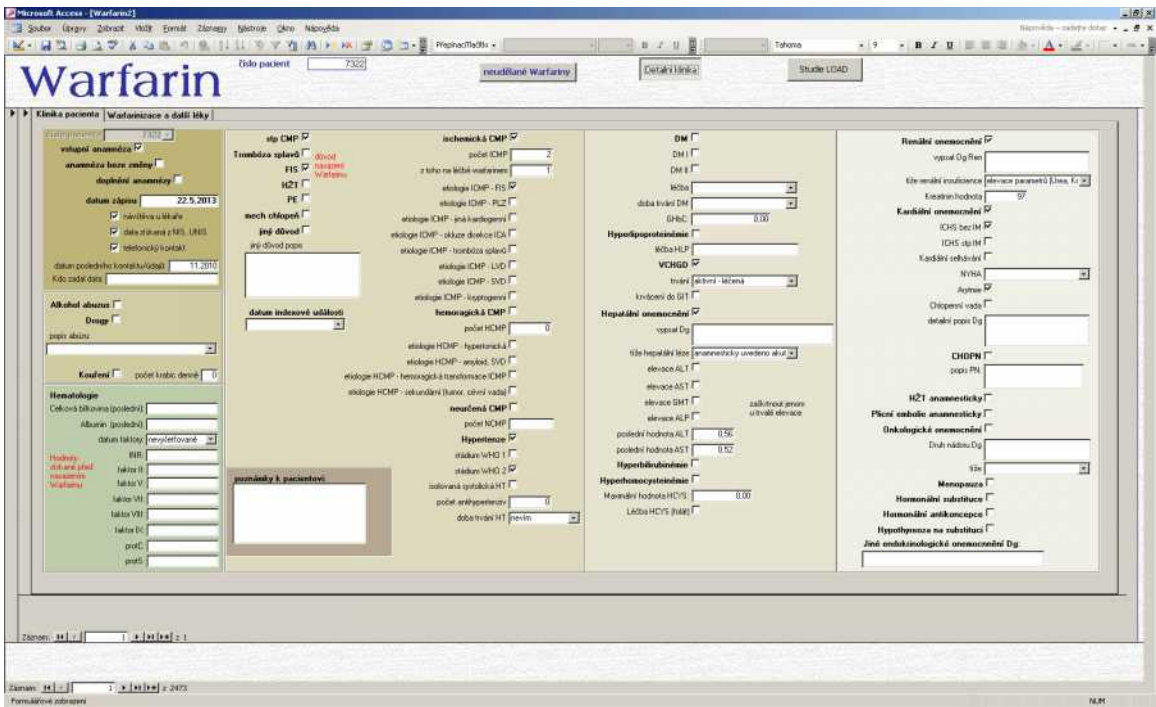
Tabulka 3.1.1: Databáze souboru - zadávaná data podle jednotlivých skupin řešených v projektu. 1 - první a druhá validační skupina (skupina 1 a 2 této práce); 2 - skupina se závažnými krvácivými komplikacemi a její kontrolní skupina (skupina 3 a 4 této práce); 3 - skupina pro tvorbu pokročilejšího FG algoritmu s

kvantifikovanými renálními, hepatálními a koagulačními parametry; 4- studie srovnávající nasazení warfarinu s a bez úvodní (loadovací) dávky podle FG algoritmu; 5 - rutinní diagnostický provoz.

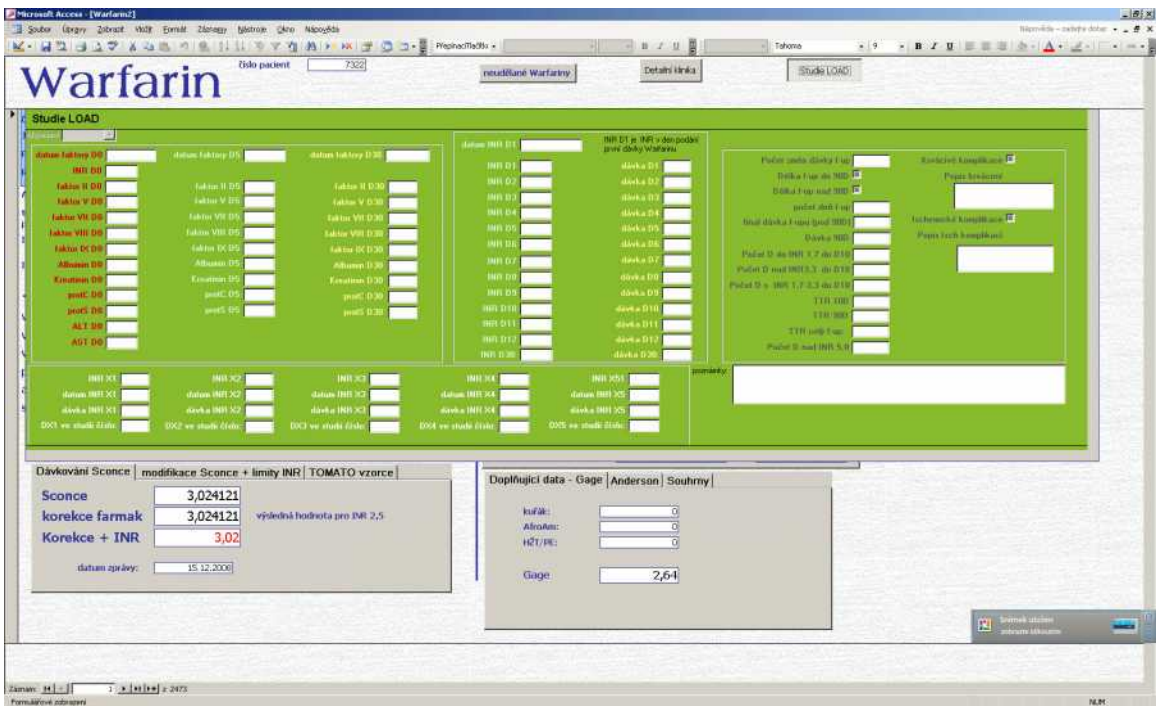
| Parametr | Obsah pole - vybraná data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| Identifikační data | Jméno, rč, věk, kontaktní údaje | ano | ano | ano | ano | ano |
| Data pro FG algoritmus výpočtu dávky | váha, výška, cílové INR, amiodaron, atorvastatin, indikace warfarinu | ano | ano | ano | ano | ano |
| Obecná anamnestická data | prodělaná onemocnění | ano | ano | ano | ano | ne |
| Konkomitanti medicína | preskripční, potravinové doplňky, alternativní preparáty | ano | ano | ano | ano | ne |
| Anamnéza léčby warfarinem | Výsledky INR, užívané dávky, změny dávky, komplikace léčby včetně krvácivých | ano | ano | ano | ano | ne |
| Výsledky koagulačních faktorů | nabírány před léčbou a 5. a 30. den léčby | ne | ne | ano | ano | ne |
| Další laboratorní parametry | žaturní, renální funkce během léčby, hladina albuminu | ne | ne | ano | ano | ne |
| Monitorace nasazení warfarinu | denní hodnoty INR a dávky v prvních 10 dnech, týdně v prvním měsíci, měsíčně do 90. dne léčby | ne | ne | ne | ano | ne |

Obrázek 3.1.1: Screenshotty databáze farmakogenetiky warfarinu.

Ukázka uživatelského prostředí databáze: A) Vstupní okno databáze se základními identifikačními údaji s možností prokliknutí do dalších částí databáze. Součástí je výsledek DNA vyšetření a výpočet dávky warfarinu podle několika algoritmů.



D) Ukázka části databáze s detailními daty o nasazení pacienta na warfarin - užité dávky warfarinu, denní výsledky INR a periodické kontroly koagulačních faktorů.



3.1.2 Nábor pacientů do souboru

Pacienti do souboru byli referováni majoritně z následujících klinických pracovišť: Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, Neurologické oddělení Oblastní nemocnice Kladno, a. s., Neurologické oddělení Oblastní nemocnice Chomutov, o. z. Krajská zdravotní, a. s., Kardiocentrum Nemocnice Na Homolce, Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce a Oddělení klinické hematologie FN Motol. Všichni pacienti byli plně informováni a vyjádřili písemný souhlas s vyšetřením DNA a se zařazením do projektu.

3.1.3 Sběr klinických dat

Klinická data pacientů byla do projektu získána následujícími postupy:

- cílené klinické vyšetření s vyplněním strukturovaného dotazníku během pravidelné kontroly ošetřujícím lékařem
- pravidelné telefonické kontroly ošetřujícím lékařem nebo vyškolenou zdravotní sestrou s periodicitou 1 roku s vyplněním strukturovaného dotazníku
- kontrolou zdravotnické dokumentace obsažené v nemocničním informačním systému u pacientů referovaných z FN Motol a Nemocnice Na Homolce

3.2 Metodika DNA diagnostiky

Během zavádění metodiky v letech 2007 až 2008 byla postupně vyzkoušena řada metodik detekce polymorfizmů významných pro stanovení denní dávky warfarinu - tj. alel *1, *2 a *3 genu *CYP2C9* a haplotypů A a B genu *VKORC1*. Iniciálně jsme použili pro detekci alel genu *CYP2C9* metodiku s využitím restriktáz *AvaII* a *NsiI* podle publikace Taubeho (Taube et al, 2000). Nicméně pro delší dobu trvání vyšetření - minimálně 24 hodin (podle doby příjmu vzorku běžně 2 pracovní dny), byla tato metodika nevhodná. Referující klinické pracoviště chce optimálně ihned (nebo do druhého dne) zahájit léčbu warfarinem a je nepraktické i neekonomické prodlužovat dobu hospitalizace pacienta pro čekání na výsledek vyšetření farmakogenetiky warfarinu. Pro praktickou aplikaci farmakogenetiky warfarinu je nezbytné dodat výsledek DNA analýzy co nejdříve, proto byly zvažovány modernější techniky DNA analýzy na bázi real-time PCR nebo High Resolution Melting (HRM) analýzy. Pro nižší ekonomickou náročnost byla vybrána HRM analýza.

3.2.1 Odběr vzorků a izolace DNA

Genomová DNA byla izolována ze standardního žilního náběru do EDTA (ethyldiaminotetraoctová kyselina) pomocí izolačního kitu (PUREGENE – Blood Kit, Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA).

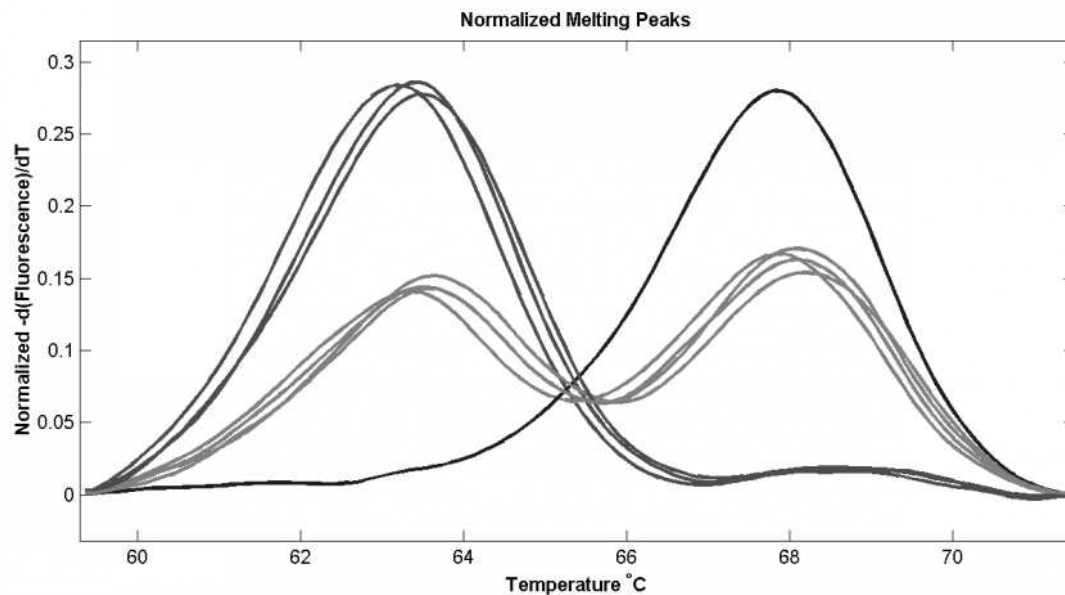
3.2.2 PCR amplifikace a High Resolution Melting analýza

High Resolution Melting analýza (HRM analýza, analýza křivek tání s vysokým rozlišením) je technika detekce nukleotidové změny PCR produktu založené na změně tvaru křivky tání (melting curve). HRM analýza využívá saturačního interkalačního fluorescenčního barviva, které vizualizuje dvojšroubovici DNA (double stranded DNA, dsDNA). Po denaturaci dsDNA dojde k uvolnění barviva a tím k poklesu fluorescenčního signálu. Obarvený produkt PCR reakce (dsDNA) je vystaven teplotnímu gradientu za snímání fluorescence, kdy je výsledná intenzita fluorescence PCR produktu vizualizována jako křivka tání, jejíž tvar závisí na vlastnostech analyzovaného vzorku - především na obsahu párů GC, na sekvenci a délce amplikonu.

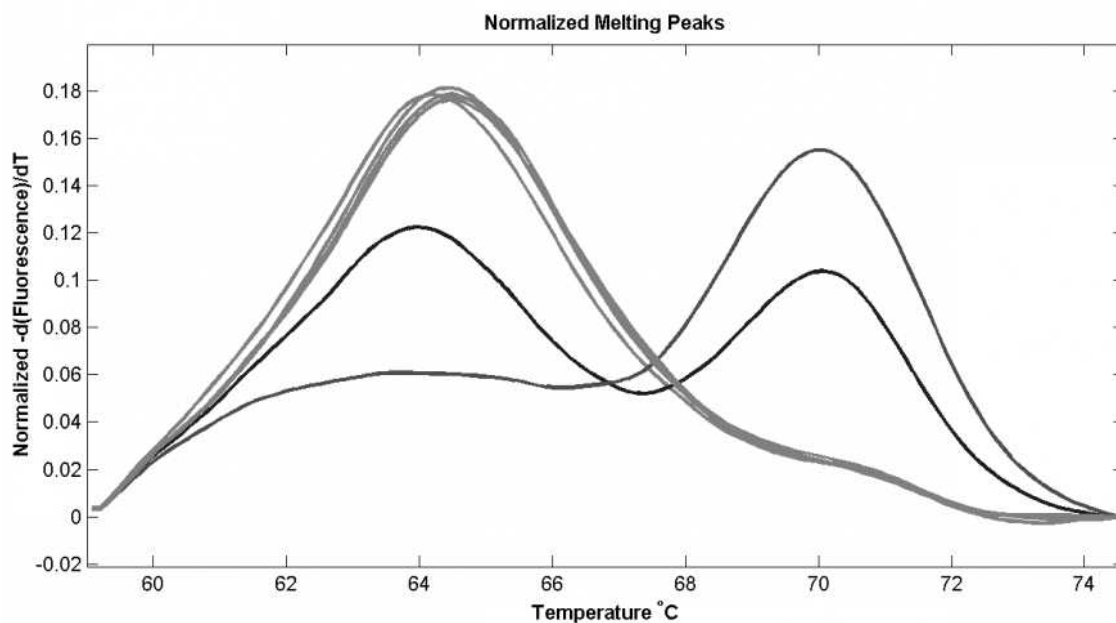
Genomová DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (MultiGene, Labnet International, Inc., New Jersey, USA) s využitím komerčně dostupného kitového master mixu (katalogové č. HRLS-ASY-0006, Idaho Technology Inc., Utah, USA) a komplementárního kitu pro detekci alel *2 a *3 genu *CYP2C9* a polymorfizmu G3673A (-1639-A>G) genu *VKORC1* (Kat. č. HRLS-ASY-007, HRLS-ASY-0010, HRLS-ASY-0011, Idaho Technology Inc., Utah, USA).

Ukázky výsledků HRM analýzy jsou uvedeny na obr. 3.2.1 až 3.2.3.

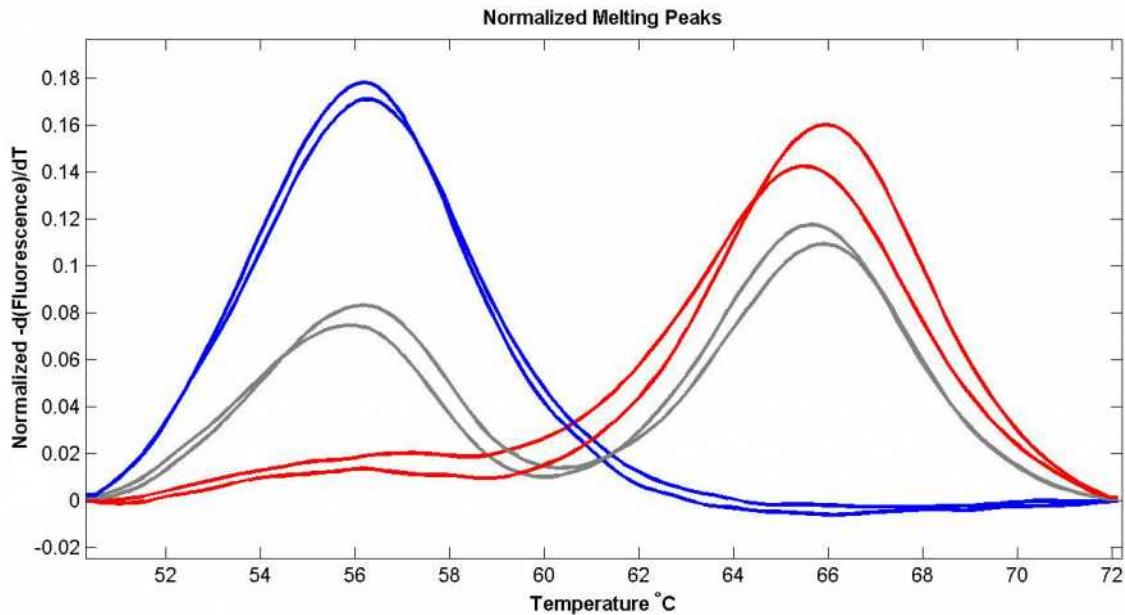
Obrázek 3.2.1. Genotypizace *CYP2C9*2* - grafická vizualizace křivek tání pomocí HRM analýzy systému LightScanner Idaho Tech, kdy červené křivky jsou pacienti bez přítomnosti *CYP2C9*2* alely (wt pro tuto alelu), šedá barva jsou heterozygoti *CYP2C9*1* nebo **3/*2* a modrá barva je homozygot *CYP2C9*2/*2*.



Obrázek 3.2.2: Genotypizace *CYP2C9*3* - grafická vizualizace křivek tání, kdy šedé křivky jsou pacienti bez přítomnosti *CYP2C9*3* alely (wt pro tuto alelu), modrá barva jsou heterozygoti *CYP2C9*1* nebo **2/*3* a červená barva je pacient s homozygotním genotypem *CYP2C9*3/*3*.



Obrázek 3.2.3: Genotypizace VKORC1 G3673A (historicky 1639 G>A), rs9923231 - grafická vizualizace křivek tání pomocí HRM analýzy systému LightScanner Idaho Tech, kdy šedé křivky jsou pacienti s haplotypem A/B, modré křivky jsou pacienti s haplotypem B/B a červená křivky jsou pacienti s A/A haplotypem.



3.3 Metodika farmakogenetického vyhodnocení

3.3.1 Zavedení farmakogenetického algoritmu

3.3.1.1 Selekce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu

3.3.1.1.1 Vstupní kritéria do prvního validačního souboru - skupina 1

V této první části projektu byla vytvořena počítačová databáze pro zadávání klinických dat pacientů. Klinické údaje (celkem více než 150 položek) zahrnovaly mj. věk, výšku, váhu, indikace léčby, komorbidity - např. hypertenze, DM, onkologická onemocnění, renální a hepatální onemocnění aj., souběžnou další medikaci, dotazník na příjem vitamínu K v potravě, veškeré údaje spojené s léčbou warfarinem - denní dávku, počet změn této dávky, výsledky INR. Klinická data byla získávána při pravidelných kontrolách, procházením nemocničních informačních

systemů a nebo strukturovaným telefonickým dotazníkem. Soubor pro vstupní analýzu čítal 1972 pacientů s provedenou DNA analýzou. Do souboru pro vlastní analýzu přesnosti algoritmů bylo zařazeno 280 pacientů s kompletními klinickými údaji, kteří navíc splňovali kritérium stability na léčbě. Stabilita byla definována jako léčba nejméně 90 dnů a zároveň poslední dva náběry INR v terapeutickém rozmezí (pro laboratorní chybu definováno jako 1,8 až 3,2) v odstupě nejméně 30 dnů na stejné denní dávce warfarinu. Do souboru byla dána vstupní podmínka etnického původu pacientů - hodnocená samotným pacientem, zařazení byli pouze pacienti kavkazského původu. Jiná selekce nebyla uplatněna.

3.3.1.1.2 Porovnávání farmakogenetické algoritmy

Volba mezi nám dostupnými publikovanými farmakogenetickými algoritmy (celkem 16 algoritmů) byla učiněna na základě jejich publikované přesnosti na daném validačním souboru (co nejvyšší hodnota R^2) a také podle etnicity validačního souboru, kdy pro významnou odlišnost mezi jednotlivými etniky, byly vybrány jen algoritmy pro populaci kavkazského typu (více viz výše, kapitola 1.9.1). Pro porovnání přesnosti byly zvoleny tři následující algoritmy využívající pouze vstupní data dostupná ještě před zahájením vlastní warfarinizace:

3.3.1.1.2.1 Podle Sconceové (Sconce et al, 2005):

Denní dávka, mg = $(0,628 - (0,0135 * [\text{věk, roky}]) - (0,24 * [\text{CYP2C9}^*2, \text{počet alel 0-2}]) - (0,37 * [\text{CYP2C9}^*3, \text{počet alel 0-2}]) - (0,241 * [\text{VKORC}, 1-3 \text{ podle haplotypu}]) + (0,0162 * [\text{výška, cm}]))$

3.3.1.1.2.2 Podle Gage (Gage et al, 2008):

Denní dávka, mg = $\exp (0,9751 - 0,3238 * [\text{VKORC}, \text{haplotyp 0-2 podle haplotypu}] + 0,4317 * [\text{povrch těla, m}^2] - 0,4008 * [\text{CYP2C9}^*3, \text{počet alel 0-2}] - 0,00745 * \text{věk} [\text{roky}] - 0,2066 * [\text{CYP2C9}^*2, \text{počet alel 0-2}] + 0,2029 * \text{cílové INR} - 0,2538 * [\text{amiodaron, 0 nebo 1}] + 0,0922 * [\text{kouření, 0 nebo 1}] - 0,0901 * [\text{afroamerická rasa, 0 nebo 1}] + 0,0644 * [\text{hluboká žilní trombóza/plicní embolie, 0 nebo 1}])$

3.3.1.1.2.3 Podle Andersona (Anderson et al, 2007):

Týdenní dávka, mg = $1,64 * \exp [3,984 + CYP2C9*1/*2 * (-0.197) + CYP2C9*1/*3 * (-0.360) + CYP2C9*2/*3 * (-0.947) + CYP2C9*2/*2 * (-0.265) + CYP2C9*3/*3 * (-1.892) + VKORC1-CT * (-0.304) + VKORC1-TT * (-0.569) + \text{věk, roky} * (-0.009) + \text{mužské pohlaví} (0.094) + \text{váha, kg} (0.003)]$

3.3.1.1.3 Statistická metodika porovnání publikovaných algoritmů

Vlastní porovnání algoritmů jsme provedli následujícími způsoby:

- 1) lineární regresní analýzu s výpočtem koeficientu determinace (R^2) mezi hodnotami dávky warfarinu skutečně užívanými a vypočtenými jednotlivými algoritmy;
- 2) porovnáním počtu pacientů s odchylkou dávky skutečně užívané a predikované algoritmem, která byla menší nebo větší než 20% užívané dávky s využitím McNemarovy modifikace chi-kvadrát testu s výpočtem poměru šancí (OR, odds ratio) jednotlivých pacientů na přítomnost jejich predikované hodnoty v takto definovaných pásmech. V případě odchylky mimo pásma nás zajímal poměr pacientů poddávkových či předávkových podle algoritmu;
- 3) porovnáním přítomnosti skutečně užívané dávky v pásmu predikovaném na základě výpočtu pro dávku warfarinu pro INR rozmezí 1,8 až 3,2 (porovnání viz bod 2). Toto pásmo uvádíme i v klinické praxi pro lékaře používající farmakogenetických algoritmů k nasazení warfarinu a jeho výpočet je založen na korekci podle Gage et al (Gage et al, 2008).
- 4) Mimo porovnání pro celý soubor jsme provedli dále arbitrárně definované podskupinové analýzy přesnosti jednotlivých algoritmů pro pacienty s obecně obtížnou warfarinizací v klinické praxi - do 40 let věku, starší 80 let, lehčích než 60 kg a těžších než 100 kg a pro skupiny pacientů s atypicky nízkou a vysokou dávkou warfarinu (<2,5 mg a >10mg denně).

Všechny dávky byly porovnávány na základě vypočtené denní dávky - u pacientů užívajících nestejnou denní dávku a v případě Andersonova algoritmu, kdy

je vypočtena týdenní dávka, to byla průměrná denní dávka. Pro adekvátní srovnání mezi algoritmy byly upraveny algoritmy podle Sconceové a Andersona podle výsledků Gage et al (Gage et al, 2004) o korekci pro dopočet cílového INR, které je jinak těmito vzorci počítáno pro INR 2,5. Pokud však pacient má jiné cílové INR (např. při mechanické chlopenní náhradě), byl výpočet navýšen o 11% dávky pro vzestup INR o 0,5 podle Gage et al (Gage et al, 2008). Statistické analýzy byly provedeny v softwaru GraphPad Prism, v.6.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) a SPSS Statistics, v.18.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA).

3.3.1.2 Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu

3.3.1.2.1 Soubor pacientů pro tvorbu a validaci vlastního algoritmu

Pro vytvoření vlastního farmakogenetického algoritmu byla využita vícečetná lineární regresní analýza klinických a genetických dat pacientů ze skupiny 1 (charakteristika sbíraných dat viz výše, bod 3.2.1.1.1). Pro zpřesnění výpočtu jsme zvolili věkovou hranici nad 50 let. Důvodem je předpokládaný pokles dávky v závislosti s věkem nad 50 let, nikoliv u mladších pacientů, a tak toto omezení může paradoxně zvýšit přesnost i pro mladší věkové skupiny. Dále jsme zahrnuli vědomě více pacientů se 4 variantními alelami než je jejich populační frekvence, opět pro zvýšení přesnosti predikce pro tyto nežádoucími účinky nejvíce ohrožené pacienty. Pro validaci byla využita skupina 2 (druhá validační skupina). Vstupním kritériem do této skupiny byla kompletní klinická data, a stabilní léčba warfarinem (kritéria viz výše). Skupina 2 neobsahoval stejné pacienty jako skupina 1. Při tvorbě farmakogenetického algoritmu není standardní výpočet velikosti vzorku. Jako dostatečný byl odhadnut počet minimálně 150 pacientů, kdy důležitější než jejich počet, je co nejvyšší přesnost ve vstupních klinických údajích (přesná váha, opravdu stabilní dávka, atp.), proto byli pacienti individuálně posouzeni a selektováni stran validity dat - druhou následnou kontrolou databázových údajů, pomocí osobních kontrol lékařem, kontrolou dokumentace a telefonními pohovory.

3.3.1.2.2 Tvorba regresního modelu

Model byl tvořen s využitím hierarchické vícečetné lineární regresní analýzy. Hierarchický postup oproti standardní vícečetné lineární regresi umožňuje postupně přidávat jednotlivé nezávislé proměnné a posuzovat tak jejich vliv na výslednou přesnost modelu individuálně.

Do statistické analýzy jsme zahrnuli následující vstupní parametry:

- 1) Genetická charakteristika pacienta - počet variantních alel 2 a 3 genu *CYP2C9*, haplotyp genu *VKORC1* (*A/A*, *A/B*, *B/B*)
- 2) Obecné charakteristiky pacienta - pohlaví, věk, váha, výška
- 3) Anamnestické údaje pacienta - indikace warfarinu, přítomnost relevantních onemocnění (ischemická cévní mozková příhoda, ischemická choroba srdeční, diabetes mellitus, hypertenze, renální onemocnění, hepatální onemocnění, prodělaná hluboká žilní trombóza a/nebo plicní embolizace), pravidelné kouření a pití alkoholu denně
- 4) Konkomitantní chronicky užívaná medikace ovlivňující dávku warfarinu (amiodaron, statiny - zejména simvastatin, atorvastatin, rosuvastatin, karbamazepin, fenytoin, sartany - losartan, irbesartan, valsartan, telmisartan, spironolakton, sulodexid, furosemid, deriváty sulfonylurey, hydrochlorthiazid, kortikoidy - prednison).

Pro testování v hierarchickém gardu byly do jednotlivých fází modelu postupně přiřazovány proměnné, které v univariální analýze dosáhly statistické významnosti $p > 0,1$.

3.3.1.2.3 Testování vytvořeného regresního modelu

Vytvořený model byl standardně testován na splnění statistických předpokladů platnosti modelu. Všechny vstupní nezávislé proměnné byly testovány na přítomnost lineární závislosti na závislé proměnné (skutečně užívaná denní dávka warfarinu). Výsledný model byl testován na vzájemnou nezávislost reziduí v modelu testem podle Durbina a Watsona. Jednotlivé případy predikce (individuálních pacientů) podle definitivního modelu byly testovány na přítomnost

outlierů (casewise diagnostics), kdy jako outlier byl označen pacient se standardizovaným reziduem vyšším než ± 3 směrodatné odchylky (SD). Rezidua vytvořeného modelu byla posouzena na přítomnost homoskedasticity a jejich normality. Všechny analýzy byly provedeny s využitím statistického softwaru SPSS Statistics, v.18.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA).

Vytvořený algoritmus pak byl validován na skupině pacientů č. 2., včetně porovnání s publikovanými algoritmy podle metodiky uvedené výše v bodu 3.2.1.1.3. Navíc byl doplněn Bland-Altmanův graf, který byl vytvořen v programu GraphPad Prism v. 6.0 (GraphPad Software, Inc., USA).

3.3.2 Posouzení vztahu genotypu a krvácivých komplikací při léčbě warfarinem

3.3.2.1 Základní parametry provedené studie

3.3.2.1.1 Hypotéza

Je mezi pacienty léčenými warfarinem s krvácivými komplikacemi častější variantní genotyp (alely *2 a *3 genu *CYP2C9*, haplotyp A/A genu *VKORC1*) než u pacientů bez krvácivých komplikací?

3.3.2.1.2 Design studie

Prospektivní, srovnávající dvě kohorty pacientů - skupina 3 (soubor se závažnými krvácivými komplikacemi) se skupinou 4 (soubor kontrol bez závažných krvácivých komplikací).

3.3.2.1.3 Konečné cíle studie

3.3.2.1.3.1 Primární konečný cíl

Závažné krvácení během léčby warfarinem u pacientů s rizikovým genotypem pro léčbu warfarinem proti pacientům s wild-type genotypem genů *CYP2C9* a *VKORC1*.

3.3.2.1.3.2 Sekundární cíle a plánované podskupiny

Závažné krvácení během léčby warfarinem hodnocené zvlášť během úvodní a udržovací fáze léčby warfarinem. Riziko bude stanoveno pro celou dobu sledování,

fázi nasazení warfarinu a udržovací léčbu warfarinem. Zvláště budou hodnoceny rizika jednotlivých genotypových subsetů pacientů - a to: genotypy *CYP2C9* *1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3, pacienti s alelou *2, *3, pacienti s alelou *2 nebo *3 (variantní genotyp *CYP2C9*), haplotypy *VKORC1* A/A, A/B a B/B, dále pacienti podle počtu variantních alel v obou genech dohromady: 0 až 4 variantní alely. V případě variantních alel v obou vyšetřovaných genech pak podle jejich jednotlivého poměru v jednotlivých genech

3.3.2.2 Soubor pacientů

3.3.2.2.1 Vstupní a výstupní kritéria pro skupinu 3 a 4

Do studie byli zařazeni pacienti s kompletními klinickými i genetickými údaji starší 18 let, kteří s tímto informovaně souhlasili. Do kontrolní skupiny byli zařazeni pouze pacienti léčení warfarinem déle než 12 měsíců. Důvodem bylo odstranění možného biasu stran celkového rizika krvácení i jiné etiologie, kdy doba více než 1 roku léčby námi byla považována za dostatečnou k "demaskování" zvýšeného sklonu ke krvácivým komplikacím. Do skupiny se závažným krvácením byli zařazeni pacienti bez ohledu na délku léčby. Vylučovací kritéria pro účast ve studii byla stanovena jako odmítnutí účasti ve studii, nekompletní klinická nebo laboratorní data a v případě pacientů z kohorty krvácivých komplikací jiná než spontánní etiologie krvácení (více viz dále bod 3.3.2.3.2.)

3.3.2.3 Definice a zpracování klinických dat

3.3.2.3.1 Zpracování klinických dat

Klinická data byla získána přímo od pacientů během plánovaných kontrol ošetřujícím lékařem, ze zdravotnické dokumentace z ambulantních kontrol i hospitalizací a pravidelnými telefonickými kontrolami s využitím cíleně zaměřeného strukturovaného dotazníku. Zvláštní důraz byl veden na známé rizikové faktory krvácení - jako např. nekontrolovaná hypertenze, anamnéza cerebrovaskulárních onemocnění - zejména postižení malých mozkových tepen charakteru leukoaraiózy, renální a hepatální postižení, současné užívání jiných léků zvyšujících riziko krvácení (nesteroidní antirevmatika, antiagregancia aj.) a polypragmázie

(definována jako užívání tří a více jiných léčiv současně mimo warfarin). Součástí sledovaných parametrů byl i odhad compliance s léčbou - subjektivní sebehodnocení pacienta i jeho částečná objektivizace zjištěním frekvence kontrol INR. Dále byly hodnoceny známé parametry léčby vedoucí ke zvýšenému riziku krvácení - výskyt hodnot INR > 4,5 a nestabilita léčby (definována jako ≥ 2 změna dávky warfarinu během posledních dvou po sobě jdoucích kontrol v odstupu nejméně 4 týdnů) (Levine et al, 2004, Lindh et al, 2008).

3.3.2.3.2 Krvácení a délka sledování

Jako primární konečný cíl byl stanoven výskyt závažného krvácení při léčbě warfarinem. V literárních pramenech zabývajících se krvácivými komplikacemi během léčby warfarinem není jednoznačná shoda na jedné definici závažného krvácení. Historicky byla použita řada méně či více odlišných definic, což značně zesložituje přímé srovnání výsledků jednotlivých souborů stran výskytu závažných krvácivých komplikací (viz výše, kapitola 1.9.2). Vzhledem k srovnatelnosti s dalšími pracemi jsme zvolili mezinárodně uznanou a deklamovanou klasifikaci podle Mezinárodní společnosti pro trombózu a hemostázu (International Society on Thrombosis and Haemostasis, ISTH), která klasifikuje jako závažná krvácení vedoucí k úmrtí pacienta, krvácení do kriticky důležitého orgánu nebo oblasti (intrakraniální, intraspinální, intraokulární, retroperitoneální, intraartikulární, perikardiální nebo intramuskulární s kompartmentovým syndromem) a/nebo krvácení s poklesem hemoglobinu o více jak 20g/l (1,24 mmol/l) nebo s nutností aplikace 2 a více transfuzních jednotek erymasy nebo celé krve (Schulman and Kearon 2005). Příhody, které nesplnily kritéria ISTH byly zadány jako nevýznamné (minor).

Všechny krvácivé události byly posouzeny při jejich zadávání a následně ještě podruhé při závěrečném zpracování dat na přímý kauzální vztah s léčbou warfarinem. Všechny krvácivé epizody s jasným traumatickým mechanismem vzniku nebyly zařazeny do souboru - např. akutní subdurální hematom bezprostředně po dopravní nehodě s poraněním hlavy. Krvácivé epizody, kde byla pouze nevýznamná klinická suspekce na traumatický mechanismus - např.

subakutní subdurální hematom s klinickými projevy v odstupu týdnů po nevýznamném úderu do hlavy, byly ponechány v souboru pro finální analýzu.

Čas sledování byl zaznamenáván v týdnech od první dávky do vzniku krvácení, celý čas sledování souboru byl udáván v měsících. Nikdo z pacientů po závažném krvácení v naší kohortě nepokračoval po vzniku závažného krvácení v léčbě warfarinem, nebyla tedy nutnost řešit tento jev v záznamu délky sledování.

3.3.2.3.3 Definované genotypy pro analýzu rizika krvácení

Vzhledem k publikovaným pracím, které tuto problematiku řešili před naší skupinou, jsme zvolili nejprve používaný zjednodušující pohled na pacienty s variantním genotypem genu *CYP2C9*, a to: pacienti s alelou *2, alelou *3 a pacienti s alelou *2 nebo *3 a pacienti s haplotypy *A/A*, *A/B* a *B/B* genu *VKORC1*. Vzhledem k velikosti souboru a relativně velkému počtu možných kombinací jednotlivých alel *CYP2C9* a haplotypů *VKORC1* - celkem 18 možností, jsme navrhli jako možné zjednodušení hodnocení pacientů podle celkového počtu variantních alel/haplotypů v obou genech současně, t.j. pacienti s žádnou až čtyřmi variantními alelami (0 - 4 VA). Pro úplnost jsme (i přes nižší počet pacientů s některými genotypy) vyhodnotili i všechny jednotlivé genotypové kombinace v genu *CYP2C9* *1/*1, *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3 a *3/*3. Kombinace genotypu v obou genech - tj. 18 podskupin - nebyly již pro malé až žádné zastoupení v našem souboru hodnoceny.

3.3.2.4 Statistická metodika

3.3.2.4.1 Velikost souboru

Odhad velikosti souboru byl proveden na základě grafického nomogramu publikovaného Altmanem (Altman 1991). Aproximace prevalence závažného krvácení podle genotypu vychází z odhadu populační frekvence nejrizikovějšího možného genotypu (3 nebo 4 rizikové alely genů *VKORC1* a *CYP2C9*), který má ve své širší definici cca 1 z 10, tj. 10% populace. Odhad častějšího výskytu krvácení u pacientů s rizikovými polymorfizmy se opírá o první práci Aithala a kolektivu (Aithal et al, 1999). Malá, i když dobře zpracovaná studie, kde nositelé *CYP2C9**2 a *3

(rizikovní) měli roční riziko závažného krvácení 8,28% a běžná populace (homozygoti *CYP2C9*1*) měla roční riziko závažného krvácení jen 2,25%, tj. platí 3,68x vyšší riziko krvácení při rizikovém genotypu.

3.3.2.4.1.1 Pesimistický odhad

Prevalence rizikového genotypu v kontrolní populaci: 10%

Předpokládaná prevalence rizikového genotypu v populaci s krvácením: 20%

Tzn. standardizovaný rozdíl je 0,28

Pak při $\alpha(p)=0.05$ a $\text{power}=0,80$: 350 tj. 175 krvácení a 175 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.01$ a $\text{power}=0,80$: 575 tj. 282 krvácení a 283 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.05$ a $\text{power}=0,90$: 500 tj. 250 krvácení a 250 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.01$ a $\text{power}=0,90$: 700 tj. 350 krvácení a 350 kontrol.

3.3.2.4.1.2 Optimistický odhad

Prevalence rizikového genotypu v kontrolní populaci: 10%

Předpokládaná prevalence rizikového genotypu v populaci s krvácením: 35%

Tzn. standardizovaný rozdíl je 0,5987, zaokrouhлено na 0.6

Pak při $\alpha(p)=0.05$ a $\text{power}=0,80$: 80 tj. 40 krvácení a 40 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.01$ a $\text{power}=0,80$: 120 tj. 60 krvácení a 60 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.05$ a $\text{power}=0,90$: 110 tj. 55 krvácení a 55 kontrol,

Pak při $\alpha(p)=0.01$ a $\text{power}=0,90$: 160 tj. 80 krvácení a 80 kontrol.

3.3.2.4.1.3 Výsledná velikost vzorku

Pro dosažení statisticky významného výsledku se minimální velikost vzorku pohybuje mezi 40 a 175 pacienty se závažnými krvácivými komplikacemi a stejně tak velkého souboru kontrol. Po dosažení náboru 40 pacientů se závažnými krvácivými komplikacemi bude provedena průběžná analýza - včetně výpočtu poměru rizik podle Coxe a bude zhodnoceno další pokračování studie.

3.3.2.4.2 Porovnání souboru se závažným krvácením a souboru kontrol

Pro porovnání mezi skupinou s krvácením a skupinou kontrol byl u kategorických proměnných použit χ^2 test nebo Fisherův exaktní test, pro spojité proměnné byl použit Mann-Whitneyho U test.

3.3.2.4.3 Coxův model poměrných rizik

Pro zjištění možné míry asociace mezi genotypem *CYP2C9* a *VKORC1*, jednotlivými klinickými charakteristikami pacientů souboru a výsledným stavem - tj. závažným krvácením - byl použit Coxův model poměrných rizik (Cox proportional hazards model). Byl vypočten poměr rizik (hazard ratio, HR) s 95% konfidenčními intervaly (95% CI) a to bez úpravy (unadjusted HR) i s úpravou na možné další proměnné (adjusted HR). Pro možnou nestabilitu výsledného vypočteného poměru rizik (HR) nebyly zařazeny všechny možné proměnné do upraveného výsledného Coxova regresního modelu. Selektce vhodných proměnných do výsledného modelu byla provedena pomocí algoritmu zpětné selekční eliminace (backward stepwise elimination algorithm). Na podkladě testu věrohodnostním poměrem (likelihood-ratio test) byly minimalizovány exkluze proměnných s vlivem na výsledný poměr rizik. Proměnné s hodnotou $p \leq 0.1$ při univariátní analýze byly použity pro eliminační algoritmus. Test dobré shody modelu (goodness of fit) pro výsledný Coxův model proporčních rizik byl proveden podle Grønnesbyho a Borgana (Grønnesby and Borgan 1996), kdy počet testovaných podskupin podle rizika (risk groups number) byl odhadnut podle Mayové a Hosmera (May and Hosmer 2004). Srovnání obou skupin (s a bez krvácení) bylo provedeno graficky vytvořením Kaplan-Meierových grafů přežití (v našem případě závažného krvácení) s adekvátním výpočtem log-rank statistiky. K posouzení pravdivosti odhadu všech definitivních modelů byly vypočteny Schoenfeldovy reziduály.

Pro účely definitivní analýzy byly vypočteny Coxovými modely jednotlivé poměry rizik pro vznik závažného krvácení HR (upravená i neupravená na další proměnné) pro různé časové intervaly: celý čas sledování a dále pro čas odpovídající fázi zahájení léčby a pro již definitivní udržovací léčbu. Za čas

zahajovací fáze je většinou arbitrárně v literatuře považováno období prvních 3 měsíců, léčba udržovací je pak definována jako léčba po 3 měsících. Abychom se vyhnuli možnému ovlivnění přesnosti výsledku (bias) výskytu závažných krvácení pro čas celého sledování (a zejména pro fázi udržovací léčby po 3 měsících), zařadili jsme do kontrolní skupiny jen pacienty s dobou sledování bez krvácivých komplikací delší než 12 měsíců. Tento čas byl námi vyhodnocen jako dostatečný i s ohledem na možný popisovaný vyšší výskyt krvácivých komplikací během prvních měsíců léčby - a tedy i dostatečný čas k manifestaci krvácivých komplikací. Pro analýzu poměru rizik (HR) závažného krvácení v první zahajovací fázi léčby (do 3 měsíců) byli pacienti s krvácením až po 3 měsíce použiti jako kontrolní skupina.

Všechny statistické analýzy byly provedeny na řádně licencovaném softwaru SPSS Statistics 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA) a STATA version 12.1 (StataCorp LP, College Station, TX, USA).

3.4 Financování projektu

Potřebnými vstupy do projektu byla v zásadě pouze DNA analýza ve fázi zavádění a validace metodiky. Vyšetření pacientů pro tyto účely bylo v letech 2009 až 2011 podpořeno grantem rezortního programu TIP Ministerstva průmyslu a obchodu ČR č. FR-TI 1/399: „Vývoj farmakogenetického diagnostického kitu pro určení dávky warfarinu“ uděleného firmě GeneProof, a. s. jehož spoluřešitelem byla Nemocnice Na Homolce. Po ukončení podpory projektu byla již vyšetření pacientů prováděna ve standardním režimu klinického molekulárně genetického vyšetření hrazeného v rámci zdravotního pojištění. Všechny ostatní činnosti - poskytnutí biologických vzorků a klinických dat pacienty, sběr dat referujícími lékaři i vyhodnocení souboru - byly nehonorované.

4 Přehled dosažených, náležitě dokumentovaných a adekvátně statisticky zhodnocených vlastních výsledků

4.1 *CYP2C9* a *VKORC1* v české populaci

Rozložení genotypů *CYP2C9* a haplotypů *VKORC1* v české populaci získané analýzou 1972 pacientů je uvedeno v tabulce 4.1.1.

V genu *CYP2C9* je nejčastější nosičství alely *1 v homozygotní formě (67,6%), které odpovídá standardní metabolizaci warfarinu. Variantní alely *2 a *3 (se sníženou schopností metabolizovat warfarin) jsou nejčastější v heterozygotní formě jako *1/*2 (17,8%) a *1/*3 (11,7%). Homozygoti pro variantní alely genu *CYP2C9* (*2/*2, *2/*3 a *3/*3) jsou zastoupeni jen v 3,4%. Nejčastějším haplotypem genu *VKORC1* je v české populaci haplotyp *A/B*, který nese 44,7% populace s intermediární citlivostí na warfarin. Druhým nejčastějším je haplotyp *B/B* (41,9%), který je zodpovědný za sníženou citlivost na warfarin. Haplotyp *A/A* je zastoupen ve 14% a je spojený s vyšší citlivostí na podaný warfarin.

Klíčovým údajem je dále individuální kombinace variant obou genů, kterou můžeme vyjádřit počtem variantních alel (VA) od žádné do čtyř. Standardní očekávatelnou dávku warfarinu mají pacienti s žádnou nebo jednou variantní alelou, kterých je v české populaci 29,2% (0 VA) a 41,5% (1 VA).

Tabulka 4.1.1: Rozložení jednotlivých genotypů *CYP2C9* a haplotypů *VKORC1* v kompletní geneticky vyšetřené skupině (n = 1972). Počet variantních alel (VA) odlišen barevně - fialová = 0 VA, modrá = 1 VA, zelená = 2 VA, žlutá = 3 VA, červená = 4 VA.

| <i>CYP2C9</i> genotyp | <i>VKORC1</i> B/B | <i>VKORC1</i> A/B | <i>VKORC1</i> A/A | celkem |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| *1/*1 | 572 (29,2%) | 586 (29,9%) | 167 (8,5%) | 1325 (67,6%) |
| *1/*2 | 135 (6,9%) | 154 (7,9%) | 60 (3,1%) | 349 (17,8%) |
| *1/*3 | 92 (4,7%) | 102 (5,2%) | 36 (1,8%) | 230 (11,7%) |
| *2/*2 | 1 (0,05%) | 14 (0,7%) | 1 (0,05%) | 16 (0,8%) |
| *2/*3 | 20 (1,0%) | 13 (0,7%) | 7 (0,4%) | 40 (2,0%) |
| *3/*3 | 1 (0,05%) | 8 (0,4%) | 3 (0,2%) | 12 (0,6%) |
| Celkem | 821 (41,9%) | 877 (44,7%) | 274 (14,0%) | 1972 (100%) |

Tabulka 4.1.2: Počet pacientů s kompletními genetickými i klinickými daty v souboru pro porovnání farmakogenetických algoritmů a jejich genotyp *CYP2C9* a haplotyp *VKORC1* (n = 280). Počet variantních alel (VA) odlišen barevně - fialová = 0 VA, modrá = 1 VA, zelená = 2 VA, žlutá = 3 VA, červená = 4 VA.

| <i>CYP2C9</i> genotyp | <i>VKORC1</i> B/B | <i>VKORC1</i> A/B | <i>VKORC1</i> A/A | celkem |
|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| *1/*1 | 78 (27,9%) | 96 (34,3%) | 23 (8,2%) | 197 (70,3%) |
| *1/*2 | 19 (6,8%) | 17 (6,1%) | 13 (4,6%) | 49 (17,5%) |
| *1/*3 | 12 (4,3%) | 9 (3,2%) | 5 (1,8%) | 26 (9,3%) |
| *2/*2 | 0 | 1 (0,4%) | 0 | 1 (0,4%) |
| *2/*3 | 5 (1,8%) | 2 (0,7%) | 0 | 7 (2,5%) |
| *3/*3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Celkem | 114 (40,7%) | 125 (44,6%) | 41 (14,6%) | 280 (100%) |

4.2 Selekce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu

4.2.1 Klinické parametry souboru pro selekci farmakogenetického algoritmu

V naší skupině 280 pacientů se stabilní dávkou (skupina 1) užívali pacienti bez variantního genotypu průměrně $6,7 \pm 0,3$ mg warfarinu denně, pacienti s 1 VA užívali $4,9 \pm 0,2$ mg denně. Nižší než obvyklou denní dávku užívali pacienti s 2 VA ($3,8 \pm 0,3$ mg) a 3 VA ($2,9 \pm 0,3$ mg). V naší populační skupině ($n = 1972$) bylo 22,7% pacientů s 2 VA, 6,7% s 3 VA a pouze 0,65% se 4 VA. Žádný pacient se 4 VA nebyl zařazen do první validační skupiny (skupina 1) pro porovnání algoritmů, ale jejich obvyklá denní dávka warfarinu se podle našich zkušeností pohybuje kolem 1 mg denně (viz tabulka č. 4.1.1. a 4.1.2).

Detailní klinické charakteristiky pacientů první validační skupiny (skupina 1) jsou uvedeny v tabulce č. 4.2.1. Hlavním parametrem porovnání přesnosti predikce je hodnota koeficientu determinace R^2 , kde nejvyšší přesnosti dosáhl algoritmus podle Sconceové (58,4%). Oba zbylé algoritmy měly jasně nižší přesnost predikce - podle Andersona 21,9% a podle Gage 23,8% (viz tabulka 4.2.2). Druhým parametrem srovnání byla přítomnost algoritmem predikované dávky v pásmu vymezeném $\pm 20\%$ skutečně užívané denní dávky. Nejpřesnější algoritmus podle Sconceové správně predikoval u 168 (60,0%) pacientů. Předávkováno by bylo 71 (25,4%) pacientů, tj. vypočtená dávka byla větší než skutečně užívaná. Průměrná chyba byla $1,53 \pm 0,83$ mg, chyba do 2 mg byla u 87,5% předávkovaných. Genotyp předávkovaných pacientů byl následující: 0 VA 15 (21,1%), 1 VA 31 (43,7%), 2 VA 18 (25,4%) a 3VA 7 (9,9%). Poddávkováno (vypočtená dávka nižší než skutečně užívaná) bylo 41 (14,6%) pacientů, a to průměrně $2,79 \pm 2,18$ mg. U 46,3% poddávkovaných byla chyba do 2 mg. Genotyp poddávkovaných pacientů byl: 0 VA 15 (36,6%), 1 VA 15 (36,6%), 2 VA 8 (19,5%) a 3 VA 3 (7,3%). Algoritmus podle Andersona správně předpověděl dávku u 91 (32,5%) pacientů, předávkoval 152 (54,3%) pacientů, a to o průměrných $2,3 \pm 0,99$ mg. U 45,4% předávkovaných pacientů byla chyba do 2 mg. Poddávkováno bylo 37 (13,2%) pacientů o průměrných $3,4 \pm 2,5$ mg, z toho 35,1% do 2 mg.

Algoritmus podle Gage správně předpověděl dávku u 103 (36,7%) pacientů. Předávkováno bylo 144 (51,4%) pacientů o průměrných $3,0 \pm 2,5$ mg (do 2 mg byla chyba u 38,2% předávkovaných). Poddávkováno bylo 33 pacientů o průměrných $3,3 \pm 2,8$ mg. Srovnání jednotlivých algoritmů proti sobě pomocí McNemarovy modifikace chí-kvadrát testu - stran pravděpodobnosti, že se pacientova skutečně užívaná dávka bude nacházet v pásmu vypočteném podle algoritmu, prokázalo jasnou nadřazenost algoritmu Sconceové proti oběma zbylým algoritmům na našem souboru. Pacient má podle algoritmu Sconceové (oproti algoritmu Andersona) 4x větší šanci, že vypočtená dávka bude uvnitř pásma $\pm 20\%$ od skutečně užívané (Odds ratio, OR 4,013, 95% CI, 2,226 až 7,234, $p < 0,001$). Obdobně algoritmus podle Sconceové dává 1,8x větší šanci na správný výsledek proti algoritmu podle Gage (OR 1,830, 95% CI, 1,097 až 3,052, $p = 0,020$). Druhým signifikantním výsledkem byla superiorita algoritmu podle Gage proti algoritmu podle Andersona (OR 2,063, 95% CI, 1,234 až 3,447, $p = 0,005$), ostatní srovnání nebyla signifikantní. Výsledky analýz přesnosti predikce pro jednotlivé podskupiny jsou uvedeny v tabulce č. 4.2.3. Nejvyšší přesnosti dosahoval i v těchto srovnáních algoritmus podle Sconceové. Vysoká přesnost byla u pacientů s nízkou (< 50 kg) i vysokou (> 100 kg) tělesnou hmotností. Nejvyšší přesnost predikce byla dosažena u pacientů užívajících denní dávku 2,5 až 7,5 mg, vyhovující predikce byla u pacientů s nízkou dávkou ($< 2,5$ mg) a naopak nepřesné byly výpočty pro pacienty s vyšší než obvyklou dávkou (7,5 až 10 mg a > 10 mg). Zcela nepřesné jsou však všechny algoritmy pro pacienty mladší 40 let věku, nejvyššího R^2 sice opět dosáhl algoritmus Sconceové, ale přesnost predikce byla celkově nízká (18,9%). Naopak u pacientů nad 80 let věku dosahovaly algoritmy podle Sconceové a Gage vyšší přesnosti, než u pacientů od 41 do 79 let věku (64,7 vs. 57,8% a 53,3% vs. 28,5%).

Tabulka 4.2.1: Klinické charakteristiky 280 pacientů v souboru pro porovnání farmakogenetických algoritmů (SD - směrodatná odchylka).

| | |
|---|------------------------|
| Charakteristika souboru | |
| Průměrný věk ± SD (minimum-maximum) [roky] | 63,1 ± 16,24 (9-89) |
| Průměrná tělesná váha ± SD (minimum-maximum) [kg] | 83,0 ± 17,37 (35-130) |
| Průměrná tělesná výška ± SD (minimum-maximum) [cm] | 172,1 ± 9,82 (133-200) |
| Ženské pohlaví | 131 (46,8%) |
| Průměrná užívaná denní dávka ± SD (minimum-maximum) [mg] | 5,02 ± 2,60 (1,0-18,0) |
| Průměrná délka léčby warfarinem (minimum-maximum) [měsíce] | 36 ± 45,15 (3-276) |
| Indikace léčby warfarinem | |
| Ischemická cévní mozková příhoda - kardioembolická, disekce vnitřní karotidy, kryptogenní s prokázaným foramen ovale patens, megadolichobasilaris | 112 (40,0%) |
| Fibrilace síní bez ischemické cévní mozkové příhody | 83 (29,6%) |
| Hluboká žilní trombóza/plicní embolie | 64 (22,9%) |
| Mechanická chlopenní náhrada | 14 (5,0%) |
| Trombóza mozkových splavů | 7 (2,5%) |
| Komorbidity | |
| Hypertenze | 164 (58,5%) |
| Diabetes mellitus | 54 (19,3%) |
| Vředová choroba gastroduodenální | 16 (5,7%) |
| Ischemická choroba srdeční | 98 (35,0%) |
| Onkologické onemocnění | 31 (11,1%) |
| Renální onemocnění | 11 (3,9%) |
| Hepatální onemocnění | 20 (7,1%) |
| Souběžně užívaná medikace s významnými interakcemi s warfarinem | |
| Amiodaron | 47 (16,8%) |
| Simvastatin | 30 (10,7%) |
| Atorvastatin | 52 (18,6%) |
| Losartan/Irbesartan/Valsartan/Telmisartan | 44 (15,7%) |
| Spironolakton | 25 (8,9%) |
| Kyselina acetylosalicylová | 12 (4,3%) |
| Sulodexid | 4 (1,4%) |
| Furosemid | 38 (13,6%) |
| Escitalopram/Citalopram | 23 (8,2%) |

Tabulka 4.2.2: Porovnání přesnosti jednotlivých algoritmů - publikovaná data a naše ověření přesnosti (SD - směrodatná odchylka). *) Výsledek z 83% derivační kohorty kavkazského původu. **) Kohorta publikovaná Carlquistem et al bez udání algoritmu, algoritmus vypočten z derivační kohorty podle Carlquista a upraven podle literárních údajů, definitivní verze publikována v práci Andersona (Anderson et al, 2007).

| Algoritmus | Derivační kohorta: medián věku± SD (rozmezí), pokud udáno [roky] | Derivační kohorta: počet pacientů (kavkazská rasa %) | Přesnost na derivační kohortě - koeficient determinace - R ² , (počet pacientů, n) | Přesnost na validační kohortě - koeficient determinace - R ² , n - počet pacientů | Přesnost na naší skupině 280 pacientů - koeficient determinace - R ² |
|--|--|--|---|--|---|
| Sconce et al (Sconce et al, 2005) | 67 (26–89) | 297 (100%) | R ² nebylo publikováno, Pearsonovo r = 0,80, p < 0,001, (n=38) | 54,2% (n = 38) | 58,4% |
| Gage et al (Gage et al, 2008) | 65±14 | 1015 (83%) | 57%* | 54% (n = 242) | 23,8% |
| Anderson et al (Carlquist et al, 2006, Anderson et al, 2007) | 71±12 (28–100) | 213, převážně kavkazského původu | 47%** | nebylo publikováno | 21,9% |

Tabulka 4.2.3: Srovnání definovaných podskupin podle koeficientů determinace (R^2) jednotlivých algoritmů a přítomnosti dávky skutečně užívané v pásmu predikovaném pro INR 1,7 až 3,3 jednotlivými algoritmy (SD - směrodatná odchylka).

| Podskupina | n | Prům. užívaná dávka w. mg \pm SD | R^2 Anderson | R^2 Gage | R^2 Sconce | Pásmo 1,7 až 3,3 dle výpočtu Anderson | Pásmo 1,7 až 3,3 dle výpočtu Gage | Pásmo 1,7 až 3,3 dle výpočtu Sconce |
|------------------------------------|-----|------------------------------------|----------------|------------|--------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Nad 80 let věku | 26 | 3,38 \pm 1,40 | 28,7% | 53,3% | 64,7% | 8 (30,8%) | 11 (42,3%) | 16 (61,5%) |
| Pod 40 let věku | 29 | 7,65 \pm 3,03 | 4,7% | 11,9% | 18,9% | 8 (27,6%) | 11 (37,9%) | 15 (51,7%) |
| 41 až 79 let věku | 225 | 4,87 \pm 2,42 | 13,8% | 28,5% | 57,8% | 59 (26,2%) | 72 (32,0%) | 122 (54,2%) |
| Denní dávka warfarinu < 2,5 mg | 41 | 2,02 \pm 0,46 | 0% | 1% | 23,8% | 1 (2,4%) | 9 (22,0%) | 13 (31,7%) |
| Denní dávka warfarinu 2,5 - 7,5 mg | 218 | 4,69 \pm 1,41 | 12,8% | 13,6% | 46,6% | 70 (32,1%) | 76 (34,9%) | 131 (60,1%) |
| Denní dávka warfarinu 7,5 - 10 mg | 21 | 9,10 \pm 0,86 | 0,9% | 6,8% | 7,6% | 4 (19,0%) | 9 (42,9%) | 11 (52,4%) |
| Denní dávka warfarinu > 10 mg | 10 | 13,32 \pm 3,24 | 3,6% | 8,1% | 5,5% | 0 | 2 (20,0%) | 2 (20,0%) |
| Váha pod 60 kg | 27 | 4,56 \pm 3,24 | 33,4% | 30,9% | 53,3% | 4 (14,8%) | 8 (29,6%) | 12 (44,4%) |
| Váha nad 100 kg | 38 | 6,23 \pm 2,59 | 5,7% | 54,1% | 57,8% | 10 (26,3%) | 3 (7,9%) | 23 (60,5%) |

4.3 Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu

4.3.1 Klinické a genetické charakteristiky souboru pro tvorbu a validaci algoritmu

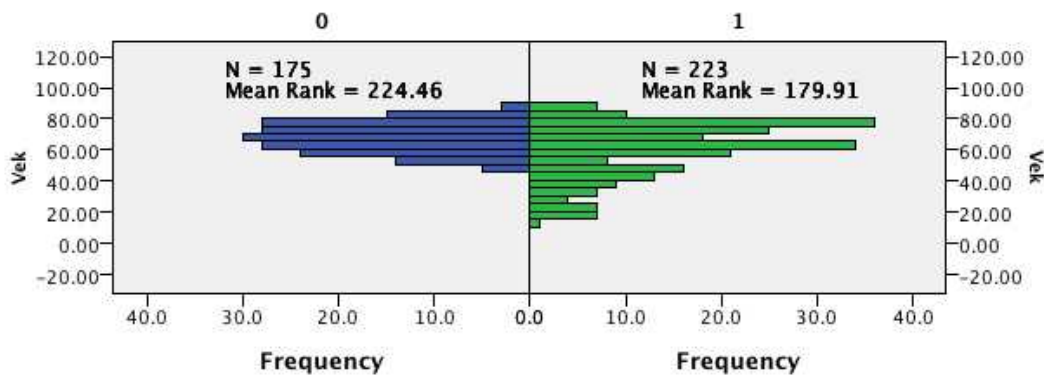
Soubor pro tvorbu vlastního farmakogenetického algoritmu čítal 175 pacientů z kohorty 1 (viz metodika), kteří splnili požadované parametry tj. zejména známá stabilizovaná denní dávka warfarinu a kompletní klinická data (viz metodika). Detailní data relevantní pro výpočet farmakogenetického algoritmu jsou uvedena v tabulce č. 4.3.1.

Do validační skupiny (skupina 2) bylo zařazeno celkem 223 pacientů. Sbíraná data byla identická jako v případě kohorty pro tvorbu vzorce. Relevantní detailní data jsou uvedena v tabulce č. 4.3.1. Významný rozdíl byl očekávatelně ve věku obou kohort ($p < 0,001$) a dále pak ve vyšším zastoupení žen v kohortě pro tvorbu vzorce (viz obr. 4.3.1.).

Tabulka 4.3.1. Relevantní klinické a genetické charakteristiky souboru pro tvorbu farmakogenetického algoritmu (skupina 1) a jeho validační skupiny (skupina 2) s uvedením statistického srovnání sbíraných parametrů (kontinuální proměnné byly srovnány s použitím Mann-Whitney U testu, ordinální a nominální proměnné pomocí χ^2 testu).

| Charakteristika souboru | Soubor pro tvorbu algoritmu (derivační) | Validační soubor | Rozdíl |
|---|---|-----------------------|----------|
| Počet pacientů | 175 | 223 | n.a. |
| Průměrný věk ± SD (rozmezí) [roky] | 68,3 ± 9,61 (50-89) | 60,17 ± 18,07 (13-89) | < 0,001* |
| Průměrná těl. váha ± SD (rozmezí) [kg] | 83,0 ± 15,61 (42-125) | 83,7 ± 19,09 (45-190) | 0,212 |
| Průměrná těl. ± SD (rozmezí) [cm] | 172,4 ± 9,71 (150-200) | 171,4 ± 9,3 (148-198) | 0,252 |
| Ženské pohlaví | 69 (39,4%) | 118 (52,9%) | 0,007* |
| Průměrná denní dávka ± SD (rozmezí) [mg] | 4,50 ± 2,08 (1,0-12,8) | 5,19 ± 2,84 (1,13-18) | 0,058 |
| Léčba amiodaronem | 35 (20,0%) | 28 (12,6%) | 0,055 |
| Léčba statinem (simvastatin, atorvastatin, losuvastatin, fluvastatin) | 63 (36,0%) | 96 (43,0%) | 0,154 |
| 1 variantní alela <i>CYP2C9</i> *2 | 38 (21,7%) | 33 (14,8%) | 0,082 |
| 2 variantní alely <i>CYP2C9</i> *2 | 3 (1,7%) | 1 (0,4%) | dtto |
| 1 variantní alela <i>CYP2C9</i> *3 | 24 (13,7%) | 26 (11,7%) | 0,8 |
| 2 variantní alely <i>CYP2C9</i> *3 | 2 (1,1%) | 2 (0,9%) | dtto |
| <i>VKORC1</i> A/A | 27 (15,4%) | 29 (13,0%) | 0,626 |
| <i>VKORC1</i> A/B | 81 (46,3%) | 99 (44,4%) | dtto |
| <i>VKORC1</i> B/B | 67 (38,3%) | 95 (42,6%) | dtto |

Obrázek 4.3.1. : Porovnání věku skupiny pro tvorbu algoritmu (v grafu 0, vlevo) a validační skupiny (v grafu 1, vpravo). Věk vynesen v letech.



4.3.2 Vlastní tvorba algoritmu

Algoritmus byl vytvořen pomocí hierarchické lineární regresní analýzy (detaily viz metodika). Byl opakovaně použit třístupňový hierarchický postup, kdy do jednotlivých fází modelu byly postupně přiřazovány proměnné, které v univariantské analýze dosáhly statistické významnosti $p > 0,1$ a zároveň splňovaly lineární vztah k závislé proměnné (skutečně užívaná denní dávka warfarinu). Tohoto stupně významnosti dosáhly následující proměnné: počet variantních alel *2 a *3 genu *CYP2C9*, haplotypy genu *VKORC1* A/A, A/B a B/B, věk, váha, výška, užívání amiodaronu a užívání statinu. Pro předpokládanou klinickou významnost bylo zařazeno i pohlaví pacienta.

Pro minimální a statisticky nevýznamný vliv na výslednou přesnost predikce jsme vyřadili parametry užívání statinu a pohlaví pacienta (detaily analýzy viz obr. 4.3.2.). Parametry zařazené do definitivního modelu byly: věk, hmotnost, výška, genotyp *VKORC1* a *CYP2C9* a užívání amiodaronu, které statisticky významně predikují výslednou denní dávku warfarinu $F(7, 167) = 66,120$, $p < 0,001$ (viz obr. č. 4.3.3.).

Obrázek č. 4.3.2. : Screenshot ze statistického softwaru SPSS v. 18: Sumarizace posouzení 3 finálních modelů v hierarchickém testování, kdy výsledný je model č. 1. Model č. 2 (přidáno pohlaví pacienta) a č. 3 (přidáno užívání statinu) nedosáhly statisticky významného navýšení přesnosti predikce (Sig. F Change 0,834 a 0,054).

Model Summary^d

| Model | R | R Square | Adjusted R Square | Std. Error of the Estimate | Change Statistics | | | | | Durbin-Watson |
|-------|-------------------|----------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------|-----|-----|---------------|---------------|
| | | | | | R Square Change | F Change | df1 | df2 | Sig. F Change | |
| 1 | .857 ^a | .735 | .724 | .25646 | .735 | 66.120 | 7 | 167 | .000 | 2.016 |
| 2 | .857 ^b | .735 | .722 | .25720 | .000 | .044 | 1 | 166 | .834 | |
| 3 | .861 ^c | .741 | .727 | .25507 | .006 | 3.772 | 1 | 165 | .054 | |

a. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha

b. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha, Sex_men_1

c. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha, Sex_men_1, simvastatin

d. Dependent Variable: davka_odmocnina

Obrázek č. 4.3.3. : Screenshot ze statistického softwaru SPSS v. 18: Sumarizace posouzení F poměru (F ratio, goodness of fit) 3 finálních modelů ANOVA testem v hierarchickém testování, kdy výsledný je model č. 1.

ANOVA^d

| Model | | Sum of Squares | df | Mean Square | F | Sig. |
|-------|------------|----------------|-----|-------------|--------|-------------------|
| 1 | Regression | 30.441 | 7 | 4.349 | 66.120 | .000 ^a |
| | Residual | 10.984 | 167 | .066 | | |
| | Total | 41.425 | 174 | | | |
| 2 | Regression | 30.444 | 8 | 3.806 | 57.529 | .000 ^b |
| | Residual | 10.981 | 166 | .066 | | |
| | Total | 41.425 | 174 | | | |
| 3 | Regression | 30.689 | 9 | 3.410 | 52.410 | .000 ^c |
| | Residual | 10.735 | 165 | .065 | | |
| | Total | 41.425 | 174 | | | |

a. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha

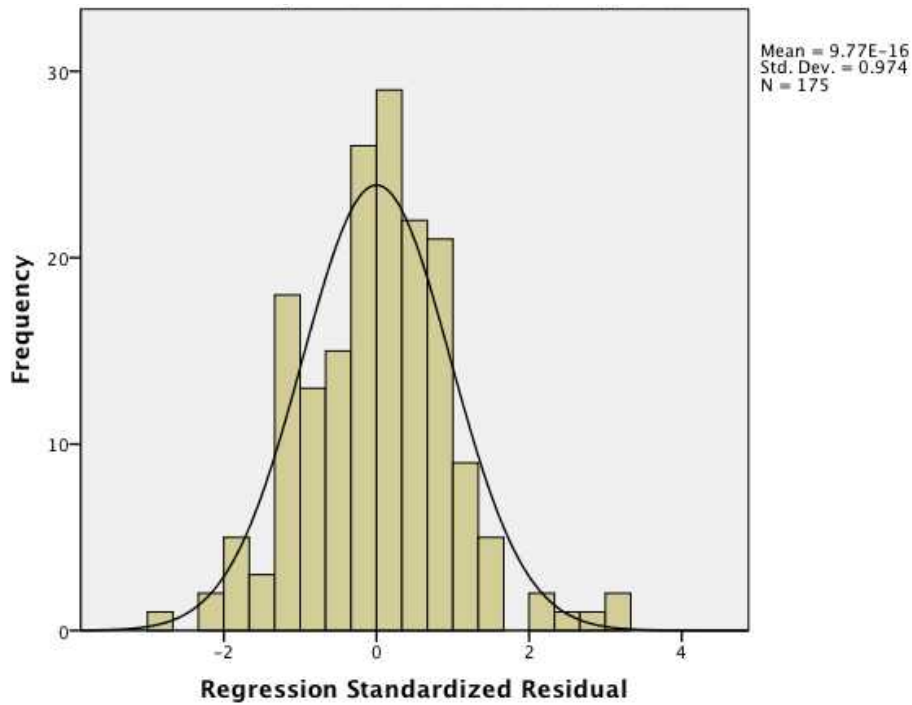
b. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha, Sex_men_1

c. Predictors: (Constant), amiodaron, Vyska, CYP2, CYP3, Vek, VKORC, Vaha, Sex_men_1, simvastatin

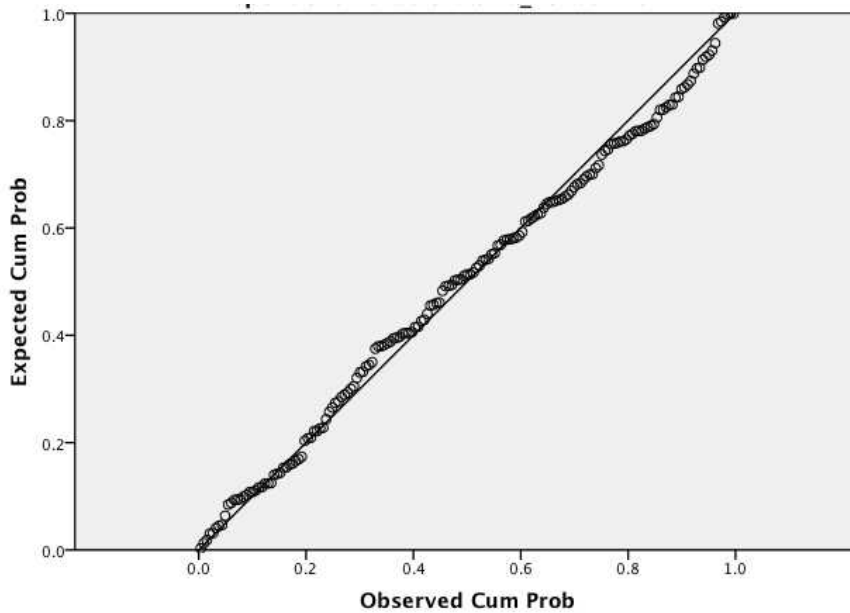
d. Dependent Variable: davka_odmocnina

Výsledný model byl testován na vzájemnou nezávislost reziduí v modelu testem podle Durбина a Watsona, kdy výsledek 2,016 znamená vynikající nezávislost pozorování (může nabývat hodnoty od 0 do 4, kdy optimální je hodnota 2, tj. neexistuje korelace mezi reziduy). Nemuseli jsme řešit přítomnost outlierů, žádný případ predikce nepřesáhnul hodnotou standardizovaného rezidua ± 3 směrodatné odchylky (SD). Rezidua vytvořeného modelu splnila předpoklady na přítomnost homoskedasticity a jejich normality (viz obr. 4.3.4. a 4.3.5.)

Obrázek 4.3.4. : Histogram standardizovaných reziduí výsledného regresního modelu, který aproximuje normální rozdělení.



Obrázek 4.3.5. : P-P křivka (P-P plot) normality rozdělení reziduí regresní analýzy finálního modelu.



4.3.3 Definitivní algoritmus

$\sqrt{\text{Denní dávka, mg}} = (2,049 - (0,016 * [\text{věk, roky}]) + (0,007 * [\text{výška, cm}]) + (0,004 * [\text{váha, kg}]) - (0,227 * [\text{CYP2C9*2, počet alel 0-2}]) - (0,296 * [\text{CYP2C9*3, počet alel 0-2}]) - (0,340 * [\text{VKORC, A/A = 0, A/B = 1, B/B = 2}]) - (0,397 * \text{léčba amiodaronem [ne = 0, ano = 1]})$

Statistická významnost jednotlivých parametrů je uvedena v obr. 4.3.6. Výsledný model dosahuje vysoké hodnoty predikce - hodnota neadjustovaného koeficientu determinace je R^2 73,5%, adjustovaný koeficient je 72,4%.

Obrázek 4.3.6.: Screenshot ze statistického softwaru SPSS v 18.0. Regresní koeficienty jednotlivých parametrů výsledného modelu a jejich významnost.

| Model | | Coefficients ^a | | | | | | | | |
|-------|------------|-----------------------------|------------|---------------------------|---------|------|---------------------------------|-------------|-------------------------|-------|
| | | Unstandardized Coefficients | | Standardized Coefficients | t | Sig. | 95.0% Confidence Interval for B | | Collinearity Statistics | |
| | | B | Std. Error | Beta | | | Lower Bound | Upper Bound | Tolerance | VIF |
| 1 | (Constant) | 2.049 | .417 | | 4.909 | .000 | 1.225 | 2.872 | | |
| | Vek | -.016 | .002 | -.309 | -7.440 | .000 | -.020 | -.012 | .921 | 1.086 |
| | Vyska | .007 | .002 | .139 | 2.898 | .004 | .002 | .012 | .694 | 1.442 |
| | Vaha | .004 | .002 | .125 | 2.590 | .010 | .001 | .007 | .685 | 1.459 |
| | CYP2 | -.227 | .042 | -.220 | -5.454 | .000 | -.309 | -.145 | .977 | 1.023 |
| | CYP3 | -.296 | .050 | -.242 | -5.988 | .000 | -.394 | -.199 | .975 | 1.026 |
| | VKORC | -.340 | .029 | -.487 | -11.855 | .000 | -.397 | -.284 | .942 | 1.062 |
| | amiodaron | -.397 | .048 | -.334 | -8.329 | .000 | -.491 | -.303 | .985 | 1.015 |

4.3.4 Validace vlastního algoritmu

Dávka vypočtená podle definitivního vlastního algoritmu při srovnání se skutečně užívanou dávkou nabývá u skupiny 1 (soubor pro tvorbu vzorce) hodnoty koeficientu determinace R^2 84,8% ($p < 0,001$). Výsledek predikce je sice vysoce přesný, ale je dán biasem při tvorbě algoritmu. Proto byl výpočet porovnán na validační skupině. U validační skupiny bylo dosaženo přesnosti podle koeficientu determinace R^2 62,3% ($p < 0,001$). Pro srovnání jsme vypočetli i přesnost

publikovaných algoritmů u validační skupiny - podle Andersona 50,1% ($p < 0,001$) a podle Sconceové 55,3% ($p < 0,001$).

Absolutní hodnota průměrné chyby predikce našeho algoritmu byla $1,57 \pm 1,59$ mg., medián absolutní chyby byl 1,12 mg. Druhým parametrem srovnání byla přítomnost algoritmem predikované dávky v pásmu vymezeném $\pm 20\%$ skutečně užívané denní dávky. Průměrná chyba predikce v procentech skutečně užívané denní dávky byla 35,47%, medián byl 22,43% (SD 41,06). Do 20% skutečně užívané denní dávky bylo predikováno 48,6% pacientů. Předávkováno bylo 88 (39,3%) pacientů z 223, tj. vypočtená dávka byla větší než skutečně užívaná. Nicméně chyba větší než 2 mg byla pouze u 29,5% z předávkovaných pacientů, navíc všichni tito pacienti užívali celkovou denní dávku vyšší než 5mg. Poddávkováno (vypočtená nižší než skutečně užívaná) bylo 126 (56,5%) pacientů a to průměrně o $1,41 \pm 1,12$ mg. U 46,8% poddávkovaných byla chyba do 2 mg.

Výsledky analýz přesnosti predikce pro jednotlivé podskupiny byli následující. Horší přesnosti dosahuje náš algoritmus u pacientů mladší 50 let věku ($n = 61$)- bylo R^2 38,8%. Naopak u pacientů nad 80 let věku ($n = 20$) jsme dosáhli dostatečné přesnosti predikce - 52,7%. U pacientů s vysokou (> 100 kg) tělesnou hmotností ($n = 34$) byl koeficient determinace 57,7%. U pacientů s hmotností nižší než 50 kg ($n = 3$) byl chybou malých čísel dokonce 97,7%.

Porovnání našeho algoritmu predikce denní dávky s dříve publikovanými algoritmy jsme graficky znázornili pomocí Bland-Altmanových grafů (obrázek 4.3.7). Numerické vyjádření Bland-Altmanova grafu je hodnota biasu (průměru rozdílů) a jeho 95% interval shody (95% limits of agreement) a v našem validačním souboru je následující:

- Náš algoritmus x algoritmus podle Sconceové:

Bias -0,2905, SD 1,325, 95% interval shody -2,888 až 2,307

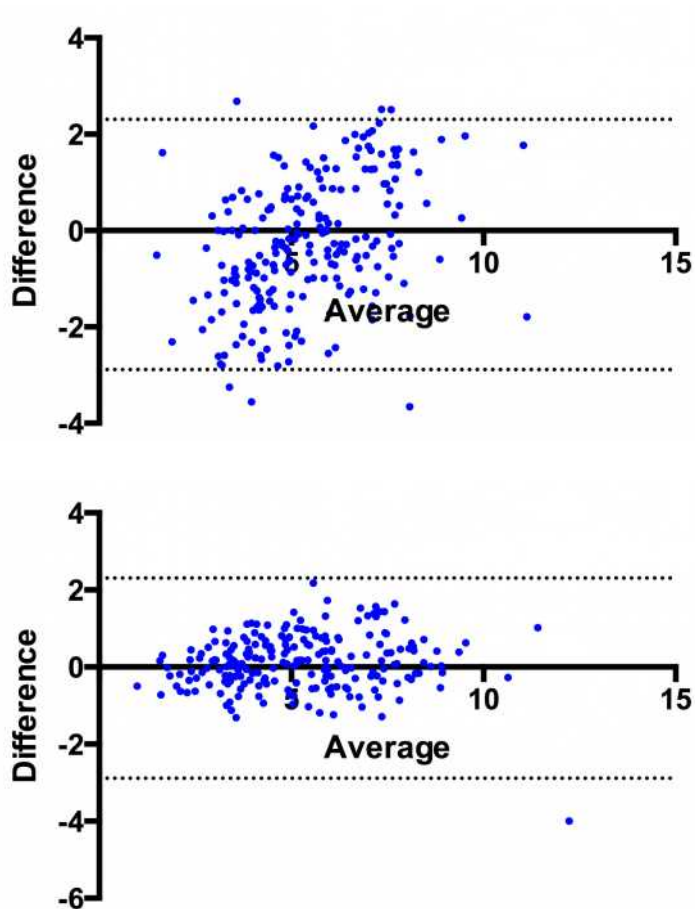
- Náš algoritmus x algoritmus podle Gage:

Bias 0,1370, SD 0,7670, 95% interval shody -1,248 až 1,522

Námi vytvořený algoritmus je v dobré shodě s dříve publikovanými algoritmy u pacientů naší validační skupiny, vyšší je shoda s algoritmem podle Sconceové, který

u našich pacientů dosahoval vyšší přesnosti predikce (viz výsledky výše, kapitola 4.2)

Obrázek 4.3.7: Bland Altmanův graf porovnávající predikované hodnoty denní dávky podle našeho algoritmu ve srovnání s publikovanými algoritmy - A) podle Andersona; B) podle Sconceové.



4.4 Riziko závažného krvácení podle genotypu *CYP2C9* a *VKORC1*

4.4.1 Klinická charakteristika souboru

Celkem 194 pacientů (51 pacientů se závažným krvácením a 143 kontrol) splnilo vstupní kritéria a bylo zařazeno do závěrečné analýzy. Základní klinické charakteristiky jsou uvedeny v tabulce 4.4.1.

Všichni zařazení pacienti byli indoevropského původu, etnicky české národnosti. Průměrný věk souboru v okamžiku zahájení léčby byl 62,9 roku. Skupina se závažným krvácením byla statisticky významně starší (průměrně 66,8 vs. 61,5 roku, $p = 0.033$), což podporuje vyšší věk jako významný rizikový faktor krvácení. V indikaci léčby warfarinem nebyly nalezeny významné rozdíly mezi skupinami. Většina pacientů ve studii byla léčena v primární (28,9%) nebo sekundární (30,4%) prevenci tromboembolických komplikací fibrilace síní (celkem 59,3%). Druhou nejčastější indikací byla hluboká žilní trombóza a/nebo plicní embolizace (25,8%). Terapeutické rozmezí INR pro léčbu warfarinem bylo pro většinu pacientů 2,0 až 3,0, pouze u pacientů s mechanickou chlopenní náhradou (6,8%) bylo 2,5 až 3,5.

Průměrná doba sledování celého souboru byla 45,7 měsíce (3 roky a 9 měsíců). Kratší doba sledování byla u kontrolní skupiny - 42 měsíců, skupina s krvácením byla sledována průměrně 56,3 měsíce, tento rozdíl nebyl signifikantní.

V komorbiditách pacientů obou skupin nebyl významný rozdíl, mimo častější anamnézy ischemické cévní mozkové příhody v kontrolní skupině (23,5% vs. 39,9%, $p = 0.036$). Tento rozdíl je daný biasem tvorby kontrolního vzorku, zejména na neurologických odděleních. Což však není dle našeho názoru na závadu, naopak je to skupina s jedním z nejvýznamnějších rizik krvácení mezi všemi pacienty nasazovanými na warfarin, kde můžeme očekávat vyšší počet událostí - a tedy i významnější rozdíl mezi variantními a nevariantními genotypy při menší velikosti souboru. Léky užívané spolu s warfarinem se lišily významně mezi pacienty s krvácením a kontrolní skupinou právě a jenom v případě 2 léků s prokazatelným (a v příbalové informaci udávaným) vyšším rizikem krvácivých komplikací při warfarinizaci.

Tabulka 4.4.1: Základní charakteristiky souboru pacientů. Rozdíl mezi skupinami byl vypočten pomocí χ^2 testu, Fisherova exaktního testu nebo Mann-Whitneyho U testu.

| | Skupina se závažným krvácením | Kontrolní skupina (bez závažného krvácení) | Celkem | Rozdíl mezi skupinami signifikantní (p<.05)* |
|---|-------------------------------|--|---------------|--|
| Pacientů (%) | 51 (26.3%) | 143 (73.7%) | 194 | |
| Mužů (%) | 27 (52.9%) | 80 (55.9%) | 107 (55.2%) | 0.711 |
| Průměrný věk (SD), roky | 66.8 (15.572) | 61.5 (17.004) | 62.9 (16.768) | 0.033* |
| Pacienti starší než 75 let (%) | 21 (41.2%) | 38 (26.6%) | 59 (30.4%) | 0.075 |
| Doba sledování, měsíce | | | | |
| Průměrná doba sledování (SD) | 56.3 (67.523) | 42.0 (39.148) | 45.7 (48.463) | 0.756 |
| Medián | 25 | 26 | 26 | |
| Rozmezí | 1 - 276 | 12 - 216 | 1 - 276 | |
| Celkový čas sledování (měsíce) | 2870 | 6002 | 8872 | |
| Údaje o léčbě warfarinem | | | | |
| INR > 4.5 | 53.8% | 23.1% | 29.9% | 0.003* |
| Průměrná denní dávka warfarinu (SD) | 3.90 (3.210) | 5.15 (2.707) | 4.82 (2.732) | |
| Medián denní dávky warfarinu | 3.21 | 5.00 | 4.55 | 0.004* |
| Léčba warfarinem stabilní (%) | 28 (54.9%) | 100 (69.9%) | 128 (66.0%) | 0.052 |
| Indikace pro léčbu warfarinem (%) | | | | |
| Ischemická cévní mozková příhoda a fibrilace síní | 10 (19.6%) | 49 (34.3%) | 59 (30.4%) | 0.051 |
| Ischemická cévní mozková příhoda jiné etiologie než při fibrilaci síní (paradoxní embolizace via foramen ovale patens, disekce karotid) | 2 (3.9%) | 8 (5.6%) | 10 (5.2%) | 1.000 |
| Ischemická cévní mozková příhoda, všechny etiologické subtypy | 12 (23.5%) | 57 (39.9%) | 69 (35.6%) | 0.036* |
| Fibrilace síní bez ischemické cévní mozkové příhody | 16 (31.4%) | 40 (28.0%) | 56 (28.9%) | 0.645 |
| Hluboká žilní trombóza a plicní embolizace | 16 (31.4%) | 34 (23.8%) | 50 (25.8%) | 0.287 |

| Pokračování tabulky 4.4.1 z předchozí strany | Skupina se závažným krvácením | Kontrolní skupina (bez závažného krvácení) | Celkem | Rozdíl mezi skupinami signifikantní (p<.05)* |
|--|--------------------------------------|---|---------------|--|
| Chlopenní náhrada | 5 (9.8%) | 8 (5.6%) | 13 (6.7%) | 0.332 |
| Trombóza mozkových splavů | 2 (3.9%) | 4 (2.8%) | 6 (3.1%) | 1.000 |
| Komorbidity (%) | | | | |
| Hypertenze | 39 (76.5%) | 90 (62.9%) | 129 (66.5%) | 0.079 |
| Ischemická choroba srdeční - včetně prodělaného infarktu myokardu či kardiálního selhání | 25 (49.0%) | 49 (34.3%) | 74 (38.1%) | 0.063 |
| Ischemická cévní mozková příhoda | 13 (25.5%) | 61 (42.7%) | 74 (38.1%) | 0.030* |
| Diabetes mellitus 2. typu | 10 (19.6%) | 29 (20.3%) | 39 (20.1%) | 0.918 |
| Malignita v remisi | 7 (13.7%) | 13 (9.1%) | 20 (10.3%) | 0.350 |
| Vředová choroba gastro-duodenální | 5 (9.8%) | 6 (4.2%) | 11 (5.7%) | 0.161 |
| Onemocnění jater | 1 (2.0%) | 10 (7.0%) | 11 (5.7%) | 0.294 |
| Renální insuficience | 4 (7.8%) | 7 (4.9%) | 11 (5.7%) | 0.437 |
| Konkomitanti medikace | | | | |
| Amiodaron | 8 (15.7%) | 30 (21.0%) | 38 (19.6%) | 0.414 |
| Statin | 22 (43.1%) | 43 (30.1%) | 65 (33.5%) | 0.090 |
| Losartan | 10 (19.6%) | 19 (13.3%) | 29 (14.9%) | 0.277 |
| Nesteroidní antirevmatikum | 10 (19.6%) | 10 (7.0%) | 20 (10.3%) | 0.011* |
| Užívání více než 3 léků mimo warfarinu | 41 (80.4%) | 79 (55.2%) | 120 (61.9%) | 0.002* |
| Souběžná antiagregační léčba | 3 (5.9%) | 5 (3.5%) | 8 (4.1%) | 0.435 |
| Sulodexid | 4 (7.8%) | 1 (0.7%) | 5 (2.6%) | 0.018* |

Pacienti, kteří prodělali závažné krvácení užívali častěji nesteroidní antirevmatika (19,6% vs. 7,0%, $p = 0,011$) a sulodexid (7,8% vs. 0,7%, $p = 0,02$). Dalším rozdílem v současné medikaci, byla skutečnost, že pacienti s krvácivými komplikacemi užívali významně častěji více než 3 další léky mimo warfarinu. Důvodem může být jednak obtížná warfarinizace těchto pacientů pro větší vliv lékových interakcí nebo také jen nutnost užívat více léků pro jejich významnější morbiditu.

Stran užívání warfarinu jsme zaznamenali několik podstatných rozdílů. Pacienti s krvácením užívali významně nižší denní dávku warfarinu - průměrně 3,90 mg vs. 5,15 mg, $p = 0,004$, medián 3,21 mg vs. 5,00, $p = 0,004$. Tato skutečnost může být dána vyšším zastoupením pacientů s variantním genotypem (a tedy nižší denní

dávkou) v této skupině. Pacienti s krvácením dále častěji během léčby dosáhli nebezpečně vysokého INR - vyššího než 4,5 - 53,8% oproti 23,1% ($p = 0,003$) a jejich léčba byla méně často hodnocena jako stabilizovaná - jen v 54,9% proti 69,9% ($p = 0,052$) ve srovnání s pacienty bez závažných krvácivých komplikací.

4.4.2 Krvácivé komplikace

Celkem do studie bylo zařazeno 51 pacientů se závažným krvácením během léčby warfarinem. Sledování trvalo průměrně 46 měsíců (medián 26 měsíců). V přepočtu se jednalo o 6,9 epizod závažného krvácení na 100 roků sledování (paciento-roků). Většina krvácení proběhla v intrakraniální lokalizaci - 5 spontánních netraumatických subdurálních krvácení a 18 intracerebrálních krvácení do mozkového parenchymu. Více detailů stran lokalizace krvácení je uvedeno v tabulce č. 4.4.2.

Pouze v 56,9% procentech případů (29 z 51 pacientů) bylo INR v čase krvácení nad terapeutickým rozmezím ($> 3,0$). V 29,4% bylo INR v terapeutickém rozmezí (2,0 - 3,0) a v 13,7% (7 z 51 pacientů) bylo INR dokonce nižší než 2,0. Oproti literárním údajům jsme nepozorovali větší množství krvácení během úvodních 3 měsíců léčby, pouze 6 pacientů (11,8%) prodělalo krvácení během této fáze léčby.

Nezávažná krvácení byla ve studii sledována rovněž, nicméně jejich počet byl významně omezen sporným hodnocením krvácivých epizod stran kauzality. Prakticky každý pacient na účinné antikoagulační léčbě udává zvýšenou tvorbu modřin a delší dobu krvácení drobných poranění - kožních a zejména slizničních (dutina ústní, nos). Epizody byly posouzeny ošetřujícím lékařem, zadány do dokumentace, nicméně po zhodnocení etiologie - tj. vyloučení drobného traumatu, bylo uznáno jako spontánní a spojené nejspíše příčinnou souvislostí s antikoagulační léčbou jen u 33 (17%) pacientů v souboru kontrol.

Tabulka 4.4.2: Charakteristika závažných krvácení podle ISTH definice: jejich lokalizace a INR v čase krvácení.

| Lokalizace krvácení | |
|---|------------|
| Intrakraniální | 23 (45.1%) |
| Gastrointestinální | 7 (13.7%) |
| Závažná epistaxe nebo slizniční krvácení s potřebou hospitalizace a transfuze | 9 (17.6%) |
| Urogenitální | 4 (7.8%) |
| Retroperitoneální | 3 (5.9%) |
| Intraartikulární | 2 (3.9%) |
| Mediastinální | 1 (2.0%) |
| Intraokulární | 1 (2.0%) |
| Svalové s kompartmentovým syndromem a operačním řešením | 1 (2.0%) |
| INR v čase krvácení | |
| < 2.0 | 7 (13.7%) |
| 2.0 – 3.0 | 15 (29.4%) |
| > 3.0 | 29 (56.9%) |

4.4.3 Genetická charakteristika souboru

V tabulce 4.4.3 je uvedeno zastoupení jednotlivých genotypů *CYP2C9* a *VKORC1* v našem souboru (zvláště pro skupinu se závažným krvácením a pro kontrolní skupinu). Vzhledem k obtížné selekci pacientů - hrozící bias ve prospěch zastoupení rizikového genotypu v kontrolní skupině (např. pro vyšší zájem lékařů o vyšetření genetiky u pacientů s komplikacemi), jsme přistoupili ke srovnání našeho souboru (krvácení a jejich kontrol) s reprezentativním populačním vzorkem. Jako populační vzorek byl použit celý soubor pacientů vyšetřených v naší laboratoři v indikaci farmakogenetiky warfarinu (n = 1839). Hlavním rozdílem byla nepřítomnost pacientů se 4 variantními alelami v souboru pro zhodnocení rizika krvácení (skupina 3 a 4). Mezi všemi vyšetřenými pacienty (n = 1839) bylo celkem 10 osob se 4 VA. Rozdíl však nebyl statisticky významný. Ani v zastoupení ostatních variant jsme neprokázali významný rozdíl mezi skupinou 3 a 4 a populačním vzorkem, soubor splnil Hardy-Weinbergovo rozdělení (detaily viz tabulka 4.4.3).

Významné rozdíly jsme naopak prokázali při srovnání pacientů s krvácením s kontrolní skupinou. Prevalence A/A haplotypu genu *VKORC1* byla 31,4% ve skupině s krvácením oproti 15,5% u kontrol (p < 0,001). Adekvátně haplotyp B/B byl častěji přítomen u kontrolní skupiny (38,1%) než u skupiny s krvácením (23,5%, p =

0,012). Překvapivě jsme u skupiny s krvácením prokázali jen nevýznamně vyšší zastoupení variantních alel *2 (25.5% vs. 21.0%, kontroly) a *3 (21.6% vs. 12.6%, kontroly) genu *CYP2C9* než u kontrolní skupiny. Rozdíl nebyl významný, ani když jsme zhodnotili variantní alely *2 a *3 dohromady (43.1% vs. 30.8%, kontroly). Významné rozdíly byly rovněž v celkovém počtu variantních alel mezi oběma podskupinami - skupina se závažným krvácením měla významně častěji zastoupeny pacienti s 2 (35,3% vs. 21,0, $p = 0,042$) a 3 (19,6% vs. 4,9%, $p = 0,001$) variantními alelami, naopak méně často pacienti s žádnou variantní alelou (15,7% vs. 30,1%, $p = 0,045$).

4.4.4 Coxovy modely proporčního rizika

V primárním neupraveném (unadjusted) Coxově modelu proporčního rizika jsme jednotlivě zhodnotili všechny sledované rizikové faktory krvácení při léčbě warfarinem. Při návrhu protokolu studie a selekci parametrů sledování souboru jsme zařadili všechny zásadní literárně udávaná rizika - jako např. hypertenzi, stav po prodělané cévní mozkové příhodě, kardiální selhávání, renální a hepatální insuficienci, polypragmázii, současnou léčbu některými skupinami léků (nesteroidní antirevmatika, antiagregancia, amiodaron, statiny - zvláště atorvastatin) a další anamnestické údaje specifické pro léčbu warfarinem - nestabilní léčbu s nutností častých změn denní dávky, anamnesticky INR vyšší než 4,0, INR mimo terapeutické rozmezí během opakovaných kontrol.

V tabulce 4.4.4 jsou uvedeny faktory, které vyšly při univariátní analýze s výsledným poměrem rizik (HR, hazard ratio) vyšším než 1,0 bez ohledu na hladinu významnosti. Tradiční rizikové faktory nedosáhly v našem souboru statistické významnosti

Zásadní vliv bez přepočtu na další faktory vyšel v případě současné léčby sulodexidem, kdy poměr rizik byl $HR = 4,3$; $CI\ 95\% = 1,5$ až $12,0$. Potvrdili jsme již v této analýze vliv polypragmázie, kdy užívání více než tří dalších léků mimo warfarinu zvýšilo poměr rizik 2,5x ($HR = 2,503$; $CI\ 95\% = 1,4$ až $4,4$).

Tabulka 4.4.3: Genotypy pacientů ve studii rizika krvácení a jejich srovnání s populačním vzorkem (n = 1839). Srovnání skupin provedeno pomocí χ^2 testu nebo likelihood-ratio testu. (VA = variantní alela). * označuje rozdíl s $p < 0,05$.

| | Pacienti se závažným krvácením (n=51) | Kontrolní skupina (n=143) | Všichni pacienti ve studii rizika krvácení (n=194) | Rozdíl mezi skupinou s krvácením a kontrolní skupinou | Populační vzorek (n=1839) | Rozdíl mezi pacienty ve studii a populační skupinou |
|--|---------------------------------------|---------------------------|--|---|---------------------------|---|
| CYP2C9 | | | | | | |
| *1/*1 (wild type) | 29 (56,9%) | 99 (69,2%) | 128 (66,0%) | 0,109 | 1232 (67,0%) | 0,775 |
| *1/*2 | 10 (19,6%) | 26 (18,2%) | 36 (18,6%) | 0,822 | 326 (17,7%) | 0,774 |
| *1/*3 | 8 (15,7%) | 14 (9,8%) | 22 (11,3%) | 0,254 | 216 (11,7%) | 0,867 |
| *2/*2 | 1 (2,0%) | 0 | 1 (0,5%) | 0,263 | 16 (0,9%) | 1,000 |
| *2/*3 | 2 (3,9%) | 4 (2,8%) | 6 (3,1%) | 0,653 | 37 (2,0%) | 0,294 |
| *3/*3 | 1 (2,0%) | 0 | 1 (0,5%) | 0,263 | 12 (0,7%) | 1,000 |
| Nosič alely *2 | 13 (25,5%) | 30 (21,0%) | 43 (22,2%) | 0,505 | 379 (20,6%) | 0,611 |
| Nosič alely *3 | 11 (21,6%) | 18 (12,6%) | 29 (14,9%) | 0,123 | 265 (14,4%) | 0,839 |
| Nosič alely *2 a/nebo*3 | 22 (43,1%) | 44 (30,8%) | 66 (34,0%) | 0,109 | 607 (33,0%) | 0,775 |
| VKORC1 | | | | | | |
| AA haplotyp | 16 (31,4%) | 14 (9,8%) | 30 (15,5%) | <0,001* | 255 (13,9%) | 0,542 |
| AB haplotyp | 23 (45,1%) | 67 (46,9%) | 90 (46,4%) | 0,829 | 816 (44,4%) | 0,590 |
| BB haplotyp | 12 (23,5%) | 62 (43,4%) | 74 (38,1%) | 0,012* | 760 (41,3%) | 0,391 |
| Celkový počet variantních alel genů CYP2C9 a VKORC1 | | | | | | |
| 0 VA | 8 (15,7%) | 43 (30,1%) | 51 (26,3%) | 0,045* | 540 (29,4%) | 0,370 |
| 1 VA | 15 (29,4%) | 63 (44,1%) | 78 (40,2%) | 0,067 | 746 (40,6%) | 0,923 |
| 2 VA | 18 (35,3%) | 30 (21,0%) | 48 (24,7%) | 0,042* | 419 (22,8%) | 0,537 |
| 3 VA | 10 (19,6%) | 7 (4,9%) | 17 (8,8%) | 0,001* | 124 (6,7%) | 0,292 |
| 3 VA (1x CYP2C9 + 2x VKORC1) | 7 (13,7%) | 6 (4,2%) | 13 (6,7%) | 0,043* | 90 (4,9%) | 1,000 |
| 3 VA (2x CYP2C9 + 1x VKORC1) | 3 (5,9%) | 1 (0,7%) | 4 (2,1%) | 0,056 | 34 (1,9%) | 1,000 |
| 4 VA | 0 | 0 | 0 | nelze | 10 (0,5%) | 0,612 |

Proměnné s hodnotou $p \leq 0,1$ při univariátním testování byly vloženy do eliminačního algoritmu pro tvorbu definitivního upraveného (adjusted) modelu. Vzhledem k počtu sledovaných událostí (= 51 krvácení) jsme použili v definitivním Coxově modelu podle Hosmera adjustaci maximálně 5 jednotlivými proměnnými. Jako nejvýznamnější byly do definitivního modelu zařazeny následující proměnné: nestabilní dávka warfarinu, souběžná léčba amiodaronem, anamnéza hluboké žilní trombózy a/nebo plicní embolie, ischemická choroba srdeční a věk nad 80 let. Definitivní model splnil parametry testování na dobrou shodu modelu. Použitý test podle Grønnesbyho a Borgana nedosáhl signifikance ($p = 0,59$), což znamená celkově dobrou shodu modelu se skutečností (goodness of fit).

Tabulka 4.4.4: Rizikové faktory krvácení s poměrem rizik (hazard ration, HR) vyšším než 1,0, výsledky univariátní analýzy Coxovým modelem.

| Rizikový faktor | Hladina významnosti (p) | HR (hazard ratio) | 95%, konfidenční interval | |
|---------------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------|---------------|
| | | | dolní rozmezí | horní rozmezí |
| Ženské pohlaví | 0,641 | 1,144 | 0,649 | 2,017 |
| Věk nad 80 let | 0,144 | 1,655 | 0,842 | 3,252 |
| Věk nad 75 let | 0,405 | 1,270 | 0,724 | 2,227 |
| Hypertenze | 0,484 | 1,263 | 0,657 | 2,428 |
| Diabetes Mellitus | 0,495 | 1,277 | 0,633 | 2,578 |
| Vředová choroba gastroduodenální | 0,572 | 1,312 | 0,512 | 3,360 |
| Ischemická choroba srdeční | 0,602 | 1,159 | 0,666 | 2,018 |
| Malignita v remisi | 0,650 | 1,205 | 0,539 | 2,696 |
| Renální insuficience | 0,408 | 1,543 | 0,553 | 4,307 |
| Hluboká žilní trombóza/plicní embolie | 0,226 | 1,447 | 0,796 | 2,632 |
| Trombóza mozkových splavů | 0,178 | 2,672 | 0,639 | 11,175 |
| Ischemická CMP | 0,471 | 2,082 | 0,284 | 15,278 |
| simvastatin | 0,441 | 1,254 | 0,705 | 2,230 |
| losartan | 0,317 | 1,430 | 0,710 | 2,877 |
| Užívání více než 3 léků souběžně | 0,150 | 1,682 | 0,829 | 3,413 |
| Sulodoxid | 0,006* | 4,262 | 1,513 | 12,008 |
| Nesteroidní antirevmatika | 0,513 | 1,607 | 0,388 | 6,660 |
| Antiagregancia | 0,218 | 2,103 | 0,645 | 6,856 |
| Nestabilní dávkování | 0,001* | 2,503 | 1,422 | 4,406 |
| INR nad 4,0 | 0,468 | 1,368 | 0,586 | 3,193 |

V neadjustovaném modelu jsme prokázali významně zvýšené riziko závažného krvácení pro nosiče alely *2 a *3 genu *CYP2C9* (HR = 1,8, CI 95% 1,03 - 3,2, p = 0,039), pro homozygoty *2 a *3 variantních alel *CYP2C9* (HR = 4,045, CI 95% 1,4 - 11,5, p = 0,009) a pro nosiče 3 variantních alel genů *CYP2C9* a *VKORC1* (HR = 2,9, CI 95% 1,4 to 6,1, p = 0,004).

Po adjustaci modelu bylo riziko závažného krvácení pro nosiče nejméně jedné variantní alely *CYP2C9* (*2 a/nebo *3) $HR_{adj} = 1,96$ (95% CI 1,08 až 3,56, p = 0,027). Prokázali jsme dále ještě vyšší riziko pro homozygoty pro variantní alelu *CYP2C9* - $HR_{adj} = 4,1$ (95% CI 1,38 až 12,18, p = 0,011). Naopak pro wild type pacienti (genotyp *1/*1) v genu *CYP2C9* jsme prokázali významně nižší riziko závažných krvácivých komplikací ($HR_{adj} = 0,51$, CI 95% 0,28 až 0,93, p = 0,027). Tento výsledek udržel statistickou významnost i po současném započtení a úpravě podle přítomnosti A/A haplotypu v genu *VKORC1* ($HR_{adj} = 0,5$, CI 95% 0,27 to 0,91, p = 0,023).

Když jsme analýzu rizika omezili na jednotlivé genotypy *CYP2C9* a ne pouze na status nosičství dané variantní alely, tak se odhady rizika staly statisticky nestabilními pro malou velikost vzorku, i když byla zachována jejich celková statistická významnost. Nejvyšší riziko nesli homozygoti pro variantní alely *CYP2C9* - genotyp *3/*3 ($HR_{adj} = 74,7$, 95% CI 6,5 až 859,0, p = 0,001) a genotyp *2/*2 ($HR_{adj} = 10,2$, CI 95% 1,3 až 82,3, p = 0,029), tento výsledek byl významný i přes skutečnost, že v souboru s krvácením byl právě jen jeden pacient s tímto genotypem.

Analýza rizika závažného krvácení jednotlivých haplotypů genu *VKORC1* v upraveném modelu hraničně nevyšla signifikantně: $HR_{adj AA} = 1,8$ (95% CI 0,97 až 3,5 p = 0,06) a $HR_{adj BB} = 0,59$ (95% CI 0,30 až 1,1, p = 0,12).

Nejzajímavějším původním zjištěním naší práce bylo popsání aditivního rizika krvácení při započtení vzájemných kombinací genotypu *CYP2C9* a *VKORC1* podle celkového počtu variantních alel (VA). Pacienti s 3 VA měli upravený poměr rizik $HR_{adj} = 4,34$ (95% CI 1,95 až 9,65, p < 0,001). 10 ze 17 pacientů s 3 variantními alelami prodělalo závažné krvácení. Existují dvě možné základní kombinace 3 variantních alel - 2 VA v genu *CYP2C9* a 1 VA v genu *VKORC1*, nebo 1 VA v genu *CYP2C9* a 2 VA v genu *VKORC1*. Obě tyto kombinace s sebou nesou významné riziko

závažného krvácení, přičemž vyšší je toto riziko pro pacienty s 2 VA v genu *CYP2C9* ($HR_{adj} \text{ 2VA } CYP2C9 \text{ 1VA VKORC1} = 9,54$, CI 95% 2,65 až 34,40, $p = 0,001$; $HR_{adj} \text{ 1VA } CYP2C9 \text{ 2VA VKORC1} = 3,0$, CI 95% 1,19 to 7,51, $p = 0,02$) (detaily viz tabulka 4.4.5).

Analýzy rozdělené podle fáze léčby jsou detailně uvedeny v tabulce č. 4.4.6. Riziko závažného krvácení bylo pro pacienty s 3 VA významně vyšší po celou dobu léčby - ve fázi iniciační (první tři měsíce) i ve fázi udržovací (po 3 měsíci). Vyšší bylo toto riziko v iniciační fázi ($HR_{adj} = 12,23$, CI 95% 1,08 až 138,48, $p = 0,043$) než v udržovací fázi ($HR_{adj} = 3,65$, CI 95% 1,51 až 8,85, $p = 0,004$). Díky malému počtu pacientů se zakrvácením v iniciační fázi léčby nebyly ostatní analýzy významné, i když jsme pozorovali trend vyššího rizika pro nosiče variantních alel a naopak trend pro nižší riziko u pacientů s wild type genotypem.

V udržovací fázi léčby jsme pozorovali vyšší riziko pro nosiče variantní alely *2 a *3 genu *CYP2C9* ($HR_{adj} = 1,95$, CI 95% 1,03 až 3,69, $p = 0,04$) a korespondující nižší riziko pro pacienty s wild type *CYP2C9* genotypem ($HR_{adj} = 0,54$, CI 95% 0,27 až 0,97, $p = 0,04$).

Nezávažná krvácení nebyla signifikantně asociována s individuálním genotypem. Po seskupení závažných a nezávažných krvácivých komplikací stále přetrvávalo vyšší riziko pro pacienty s 3 variantními alelami ($HR_{adj} = 2,28$, CI 95% 1,14 až 4,55, $p = 0,02$); pro nosiče *CYP2C9**2 ($HR_{adj} = 2,07$, CI 95% 1,28 až 3,34, $p = 0,003$) i pro nosiče alely *3 ($HR_{adj} = 1,80$, CI 95% 1,02 až 3,15, $p = 0,041$).

Tabulka 4.4.5: Upravené poměry rizik (Adjusted hazard ratio, HR_{adj}) závažného krvácení podle jednotlivých genotypů.

| Genotyp | Hladina významnosti (p); * <0,05 | Poměr rizik, hazard ratio, HR | 95% konfidenční interval | |
|--|----------------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------|
| | | | dolní hranice | horní hranice |
| <i>CYP2C9</i> *1/*1 (wild type) | 0,027 | 0,510 | 0,281 | 0,926 |
| <i>CYP2C9</i> *1/*2 | 0,609 | 1,215 | 0,577 | 2,560 |
| <i>CYP2C9</i> *1/*3 | 0,183 | 1,735 | 0,772 | 3,902 |
| <i>CYP2C9</i> *2/*2 | 0,029 | 10,199 | 1,264 | 82,286 |
| <i>CYP2C9</i> *2/*3 | 0,327 | 2,084 | 0,480 | 9,049 |
| <i>CYP2C9</i> *3/*3 | 0,001 | 74,678 | 6,492 | 859,007 |
| <i>CYP2C9</i> *2 nosič (*1/*2, *2/*2, *2/*3) | 0,236 | 1,509 | 0,764 | 2,978 |
| <i>CYP2C9</i> *3 nosič (*1/*3, *2/*3, *3/*3) | 0,040 | 2,089 | 1,035 | 4,217 |
| <i>CYP2C9</i> *2 a/nebo *3 nosič (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) | 0,027 | 1,962 | 1,080 | 3,563 |
| <i>CYP2C9</i> *2 a/nebo *3 homozygot (*2/*2, *2/*3, *3/*3) | 0,011 | 4,103 | 1,382 | 12,176 |
| <i>VKORC1</i> AA haplotyp (low dose) | 0,060 | 1,841 | 0,974 | 3,479 |
| <i>VKORC1</i> AB haplotyp (intermediate dose, wild type) | 0,964 | 1,013 | 0,570 | 1,801 |
| <i>VKORC1</i> BB haplotyp (high dose) | 0,116 | 0,588 | 0,304 | 1,140 |
| 0 VA | 0,152 | 0,569 | 0,264 | 1,230 |
| 1 VA | 0,142 | 0,613 | 0,319 | 1,179 |
| 2 VA | 0,376 | 1,322 | 0,713 | 2,451 |
| 3 VA | <0,001 | 4,340 | 1,951 | 9,654 |
| 3 VA (1x <i>CYP2C9</i> + 2x <i>VKORC1</i>) | 0,020 | 2,989 | 1,190 | 7,508 |
| 3 VA (2x <i>CYP2C9</i> + 1x <i>VKORC1</i>) | 0,001 | 9,542 | 2,647 | 34,396 |

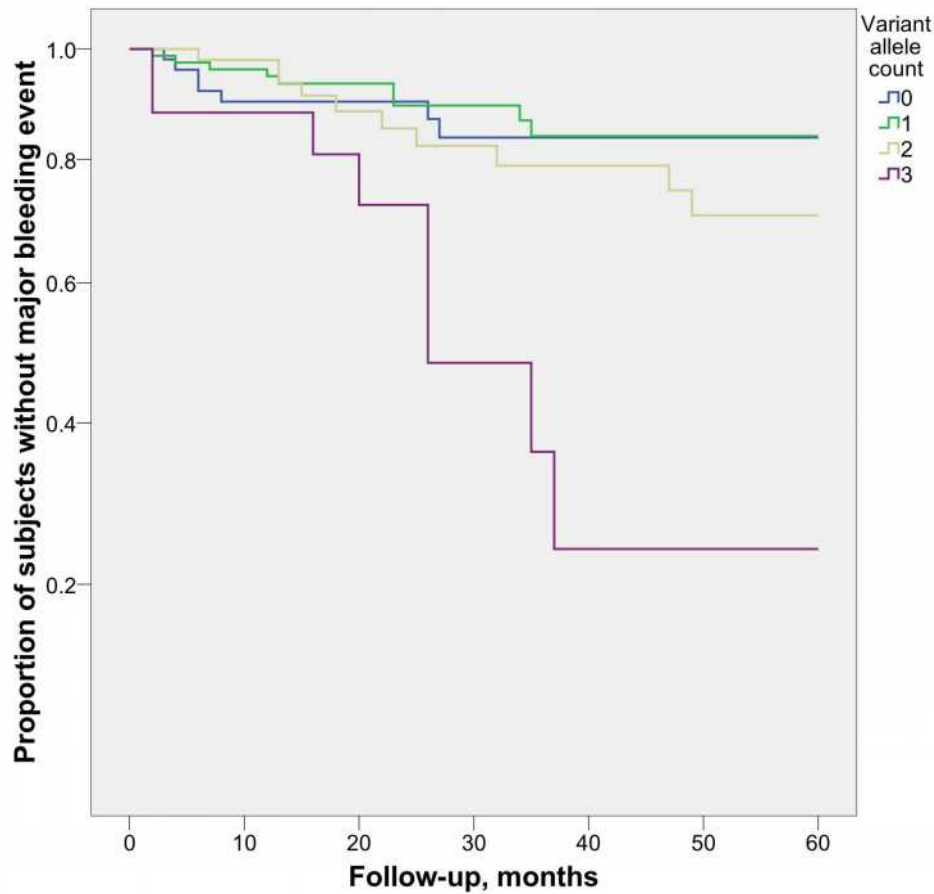
* - Proměnné ve výsledném modelu: nestabilní dávka, užívání amiodaronu, DVT/PE, ICHS a věk nad 80 let.

Tabulka 4.4.6: Upravené poměry rizik (HR_{adj}) závažného krvácení podle fáze terapie a genotypu. Iniciační - první tři měsíce, udržovací léčba - po třetím měsíci.
p - hladina významnosti, n.a.- nedostupný.

| genotyp | p | HR iniciace | 95% konfidenční interval | | p | HR udržova cí | 95% konfidenční interval | |
|---|-------|----------------|--------------------------------|---------|-------|---------------------|-----------------------------|-------|
| | | | horní | dolní | | | horní | dolní |
| <i>CYP2C9</i> *1/*1 | 0,392 | 0,492 | 0,097 | 2,498 | 0,041 | 0,514 | 0,271 | 0,973 |
| <i>CYP2C9</i> *2 (*1/*2, *2/*2, *2/*3) | 0,745 | 0,697 | 0,079 | 6,136 | 0,178 | 1,640 | 0,798 | 3,372 |
| <i>CYP2C9</i> *3 (*1/*3, *2/*3, *3/*3) | 0,163 | 3,445 | 0,607 | 19,567 | 0,085 | 1,970 | 0,911 | 4,260 |
| <i>CYP2C9</i> *2 a/nebo *3 (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) | 0,392 | 2,032 | 0,400 | 10,311 | 0,041 | 1,947 | 1,028 | 3,686 |
| <i>VKORC1</i> AA (low dose) | 0,601 | 1,535 | 0,308 | 7,653 | 0,075 | 1,830 | 0,940 | 3,563 |
| <i>VKORC1</i> AB | 0,396 | 0,477 | 0,086 | 2,634 | 0,646 | 1,155 | 0,625 | 2,133 |
| <i>VKORC1</i> BB (high dose) | 0,541 | 2,117 | 0,191 | 23,438 | 0,053 | 0,478 | 0,227 | 1,008 |
| 0 VA | 0,616 | 1,545 | 0,282 | 8,455 | 0,078 | 0,455 | 0,189 | 1,093 |
| 1 VA | 0,365 | 0,444 | 0,076 | 2,579 | 0,239 | 0,656 | 0,325 | 1,323 |
| 2 VA | n.a. | | | | 0,181 | 1,547 | 0,816 | 2,933 |
| 3 VA | 0,043 | 12,225 | 1,079 | 138,477 | 0,004 | 3,651 | 1,506 | 8,854 |

4.4.5 Kaplan-Meierova analýza

Obrázek 4.4.1: Čas k závažnému krvácení. Kaplan-Meierovy křivky (time-to-event) podle počtu variantních alel (VA) v genech *CYP2C9* a *VKORC1* a tabulka pacientů v riziku (patients at risk). Log-rank test (equality of survivor function) byl $\chi^2 = 8,494$, $p = 0,004$.



| Počet pacientů v riziku | 0 měsíců | 10 měsíců | 20 měsíců | 30 měsíců | 40 měsíců | 50 měsíců | 60 měsíců |
|-------------------------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 0 VA | 51 | 46 | 39 | 24 | 15 | 15 | 12 |
| 1 VA | 78 | 75 | 53 | 35 | 26 | 23 | 21 |
| 2 VA | 48 | 47 | 29 | 24 | 20 | 17 | 16 |
| 3 VA | 17 | 15 | 8 | 4 | 2 | 2 | 2 |

5 Diskuse metodických postupů a výsledků, včetně srovnání s literaturou

5.1 Přesnost výpočtu podle farmakogenetického algoritmu

Námi zjištěná přesnost jednotlivých algoritmů na vzorku české populace odpovídala publikované přesnosti v případě vzorce podle Sconceové. Farmakogenetický algoritmus Sconceové byl vytvořen multivariátní lineární regresní analýzou klinických dat 297 pacientů (derivační kohorta) a byl ověřen na souboru dalších 38 pacientů (validační kohorta). Udávaná hodnota R^2 pro validační kohortu byla 54,2%, derivační soubor dobře koreloval s predikovanou hodnotou - Pearsonovo r bylo 0,80 ($p < 0,001$). Náš soubor dosáhl podobného výsledku ($R^2 = 58,4\%$; Pearsonovo $r = 0,76$, $p < 0,001$) jako publikovaný soubor derivační i validační. Naopak v případě algoritmů podle Gage a Andersona se naše výsledky posouzení přesnosti významně liší (23,8% a 21,9% proti 55% a 47%), více viz tabulka č. 5. Rozdíl mezi algoritmy v přesnosti lze vysvětlit zřejmě kvalitou tvorby algoritmu, rozsahem sledovaných klinických parametrů jednotlivých souborů a také odlišnostmi v etnickém zastoupení kohort. Vyšší přesnost algoritmu Sconceové lze vysvětlit možná i preciznějším mechanismem tvorby algoritmu. Mezi analyzované údaje souboru patřilo i měření plazmatické hladiny warfarinu a výpočet clearance obou enantiomerů warfarinu, což jistě snížilo vliv non-compliance a zpřesnilo selekci pacientů i údajů pro regresní analýzu. Vzorec podle Andersona byl vytvořen literárně blíže autory neupřesněným způsobem - kombinací dat z derivační kohorty z práce Carlquista (Carlquist et al, 2006) a literárních údajů, což jistě může přispět k horší replikovatelnosti dat. Vzhledem k velmi vysoké závislosti denní dávky warfarinu na etnickém původu pro odlišnou distribuci variantních polymorfismů mezi jednotlivými etniky je také klíčový původ derivační kohorty. Česká populace vykazuje z populačního hlediska obdobné parametry jako všechny dosud publikované kohorty populací indoevropských etnik. Z hlediska složení kohort stran

etnického původu, na kterých byly jednotlivé algoritmy vytvořeny, byla anglická (100% kavkazská populace) Sconceové nejbližší naší české kohortě. V případě Gage et al bylo jen 83% kohorty kavkazské etnicity a Anderson přesně vůbec etnicitu neuvedl. Obdobná práce amerických autorů na souboru 71 pacientů (z toho jen 66% bylo kavkazského původu) (Shaw et al, 2010) dospěla k obdobným výsledkům v případě algoritmu podle Sconceové ($R^2 = 54\%$). Nejlepší přesnosti dosáhl v této práci algoritmus podle Gage ($R^2 = 66\%$), který na našem souboru dosahoval jen 23,8%. Odlišné výsledky mohou být způsobeny opět zejména vlivem etnických rozdílů na účinek warfarinu. Z toho jasně plyne potřeba ověření, popřípadě vývoj nového algoritmu, pro každou lokální populaci. Je smutnou skutečností, že jedna z nejcitovanějších zaslepených randomizovaných studií porovnávajících farmakogenetické a klasické empirické dávkování používala právě algoritmus podle Andersona a její negativní výsledky, spolu s nástupem nových léčiv, vedly ke snížení zájmu o tuto oblast (Anderson et al, 2007). Nicméně přesná predikce dávky warfarinu a možnost selekce pro warfarin rizikových pacientů (3 nebo 4 variantní alely nebo variantní homozygot CYP2C9) jsou jistě pro klinickou praxi přínosem i na základě dostupných publikovaných dat.

5.2 Vlastní vytvořený algoritmus

S cílem vylepšit přesnost predikce denní dávky warfarinu u našich pacientů v rutinní klinické praxi jsme přistoupili k vývoji vlastního farmakogenetického algoritmu. Na naší validační skupině jsme dosáhli přesnosti predikce podle koeficientu determinace R^2 62,3% ($p < 0,001$). Oproti nám dostupným literárním datům (viz tabulka 1.9.2) je náš algoritmus jedním z vůbec nejpřesnějších algoritmů používajících striktně data dostupná před zahájením léčby - podobné přesnosti dosáhl pouze algoritmus podle Thama u východoasijské populace - 60,2% (Tham et al, 2006), podle Miaoa u čínské populace - 62,8% (Miao et al, 2007) a podle Wadeliusové u švédské populace - 59% (Wadelius et al, 2009).

Srovnáme-li výsledky našeho algoritmu s přesností publikovaných algoritmů u stejné validační skupiny pacientů - podle Andersona 50,1% (Anderson et al, 2007) a podle Sconceové 55,3% (Sconce et al, 2005), pak náš algoritmus má nejvyšší

přesnost predikce. Navíc oba porovnávané publikované algoritmy jsme pro účely srovnání doplnili o přepočítání na cílové INR a o korekci dávky při léčbě amiodaronem. Pokud bychom srovnávali náš algoritmus s publikovanými algoritmy bez této korekce, pak by vyzněly výsledky pro náš algoritmus ještě přesvědčivěji.

Stran směru chyby predikce je výhodou námi vytvořeného algoritmu vyšší tendence k poddávkování než k předávkování pacientů: 56,5% versus 39,3% pacientů. Navíc klinicky závažné předávkování (chyba větší než 2 mg) hrozilo jen u 29,5% z předávkovaných pacientů, tj. u 11,6% z celé validační skupiny. Chyba ve smyslu poddávkování byla nejen častější, ale i významnější, stran chybné velikosti dávky. Chyba nad 2 mg byla zaznamenána u 46,8% poddávkových pacientů, tj. u 26,4% všech pacientů celé validační skupiny.

Uspokojivé hodnoty predikce použitelné v klinické praxi jsme dosáhli s použitím našeho algoritmu u pacientů nad 80 let věku (52,7%), s tělesnou hmotností > 100 kg (57,7%) a u pacientů s hmotností < 50 kg (97,7%).

Limitací námi vyvinutého algoritmu je nižší přesnost predikce u pacientů mladších 50 let věku ($R^2 = 38,8\%$). Nicméně obdobně nízkou přesnost predikce mají i ostatní publikované algoritmy vytvořené na derivační kohortě pacientů staršího průměrného věku. Tato nepřesnost je vyjádřena i dosti odlišným složením a poměrem prediktorů denní dávky warfarinu - u mladších a zejména dětských pacientů. Vliv věku, tělesné hmotnosti a výšky je významně vyšší u mladších pacientů, než u starší dospělé populace. Proto je i klinický význam použití farmakogenetických dat u mladších pacientů celkově nižší. V publikovaných dětských souborech se pohybuje např. vliv tělesné výšky od 29,8% do 40% (Hamberg et al, 2013), což je významně více než u starších dospělých kohort, kde je cca 10% (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium et al, 2009). Jedinou cestou, jak překonat nepřesnost pro mladší věkovou skupinu, je vytvořit speciální algoritmus pro tuto podskupinu pacientů.

5.3 Krvácivé komplikace a farmakogenetika

Naše práce prokázala vztah celkového počtu variantních alel genů *CYP2C9* a *VKORC1* a rizika vzniku závažných krvácivých komplikací při léčbě warfarinem. Významně vyšší riziko krvácení jsme zjistili pro nosiče tří variantních alel během celého průběhu léčby, během zahájení léčby i během léčby udržovací. Nejvyšší riziko ze všech možných kombinací genotypu jsme zjistili právě u pacientů s třemi variantními alelami obou studovaných genů (*CYP2C9* a *VKORC1*), navíc lze předpokládat, že ještě vyšší riziko budou mít pacienti se čtyřmi variantními alelami, kteří však díky své nízké populační frekvenci (< 0,5%) nebyli do analýzy zařazeni. Toto zjištění je zajímavé na podkladě literárně udávané nevýznamnosti podílu variantního genotypu v genu *VKORC1*, když je studován izolovaně - tj. bez ohledu na současnou přítomnost variantního genotypu v genu *CYP2C9* (Limdi et al, 2008, Meckley et al, 2008).

Dále jsme prokázali závislost kombinace genotypu v obou genech *CYP2C9* a *VKORC1* na snižující se denní dávce warfarinu a narůstajícím riziku závažných krvácivých komplikací, kdy lze riziko seřadit vzestupně podle genotypu následovně: *CYP2C9* *1/*1 + *VKORC1* B/B < *CYP2C9* *1/*1 + *VKORC1* A/B < *CYP2C9* *1/*2 + *VKORC1* B/B. Tento vztah nebyl literárně dosud argumentován.

Dalším zajímavým zjištěním této práce je pozorování konstantního rizika pacientů s třemi variantními alelami během celého časového průběhu léčby, tj. v úvodní fázi léčby (arbitrárně první tři měsíce léčby) i během pozdější udržovací fáze léčby. Oproti literárním údajům (Meckley et al, 2008, Wadelius et al, 2009) jsme nepozorovali větší množství krvácení během úvodních 3 měsíců léčby, pouze 6 pacientů (11,8%) prodělalo krvácení během této fáze léčby. Náš soubor pacientů měl dále, ve srovnání s obdobnými publikovanými kohortami, delší čas sledování - průměrně 45,7 měsíců (3,8 roku) oproti Meckley et al 3,4 roku a Wadelius et al 6 měsíců. Je zajímavé, že toto riziko zůstává významné i při současném hodnocení závažných a nezávažných krvácivých komplikací. Jedinou prací se srovnatelným výsledkem je studie Higashiho a kolektivu, kdy doba sledování byla průměrně 68 měsíců, ale vyšetřen byl pouze gen *CYP2C9*. První tři měsíce léčby bylo pozorováno

pro nosiče variantního genotypu (alely *2 a *3 *CYP2C9*) riziko HR = 3,94 (1,29 - 12,06), které sice pokleslo v udržovací fázi léčby (HR = 2,39 (1,18 až 4,86)), ale stále zůstalo významné (Higashi et al, 2002). Toto zjištění může mít významný klinický dopad na uvažování o eventuální výměně warfarinu za nově dostupná selektivní antikoagulancia (gatrany, xabany). Standardně není doporučováno pacienty stabilizované na warfarinu zaměňovat na nová antikoagulancia, nicméně v případě pacientů s variantním genotypem je pro takovou záměnu klinicky relevantní důvod.

O příčině zvýšeného rizika krvácení u pacientů s variantním genotypem nejsou přímá experimentální data a tak o ní můžeme jen spekulovat. Předpokládá se souvislost s nízkou - nižší než obvyklou dávkou, která je variantním metabolismem způsobena. Pacient s neočekávaně nižší dávkou a navíc i delším, než obvyklým poločasem warfarinu, je vystaven riziku nasazení nepřiměřeně vyšší dávky ošetřujícím lékařem, který očekává a používá standardně platná pravidla dávkování, která platí pro většinu pacientů (bez variantního genotypu). Může tak snadno dojít k předávkování pacienta nepřiměřeně velkou dávkou warfarinu. Další možnou příčinou je zvýraznění rozdílu v hladině warfarinu mezi pacienty s a bez variantního genotypu při lékových interakcích, kdy relativní vzestup/pokles hladiny warfarinu (a tedy i antikoagulačního efektu) je násobně vyšší u pacientů variantních. Poslední možností efektu menší dávky je relativně nižší farmakokinetická stabilita při nižší účinné hladině warfarinu při náhlých změnách v eliminaci nebo příjmu léku (např. dehydratace, infekce, chyby v dávkování atp.).

Naše výsledky dále potvrdily literárně udávané vyšší riziko závažného krvácení u pacientů s variantními alelami genu *CYP2C9*. Nejvýznamnějším jednotlivým prediktorem závažného krvácení byla právě přítomnost alel *2 a *3 genu *CYP2C9*. Literárních důkazů pro toto zvýšené riziko je celá řada. Nicméně jejich porovnání je složité pro odlišnou metodiku publikovaných studií. Zásadní odlišnosti existují zejména v různých použitých definicích závažnosti krvácivých komplikací - nesrovnatelné vstupní parametry pak vedou k odlišným definicím pro stejně závažná krvácení mezi jednotlivými studiemi. Publikované riziko pro nosiče variantních alel genu *CYP2C9* se pak pro závažné krvácení (podle různých definic) pohybují od HR 2,39 (1,18 až 4,86) (Higashi et al, 2002) do 3,18 (1,30 až 7,78)

(Meckley et al, 2008). Srovnatelnější data jsou pak k dispozici pro celkový počet krvácivých komplikací bez ohledu na jejich závažnost. V metaanalýze Sandersona et al (Sanderson et al, 2005) bylo zjištěno relativní riziko (RR) 1,91 (1,16 až 3,17) pro nosiče alely *2, 1,77 (1,07 až 2,91) pro nosiče alely *3, a 2,26 (1,36 až 3,75) pro nosiče nejméně jedné alely *2 nebo *3. Recentní metaanalýza Jorgensenovy skupiny (Jorgensen et al, 2012) oproti všem dosavadním analýzám neprokázala významný vliv variantní alely *CYP2C9*2* a potvrdila toto riziko jako významné pouze u nosičů alely *3. Nicméně metodicky tato kontroverzní práce měla řadu chyb - nízký počet zařazených pacientů, nehomogenní kontrolní skupina a zařazení všech typů krvácení bez ohledu na jejich závažnost. A to i přesto, že řada studií prokázala nevýznamnost vztahu variantního genotypu a rizika nezávažných krvácivých komplikací (Higashi et al, 2002, Limdi et al, 2008, Meckley et al, 2008). Naše práce ve shodě s výše citovanými autory také nepotvrdila významnou vazbu nezávažných krvácení s rizikovým genotypem. Příčinou většiny z nich je většinou drobná traumatizace, velmi často pacientem neglektovaná a tedy obtížně hodnotitelná, logicky nemající příčinnou souvztažnost s přítomností variantního genotypu. Dále je metodickým problémem nevyhnutelný bias při sběru dat o těchto krvácivých epizodách, kdy vzhledem k jejich nezávažnosti pacienti léčení warfarinem nevyhledávají lékařské ošetření, které může jako jediné poskytnout objektivizaci a následnou adjudikaci sbíraných klinických dat. Proto jsme se v naší práci soustředili, jako majorita autorů, pouze na jasná a objektivně ověřitelná závažná krvácení.

Je potřeba zmínit některé limity naší studie. Velikost vzorku (souboru) splnila kritéria statistické významnosti vypočtené před zahájením studie. Nicméně, vzhledem k nízké populační frekvenci pacientů s 4 variantními alelami (< 0,5%), nebyli zahrnuti žádní pacienti s tímto variantním genotypem, kteří by předpokladatelně byli nejzajímavější stran velikosti rizika. Rovněž některé výsledky vypočtených rizik, pro jednotlivé méně časté genotypy, je třeba interpretovat opatrně s ohledem na nízký počet zařazených pacientů (viz výsledky podle genotypu). Celková frekvence závažných krvácivých komplikací v naší kohortě (6,9 epizod na 100 paciento-roků) odpovídá obdobným publikovaným souborům. Jediným rozdílem byla námi pozorovaná nižší frekvence krvácení v iniciační fázi

léčby. Možným vysvětlením je důsledné nasazování pacientů v podmínkách hospitalizace, kdy je jistě častější frekvence kontrol INR než v ambulantním prostředí - typicky za hospitalizace denně pod dobu prvních 7 až 10 dnů, oproti 1 až 2 kontrolám v prvním týdnu u ambulantních pacientů.

Posledním nezapočteným významným faktorem, který nebyl zařazen do analýzy rizika, jsou některé možné další rizikové faktory intracerebrálního krvácení - zejména postižení mozkových tepen malého kalibru (nemoc malých tepen, leukoaraióza) nebo asymptomatická mozková mikrokrvácení (cerebral microbleeds) detekovaná magnetickou rezonancí, která nebyla hodnocena pro nekompletnost zdrojových dat. Tento faktor by byl jistě zajímavým příspěvkem v naší analýze i pro jednoznačně vyšší relativní zastoupení pacientů po prodělané cévní mozkové příhodě dané primárně vysokým nábořem pacientů do souboru z neurologických pracovišť.

5.4 Warfarin s využitím farmakogenetiky ve srovnání s novými perorálními antikoagulancii

S rapidním nástupem nové generace selektivních antikoagulancií (NOAC, new oral anticoagulants) do klinické praxe postupně od roku 2009 se stále více v odborné literatuře diskutuje otázka dalšího použití warfarinu. Do rutinní klinické praxe aktuálně vstoupily tři léky ze skupiny NOAC - přímý inhibitor trombinu - dabigatran (Pradaxa, Boehringer Ingelheim) a přímé inhibitory aktivovaného faktoru X - apixaban (Eliquis, Pfizer a Bristol-Myers Squibb) a rivaroxaban (Xarelto, Bayer). Všechny léky prokázaly svojí noninferioritu a v některých případech i superioritu v primárních konečných cílech relevantních klinických studií ve srovnání s warfarinem v následujících klinických indikacích - prevence tromboembolických komplikací u pacientů s nevalvulární fibrilací síní (dabigatran - studie RE-LY, apixaban - studie ARISTOTLE, rivaroxaban - studie ROCKET-AF) i v indikaci léčby hluboké žilní trombózy a plicní embolizace (dabigatran - studie RECOVER, apixaban - studie AMPLIFY, rivaroxaban - studie EINSTEIN).

Ve všech těchto studiích byly celkové rozdíly v efektivitě warfarinu a NOAC sice statisticky významné, ale v absolutních číslech relativně malé. Marketingově a

publikačně zdůrazňovaná redukce relativního rizika o desítky procent je postavena na rozdílu několika desítek jednotlivců s primárním konečným cílem mezi warfarinem a NOAC. Jako příklad použijme studii RE-LY srovnávající dabigatran 110 mg a 150 mg proti warfarinu (Connolly et al, 2009) .

Do studie RE-LY bylo zařazeno celkem 18113 pacientů. Primární konečný cíl - CMP nebo systémová embolizace proběhla během 1 roku sledování u 199 z 6022 pacientů (1,69%) léčených warfarinem oproti 182 z 6015 pacientů (1,53%) léčených 110 mg dabigatranu (relativní riziko, RR 0,91, 95% CI 0,74–1,11, $p = 0,34$) a 134 z 6076 pacientů (1,11%) léčených 150 mg dabigatranu (RR 0,66, 95% CI 0,53–0,82, $p < 0,001$).

Zásadní podstatou tohoto rozdílu významně nižší výskyt krvácivých cévních mozkových příhod, které jsou započteny do primárního konečného cíle - CMP a systémové embolizace. Ve skupině léčené warfarinem to bylo 45 pacientů, dabigatranem 110 mg - 14 pacientů a dabigatranem 150 mg 12 pacientů za 1 rok (viz tabulka 5.4.1). Na základě závěrů studií RE-LY, ARISTOTLE a ROCKET-AF pak řada odborných společností - zejména Evropská kardiologická společnost (European Society of Cardiology, ESC) začala uvádět NOAC jako první volbu v prevenci tromboembolismu u pacientů s fibrilací síní (Camm et al, 2012).

Nicméně ve studii RE-LY nebylo vůbec zařazeno využití farmakogenetiky. Pokud bychom aplikovali naše výsledky stran rizika krvácení podle individuálního genotypu v genech *CYP2C9* a *VKORC1* na kohortu ze studie RE-LY, pak by výsledky mohly být následující: Vyřadíme všechny pacienty s 3 nebo 4 variantními alelami ještě před zahájením léčby warfarinem. Při námi zjištěné populační frekvenci vyřadíme celkem 7,35% pacientů - tj. 443 pacientů, v kohortě zůstane 5579 pacientů. U pacientů se závažným krvácením (aproximativně stejný poměr je i u hemoragické CMP) pak víme, že tito pacienti tvoří 19,6% všech krvácení na warfarinu a že bychom teoreticky zabránili 19,6% krvácivým komplikacím jejich vyřazením - tj. hypoteticky 9 krvácením ze 45, výsledek by byl 36 krvácení z 5579 pacientů.

Tabulka 5.4.1: Studie RE-LY. Data ze studie RE-LY porovnávající dabigatran 110 mg a 150 mg oproti warfarinu přepočtená podle farmakogenetické selekce.

| | warfarin RE-LY | warfarin po odebrání 3+4VA | warfarin pouze <i>CYP2C9*1/*1</i> | dabigatran 110mg | dabigatran 150mg |
|----------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
| Celkový počet pacientů | 6022 | 5579 | 4071 | 6015 | 6076 |
| CMP a systémová embolizace | 199 | 179 | 119 | 182 | 134 |
| Systémová embolizace | 12 | 11 | 8 | 9 | 111 |
| Hemoragická CMP | 45 | 36 | 15 | 14 | 12 |
| Ischemická CMP | 142 | 132 | 96 | 159 | 111 |
| Závažná krvácení | 397 | 319 | 131 | 322 | 375 |

Tabulka 5.4.2: Poměry šancí (odds ratio, OR) všech pacientů ve studii RE-LY upravené podle farmakogenetické selekce s uvedením 95% CI.

| Parametr porovnání | dabigatran 110mg versus warfarin | dabigatran 150mg versus warfarin |
|---|----------------------------------|----------------------------------|
| CMP a systémová embolizace - warfarin všichni pacienti | 0,91 (0,74 - 1,12, p = 0,41) | 0,66 (0,53 - 0,82, p<0,001) |
| CMP a systémová embolizace - warfarin bez 3 a 4 VA pacientů | 0,94 (0,76 - 1,16, p = 0,60) | 0,68 (0,54 - 0,85, p<0,001) |
| CMP a systémová embolizace - warfarin pouze pacienti <i>CYP2C9*1/*1</i> | 1,04 (0,82 - 1,31, p = 0,81) | 0,75 (0,58 - 0,96, p = 0,03) |
| Závažná krvácení - warfarin všichni pacienti | 0,80 (0,69 - 0,93, p=0,004) | 0,93 (0,81 - 1,08, p = 0,35) |
| Závažná krvácení - warfarin bez 3 a 4 VA | 0,93 (0,80 - 1,09, p = 0,39) | 1,09 (0,93 - 1,27, p = 0,31) |
| Závažná krvácení - pouze <i>CYP2C9*1/*1</i> | 1,70 (1,39 - 2,09, p<0,001) | 1,98 (1,62 - 2,42, p<0,001) |

Druhou strategií, pak může být nasazení na warfarin pouze pacientů s genotypem *CYP2C9* *1/*1 - tj. pouze 67,6% populace, kdy víme z naší práce, že jejich poměr rizik pro závažné krvácení je významně nižší - HR = 0,51, 95% CI 0,28 - 0,93, p = 0,027. Pak dostaneme u warfarinu poměr krvácení 15 z 4071 pacientů (viz tabulka 5.4.1). Upravené výpočty podílu šancí (odds ratio) na primární konečný cíl (všechny CMP a periferní embolizace) jsou pak uvedeny v tabulce 5.4.2. Vidíme, že rozdíl mezi warfarinem a dabigatranem 110 mg zůstal nevýznamný za použití obou farmakogenetických selekcí (vyřazení pacientů s 3 a 4 VA, zařazení pouze *CYP2C9* *1/*1). Zajímavá je i změna směru statisticky nevýznamného trendu ve prospěch warfarinu OR 0,94 a OR 1,04 oproti původním 0,91 ve prospěch dabigatranu 110 mg. V případě srovnání selektované populace léčené warfarinem a dabigatranu 150 mg nedošlo ke změně výsledku porovnání - nicméně rozdíl mezi dabigatranem 150 mg a warfarinem se zmenšil ve prospěch warfarinu (OR 0,68 a OR 0,75 proti původním OR 0,66), rovněž se snížila statistická významnost rozdílu (p = 0,03 proti původním p < 0,001). Nejvýznamnější změnou, které by šlo teoreticky docílit v klinické praxi s použitím farmakogenetické selekce, je významné snížení výskytu závažných krvácivých komplikací. Ve studii RE-LY rozdíl mezi warfarinem a dabigatranem 110 mg a 150 mg nebyl významný - viz tabulka 5.4.2. Nicméně tento rozdíl se stává významným ve prospěch warfarinu při selekci pouze pacientů s wild type genotypem *CYP2C9* - riziko krvácení na dabigatranu 110 mg i 150 mg je pak významně vyšší - OR 1.70 (1,39 - 2,09, p<0,001) a 1,98 (1,62 - 2,42, p<0,001).

A to vycházíme z dat, která již v původní studii RE-LY byla pro warfarin a priori nevýhodná. Pacienti ve studii RE-LY ve warfarinové větvi byli léčeni nejen s vynecháním farmakogenetiky warfarinu, ale i bez dalších moderních technologií warfarinizace - nebylo použito individuální monitorování INR, frekvence kontrol INR nebyla příliš častá, pacienti nebyli léčeni v dedikovaných antikoagulačních centrech. To vše vedlo k relativně nízkému času v terapeutickém rozmezí (TTR) v celé studii - 64%. Moderní práce kohort ze specializovaných antikoagulačních center většinou přesahují 75%. Vezmeme-li data ze subanalýzy studie RE-LY, kde byl dabigatran srovnán s warfarinem podle kvality vedení antikoagulace (podle kvartilů

celkového TTR jednotlivých center ve studii), pak u nejlépe antikoagulovaných pacientů ve studii (TTR > 72,6%) nebyl významný rozdíl v efektivitě warfarinu proti dabigatranu 110 mg (HR 0,92, 95% CI 0,59 - 1,45) ani 150 mg (HR 0,95, 95% CI 0,61 - 1,48) (Wallentin et al, 2010). Provedeme-li obdobnou aproximaci (tabulka 5.4.3), jak je uvedeno výše, i na kohortu dobře antikoagulovaných pacientů (TTR > 72,6%), pak dojdeme k následujícím výsledkům (tabulka 5.4.4). Nejzajímavější je vymizení významnosti hlavní udávané výhody dabigatranu nad warfarinem - nižšího počtu intrakraniálních krvácení.

Tabulka 5.4.3: Počty pacientů s časem v terapeutickém rozmezí (TTR) > 72,6% ze studii RE-LY upravené podle farmakogenetické selekce.

| | warfarin RE-LY | warfarin po odebrání 3+4VA | warfarin pouze <i>CYP2C9*1/*1</i> | dabigatran 110mg | dabigatran 150mg |
|----------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
| Celkový počet pacientů | 1509 | 1398 | 1020 | 1482 | 1514 |
| CMP a systémová embolizace | 40 | 34 | 20 | 36 | 38 |
| Intrakraniální krvácení | 23 | 18 | 8 | 6 | 9 |
| Ischemická CMP | 17 | 16 | 12 | 30 | 29 |

Tabulka 5.4.4: Poměry šancí (odds ratio, uvedeny 95% CI a hladina významnosti) pacientů s časem v terapeutickém rozmezí (TTR) > 72,6% ze studii RE-LY upravené podle farmakogenetiky.

| Parametr porovnání | dabigatran 110mg versus warfarin | dabigatran 150mg versus warfarin |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| CMP a systémová embolizace warfarin s TTR > 72,6% - všichni pacienti | 0,91 (0,58 - 1,44, p = 0,73) | 0,95 (0,60 - 1,48, p = 0,82) |
| CMP a systémová embolizace warfarin s TTR > 72,6% - bez 3 a 4 VA pacientů | 1,00 (0,62 - 1,61, p = 1,00) | 1,03 (0,65 - 1,65, p = 0,91) |
| CMP a systémová embolizace warfarin s TTR > 72,6% - pouze pacienti <i>CYP2C9</i> *1/*1 | 1,25 (0,72 - 2,16, p = 0,50) | 1,29 (0,75 - 2,22, p = 0,42) |
| Intrakraniální krvácení - všichni pacienti na warfarinu s TTR > 72,6% | 0,26 (0,11 - 0,61, p = 0,002) | 0,39 (0,18 - 0,82, p = 0,01) |
| Intrakraniální krvácení warfarin s TTR > 72,6% - bez 3 a 4 VA pacientů | 0,31 (0,19 - 0,74, p = 0,01) | 0,46 (0,21 - 1,00, p = 0,05) |
| Intrakraniální krvácení - warfarin s TTR > 72,6% - pouze pacienti <i>CYP2C9</i> *1/*1 | 0,57 (0,20 - 1,61, p = 0,30) | 0,83 (0,32 - 2,16, p = 0,81) |

V porovnání s rivaroxabanem ve studii ROCKET-AF (Patel et al, 2011) by byl efekt zařazení farmakogenetiky warfarinu ještě markantnější. Vstupní počty pacientů ze studie ROCKET-AF a jejich přepočtená aproximace podle farmakogenetiky jsou uvedeny v tabulce 5.4.5, vypočtené riziko krvácení pak v tabulce 5.4.6. Celkové výsledky studie - všechny CMP se stávají nevýznamnými, tj. warfarin není horší než rivaroxaban, navíc významně klesá riziko krvácení, kdy maximální rozdíl je u pacientů s wild type genotypem *CYP2C9* - poměr šancí na závažné krvácení je u rivaroxabanu 2,59 x vyšší (2,10 - 3,19, p < 0,001).

Tabulka 5.4.5. Počty pacientů s jednotlivými konečnými cíli ze studie ROCKET-AF. Celkové počty pacientů pro jednotlivé porovnání uvedeny za lomítkem. Konečný cíl CMP a sys. embolizace uveden jako per-protocol, as-treated populace, závažná a intrakraniální krvácení na safety populaci, CMP u safety on-treatment populace.

| | warfarin ROCKET-AF | warfarin po odebrání 3+4VA | warfarin pouze <i>CYP2C9*1/*1</i> | rivaroxaban |
|--|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Celková CMP bez systémové embolizace | 211/7082 | 189/6561 | 134/4787 | 178/7082 |
| Závažná krvácení | 386/7125 | 310/6601 | 107/4817 | 395/7111 |
| Intrakraniální krvácení | 84/7125 | 67/6601 | 45/4817 | 55/7111 |
| Ischemická CMP | 161/7082 | 149/6561 | 109/4787 | 149/7061 |
| Hemoragická CMP | 50/7082 | 40/6561 | 25/4787 | 29/7061 |

Tabulka 5.4.6. Porovnání rivaroxabanu a warfarinu na základě dat studie ROCKET-AF a jejich aproximace po farmakogenetické selekci.

| Parametr porovnání | Poměr šancí (95% konfidenční interval a hladina významnosti, p) |
|---|--|
| Závažná krvácení - všichni pacienti na warfarinu (data ze studie ROCKET-AF) | 1,03 (0,89 - 1,19, p = 0,74) |
| Závažná krvácení - pacienti bez 3 a 4 VA | 1,19 (1,03 - 1,40, p = 0,03) |
| Závažná krvácení - pouze pacienti s genotypem <i>CYP2C9 *1/*1</i> | 2,59 (2,10 - 3,19, p < 0,001) |
| Intrakraniální krvácení - všichni pacienti na warfarinu (data ze studie ROCKET-AF) | 0,65 (0,47 - 0,92, p = 0,02) |
| Intrakraniální krvácení - pacienti bez 3 a 4 VA | 0,76 (0,53 - 1,09, p = 0,15) |
| Intrakraniální krvácení - pouze pacienti s genotypem <i>CYP2C9 *1/*1</i> | 0,83 (0,56 - 1,23, p = 0,36) |
| Všechny CMP - všichni pacienti na warfarinu (data ze studie ROCKET-AF) | 0,84 (0,69 - 1,03, p = 0,10) |
| Všechny CMP - pacienti bez 3 a 4 VA | 0,87 (0,71 - 1,07, p = 0,19) |
| Všechny CMP - pouze pacienti <i>CYP2C9 *1/*1</i> | 0,90 (0,71 - 1,12, p = 0,35) |

6 Závěry a zhodnocení cílů práce

6.1 Přesnost výpočtu podle publikovaných farmakogenetických algoritmů

Na námi vytvořené kohortě 280 pacientů jsme potvrdili klinickou využitelnost farmakogenetického algoritmu pro predikci denní dávky warfarinu.

V rutinní klinické praxi jsme dosáhli slušné a literárně zcela srovnatelné přesnosti predikce v porovnání s publikovanými kohortami.

Z porovnávaných publikovaných farmakogenetických algoritmů dosáhl nejvyšší hodnoty koeficientu determinace (R^2) na našem souboru pacientů stabilizovaných na warfarinu algoritmus podle Sconceové (58,4%). Oba zbylé porovnávané algoritmy měly jasně nižší přesnost predikce - podle Andersona 21,9% a podle Gage 23,8%.

Algoritmus podle Sconceové byl významně přesnější stran pravděpodobnosti, že se pacientova skutečně užívaná dávka bude nacházet $\pm 20\%$ v pásmu vypočteném podle algoritmu. Pacient má podle algoritmu Sconceové oproti algoritmu podle Gage 1,8x a podle Andersona dokonce 4x větší šanci, že vypočtená dávka bude odpovídat dávce skutečně užívané.

Nejvyšší přesnost predikce byla dosažena i u předem definovaných podskupin pacientů - s nízkou (< 50 kg) i vysokou (> 100 kg) tělesnou hmotností a pacientů starších 80 let věku.

6.2 Vlastní farmakogenetický algoritmus

Za použití vícečetné hierarchické lineární regresní analýzy jsme na podkladě dat sebrané derivační kohorty (n = 175) vytvořili vlastní farmakogenetický algoritmus:

$\sqrt{\text{Denní dávka, mg}} = (2,049 - (0,016 * [\text{věk, roky}]) + (0,007 * [\text{výška, cm}]) + (0,004 * [\text{váha, kg}]) - (0,227 * [\text{CYP2C9}^2, \text{ počet alel 0-2}]) - (0,296 * [\text{CYP2C9}^3, \text{ počet alel 0-2}]) - (0,340 * [\text{VKORC}, A/A = 0, A/B = 1, B/B = 2]) - (0,397 * \text{léčba amiodaronem [ne = 0, ano = 1]})$.

Výsledný model dosahuje vysoké hodnoty přesnosti predikce, hodnota adjustovaného koeficientu determinace je R^2 72,4%. Na validační kohortě bylo dosaženo přesnosti podle koeficientu determinace R^2 62,3% ($p < 0,001$).

Přesnost predikce našeho algoritmu byla jedna z nejvyšších dosud publikovaných obecně, i ve srovnání přímo na naší validační kohortě, s dosud publikovanými algoritmy (podle Andersona 50,1%, podle Sconceové 55,3%).

Náš algoritmus má v klinické praxi výhodnou vlastnost většího podílu predikce nižší než skutečné denní dávky, tj. častějšího poddávkování než předávkování pacienta. Chyba větší než 2 mg byla pouze u 29,5% z předávkováných pacientů.

6.3 Krvácivé komplikace a farmakogenetika

Prokázali jsme statisticky významně vyšší riziko závažných krvácivých komplikací při léčbě warfarinem pro nosiče variantního genotypu v genech *CYP2C9* a *VKORC1*.

Potvrdili jsme literárně udávané vyšší riziko krvácení pro nosiče nejméně jedné variantní alely *CYP2C9* (*2 a/nebo *3) a ještě výraznější riziko pro homozygoty pro variantní alely *CYP2C9*.

Nejzajímavějším původním zjištěním této práce bylo popsání aditivního rizika krvácení při započtení vzájemných kombinací genotypu *CYP2C9* a *VKORC1* podle celkového počtu variantních alel, kdy nejvyšší riziko závažného krvácení mají nosiči 3 variantních alel v genech *CYP2C9* a *VKORC1*. Toto riziko navíc je statisticky významné během celého časového průběhu léčby warfarinem, tj. ve fázi nasazení warfarinu, ale i během léčby udržovací.

Naopak pro wild type pacienty (genotyp *1/*1) v genu *CYP2C9* jsme prokázali významně nižší riziko závažných krvácivých komplikací.

6.4 Zhodnocení významu farmakogenetiky warfarinu

Obecně můžeme z naší vlastní více než sedmileté zkušenosti s touto metodikou konstatovat, že i přes omezený počet důkazů pro její využití má své

místo v rutinní klinické praxi specializovaných antikoagulačních center zejména u rizikových podskupin pacientů.

Vzhledem k její dostupnosti a stávající znalosti by mohla být farmakogenetika warfarinu využívána zejména při zahájení léčby warfarinem u pacientů s celkově vysokým rizikem krvácení (např. HAS-BLED skóre nad 3 body nebo u pacientů s recentním mozkovým infarktem).

Pacienti s rizikovým genetickým profilem (3 nebo 4 variantní alely) jistě budou vhodnými kandidáty na léčbu novými antikoagulancii (xabany, gatrany) a to, při zahájení antikoagulace jako lékem první volby, nebo v případě již stabilně warfarinizovaných pacientů, jako kandidáti výměny warfarinu za nová antikoagulancia.

Warfarin zejména u pacientů s nerizikovým genotypem (*CYP2C9*1/*1*) zůstává bezpečným a použitelným perorálním antikoagulanciem i ve srovnání s novějšími antikoagulancii (gatrany, xabany).

7 Seznam použité literatury

Aithal, G., Day, C., Kesteven, P. et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet*, 1999; 353 (9154): 717-719.

Altman, D. G. *Practical Statistics for Medical Research* 1991, Chapman and Hall.

Anderson, J., Horne, B., Stevens, S. et al. Randomized Trial of Genotype-Guided Versus Standard Warfarin Dosing in Patients Initiating Oral Anticoagulation. *Circulation*, 2007; 116: 2563-2570.

Anderson, J. L., Horne, B. D., Stevens, S. M. et al. A Randomized and Clinical Effectiveness Trial Comparing Two Pharmacogenetic Algorithms and Standard Care for Individualizing Warfarin Dosing (CoumaGen-II) Clinical Perspective. *Circulation*, 2012; 125 (16): 1997-2005.

Anthony, M., Romero, K., Malone, D. C. et al. Warfarin Interactions With Substances Listed in Drug Information Compendia and in the FDA-Approved Label for Warfarin Sodium. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2010; 86 (4): 425-429.

Borgiani, P., Ciccacci, C., Forte, V. et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics*, 2009; 10: 261-266.

Brent, J. and Naumov, V. *Stalin's last crime: the plot against the Jewish doctors, 1948-1953*. London, UK 2003, Harper and Collins.

Burmester, J. K., Berg, R. L., Yale, S. H. et al. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med*, 2011; 13 (6): 509-518.

Butt, H. R., Allen, E. V., and Bollman, J. L. Preparation from spoiled sweet clover (3,3'-methylene-bis-4-hydroxycoumarin) which prolongs the coagulation and prothrombin time of blood: Preliminary report of experimental and clinical studies. *Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic*, 1941; 16: 388-395.

Bye, A. and King, H. K. The biosynthesis of 4-hydroxycoumarin and dicoumarol by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. *Biochemistry Journal*, 1970; 117 (2): 237.

Caldwell, M. D., Awad, T., Johnson, J. A. et al. CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose. *Blood*, 2008; 111 (8): 4106-4112.

Camm, A. J., Lip, G. Y. H., De Caterina, R. et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: An update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation * Developed with the special

contribution of the European Heart Rhythm Association. *European Heart Journal*, 2012; 33 (21): 2719-2747.

Caraco, Y., Blotnick, S. and Muszkat, M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 83: 460-470.

Carlquist, J. F., Horne, B. D., Muhlestein, J. B. et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis*, 2006; 22: 191-197.

Cojocar, V., Balali-Mood, K., Sansom, M. S. P. et al. Structure and Dynamics of the Membrane-Bound Cytochrome P450 2C9. *PLoS Comp Biol*, 2011; 7 (8): e1002152.

Connolly, S. J., Ezekowitz, M. D., Yusuf, S. et al. Dabigatran versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*, 2009; 361 (12): 1139-1151.

D'Andrea, G., D'Ambrosio, R. L., 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 (2): 645-649.

Dickmann, L. J., Rettie, A. E., Kneller, M. B. et al. Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9* 5) expressed among African Americans. *Molecular Pharmacology*, 2001; 60 (2): 382-387.

Fihn, S. D. Risk Factors for Complications of Chronic Anticoagulation A Multicenter Study. *Annals of Internal Medicine*, 1993; 118: 511-520.

Flockhart, D. A., Skaar, T., Berlin, D. S. et al. Clinically available pharmacogenomics tests. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2009; 86 (1): 109-113.

Gage, B., Eby, C., Johnson, J. et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 84: 326-331.

Gage, B. F., Eby, C., Milligan, P. E. et al. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost*, 2004; 91: 87-94.

Gardiner, S. J. and Begg, E. J. Pharmacogenetics, drug-metabolizing enzymes, and clinical practice. *Pharmacological Review*, 2006; 58 (3): 521-590.

Geisen, C., Watzka, M., Sittinger, K. et al. VKORC1 haplotypes and their impact on the inter-individual and inter-ethnic variability of oral anticoagulation. *Thrombosis and Haemostasis*, 2005; 94 (4): 773-779.

Grønnesby, J. K. and Borgan, Ø. A method for checking regression models in survival analysis based on the risk score. *Lifetime Data Analysis*, 1996; 2 (4): 315-328.

Hamberg, A.-K., Wadelius, M., Friberg, L. E. et al. Characterising variability in warfarin dose requirements in children using modelling and simulation. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013, 10.1111/bcp.12308: n/a-n/a.

Hankey, G. J. and Warlow, C. P. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet*, 1999; 354: 1457-1463.

Hart, R., Pearce, L. and Aguilar, M. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*, 2007; 146: 857-867.

Higashi, M., Veenstra, D. L., Kondo, L. M. et al. Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy. *JAMA*, 2002; 287: 1690-1698.

Hillman, M., Wilke, R., Yale, S. et al. A prospective, randomized pilot trial of model-based warfarin dose initiation using CYP2C9 genotype and clinical data. *Clin Med Res*, 2005; 3: 137-145.

Hillman, M. A., Wilke, R. A., Caldwell, M. D. et al. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. *Pharmacogenetics*, 2004; 14: 539-547.

Holbrook, A., Pereira, J., Labiris, R. et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Archives of Internal Medicine*, 2005; 165 1095–1106.

Huang, S., Chen, H., Wang, X. et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. *Pharmacogenet Genomics*, 2009; 19: 226-234.

Ieiri, I., Tainaka, H., Morita, T. et al. Catalytic activity of three variants (Ile, Leu, and Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection using single-strand conformation polymorphism analysis. *Therapeutic drug monitoring*, 2000.

International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein, T. E., Altman, R. B. et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med*, 2009; 360: 753-764.

Joffe, H., Xu, R., Johnson, F. et al. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost*, 2004; 91: 1123-1128.

Jorgensen, A. L., FitzGerald, R. J., Oyee, J. et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 on Patient Response to Warfarin: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PloS one*, 2012; 7 (8): e44064.

Kimmel, S. E., Christie, J., Kealey, C. et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. *Pharmacogenomics J*, 2008; 8: 53-60.

Kimmel, S. E., French, B., Kasner, S. E. et al. A Pharmacogenetic versus a Clinical Algorithm for Warfarin Dosing. *New England Journal of Medicine*, 2013; 369 (24): 2283-2293.

Lenzini, P., Wadelius, M., Kimmel, S. et al. Integration of Genetic, Clinical, and INR Data to Refine Warfarin Dosing. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2010; 87 (5): 572-578.

Levine, M. N., Raskob, G., Kearon, C. et al. Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest*, 2004; 126: 287S-310S.

Limdi, N. A., Mcgwin, G., Goldstein, J. et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 83: 312-321.

Linder, M., Looney, S., Adams, J. et al. Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis*, 2002; 14: 227-232.

Lindh, J. D., Holm, L., Dahl, M. L. et al. Incidence and predictors of severe bleeding during warfarin treatment. *J Thromb Thrombolysis*, 2008; 25 (2): 151-159.

Link, K. P. The Discovery of Dicumarol and Its Sequels. *Circulation*, 1959; 19 (1): 97-107.

Loebstein, R., Dvoskin, I., Halkin, H. et al. A coding VKORC1 Asp36Tyr polymorphism predisposes to warfarin resistance. *Blood*, 2007; 109 (6): 2477-2480.

Maddison, J., Somogyi, A. A., Jensen, B. P. et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of single dose (R)- and (S)-warfarin administered separately and together: relationship to VKORC1 genotype. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2012; 75 (1): 208-216.

Maliepaard, M., Nofziger, C., Papaluca, M. et al. Pharmacogenetics in the evaluation of new drugs: a multiregional regulatory perspective. *Nature Reviews: Drug Discovery*, 2013; 12 (2): 103-114.

- Margaglione, M., Colaizzo, D., D'Andrea, G. et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*, 2000; 84: 775-778.
- May, S. and Hosmer, D. W. A cautionary note on the use of the Grønnesby and Borgan goodness-of-fit test for the Cox proportional hazards model. *Lifetime Data Analysis*, 2004; 10 (3): 283-291.
- McDonald, M., Rieder, M., Nakano, M. et al. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol*, 2009; 75: 1337-1346.
- Meckley, L., Wittkowsky, A., Rieder, M. et al. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin patients. *Thromb Haemost*, 2008; 100: 229-239.
- Miao, L., Yang, J., Huang, C. et al. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol*, 2007; 63: 1135-1141.
- Michaud, V., Vanier, M. C., Brouillette, D. et al. Combination of phenotype assessments and CYP2C9-VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 83: 740-748.
- Millican, E., Lenzini, P., Milligan, P. et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood*, 2007; 110: 1511-1515.
- Miners, J. and Birkett, D. Cytochrome P4502C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1998; 45 (6): 525.
- Nelson, D. R. The cytochrome p450 homepage. *Human Genomics*, 2009; 4 (1): 59-65.
- O'Reilly, R. A. Studies on the optical enantiomorphs of warfarin in man. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 1974; 16 (2): 348-354.
- Oldenburg, J., Bevens, C. G., Fregin, A. et al. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thrombosis and Haemostasis*, 2007; 98 (3): 570-578.
- Owen, R. P., Gong, L., Sagreiya, H. et al. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics*, 2010; 20 (10): 642-644.
- Patel, M. R., Mahaffey, K. W., Garg, J. et al. Rivaroxaban versus Warfarin in Nonvalvular Atrial Fibrillation. *New England Journal of Medicine*, 2011; 365 (10): 883-891.

- Perini, J., Struchiner, C., Silva-Assunção, E. et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 84: 722-728.
- Pirmohamed, M., Burnside, G., Eriksson, N. et al. A Randomized Trial of Genotype-Guided Dosing of Warfarin. *New England Journal of Medicine*, 2013; 369 (24): 2294-2303.
- Rieder, M., Reiner, A., Gage, B. et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *New England Journal of Medicine*, 2005; 352 (22): 2285-2293.
- Rieder, M., Reiner, A. and Rettie, A. γ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Haemos*, 2007; 5: 2227-2234.
- Ringleb, P. A., Bousser, M., Ford, G. et al. European Stroke Organization: Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack. *Cerebrovasc Dis*, 2008; 25: 457-507.
- Roderick, L. M. A Problem in the coagulation of the blood: Sweet Clover Disease of Cattle. *American Journal of Physiology*, 1931; 96 (2): 413-425.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V. et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 2004; 427: 537-541.
- Sanderson, S., Emery, J. and Higgins, J. Cyp2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis. *Genet Med*, 2005; 7: 97-104.
- Sanoski, C. A. Clinical Observations With the Amiodarone/Warfarin Interaction : Dosing Relationships With Long-term Therapy. *Chest*, 2002; 121 (1): 19-23.
- Schelleman, H., Chen, J., Chen, Z. et al. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*, 2008; 84: 332-339.
- Schulman, S. and Kearon, C. Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005; 3 (4): 692-694.
- Schwarz, U., Ritchie, M., Bradford, Y. et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med*, 2008; 358: 999-1008.

Sconce, E., Khan, T. I., Wynne, H. A. et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood*, 2005; 106: 2329-2333.

Shaw, P. B., Donovan, J. L., Tran, M. T. et al. Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 2010; 30 (2): 220-225.

Soars, M. G., Gelboin, H. V., Krausz, K. W. et al. A comparison of relative abundance, activity factor and inhibitory monoclonal antibody approaches in the characterization of human CYP enzymology. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2003; 55 (2): 175-181.

Stafford, D. W. The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2005; 3 (8): 1873-1878.

Stam, J., de Bruijn, S. S. F. T. M. and deVeber, G. Anticoagulation for cerebral sinus thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 2002, 10.1002/14651858.CD002005. (4): CD002005.

Takeuchi, F., McGinnis, R., Bourgeois, S. et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet*, 2009; 5: e1000433.

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

Tham, L. S., Nafziger, A., Guo, J. et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther*, 2006; 80: 346-355.

Tie, J.-K., Jin, D.-Y. and Stafford, D. W. Human vitamin K epoxide reductase and its bacterial homologue have different membrane topologies and reaction mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 2012; 287 (41): 33945-33955.

Valente, E. J., Trager, W. F. and Jensen, L. H. The crystal and molecular structure and absolute configuration of (-)-(S)-warfarin. *Acta Crystallographica Section B*, 1975; 31 (4): 954-960.

Van Booven, D., Marsh, S., McLeod, H. et al. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 10.1097/FPC.0b013e3283349e84: 1.

- Veenstra, D., Blough, D. K., Higashi, M. K. et al. CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther*, 2005; 77: 353-364.
- Vormfelde, S. V., Brockmoller, J., Bauer, S. et al. Relative impact of genotype and enzyme induction on the metabolic capacity of CYP2C9 in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther*, 2009; 86 (1): 54-61.
- Wadelius, M., Chen, L., Lindh, J. et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*, 2009; 113: 784-792.
- Wadelius, M., Chen, L. Y., Downes, K. et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J*, 2005; 5: 262-270.
- Wadelius, M., Chen, L. Y., Eriksson, N. et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet*, 2007; 121: 23-34.
- Wadelius, M., Sörlin, K., Wallerman, O. et al. Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors. *Pharmacogenomics Journal*, 2004; 4 (1): 40-48.
- Wallentin, L., Yusuf, S., Ezekowitz, M. D. et al. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *The Lancet*, 2010; 376 (9745): 975-983.
- Wang, T., Li, H., Tjong, W. et al. Genetic factors contribute to patient-specific warfarin dose for Han Chinese. *Clin Chim Acta*, 2008; 396: 76-79.
- Weinshilboum, R. Inheritance and drug response. *New England Journal of Medicine*, 2003; 348 (6): 529-537.
- Whirl-Carrillo, M., McDonagh, E. M., Hebert, J. M. et al. Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 2012; 92 (4): 414-417.
- Whitlon, D. S., Sadowski, J. A. and Suttie, J. W. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*, 1978; 17 (8): 1371-1377.
- Williams, P. A., Cosme, J., Ward, A. et al. Crystal structure of human cytochrome P450 2C9 with bound warfarin. *Nature*, 2003; 424 (6947): 464-468.

8 Seznam příloh - publikace k tématu disertační práce

8.1 Články, které jsou podkladem této práce

Tomek A, Maťoška V, Kolářová T, Neumann J, Šrámek M, Šarbochová I, Táborský L, Bojar M, Goetz P, Serebruany VL. The Bleeding Risk During Warfarin Therapy is Associated with Number of Variant Alleles of *CYP2C9* and *VKORC1* Genes. *Cardiology* 2013; 125(3):182-191. (IF 2012 = 1,512).

Tomek A, Kolářová T, Martinková S, Lacinová Z, Šrámek M, Šarbochová I, Neumann J, Táborský L, Maťoška V. Přesnost farmakogenetických algoritmů pro výpočet denní dávky warfarinu. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* 2013; 76/109(5):596-602. (IF 2012 = 0,372).

Tomek A, Maťoška V, Eisert C, Serebruany VL. Optimization of anticoagulation for stroke prevention: Pharmacogenetic consideration. *American Journal of Therapeutics*, 2011; 18(3):55-66. (IF 2011 = 1,487).

Tomek A, Maťoška V, Kumstýřová T. Farmakogenetické vyšetření a antikoagulační léčba warfarinem. *Medicína po promoci* 2011, 12, suppl. 2:25-29.

Tomek A, Maťoška V, Kumstýřová T, Táborský L. Využití farmakogenetiky při léčbě warfarinem. *Vnitřní lékařství. Vnitř Lék* 2009; 55(6):565-9.

Tomek A, Šarbochová I, Urbanová B, Magerová H, Maťoška V. Warfarinizace po kardioembolické cévní mozkové příhodě - komentovaná kazuistika. *Causa subita* 2013, 16(3):94-98.

Tomek A, Maťoška V. Jak a proč vůbec léčit warfarinem. *Causa Subita* 2012; 15(5):202-206.

8.2 Vybrané přednášky nebo postery na základě této disertační práce s publikovaným abstraktem

Tomek A, Matoska V, Kolarova T, Sramek M, Sarbochova I, Taborsky L, Bojar M, The effect of factor VII level on pharmacogenetic guided warfarin dosing, XXI. European Stroke Conference, Lisboa, Portugal, 22 – 25 May 2012, *Cerebrovasc Dis* 2012; 33 (Supplementum 2).

Tomek A, Maťoška V, Kumstýřová T, Ružinová K, Šťovíčková K, Šrámek M, Šarbochová I, Táborský M, Bojar M, Goetz P. Warfarin loading dose guided by pharmacogenetics is effective and safe in cardioembolic stroke patients. XX. European Stroke Conference, 24-27 May 2011, Hamburg, Germany. *Cerebrovasc Dis* 2011;31(suppl 2):31.

Tomek A, Maťoška V, Kumstýřová T, Lacinová Z, Táborský L, Bojar M. Precision of pharmacogenetics algorithms for estimation of warfarin daily dose. XIX. European Stroke Conference, 25 – 28.5. 2010, Barcelona, Španělsko. *Cerebrovasc Dis* 2010; 29(suppl. 2):320.

Tomek A, Maťoška V, Kumstýřová T, Táborský L. The Risk of Bleeding Complications in Maintenance Therapy with Warfarin is Associated with Variant Polymorphisms in the *CYP2C9* and *VKORC1* Genes. XVIII. European Stroke Conference, 26 – 29 May 2009, Stockholm, Sweden, *Cerebrovasc Dis* 2009; 27(suppl 6):63.

The Bleeding Risk during Warfarin Therapy Is Associated with the Number of Variant Alleles of CYP2C9 and VKORC1 Genes

Aleš Tomek^{a,c} Václav Maťoška^c Tereza Kolářová^c Jiří Neumann^d
Martin Šrámek^a Ivana Šarbochová^a Luděk Tábořský^c Martin Bojar^a
Petr Goetz^b Victor L. Serebruany^e

^aNeurology Department, and ^bInstitute of Medical Genetics, Charles University, 2nd School of Medicine, and ^cMolecular Genetics Laboratory, Hospital Na Homolce, Prague, and ^dNeurology Department, Hospital Chomutov, Chomutov, Czech Republic; ^eHeartDrug™ Research Laboratories, Johns Hopkins University, Baltimore, Md., USA

Key Words

Warfarin · Bleeding risk · Major bleeding event · CYP2C9 gene · VKORC1 gene

Abstract

Background: Warfarin is commonly used for the treatment and prevention of arterial and venous thromboembolism but its use is hindered by the risk of bleeding. The main reason for this risk is a narrow therapeutic index and a wide response variability after warfarin treatment. These shortcomings affect clinical outcomes including bleeding complications and may be associated with variant polymorphisms in the CYP2C9 and VKORC1 genes. **Aim:** It was the aim of this study to assess the impact of the total variant allele count of CYP2C9 and VKORC1 genes on bleeding related to warfarin treatment. **Methods:** In a retrospective cohort-design study, patients were genotyped for polymorphisms in genes CYP2C9 (*1, *2, *3) and VKORC1 (haplotype A, B). Extensive clinical data were obtained. Adjusted hazard ratios (HR) for the occurrence of major bleeding events (MBE) were counted separately for the induction and maintenance phases of

warfarin therapy. **Results:** Out of the 329 patients in our clinical database, 194 patients were eligible and included in the analysis. MBE occurred in 51 patients (26.3%) during a mean follow-up of 26 months: 6 patients (11.8%) experienced early MBE during warfarin initiation, and 45 MBE occurred during the maintenance phase. The adjusted HR for MBE risk for patients with any CYP2C9 variant allele was 1.962 [95% confidence interval (CI) 1.08–3.56, $p = 0.027$]; for the VKORC1 AA haplotype, HR was 1.841 (95% CI 0.97–3.48, $p = 0.06$), while for 3 variant allele carriers of both genes, HR was 4.34 (95% CI 1.95–9.65, $p < 0.001$). Despite the insignificant association of the VKORC1 genotype with bleeding in our study, we have noted a warfarin dose-dependent effect with risk significance ascending: CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 B/B < CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 A/B < CYP2C9 *1/*2 + VKORC1 B/B. **Conclusion:** Patients who are carriers of 3 variant alleles of the genes CYP2C9 and VKORC1 exhibited a significantly higher risk of MBE during the initiation and maintenance phases of warfarin therapy. Vigilant and careful management of patients with a higher variant allele count, including switching to newer anticoagulants, could be considered in this high-risk cohort.

Copyright © 2013 S. Karger AG, Basel

What Is Known about This Topic?

- Variant genetic polymorphisms of genes CYP2C9 and VKORC1 are associated with impaired anticoagulation after warfarin treatment, potentially impacting the therapeutic ratio, and the risk of overdose and bleeding.
- The risk of bleeding complications is higher for patients with alleles *2 and *3 of CYP2C9, especially in the initiation phase of therapy.
- Although the VKORC1 variant status has a larger effect on warfarin dose requirements than CYP2C9, it is not significantly associated with bleeding risk.

What Does This Study Add?

- A novel simplified way to assess 18 possible common variant genotype combinations of genes CYP2C9 and VKORC1 as a variant allele count (0–4).
- The bleeding risk is higher in patients with 3 variant alleles of genes CYP2C9 and VKORC1 than in patients with just isolated variant alleles in CYP2C9, which could be used as a new biomarker for bleeding risk assessment.
- The higher risk of major bleeding in patients with 3 variant alleles is pronounced during the initiation as well as the maintenance phase of warfarin therapy.
- Patients with wild-type genotype in gene CYP2C9 (*1/*1) have a significantly lower bleeding risk.

Introduction

Warfarin is the most commonly used vitamin K antagonist for treatment and prevention of arterial and venous thromboembolism. Even with the recent introduction of a newer generation of anticoagulation drugs to the clinical practice (direct thrombin inhibitors and oral factor Xa inhibitors), presumably, there will still be a major role for warfarin. Due to the notoriously known narrow therapeutic range of warfarin and the variability in patient response, it is challenging for the clinicians to manage the therapy correctly. One possible improvement in managing warfarin patients is the application of pharmacogenetics.

Adjustments of individual warfarin dose requirements are heavily related to a multitude of genetic and nongenetic factors. Those include, but are not limited to, age, sex, body size (responsible for 10–20% of dose variability) and fluctuating factors such as vitamin K intake, state of renal and hepatic metabolism, drug interactions, actual balance of hemostasis, patient compliance, and physicians' adherence to treatment control (30–40% of dose variability) [1, 2]. The individual genetic profile explains 40–60% of warfarin dose response variability.

Conclusive major influence was demonstrated for two genes that code for cytochrome P450 2C9 isoenzyme, i.e. biotransformation of warfarin (gene CYP2C9), and vitamin K epoxide reductase, i.e. warfarin target (gene VKORC1). Two common variant alleles of CYP2C9 that cause significantly decreased biotransformation of warfarin have been identified: *2 allele (R144C) and *3 allele (I359L), with overall frequencies estimated at around 20% in Caucasians [3]. The CYP2C9 *2 and *3 variant alleles are significantly associated with lower warfarin dose requirements [2, 4], above-range international normalized ratio (INR) and a probability of overdosing [4, 5], longer time above therapeutic INR range [6], longer time to reach dose stabilization [4] and higher risk of bleeding complications [4, 7, 8].

Rieder et al. [9] have identified 9 VKORC1 haplotypes, H1–H9, with 10 most common noncoding single nucleotide polymorphisms and used them to triage patients to A/A (low-dose), A/B and B/B (high-dose) haplotype groups. The variant low-dose A/A haplotype is present in 9–15% of Caucasian populations [3]. The variant haplotype is significantly associated with the required warfarin dose [9–11] and less strongly with a shorter time to achieve therapeutic INR and a probability of overanticoagulation [6, 12]. The risk of bleeding for carriers of the VKORC1 AA haplotype was reported to be nonsignificantly higher or not different when compared with non-carriers [6, 12, 13]. The most convincing association of the individual genotype and bleeding risk was reported for carriers of variant *2 and *3 alleles of gene CYP2C9 for major bleeding complications occurring during the initiation phase of therapy with warfarin [4, 6, 13].

Therefore, we assessed an association between CYP2C9 and VKORC1 variant genotype and the occurrence of major bleeding complications in a warfarin-treated cohort.

Materials and Methods

Study Settings and Design

The study was conducted at three anticoagulation clinics affiliated with the Departments of Neurology and Hematology at the University Hospital Motol (Charles University, 2nd School of Medicine, Prague, Czech Republic) and the Department of Neurology of Chomutov Hospital (Chomutov, Czech Republic) between February 2007 and February 2012 with Institutional Review Board approval. We applied a retrospective cohort design. Study subjects were recruited from consecutive consenting patients referred from participating departments for pharmacogenetic testing to the molecular genetics laboratory (Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic), a fully certified facility (CIA ISO 15189:

2007, Det Norske Veritas ISO 9001:2000) with established internal and external genotype quality control procedures. All patients were enrolled if they provided written informed consent after screening to determine eligibility for the study. Genomic data for all patients indicating CYP2C9 and VKORC1 gene variants in our laboratory simultaneously were used as a population sample for the comparison of allele frequency distribution of the CYP2C9 and VKORC1 variant genotype in a Czech population to exclude possible bias in the selection of the study sample.

Eligibility

To be eligible for the study, patients had to be treated with warfarin with available complete clinical and laboratory data from the first warfarin exposure, >18 years and compliant with study participation. To be included in the control group, patients (without major bleeding) needed to have been treated with warfarin for at least 12 months. Patients with major bleeding complications were included regardless of the length of follow-up. Exclusion criteria were noncompliance or refusal of study protocol, incomplete data and clinical factors that may have led to hemorrhage independent of warfarin therapy [diagnosis of active cancer with concurrent chemotherapy (not cancer in remission), thrombocytopenia, traumatic mechanism of bleeding, and underlying anatomic brain abnormalities, such as tumors or vascular malformations].

Clinical Data

Clinical data were abstracted from inpatient and outpatient medical records and directly from patients during regular planned visits and through regular telephone follow-up with specific emphasis on bleeding complications and with a structured questionnaire aimed at previously known and published clinical risk factors for bleeding events when treated with warfarin, i.e. elevated systolic blood pressure, detailed history of cerebrovascular disease, renal and hepatic disease, diabetes mellitus, indication and intensity of anticoagulation (higher target INR, i.e. 2.5–3.5), compliance with therapy (self-assessed and frequency of INR controls), occurrence of above-range INR (defined as >4.5 at least once during follow-up), unstable warfarin dosing (defined as presence of at least one period of time during the presumed maintenance phase of therapy with ≥ 2 warfarin dose changes on subsequent regular visits), interacting drugs at start of treatment (prescription and over-the-counter drugs including vitamins and herbal products), concomitant use of 3 or more other drugs, as well as specifically concomitant use of other drugs with bleeding risk [antiplatelet drugs, sulodexide, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)]. NSAID use was defined as daily intake for at least 4 weeks. Patients in the study were allowed to use ibuprofen, diclofenac and meloxicam [14, 15].

Genotyping

Five milliliters of peripheral blood was obtained during a regularly scheduled blood draw. Genomic DNA was isolated from whole blood with Puregene Blood Kit (Qiagen Inc., Chatsworth, Calif., USA). Genotyping was performed using the high-resolution DNA melting technique with the LightScanner system (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, Utah, USA). The Genotyping Master Mix (Cat. No. HRLS-ASY-0006; Idaho Technology) and primer/probe reagents designed for detection of alleles *2 and *3 of the gene CYP2C9 and single nucleotide polymorphism -1639-A>G (Cat. No. HRLS-ASY-007, HRLS-ASY-0010, HRLS-ASY-

0011; Idaho Technology) were used for polymerase chain reaction in PCR cyler MultiGene (Labnet International, Inc., Edison, N.J., USA).

Genotypes

Warfarin bleeding risks have been assessed according to the individual genotype using as a predefined risk factor status of being a *2, *3 and *2 or *3 allele carrier in the case of the CYP2C9 gene and low-dose haplotype A/A in the case of the VKORC1 gene. Haplotype AB was chosen as a reference genotype for the VKORC1 gene due to its average warfarin dose requirements and the highest frequency in our population, although haplotype BB has an ancestral status [16]. While testing the pharmacogenetic status of warfarin patients with the genotype data on the two most proven genes, CYP2C9 and VKORC1, there are 18 basic combinations of variant and wild-type alleles. The interaction between VKORC1 AA haplotype and CYP2C9 variants was expressed as total count of variant alleles, i.e. every person could have 0–2 variant alleles in each one of the two genes (0–4 in total).

Outcomes

The primary endpoint was the occurrence of an MBE during the therapy with warfarin. We used the criteria of the International Society on Thrombosis and Haemostasis to classify bleeding episodes as major (fatal and/or symptomatic bleeding in a critical area or organ, e.g., intracranial, intraocular, retroperitoneal, intraarticular, pericardial, or intramuscular with compartment syndrome, and/or bleeding causing a fall in hemoglobin level of 20 g/l or more or leading to transfusion of two or more units of whole blood or erythrocytes) or minor (all recorded episodes not fulfilling criteria for major bleeding) [17]. Follow-up time to the occurrence of a bleeding event was measured in weeks from the initial dose until bleeding, and total follow-up was measured in months. None of the subjects in the major bleeding cohort continued therapy after the bleeding event. All bleeding episodes were assessed for causality in relation to warfarin, whereas noncausal events were not included in the analysis (i.e. traumatic origin of bleeding).

Statistical Analysis

Predefined subgroups based on genotype were CYP2C9 wild-type patients (*1/*1), *2, *3 and 2* and 3* allele carriers, VKORC1 AA, AB and BB haplotypes carriers and subjects with 0, 1, 2, 3 and 4 variant alleles in genes CYP2C9 and VKORC1. Using χ^2 tests for categorical variables and Mann-Whitney tests for continuous variables, baseline characteristics were compared between the major bleeding and control groups.

The associations between CYP2C9 and VKORC1 genotypes and the primary and secondary endpoints were evaluated using survival analysis techniques. We used Cox proportional hazards models to compute a hazard ratio (HR) with 95% confidence interval (CI), both unadjusted and adjusted, for the potential confounding covariates. Due to the possibility of numerically unstable estimates and large standard error, we did not include all available covariates in the final Cox proportional hazards model. Therefore, a backward stepwise elimination algorithm with a likelihood ratio statistic to minimize the exclusion of predictors involved in suppressor effects was used. Variables with a p value ≤ 0.1 on univariate testing were included in the elimination algorithm. Goodness of fit of the model was tested with the Grønnesby and Borgan test for the Cox proportional hazards model [18], with the number of

risk groups based on May and Hosmer [19]. Additionally, Kaplan-Meier survival curves were created and log-rank statistics were calculated. Schoenfeld residuals were calculated for all models to assess a significant departure from the model assumption. We calculated the HR (adjusted and unadjusted) for the occurrence of MBE during the entire follow-up time and separately for the induction and maintenance phases of therapy. The arbitrary limit between the induction and maintenance phase was defined as 3 months. To avoid bias in calculating the HR for major bleeding during the entire follow-up period, we included as control subjects only patients with >12 months of documented warfarin therapy without MBE. The 12-month cut-off was chosen arbitrarily due to the higher risk of bleeding events occurring in the initiation phase of the therapy, i.e. sufficient time of warfarin exposure to manifest bleeding. To calculate the HR for the induction phase of the therapy, patients with MBE presenting after 3 months were analyzed as control group patients. All statistical analysis was done using PASW Statistics 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, Ill., USA) and STATA version 12.1 (StataCorp LP, College Station, Tex., USA) software.

Results

Out of the 329 patients in our clinical database, 194 patients were eligible and included in the analysis. Table 1 summarizes the main clinical characteristics of the study cohort. All patients in the study were of Czech (Caucasian) origin. The mean age of all patients at the start of therapy was 62.9 years. However, there was a statistically significant difference between the groups; patients with major bleeding were older (mean age 66.8 vs. 61.5 years, $p = 0.033$). There were no differences between the groups in indication of warfarin therapy. The majority of the study patients were treated with warfarin for primary (28.9%) or secondary prevention (30.4%) of thromboembolism in atrial fibrillation. The other indications for warfarin were deep vein thrombosis with or without pulmonary embolism (25.8%), mechanical heart valve replacement (6.8%) and the secondary prevention of stroke of other etiology than atrial fibrillation (paradoxical embolism and patent foramen ovale 3.6%, carotid artery dissection 1.5% and cerebral sinus thrombosis 3.1%). The therapeutic target was an INR range between 2.0 and 3.0 in all patients except for mechanical valve replacement patients (INR range 2.5–3.5).

The mean follow-up time was 45.7 months (3 years, 9 months). There were no statistically significant differences in comorbid conditions between patients with MBE and the control group, with the exception of a history of ischemic stroke, which was less prevalent in the group with MBE (23.5 vs. 39.9%, $p = 0.036$). Drugs with potential confounding factors for bleeding risk, namely NSAID and sulodexide, were used more frequently in patients

with major bleeding (NSAID, 19.6 vs. 7.0%, $p = 0.011$; sulodexide, 7.8 vs. 0.7%, $p = 0.02$). Patients with MBE were also more likely to regularly use more than three drugs (80.4 vs. 55.2%, $p = 0.002$). The final notable surprising difference was that the daily dose of warfarin in patients with bleeding events was significantly smaller (mean daily dose 3.90 vs. 5.15 mg, $p = 0.004$) when compared with nonbleeding controls. There were no other significant differences in all other concomitant medications including distribution of antiplatelet agents (acetylsalicylic acid).

The primary endpoint – MBE – occurred in 51 patients (26.3%) during the entire follow-up of 26 months (median), with a mean of 46 months (6.9 episodes of MBE per 100 patient-years). The majority of bleeding was intracranial (5 subdural, 18 intracerebral). The INR at the time of bleeding in 29 cases (56.9%) was above the therapeutic range (>3.0). Only 6 patients (11.8%) suffered MBE in the first 3 months of the therapy, while 45 patients experienced bleeding during the maintenance phase (i.e. from 3 months till the end of follow-up). Minor bleeding episodes were observed in 33 patients (17%) and were included in the analysis after adjudication for causality (majority of self-reported minor bleedings, i.e. bruising, gingival bleeding and epistaxis were discredited due to presumably traumatic origin). Additional details are provided in table 2. The prevalence of the CYP2C9 and VKORC1 wild-type and variant genotype in two cohorts is outlined in table 3. To test for population stratification, a comparison of genotype composition of the index cohort with a population sample from the same reference laboratory ($n = 1,839$) has been performed to exclude possible bias in selecting a smaller sample size. Due to the smaller sample size, we did not have any patients with 4 variant alleles in our study (0 vs. 3 patients, or 0.5% in the population sample). Otherwise, the allelic frequencies of all patients in the study cohort were not significantly different to the population sample, and both cohorts followed the Hardy-Weinberg distribution (for details, see table 3).

On the other hand, we observed significant differences between the genotype of the cohort with MBE and the control group. The prevalence of the VKORC1 AA haplotype was 31.4% in the bleeding group compared to 15.5% in controls ($p < 0.001$); the BB haplotype was more prevalent in the control group (38.1 vs. 23.5%, $p = 0.012$). Surprisingly, there were no significant differences in overall prevalence of allele *2 and *3 carriers of the CYP2C9 gene between the groups in spite of trends for a higher frequency of variant alleles in the bleeding group

Table 1. Demographics and clinical characteristics

| Variable | Patients with MBE | Patients without MBE | All patients | Groups differed significantly ¹ (p < 0.05) |
|--|-------------------|----------------------|--------------|--|
| Subjects | 51 (26.3) | 143 (73.7) | 194 | |
| Men | 27 (52.9) | 80 (55.9) | 107 (55.2) | 0.711 |
| Mean age ± SD, years | 66.8±15.572 | 61.5±17.004 | 62.9±16.768 | 0.033 |
| Patients >75 years | 21 (41.2) | 38 (26.6) | 59 (30.4) | 0.075 |
| Follow-up, months | | | | |
| Mean ± SD | 56.3±67.523 | 42.0±39.148 | 45.7±48.463 | 0.756 |
| Median | 25 | 26 | 26 | |
| Range | 1–276 | 12–216 | 1–276 | |
| Total | 2,870 | 6,002 | 8,872 | |
| Treatment data | | | | |
| INR >4.5, % | 53.8 | 23.1 | 29.9 | 0.003 |
| Mean warfarin daily dose ± SD, mg | 3.90±3.210 | 5.15±2.707 | 4.82±2.732 | |
| Median warfarin daily dose, mg | 3.21 | 5.00 | 4.55 | 0.004 |
| Warfarin therapy stable | 28 (54.9) | 100 (69.9) | 128 (66.0) | 0.052 |
| Indication for warfarin treatment | | | | |
| Ischemic stroke and atrial fibrillation | 10 (19.6) | 49 (34.3) | 59 (30.4) | 0.051 |
| Ischemic stroke, other etiology (right-left shunt/ patent foramen ovale, carotid artery dissection) | 2 (3.9) | 8 (5.6) | 10 (5.2) | 1.000 |
| Any ischemic stroke | 12 (23.5) | 57 (39.9) | 69 (35.6) | 0.036 |
| Atrial fibrillation without stroke | 16 (31.4) | 40 (28.0) | 56 (28.9) | 0.645 |
| Deep vein thrombosis/pulmonary embolism | 16 (31.4) | 34 (23.8) | 50 (25.8) | 0.287 |
| Valve replacement | 5 (9.8) | 8 (5.6) | 13 (6.7) | 0.332 |
| Cerebral sinus thrombosis | 2 (3.9) | 4 (2.8) | 6 (3.1) | 1.000 |
| Comorbid conditions | | | | |
| Hypertension | 39 (76.5) | 90 (62.9) | 129 (66.5) | 0.079 |
| Myocardial infarction, congestive heart failure | 25 (49.0) | 49 (34.3) | 74 (38.1) | 0.063 |
| Ischemic stroke | 13 (25.5) | 61 (42.7) | 74 (38.1) | 0.030 |
| Type 2 diabetes mellitus | 10 (19.6) | 29 (20.3) | 39 (20.1) | 0.918 |
| Malignancy in remission | 7 (13.7) | 13 (9.1) | 20 (10.3) | 0.350 |
| Peptic ulcer disease | 5 (9.8) | 6 (4.2) | 11 (5.7) | 0.161 |
| Hepatic disease | 1 (2.0) | 10 (7.0) | 11 (5.7) | 0.294 |
| Renal insufficiency | 4 (7.8) | 7 (4.9) | 11 (5.7) | 0.437 |
| Concomitant medication | | | | |
| Amiodarone | 8 (15.7) | 30 (21.0) | 38 (19.6) | 0.414 |
| Statin | 22 (43.1) | 43 (30.1) | 65 (33.5) | 0.090 |
| Losartane | 10 (19.6) | 19 (13.3) | 29 (14.9) | 0.277 |
| NSAIDs | 10 (19.6) | 10 (7.0) | 20 (10.3) | 0.011 |
| More than 3 drugs | 41 (80.4) | 79 (55.2) | 120 (61.9) | 0.002 |
| Antiplatelet drugs (acetylsalicylic acid) | 3 (5.9) | 5 (3.5) | 8 (4.1) | 0.435 |
| Sulodexide | 4 (7.8) | 1 (0.7) | 5 (2.6) | 0.018 |

Figures in parentheses are percentages.

¹ Using the χ^2 test, Fisher's exact test or Mann-Whitney U test, as appropriate.

(allele *2 carriers 25.5% in the bleeding group vs. 21.0% in the control group, allele *3 carriers 21.6 vs. 12.6%, allele *2 and/or *3 carriers 43.1 vs. 30.8%, respectively). The groups further differed in variant allele numbers of the VKORC1 and CYP2C9 genes. The difference was significant in the prevalence of patients with none, 2 and 3 vari-

ant alleles with distinct predominance of the variant genotype in patients with bleeding events (0 variant alleles – 15.7% in the bleeding group vs. 30.1% in the control group, p = 0.045; 2 variant alleles – 35.3 vs. 21.0%, p = 0.042; 3 variant alleles – 19.6 vs. 4.9%, p = 0.001, respectively).

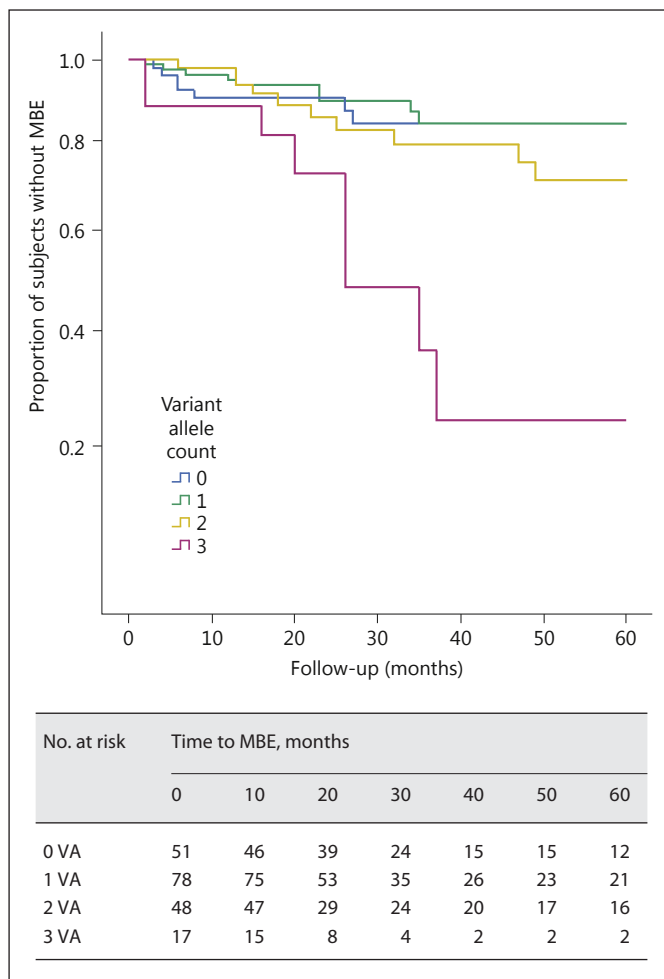


Fig. 1. Time to MBE. Curves represent Kaplan-Meier time-to-event analyses for carriers of respective number of variant alleles (VA) in genes CYP2C9 and VKORC1. $\chi^2 = 8.494$, $p = 0.004$, with log-rank test for equality of survivor function.

In the primary unadjusted Cox proportional hazards model of our cohort for the risk of major bleeding, all the traditional risk factors for bleeding including age, hypertension and history of ischemic stroke or peptic ulcer disease were not statistically significant. Unadjusted HR for MBE was significant for concomitant sulodexide use (HR = 4.3, 95% CI 1.5–12.0) and polypragmatic treatment with more than three drugs (HR = 2.503, 95% CI 1.4–4.4). There was a significantly higher risk for major bleeding in carriers of either the *2 or *3 allele of the CYP2C9 gene (HR = 1.8, 95% CI 1.03–3.2, $p = 0.039$), for homozygotes of variant CYP2C9 alleles (HR = 4.045, 95% CI 1.4–11.5, $p = 0.009$) and for carriers of 3 variant alleles in the CYP2C9 and VKORC1 genes (HR = 2.9, 95% CI 1.4–6.1, $p = 0.004$; fig. 1).

Table 2. ISTH-defined MBE

| | |
|--|-----------|
| Localization of bleeding | |
| Intracranial | 23 (45.1) |
| Gastrointestinal | 7 (13.7) |
| Epistaxis with need of transfusion | 9 (17.6) |
| Urogenital | 4 (7.8) |
| Retroperitoneal | 3 (5.9) |
| Intra-articular | 2 (3.9) |
| Mediastinal | 1 (2.0) |
| Intraocular | 1 (2.0) |
| Muscular with compartment syndrome and need of surgery | 1 (2.0) |
| INR at the time of bleeding | |
| <2.0 | 7 (13.7) |
| 2.0–3.0 | 15 (29.4) |
| >3.0 | 29 (56.9) |

Figures in parentheses are percentages. ISTH = International Society on Thrombosis and Haemostasis.

In the final adjusted model, the following covariates were included: unstable dose, concomitant amiodarone, history of deep vein thrombosis and/or pulmonary embolism, ischemic heart disease and age >80 years. The Grønnesby and Borgan goodness-of-fit test results failed to reach significance ($p = 0.59$), indicating a good overall fit of the final model.

The adjusted HR for carriers of any variant allele of CYP2C9 (*2 and/or *3) and major bleeding was 1.96 (95% CI 1.08–3.56, $p = 0.027$). There was an even higher risk for homozygotes of the CYP2C9 variant allele: HR_{adj} = 4.1, 95% CI 1.38–12.18 ($p = 0.011$). In contrast, wild-type status (*1/*1) in the CYP2C9 gene carried a significantly lower risk of MBE (HR_{adj} = 0.51, 95% CI 0.28–0.93, $p = 0.027$). This result retained significance even when adjusted for the concomitant AA haplotype of the VKORC1 gene (HR_{adj} = 0.5, 95% CI 0.27–0.91, $p = 0.023$).

When the analyses were restricted to individual CYP2C9 genotypes (e.g., *1/*3) and not to an allele carrier status, the HR estimates became unstable due to the much smaller sample size, although holding significance. The highest risk carried homozygotes for allele *3 (HR_{adj} = 74.7, 95% CI 6.5–859.0, $p = 0.001$) and homozygotes for allele *2 (HR_{adj} = 10.2, 95% CI 1.3–82.3, $p = 0.029$), although there was only 1 patient for each of these genotypes in the cohort who suffered major bleeding.

In the adjusted Cox proportional hazards model, neither the VKORC1 AA nor the BB HRs for bleeding were statistically significant: HR_{adj AA} = 1.8 (95% CI 0.97–3.5, $p = 0.06$) and HR_{adj BB} = 0.59 (95% CI 0.30–1.1, $p = 0.12$).

Table 3. Patient genotypes

| Variable | Patients with MBE (n = 51) | Patients without MBE (n = 143) | All patients in the study (n = 194) | Groups (major bleeding vs. control) differed significantly ¹ (p < 0.05) | Population sample (n = 1,839) | Groups (all study patients and population sample) differed significantly ¹ (p < 0.05) |
|--|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|-------------------------------|--|
| <i>CYP2C9</i> | | | | | | |
| 1 allele carrier, wild type (*1/*1) | 29 (56.9) | 99 (69.2) | 128 (66.0) | 0.109 | 1,232 (67.0) | 0.775 |
| *1/*2 | 10 (19.6) | 26 (18.2) | 36 (18.6) | 0.822 | 326 (17.7) | 0.774 |
| *1/*3 | 8 (15.7) | 14 (9.8) | 22 (11.3) | 0.254 | 216 (11.7) | 0.867 |
| *2/*2 | 1 (2.0) | 0 | 1 (0.5) | 0.263 | 16 (0.9) | 1.000 |
| *2/*3 | 2 (3.9) | 4 (2.8) | 6 (3.1) | 0.653 | 37 (2.0) | 0.294 |
| *3/*3 | 1 (2.0) | 0 | 1 (0.5) | 0.263 | 12 (0.7) | 1.000 |
| *2 allele carrier | 13 (25.5) | 30 (21.0) | 43 (22.2) | 0.505 | 379 (20.6) | 0.611 |
| *3 allele carrier | 11 (21.6) | 18 (12.6) | 29 (14.9) | 0.123 | 265 (14.4) | 0.839 |
| *2 or *3 allele carrier | 22 (43.1) | 44 (30.8) | 66 (34.0) | 0.109 | 607 (33.0) | 0.775 |
| <i>VKORC1</i> | | | | | | |
| AA (low-dose) haplotype | 16 (31.4) | 14 (9.8) | 30 (15.5) | <0.001 | 255 (13.9) | 0.542 |
| AB haplotype | 23 (45.1) | 67 (46.9) | 90 (46.4) | 0.829 | 816 (44.4) | 0.590 |
| BB (high-dose) haplotype | 12 (23.5) | 62 (43.4) | 74 (38.1) | 0.012 | 760 (41.3) | 0.391 |
| <i>CYP2C9 and VKORC1 variant allele number</i> | | | | | | |
| 0 VA | 8 (15.7) | 43 (30.1) | 51 (26.3) | 0.045 | 540 (29.4) | 0.370 |
| 1 VA | 15 (29.4) | 63 (44.1) | 78 (40.2) | 0.067 | 746 (40.6) | 0.923 |
| 2 VA | 18 (35.3) | 30 (21.0) | 48 (24.7) | 0.042 | 419 (22.8) | 0.537 |
| 3 VA | 10 (19.6) | 7 (4.9) | 17 (8.8) | 0.001 | 124 (6.7) | 0.292 |
| 3 VA (1 × CYP2C9 + 2 × VKORC1) | 7 (13.7) | 6 (4.2) | 13 (6.7) | 0.043 | 90 (4.9) | 1.000 |
| 3 VA (2 × CYP2C9 + 1 × VKORC1) | 3 (5.9) | 1 (0.7) | 4 (2.1) | 0.056 | 34 (1.9) | 1.000 |
| 4 VA | 0 | 0 | 0 | not applicable | 10 (0.5) | 0.612 |

Figures in parentheses are percentages. VA = Variant allele.

¹ Using the χ^2 test or likelihood ratio, as appropriate.

Most importantly, the highest bleeding risk was associated in patients with a combination of variant alleles for both genes – CYP2C9 and VKORC1. Three variant allele patients had an adjusted HR for major bleeding of 4.34 (95% CI 1.95–9.65, $p < 0.001$). In fact, 10 out of 17 patients with 3 variant alleles in our cohort had a major bleeding complication. There are two possible combinations regarding 3 variant alleles, i.e. 1 variant in CYP2C9 plus 2 variants in VKORC1, or 2 in CYP2C9 and 1 in VKORC1 gene. Both combinations carried a significant risk, with variant homozygotes in CYP2C9 having a higher risk ($HR_{adj} 2VA_{CYP2C9} 1VA_{VKORC1} = 9.54$, 95% CI 2.65–34.40, $p = 0.001$; $HR_{adj} 1VA_{CYP2C9} 2VA_{VKORC1} = 3.0$, 95% CI 1.19–7.51, $p = 0.02$; for additional details, see table 4). The risk of major bleeding in the initiation and maintenance phases of warfarin therapy was significant only for patients with 3 variant alleles in both phases of therapy, with the higher risk in the initiation phase ($HR_{adj} = 12.23$, 95% CI 1.08–138.48, $p = 0.043$) than in the maintenance phase ($HR_{adj} =$

3.65, 95% CI 1.51–8.85, $p = 0.004$). Due to the small number of patients with MBE in the initiation phase, the results for other genotypes were not significant although there was a trend for a higher bleeding risk in variant allele carriers and a lower bleeding risk in wild-type patients. In the maintenance phase of therapy, we observed a higher bleeding risk in carriers of allele *2 and *3 of the CYP2C9 gene ($HR_{adj} = 1.95$, 95% CI 1.03–3.69, $p = 0.04$) and a correspondingly lower risk in patients with wild-type CYP2C9 genotype ($HR_{adj} = 0.54$, 95% CI 0.27–0.97, $p = 0.04$).

Minor bleedings alone were not significantly associated with individual genotypes (data not shown). When we grouped major and minor bleedings as a single variable, there was a significant risk for all bleeding episodes in patients with 3 variant alleles ($HR_{adj} = 2.28$, 95% CI 1.14–4.55, $p = 0.02$), in patients with the CYP2C9 *2 allele ($HR_{adj} = 2.07$, 95% CI 1.28–3.34, $p = 0.003$) and in patients with the *3 allele ($HR_{adj} = 1.80$, 95% CI 1.02–3.15, $p = 0.041$).

Table 4. Adjusted HR for bleeding event by individual genotypes¹

| Risk factor | Level of significance (p < 0.05) | HR | 95% CI | |
|--|----------------------------------|--------|--------|---------|
| | | | lower | upper |
| CYP2C9 *1/*1 (wild type) | 0.027 | 0.510 | 0.281 | 0.926 |
| CYP2C9 *1/*2 | 0.609 | 1.215 | 0.577 | 2.560 |
| CYP2C9 *1/*3 | 0.183 | 1.735 | 0.772 | 3.902 |
| CYP2C9 *2/*2 | 0.029 | 10.199 | 1.264 | 82.286 |
| CYP2C9 *2/*3 | 0.327 | 2.084 | 0.480 | 9.049 |
| CYP2C9 *3/*3 | 0.001 | 74.678 | 6.492 | 859.007 |
| CYP2C9 *2 allele carrier (*1/*2, *2/*2, *2/*3) | 0.236 | 1.509 | 0.764 | 2.978 |
| CYP2C9 *3 allele carrier (*1/*3, *2/*3, *3/*3) | 0.040 | 2.089 | 1.035 | 4.217 |
| CYP2C9 *2 and/or *3 allele carrier (*1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) | 0.027 | 1.962 | 1.080 | 3.563 |
| CYP2C9 *2 and/or *3 allele homozygote (*2/*2, *2/*3, *3/*3) | 0.011 | 4.103 | 1.382 | 12.176 |
| VKORC1 AA haplotype (low dose) | 0.060 | 1.841 | 0.974 | 3.479 |
| VKORC1 AB haplotype (intermediate dose, wild type) | 0.964 | 1.013 | 0.570 | 1.801 |
| VKORC1 BB haplotype (high dose) | 0.116 | 0.588 | 0.304 | 1.140 |
| 0 VA | 0.152 | 0.569 | 0.264 | 1.230 |
| 1 VA | 0.142 | 0.613 | 0.319 | 1.179 |
| 2 VA | 0.376 | 1.322 | 0.713 | 2.451 |
| 3 VA | <0.001 | 4.340 | 1.951 | 9.654 |
| 3 VA (1 × CYP2C9 + 2 × VKORC1) | 0.020 | 2.989 | 1.190 | 7.508 |
| 3 VA (2 × CYP2C9 + 1 × VKORC1) | 0.001 | 9.542 | 2.647 | 34.396 |

VA = Variant allele.

¹ Adjusted for unstable dose, amiodarone, deep vein thrombosis/pulmonary embolism, ischemic heart disease, age >80 years.

Discussion

Our study reports an association of the total number of CYP2C9 and VKORC1 variant alleles with the occurrence of bleeding complications in warfarin-treated patients. Our results suggest that the risk of major bleeding is present in carriers of 3 variant alleles during the whole follow-up, including the maintenance phase of warfarin therapy.

The strongest association of bleeding risk was found with the total variant allele count of both genes (CYP2C9, VKORC1), despite some previous evidence suggesting no significant association of the VKORC1 genotype with bleeding complications [6, 13]. Importantly, there was a warfarin dose-dependent effect with risk significance ascending: CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 B/B < CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 A/B < CYP2C9 *1/*2 + VKORC1 B/B. The finding of a higher bleeding risk in carriers of 3 variant alleles was consistent through both phases of therapy, i.e. in the first 3 months but also in the maintenance phase. Moreover, this association remains consistent when major and minor bleedings were combined. Due to very low numbers of patients with 4 variant alleles [10 (0.5%) out

of 1,839 patients analyzed in our laboratory], we suspect that the bleeding risk would be even higher than in 3 variant allele patients. We could only speculate about the mechanism of influence of the variant genotype on bleeding risk during the maintenance phase. The most plausible could be the fact of lower dosing requirements with a consequently lower stability of warfarin steady state with unexpected changes in drug elimination or intake (i.e. infections, dehydration, errors in dosing, and others).

Our results confirmed previous reports describing a higher risk of major bleeding in patients with variant polymorphisms of the CYP2C9 gene. The major single genetic marker for predicting bleeding in our cohort appears to be a variant polymorphism of the CYP2C9 gene: alleles *2 and *3. The evidence base for a higher bleeding risk in variant CYP2C9 patients is substantial; however, the comparison of bleeding outcomes is complicated due to the significant variability in terms of study methodology, data collection, especially different risk analysis approaches, and definitions of bleeding. Published risk assessment data from original studies for carriers of variant versus wild-type alleles of the CYP2C9 gene range from HR 2.39 (1.18–4.86) [4] to 3.18 (1.30–7.78) [6] for major

bleeding complications, although different definitions, such as serious, major and life threatening, were applied. More comparable data can be yielded for total bleeding event count. In the meta-analysis done by Sanderson et al. [20], the relative risk of bleeding was reported as 1.91 (1.16–3.17) for carriers of allele *2, 1.77 (1.07–2.91) for allele *3, and 2.26 (1.36–3.75) for at least one of alleles *2 or *3. A more recent meta-analysis by Jorgensen et al. [21] concluded that CYP2C9 *2 allele carriers of Caucasian origin do not carry a significant risk of bleeding and that only *3 allele carriers do have a significant risk of bleeding. The limitations include a low number of patients, a nonhomogenous control group and rigorous inclusion of all bleeding complications including minor bleeding [19]. Some of the previous reports have shown that minor bleeding episodes alone were not significantly linked with variant genotype, and most of the previous significant results were found only in selected populations of major bleeding complications [4, 6, 13]. Minor bleeding events in our cohort were not influenced by variant genotype either. There is an unavoidable possible bias involved in evaluating the cause of minor bleedings derived exclusively from self-reported history (minor trauma vs. spontaneous) since patients were not usually seen immediately by medical professionals and properly adjudicated. Therefore, we concentrated on major bleeding complications in our analysis.

Further, due to a comparatively longer follow-up duration in the index study, it was suggested that patients with variant genotype (3 variant alleles and variant CYP2C9) retain a significantly higher bleeding risk in the maintenance phase of therapy. This is similar to results reported by Higashi et al. [4] and may impact possible clinical strategies to switch stabilized patients to newer anticoagulants.

Some limitations of our study are worth mentioning aside from sample size and retrospective design chosen due to overall low incidence of major bleeding complications. The results for bleeding risk estimates of less frequent genotypes in our cohort should be interpreted with caution due to potential statistical instability. However, 6.9 episodes of MBE per 100 patient-years in our cohort are well in line with available evidence. Although there was a lower proportion of major bleedings in the initiation phase of our cohort than expected, a possible explanation could be the fact that the majority of patients were initiated on warfarin under rigorous daily monitoring in an inpatient hospital setting. The source of potential bias could also be that some potential risk factors for bleeding were not collected or assessed, such as leukoaraiosis or

asymptomatic cerebral microbleeds. The higher incidence of stroke in the control group could be caused by referral from neurology departments. With the rapid advent of new anticoagulants (dabigatran, apixaban, rivaroxaban and others), there will still be a place for warfarin in the foreseeable future due to its cost and well-proven efficacy in preventing thromboembolic events at least in some regions dependent on health care funding. It is well known that if the treatment is well conducted for a longer time within the therapeutic range, the incidence of bleeding and thromboembolic adverse events during warfarin therapy is low. Moreover, the superiority of novel agents would be significantly less pronounced in well-managed patients, as shown for dabigatran in the secondary analyses of the RE-LY trial [22]. Hypothetically, if patients with 3 or 4 variant alleles would be switched from warfarin to new oral anticoagulants from the beginning, the difference in bleeding complications between drugs will be much less pronounced. Finally, further studies should evaluate affiliated costs more precisely, especially considering that warfarin is cheap around the world. In conclusion, we have confirmed a higher risk for major bleeding complications on warfarin therapy for carriers of 3 variant alleles in the CYP2C9 and VKORC1 genes. The higher risk of major bleeding in patients with 3 variant alleles is pronounced during initiation as well as during the maintenance phase of warfarin therapy. The assessment of the total variant allele count in CYP2C9 and VKORC1 genes could be further exploited as a simplified and more valid biomarker of a higher bleeding risk in warfarin-treated patients than just the assessment of the variant CYP2C9 allele carrier status alone. This information could guide clinicians weighing benefits and risks of anticoagulation with warfarin when making a clinical decision between warfarin and new anticoagulant agents.

Acknowledgements

We would like to thank Ivana Hadačová, Jitka Segethová, Hana Magerová, Ondřej Chudomel, Jaroslava Schwabová and Barbora Urbanová for patient referral, Zuzana Lacinová, Dana Bielmaczková, Vojtěch Kaplan and Simona Martínková for DNA analysis and Katarina Ružinová, Hana Harazimová and Kateřina Štovičková for their technical and data management assistance.

This study was supported by the Grant Agency of the Ministry of Industry of the Czech Republic (FR-TI 1/399).

References

- 1 Wadelius M, Chen L, Lindh J, Eriksson N, Ghori M, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P: The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009;113:784–792.
- 2 International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA: Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009;360:753–764.
- 3 Tomek A, Matoska V, Eisert C, Serebruany VL: Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. *Am J Ther* 2011;18:e55–e66.
- 4 Higashi M, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkowsky AK, Srinouanprachanhtho SL, Farin FM, Rettie AE: Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002;287:1690–1698.
- 5 Joffe H, Xu R, Johnson F, Longtine J, Kucher N, Goldhaber S: Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost* 2004;91:1123–1128.
- 6 Meckley L, Wittkowsky A, Rieder M, Rettie A, Veenstra D: An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin patients. *Thromb Haemost* 2008;100:229–239.
- 7 Aithal G, Day C, Kesteven P, Daly A: Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717–719.
- 8 Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E, Di Minno G: Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000;84:775–778.
- 9 Rieder M, Reiner A, Gage B, Nickerson D, Eby C, McLeod H, Blough D, Thummel K, Veenstra D, Rettie A: Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005;352:2285–2293.
- 10 Sconce E, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F: The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329–2333.
- 11 Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N, Wallerman O, Melhus H, Wadelius C, Bentley D, Deloukas P: Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005;5:262–270.
- 12 Schwarz U, Ritchie M, Bradford Y, Li C, Dudek S, Frye-Anderson A, Kim R, Roden D, Stein C: Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008;358:999–1008.
- 13 Limdi NA, McGwin G, Goldstein J, Beasley T, Arnett DK, Adler BK, Baird MF, Acton R: Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:312–321.
- 14 Lindh JD, Holm L, Dahl ML, Alfredsson L, Rane A: Incidence and predictors of severe bleeding during warfarin treatment. *J Thromb Thrombolysis* 2008;25:151–159.
- 15 Levine MN, Raskob G, Kearon C, Schulman S: Hemorrhagic complications of anticoagulant treatment. *Chest* 2004;126:287S–310S.
- 16 Database of Single Nucleotide Polymorphisms (DBSNP). Bethesda, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (DBSNP build ID: 119/137). http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/snp_ref.cgi?Rs=9934438.
- 17 Schulman S, Kearon C, Subcommittee on Control of Anticoagulation of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: Definition of major bleeding in clinical investigations of antihemostatic medicinal products in non-surgical patients. *J Thromb Haemost* 2005;3:692–694.
- 18 Grønnesby JK, Borgan Ø: A method for checking regression models in survival analysis based on the risk score. *Lifetime Data Anal* 1996;2:315–328.
- 19 May S, Hosmer DW: A cautionary note on the use of the Grønnesby and Borgan goodness-of-fit test for the Cox proportional hazards model. *Lifetime Data Anal* 2004;10:283–291.
- 20 Sanderson S, Emery J, Higgins J: CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005;7:97–104.
- 21 Jorgensen AL, FitzGerald RJ, Oyee J, Pirmohamed M, Williamson PR: Influence of CYP2C9 and VKORC1 on patient response to warfarin: a systematic review and meta-analysis. *PloS One* 2012;7:e44064.
- 22 Wallentin L, Yusuf S, Ezekowitz MD, Alings M, Flather M, Franzosi MG, Pais P, Dans A, Eikelboom J, Oldgren J, Pogue J, Reilly PA, Yang S, Connolly SJ, RE-LY investigators: Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *Lancet* 2010;376:975–983.

Přesnost farmakogenetických algoritmů pro výpočet denní dávky warfarinu

Accuracy of Pharmacogenetic Algorithms in Predicting Warfarin Daily Dose

Souhrn

Úvod: Při léčbě warfarinem je zapotřebí užívat široké rozpětí dávků k udržení terapeutického INR s nutností častých kontrol a následných korekcí. Na individuální senzitivitě se mimo negenetických faktorů podílí individuální genetická výbava – polymorfizmy genů *CYP2C9* a *VKORC1*. Na základě farmakogenetiky je možné před zahájením terapie odhadnout výpočtem individuální dávku warfarinu. **Cíl:** Ověřit rozložení polymorfizmů genů *CYP2C9* a *VKORC1* v české populaci a srovnat skutečnou denní dávku warfarinu s dávkou vypočtenou pomocí tří publikovaných farmakogenetických algoritmů. **Soubor a metodika:** Genotypizace *CYP2C9* a *VKORC1* byla provedena u 1 972 pacientů. Přesnost výpočtu dávky byla ověřena na souboru 280 pacientů se známou stabilizovanou dávkou warfarinu. Byla provedena genotypizace polymorfizmů ovlivňujících dávku warfarinu (alely *1, *2 a *3 *CYP2C9*, haplotypy A a B genu *VKORC1*). Od pacientů byly získány údaje relevantní pro výpočet dávky warfarinu podle porovnávaných algoritmů a skutečně užívaná dávka warfarinu. **Výsledky:** Variantní genotyp *CYP2C9* spojený se sníženou metabolizací warfarinu byl v populační kohortě přítomen následovně: heterozygoti 11,6 %, homozygoti 1,1 %. Haplotyp *A/A VKORC1* spojený s vyšší citlivostí na warfarin byl zastoupen ve 14 %. Standardní očekávatelnou dávkou warfarinu mají pacienti s žádnou (29,2 %) nebo jednou variantní alelou (41,5 %). Hodnoty koeficientu determinace (R^2) jednotlivých algoritmů byly: podle Andersona 21,9 %, Gage 23,8 % a Sconceové 58,4 %. **Závěr:** Největší přesnosti dosahuje na naší kohortě algoritmus Sconceové, kdy má pacient 4krát větší šanci, že vypočtená dávka bude ± 20 % skutečné dávky proti ostatním algoritmům. Použití farmakogenetických algoritmů je přesné u pacientů všech váhových kategorií, pacientů nad 80 let, není však výhodné u pacientů do 40 let věku.

Abstract

Introduction: Warfarin is used in a wide range of doses and requires frequent INR monitoring with respective dose adjustment. Intra-individual variability of warfarin dose is determined by the individual genotype and *CYP2C9* and *VKORC1* gene polymorphisms. Pharmacogenetic algorithms could be used to predict the daily dose of warfarin even before the initiation of warfarin treatment. **Aim of study:** To assess frequency of *CYP2C9* and *VKORC1* polymorphism in the Czech population and to compare empirical daily dose of warfarin with the dose predicted by three previously published pharmacogenetic algorithms. **Methods:** *CYP2C9* (alleles *1, *2 and *3) and *VKORC1* (haplotypes A and B) genotyping was performed in 1972 patients. Accuracy of warfarin daily dose prediction was assessed in a cohort of 280 patients with complete relevant clinical data and on a stable dose of warfarin. **Results:** The heterozygous form of the variant genotype of *CYP2C9* (reduced warfarin metabolism) was present in 11.6 % of patients in our cohort, the homozygous form was found in 1.1%. *VKORC1* haplotype *A/A* (lower sensitivity for warfarin) was present in 14% of the cohort. Standard expected mean dose of warfarin was used by patients with no (29.2%) or 1 variant allele (41.5%). Coefficients of determination (R^2) of the respective assessed algorithms were: Anderson 21.9%, Gage 23.8% and Sconce 58.4%. **Conclusion:** The algorithm by Sconce et al. provided the highest agreement between the predicted and empirical daily dose, with 4-fold higher probability that the predicted dose will be ± 20 % of the empirical dose compared to other assessed algorithms. Pharmacogenetic algorithms were found to be useful in patients of all body weight categories and in patients older than 80 years but not in patients younger than 40 years.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy. The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

A. Tomek^{1,2}, T. Kolářová²,
Z. Lacinová², S. Martinková²,
M. Šrámek¹, I. Šarbochová¹,
J. Neumann³, L. Táborský²,
V. Maťoška²

¹ Neurologická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

² Laboratoř molekulární genetiky, OKBHI, Nemocnice Na Homolce, Praha

³ Neurologické oddělení, Krajská zdravotní, a.s. – Nemocnice Chomutov, o. z.



prim. MUDr. Aleš Tomek
Neurologická klinika
2. LF UK a FN v Motole
V Úvalu 84
150 06 Praha 5
e-mail: ales.tomek@fnmotol.cz

Přijato k recenzi: 15. 2. 2013

Přijato do tisku: 13. 5. 2013

Podpora: rezortní program TIP
Ministerstva průmyslu a obchodu ČR
– FR-TI 1/399.

Klíčová slova

warfarin – farmakogenetika – protein *CYP2C9* – protein *VKORC1*

Key words

warfarin – pharmacogenetics – *CYP2C9* protein – *VKORC1* protein

Úvod

Warfarin zůstává v ČR první volbou mezi antikoagulačními léky u pacientů s kardioembolickým iktem. Tuto pozici si u nás, i přes rapidní nástup nových antikoagulantů (dabigatran, rivaroxaban, v tomto roce výhledově i apixaban), udrží ještě nejméně několik let. Důvodem jsou aktuálně platná pravidla úhrady dabigatranu a rivaroxabanu zdravotními pojišťovkami, kdy je nejdříve nutné vyzkoušet warfarin a teprve po jeho selhání je možné nasadit nové antikoagulans. Nutnou podmínkou je vždy pečlivá klinická praxe se snahou o vysoký čas v terapeutickém rozmezí, adekvátní zahajovací dávka, správná frekvence kontrol INR a optimálně i využití pokročilejších technik – selfmonitoringu INR a farmakogenetiky. Navíc pokud dosáhneme nejméně 70 % času v terapeutickém rozmezí (2,0 až 3,0), pak je efektivita warfarinu shodná s novými perorálními antikoagulanty [1].

Klíčový moment warfarinizace, kdy je velký prostor pro zásadní komplikace, představuje právě okamžik hledání správné dávky warfarinu a její stabilizace. Denní dávka warfarinu se u jednotlivých pacientů velmi liší (od 0,5 do 25 mg). Podkladem odlišností jsou za prvé faktory negenetické (věk, pohlaví, výška, váha, renální a hepatální funkce, lékové interakce, aktuální vyhlazení koagulační kaskády a další), které vysvětlují 30–50 % variability, a za druhé faktory genetické. Vliv genetiky na denní dávku byl studován u nejméně 40 genů, největší vliv je však přisuzován genům *CYP2C9* a *VKORC1*, které vysvětlí asi 40 až 60 % variability dávky.

CYP2C9

Gen *CYP2C9* kóduje jeden z enzymů systému cytochromu P450, izoenzymu 2C9, který určuje rychlost odbourávání warfarinu (farmakokinetika). V naší populaci převládá alela *1 v homozygotní formě *1/*1. Variantní alely *2 a *3 genu *CYP2C9* jsou signifikantně spojeny s nižší než obvyklou dávkou warfarinu [2,3], častějším INR nad terapeutickým rozmezím, vyšší pravděpodobností předávkování [2,4], delším časem nad terapeutickým rozmezím [5], delším časem k dosažení stabilizace dávky [2] a vyšším rizikem krvácivých komplikací [2,6,7].

VKORC1

Gen *VKORC1*, který kóduje podjednotku 1 enzymového komplexu vitamin-K-epo-

xidreduktázy (cílový enzym blokován warfarinem), a určuje tak individuální „citlivost“ na podaný warfarin (farmakodynamika). Variantní haplotyp genu *VKORC1* (haplotyp A, vysoká senzitivita na warfarin) je významně spojen s nižší dávkou warfarinu [8–11] a méně významně s kratším časem k dosažení terapeutického rozmezí s pravděpodobnějším předávkováním [5,12]. Riziko krvácivých komplikací pro nosiče haplotypu A je v různých studiích nevýznamně vyšší nebo shodné oproti nosičům nejčastějšího haplotypu indoevropské populace AB [5,12,13]. Vzácné bodové mutace v genu *VKORC1* (kodony 29, 45, 58, 66, 128) jsou odpovědné za farmakodynamický typ rezistence na warfarin, který je obvykle definován jako denní dávka vyšší než 25 mg a současně zvýšená sérová koncentrace warfarinu pro dosažení terapeutického rozmezí [14,15]. Populační frekvence těchto mutací není přesně známa, ale jedná se o velmi vzácný stav popsán jen v individuálních případech.

Celkově můžeme najít v populaci 18 různých kombinací polymorfizmů *CYP2C9* (*1, *2 a *3) a haplotypů *VKORC1* (AA, A/B a B/B). Toto rozdělení na 18 podskupin je však dosti nepraktické, a je tak snaha o zjednodušení využitelné v klinické praxi. Podíváme-li se na počet variantních alel obou genů (*CYP2C9* a *VKORC1*), současně pak můžeme rozdělit všechny pacienty podle celkového počtu variantních alel obou genů. Logicky tak má každý pacient nula až čtyři variantní alely (dvě kopie každého genu od obou rodičů). Nejvíce redukovanou dávkou warfarinu – typicky kolem 1 mg denně – mají nosiči čtyř variantních alel.

Můžeme použít tři základní strategie nasazení warfarinu:

1. empirické nasazení základní dávkou (2,5 či 5 nebo 10 mg) v prvních dnech s následnými korekcemi podle INR,
2. odhad dávky podle algoritmu využívajícího klinická data pacienta (věk, komorbidita atp.) a
3. odhad dávky podle individuálního farmakogenetického profilu pacienta.

Hlavním cílem farmakogenetického vyšetření je stanovení odhadu denní dávky warfarinu ještě před zahájením vlastní léčby. K tomuto cíli lze použít tři základní postupy. Prvním jsou dávkovací tabulky,

v nichž pokud známe genotyp pacienta, najdeme rozmezí, kde se s různě vysokou pravděpodobností bude nacházet denní dávka individuálního pacienta (např. pro genotyp *CYP2C9* *1/*1 a *VKORC* A/B: 5 až 7 mg denně). Tento postup (včetně dávkovací tabulky) doporučuje například americká FDA. Přesnost této predikce však patří k nejnižším z uvedených postupů, např. v práci Finkelmana et al [16] dosáhla tabulka úspěšné predikce (+/- 20 % denní dávky) jen u 43 % pacientů.

Druhým postupem je využití farmakogenetického algoritmu, tj. regresní analýzou vytvořeného komplexního vzorce, kde pro výpočet odhadované denní dávky dosazujeme klinická a genetická data jednotlivého pacienta. Takovýchto algoritmů byla publikována celá řada a používají odlišné vstupní parametry. Mezi nejčastěji užívanými vstupními klinickými charakteristikami pacientů patří dobře kvantifikovatelné parametry, jako jsou pohlaví, věk, výška a váha. V různé míře byly zkoušeny i další, již hůře kvantifikovatelné parametry, jako jen např. přítomnost renálního či hepatálního onemocnění nebo užívání léků ovlivňujících dávku warfarinu (induktory nebo inhibitory jaterního cytochromu P450). Přesnost predikce jednotlivých algoritmů je udávána hodnotou koeficientu determinace (R^2), která může nabývat hodnoty od 0 % (absolutní chyba) do 100 % (zcela přesný odhad). U publikovaných vzorců se hodnota R^2 pohybuje od 31 do 62 % [17].

Třetím postupem, který však ztrácí hlavní půvab metodiky (tj. predikce ještě před zahájením léčby), ale zato dosahuje nejvyšší přesnosti, je provedení výpočtu farmakogenetickým algoritmem až po několika dnech od zahájení léčby. Dosazujeme do výpočtu „průběžný mezivýsledek INR“ (např. po třech dnech podávání warfarinu), což nám umožní započítat aktuální reakci pacienta na podaný warfarin ještě před dosažením stabilizace dávky. Tento postup oboje problém špatně kvantifikovatelných vstupních charakteristik pacienta: celkové aktuální naladění stavu koagulace, dietární obsah vitamínu K, úroveň jaterního metabolismu, individuální vstupní hladiny koagulačních faktorů a jiné. Znalost průběžného INR vede k vyšší přesnosti výpočtu, R^2 se pohybuje od 69 do 72 % [18,19], ale nezabrání významnému předávkování pacientů s velmi nízkou dávkou v prvních dnech léčby.

Cíl práce

Cílem naší studie bylo:

1. ověřit populační rozložení variant genů odpovědných za denní dávku warfarinu, tj. alel genu *CYP2C9* a haplotypů genu *VKORC1*, v české populaci a
2. porovnat přesnost a klinický přínos vybraných publikovaných farmakogenetických algoritmů na našem souboru pacientů se známou, empiricky získanou a stabilizovanou dávkou warfarinu.

Soubor a metodika

V roce 2007 jsme zavedli molekulárně genetické vyšetření genů *CYP2C9* a *VKORC1*. Genomová DNA byla izolována z žilního náběru pomocí izolačního kitu (PUREGENE – Blood Kit, Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA). Genomová DNA byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (MultiGene, Labnet International, Inc., New Jersey, USA) s využitím kitového master mixu (katalogové č. HRLS-ASY-0006, Idaho Technology Inc., Utah, USA), primerů a sondami vyvinutých specificky pro detekci alel *2 a *3 genu *CYP2C9* a komerčně dostupného kitu pro detekci polymorfismu –1639-A>G (kat. č. HRLS-ASY-007, HRLS-ASY-0010, HRLS-ASY-0011, Idaho Technology Inc., Utah, USA). Genotypizace byla provedena technikou HRM (High Resolution DNA Melting) na systému LightScanner (Idaho Technology Inc., Utah, USA). Pacienti, u nichž byl nasazován warfarin, byli indikováni k vyšetření ze zúčastněných pracovišť (FN v Motole, Nemocnice Na Homolce, Nemocnice Chomutov, o. z.).

Byla vytvořena počítačová databáze pro zadávání klinických dat pacientů. Klinické údaje (celkem více než 150 položek) zahrnovaly mj. věk, výšku, váhu, indikace léčby, komorbiditu – např. hypertenze, DM, onkologická onemocnění, renální a hepatální onemocnění aj., souběžnou další medikaci, dotazník na příjem vitamínu K v potravě, veškeré údaje spojené s léčbou warfarinem – denní dávku, počet změn této dávky, výsledky INR. Klinická data byla získávána při pravidelných kontrolách, procházením nemocničních informačních systémů anebo strukturovaným telefonickým dotazníkem.

Soubor pro vstupní analýzu čítal 1 972 pacientů s provedeným testem DNA. Do souboru pro vlastní analýzu přesnosti algoritmů bylo zařazeno

280 pacientů s kompletními klinickými údaji, kteří navíc splňovali kritérium stabilizace na léčbě. Stabilita byla definována jako léčba nejméně 90 dnů a zároveň poslední dva následné náběry INR v terapeutickém rozmezí (pro laboratorní chybu definováno jako 1,8 až 3,2) v odstupu nejméně 30 dnů na stejné denní dávce warfarinu. Jiná selekce nebyla uplatněna.

Volba mezi nám dostupnými publikovanými farmakogenetickými algoritmy (celkem 16 algoritmů) byla učiněna na základě jejich publikované přesnosti na daném validizačním souboru (co nejvyšší hodnota R²) a také podle etnicity validizačního souboru, kdy pro významnou odlišnost mezi jednotlivými etniky byly vybrány jen algoritmy pro populaci kavkazského typu. Pro porovnání přesnosti byly zvoleny tři následující algoritmy využívající pouze vstupní data dostupná ještě před zahájením vlastní warfarinizace:

- podle **Sconceové et al** [8]: √denní dávka, mg = (0,628 – (0,0135 × [věk, roky]) – (0,24 × [CYP2C9*2, počet alel 0–2]) – (0,37 × [CYP2C9*3, počet alel 0–2]) – (0,241 × [VKORC, 1–3 podle haplotypu]) + (0,0162 × [výška, cm]))
- podle **Gage et al** [20]: denní dávka, mg = exp (0,9751 – 0,3238 × [VKORC, haplotyp 0–2 podle haplotypu] + 0,4317 × [povrch těla, m²] – 0,4008 × [CYP2C9*3, počet alel 0–2] – 0,00745 × věk [roky] – 0,2066 × [CYP2C9*2, počet alel 0–2] + 0,2029 × cílové INR – 0,2538 × [amiodaron, 0 nebo 1] + 0,0922 × [kouření, 0 nebo 1] – 0,0901 × [afroamerická rasa, 0 nebo 1] + 0,0644 × [DVT/PE, 0 nebo 1])
- podle **Andersona et al** [21]: týdenní dávka, mg = 1,64 × expe [3,984 + CYP2C9*1/*2 × (–0,197) + CYP2C9*1/*3 × (–0,360) + CYP2C9*2/*3 × (–0,947) + CYP2C9*2/*2 × (–0,265) + CYP2C9*3/*3 × (–1,892) + VKORC1–CT × (–0,304) + VKORC1–TT × (–0,569) + věk, roky × (–0,009) + mužské pohlaví (0,094) + váha, kg (0,003)]

Vlastní porovnání algoritmů jsme provedli následujícími způsoby:

1. lineární regresní analýzou s výpočtem koeficientu determinace (R²) mezi hodnotami dávky warfarinu skutečně

užívanými a vypočtenými jednotlivými algoritmy,

2. porovnáním počtu pacientů s odchylkou dávky skutečně užívané a predikované algoritmem, která byla menší nebo větší než 20 % užívané dávky s využitím McNemarovy modifikace chí-kvadrát testu s výpočtem poměru šancí (OR, Odds Ratio) jednotlivých pacientů na přítomnost jejich predikované hodnoty v takto definovaných pásmech. V případě odchylky mimo pásma nás zajímal poměr pacientů poddávkových či předávkových podle algoritmu,
3. porovnáním přítomnosti skutečně užívané dávky v pásmu predikovaném na základě výpočtu pro dávku warfarinu pro INR rozmezí 1,7 až 3,3 (porovnání viz bod 2). Toto pásmo uvádíme i v klinické praxi pro lékaře používající farmakogenetické algoritmy k nasazení warfarinu a jeho výpočet je založen na korekci podle Gage et al [20].

Mimo porovnání pro celý soubor jsme provedli dále arbitrárně definované podskupinové analýzy přesnosti jednotlivých algoritmů pro pacienty s obecně obtížnou warfarinizací v klinické praxi – do 40 let věku, starší 80 let, lehčích než 60 kg a těžších než 100 kg a pro skupiny pacientů s atypicky nízkou a vysokou dávkou warfarinu (< 2,5 mg a > 10 mg denně).

Všechny dávky byly porovnávány na základě vypočtené denní dávky – u pacientů užívajících nestejnou denní dávku a v případě Andersonova algoritmu, kdy je vypočtena týdenní dávka. Pro adekvátní srovnání mezi algoritmy byly upraveny algoritmy podle Sconceové a Andersona na základě výsledků Gage et al [22] o korekci pro dopočet cílového INR, které je jinak těmito vzorci počítáno pro INR 2,5. Pokud však pacient má jiné cílové INR (např. při mechanické chlopenní náhradě), byl výpočet navýšen o 11 % dávky pro vzestup INR o 0,5 podle Gage et al [20].

Statistické analýzy byly provedeny v softwaru GraphPad Prism, v.4.0 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA) a SPSS Statistics, v.18.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois, USA).

Autoři prohlašují, že studie na lidských subjektech popsáná v manu skriptu byla provedena v souladu s etickými standardy příslušné komise (institucionální a národní) odpovědné za provádění klinických

Tab. 1. Rozložení jednotlivých genotypů v genech CYP2C9 a VKORC1 v kompletní geneticky vyšetřené kohortě (n = 1 972).

| CYP2C9 genotyp | VKORC1 haplotyp B/B | VKORC1 haplotyp A/B | VKORC1 haplotyp A/A | Celkem |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| *1/*1 | 572 (29,2 %) | 586 (29,9 %) | 167 (8,5 %) | 1 325 (67,6 %) |
| *1/*2 | 135 (6,9 %) | 154 (7,9 %) | 60 (3,1 %) | 349 (17,8 %) |
| *1/*3 | 92 (4,7 %) | 102 (5,2 %) | 36 (1,8 %) | 230 (11,7 %) |
| *2/*2 | 1 (0,05 %) | 14 (0,7 %) | 1 (0,05 %) | 16 (0,8 %) |
| *2/*3 | 20 (1,0 %) | 13 (0,7 %) | 7 (0,4 %) | 40 (2,0 %) |
| *3/*3 | 1 (0,05 %) | 8 (0,4 %) | 3 (0,2 %) | 12 (0,6 %) |
| Celkem | 821 (41,9 %) | 877 (44,7 %) | 274 (14,0 %) | 1 972 (100 %) |

Počet variantních alel (VA) odlišen barevně – ■ = 0 VA, ■ = 1 VA, ■ = 2 VA, ■ = 3 VA, ■ = 4 VA.

Tab. 2. Počet pacientů s kompletními genetickými i klinickými daty v souboru pro porovnání farmakogenetických algoritmů podle jejich kombinací genotypů v genech CYP2C9 a VKORC1 (n = 280).

| CYP2C9 genotyp | VKORC1 haplotyp B/B | VKORC1 haplotyp A/B | VKORC1 haplotyp A/A | Celkem |
|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| *1/*1 | 78 (27,9 %) | 96 (34,3 %) | 23 (8,2 %) | 197 (70,3 %) |
| *1/*2 | 19 (6,8 %) | 17 (6,1 %) | 13 (4,6 %) | 49 (17,5 %) |
| *1/*3 | 12 (4,3 %) | 9 (3,2 %) | 5 (1,8 %) | 26 (9,3 %) |
| *2/*2 | 0 | 1 (0,4 %) | 0 | 1 (0,4 %) |
| *2/*3 | 5 (1,8 %) | 2 (0,7 %) | 0 | 7 (2,5 %) |
| *3/*3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Celkem | 114 (40,7 %) | 125 (44,6 %) | 41 (14,6 %) | 280 (100 %) |

Počet variantních alel (VA) odlišen barevně – ■ = 0 VA, ■ = 1 VA, ■ = 2 VA, ■ = 3 VA, ■ = 4 VA.

studií a Helsinskou deklarácí z roku 1975, revidovanou v r. 2000.

Výsledky

Rozložení genotypů CYP2C9 a VKORC1 v české populaci získané analýzou 1 972 pacientů je uvedeno v tab. 1. V genu CYP2C9 je nejčastější nosičství alely *1 v homozygotní formě (67,6 %), které odpovídá standardní metabolizaci warfarinu. Variantní alely *2 a *3 (se sníženou schopností metabolizovat warfarin) jsou nejčastější v heterozygotní formě jako *1/*2 (6,9 %) a *1/*3 (4,7 %). Homozygoti pro variantní alely genu CYP2C9 (*2/*2, *2/*3 a *3/*3) jsou zastoupeni jen v 1,1 %. Nejčastějším haplotypem genu VKORC1 je v české populaci haplotyp A/B, který nese 44,7 % popu-

lace s intermediární citlivostí na warfarin. Druhým nejčastějším je haplotyp B/B (41,9 %), jenž je odpovědný za sníženou citlivost na warfarin. Haplotyp A/A je zastoupen ve 14 % a je spojen s vyšší citlivostí na podaný warfarin. Klíčovým údajem je dále individuální kombinace variant obou genů, kterou můžeme vyjádřit počtem variantních alel (VA) od žádné do čtyř. Standardní očekávatelnou dávkou warfarinu mají pacienti s žádnou nebo jednou variantní alelou, kterých je v české populaci 29,2 % (0 VA) a 41,5 % (1 VA). V naší kohortě 280 pacientů se stabilní dávkou užívali pacienti bez variantního genotypu průměrně 6,7 ± 0,3 mg warfarinu denně, pacienti s 1 VA užívali 4,9 ± 0,2 mg denně. Nižší než obvyklou denní dávkou užívali pacienti s 2 VA

(3,8 ± 0,3 mg) a 3 VA (2,9 ± 0,3 mg). V naší populační kohortě bylo 22,7 % pacientů s 2 VA, 6,7 % s 3 VA a pouze 0,65 % se 4 VA. Žádný pacient se 4 VA nebyl zařazen do kohorty pro porovnání algoritmů, ale jejich obvyklá denní dávka warfarinu se podle našich zkušeností pohybuje kolem 1 mg denně (pro detaily tab. 2).

Porovnání přesnosti jednotlivých farmakogenetických algoritmů bylo provedeno na kohortě 280 pacientů se známou stabilní dávkou warfarinu, jejich klinické charakteristiky jsou uvedeny v tab. 3. Hlavním parametrem porovnání přesnosti predikce je hodnota koeficientu determinace R², kde nejvyšší přesnosti dosáhl algoritmus podle Sconceové (58,4 %). Oba zbylé algoritmy měly jasně nižší přesnost predikce – podle Andersona 21,9 % a podle Gage 23,8 %. Druhým parametrem srovnání byla přítomnost algoritmem predikované dávky v pásmu vymezeném ± 20 % skutečně užívané denní dávky. Nejpresnější algoritmus podle Sconceové správně predikoval u 168 (60,0 %) pacientů. Předávkováno by bylo 71 (25,4 %) pacientů, tj. vypočtená dávka byla větší než skutečně užívaná. Průměrná chyba byla 1,53 ± 0,83 mg, chyba do 2 mg byla u 87,5 % předávkovaných. Genotyp předávkovaných pacientů byl následující: 0 VA 15 (21,1 %), 1 VA 31 (43,7 %), 2 VA 18 (25,4 %) a 3 VA 7 (9,9 %). Podávkováno (vypočtená nižší než skutečně užívaná) bylo 41 (14,6 %) pacientů, a to průměrně 2,79 ± 2,18 mg. U 46,3 % podávkovaných byla chyba do 2 mg. Genotyp podávkovaných pacientů byl: 0 VA 15 (36,6 %), 1 VA 15 (36,6 %), 2 VA 8 (19,5 %) a 3 VA 3 (7,3 %). Algoritmus podle Andersona správně předpověděl dávku u 91 (32,5 %) pacientů, předávkoval 152 (54,3 %) pacientů, a to o průměrných 2,3 ± 0,99 mg. U 45,4 % předávkovaných pacientů byla chyba do 2 mg. Poddávkováno bylo 37 (13,2 %) pacientů o průměrných 3,4 ± 2,5 mg, z toho 35,1 % do 2 mg. Algoritmus podle Gage správně předpověděl dávku u 103 (36,7 %) pacientů. Předávkováno bylo 144 (51,4 %) pacientů o průměrných 3,0 ± 2,5 mg (do 2 mg byla chyba u 38,2 % předávkovaných). Poddávkováno bylo 33 pacientů o průměrných 3,3 ± 2,8 mg. Srovnání jednotlivých algoritmů proti sobě pomocí McNemarovy modifikace chí-kvadrát testu – ohledně prav-

děpodobnosti, že se pacientova skutečně užívaná dávka bude nacházet v pásmu vypočteném podle algoritmu, prokázalo jasnou nadřazenost algoritmu Sconceové proti oběma zbylým algoritmům na našem souboru. Pacient má podle algoritmu Sconceové (oproti algoritmu Andersona) 4krát větší šanci, že vypočtená dávka bude uvnitř pásma $\pm 20\%$ od skutečně užívané (Odds Ratio, OR 4,013; 95% CI 2,226–7,234; $p < 0,001$). Obdobně algoritmus podle Sconceové dává 1,8krát větší šanci na správný výsledek proti algoritmu podle Gage (OR 1,830; 95% CI 1,097–3,052; $p = 0,020$). Druhým významným výsledkem byla superiorita algoritmu podle Gage proti algoritmu podle Andersona (OR 2,063; 95% CI 1,234–3,447; $p = 0,005$), ostatní srovnání nebyla významná. Výsledky analýz přesnosti predikce pro jednotlivé podskupiny jsou uvedeny v tab. 4. Nejvyšší přesnosti dosáhl i v těchto srovnáních algoritmus podle Sconceové. Vysoká přesnost byla u pacientů s nízkou (< 50 kg) i vysokou (> 100 kg) tělesnou hmotností. Nejvyšší přesnost predikce byla dosažena u pacientů užívajících denní dávku 2,5 až 7,5 mg, vyhovující predikce byla u pacientů s nízkou dávkou ($< 2,5$ mg) a naopak nepřesné byly výpočty pro pacienty s vyšší než obvyklou dávkou (7,5 až 10 mg a > 10 mg). Zcela nepřesné jsou však všechny algoritmy pro pacienty mladší 40 let věku, nejvyššího R^2 sice opět dosáhl algoritmus Sconceové, ale přesnost predikce byla celkově nízká (18,9 %). Naopak u pacientů nad 80 let věku dosahovaly algoritmy podle Sconceové a Gage vyšší přesnost než u pacientů od 41 do 79 let věku (64,7 vs 57,8 % a 53,3 % vs 28,5 %).

Diskuze

Námi zjištěná přesnost jednotlivých algoritmů na vzorku české populace odpovídala publikované přesnosti v případě vzorce podle Sconceové. Vzorec byl vytvořen multivariátní lineární regresní analýzou klinických dat 297 pacientů (derivační kohorta) a byl ověřen na souboru dalších 38 pacientů (validační kohorta). Udávaná hodnota R^2 byla 54,2 % pro derivační kohortu, validační soubor dobře koreloval s predikovanou hodnotou – Pearsonovo r bylo 0,80 ($p < 0,001$). Náš soubor dosáhl podobného výsledku ($R^2 = 58,4\%$; Pearsonovo $r = 0,76$, $p < 0,001$) jako publiko-

Tab. 3. Klinické charakteristiky 280 pacientů v souboru pro porovnání farmakogenetických algoritmů.

| Charakteristika souboru | |
|---|----------------------------|
| průměrný věk \pm SD (minimum-maximum) [roky] | 63,1 \pm 16,24 (9–89) |
| průměrná tělesná váha \pm SD (minimum-maximum) [kg] | 83,0 \pm 17,37 (35–130) |
| průměrná tělesná výška \pm SD (minimum-maximum) [cm] | 172,1 \pm 9,82 (133–200) |
| ženské pohlaví | 131 (46,8 %) |
| průměrná užívaná denní dávka \pm SD (minimum-maximum) [mg] | 5,02 \pm 2,60 (1,0–18,0) |
| průměrná délka léčby warfarinem (minimum-maximum) [měsíců] | 36 \pm 45,15 (3–276) |
| Indikace léčby warfarinem | |
| ischemická cévní mozková příhoda – kardioembolická, disekce vnitřní karotidy, kryptogenní s prokázaným foramen ovale patens, megadolichobasilaris | 112 (40,0 %) |
| fibrilace síní bez ischemické cévní mozkové příhody | 83 (29,6 %) |
| hluboká žilní trombóza/plicní embolie | 64 (22,9 %) |
| mechanická chlopenní náhrada | 14 (5,0 %) |
| trombóza mozkových splavů | 7 (2,5 %) |
| Komorbidity | |
| hypertenze | 164 (58,5 %) |
| diabetes mellitus | 54 (19,3 %) |
| vředová choroba gastroduodenální | 16 (5,7 %) |
| ischemická choroba srdeční | 98 (35,0 %) |
| onkologické onemocnění | 31 (11,1 %) |
| renální onemocnění | 11 (3,9 %) |
| hepatální onemocnění | 20 (7,1 %) |
| Souběžně užívaná medikace s významnými interakcemi s warfarinem | |
| amiodaron | 47 (16,8 %) |
| simvastatin | 30 (10,7 %) |
| atorvastatin | 52 (18,6 %) |
| losartan/irbesartan/valsartan/telmisartan | 44 (15,7 %) |
| spironolakton | 25 (8,9 %) |
| kyselina acetylosalicylová | 12 (4,3 %) |
| sulodexid | 4 (1,4 %) |
| furosemid | 38 (13,6 %) |
| escitalopram/citalopram | 23 (8,2 %) |
| SD – směrodatná odchylka | |

vaný soubor derivační i validační. Naopak v případě algoritmů podle Gage a Andersona se naše výsledky posouzení přesnosti významně liší (23,8 % a 21,9 % proti 55 % a 47 %), více v tab. 5. Rozdíl mezi algoritmy v přesnosti lze vy-

světlit zřejmě kvalitou tvorby algoritmu, rozsahem sledovaných klinických parametrů jednotlivých souborů a také odlišnostmi v etnickém zastoupení kohort. Vyšší přesnost algoritmu Sconceové lze vysvětlit možná i preciznějším mecha-

Tab. 4. Srovnání definovaných podskupin podle koeficientů determinace (R2) jednotlivých algoritmů a přítomnosti dávky skutečně užívané v pásmu predikovaném pro INR 1,7–3,3 jednotlivými algoritmy.

| Podskupina | n | Prům. užívaná dávka w. mg ± SD | R2 Anderson | R2 Gage | R2 Sconce | pásmo 1,7–3,3 dle výpočtu Anderson | pásmo 1,7–3,3 dle výpočtu Gage | pásmo 1,7–3,3 dle výpočtu Sconce |
|----------------------------------|-----|--------------------------------|-------------|---------|-----------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| nad 80 let věku | 26 | 3,38 ± 1,40 | 28,7 % | 53,3 % | 64,7 % | 8 (30,8 %) | 11 (42,3 %) | 16 (61,5 %) |
| pod 40 let věku | 29 | 7,65 ± 3,03 | 4,7 % | 11,9 % | 18,9 % | 8 (27,6 %) | 11 (37,9 %) | 15 (51,7 %) |
| 41–79 let věku | 225 | 4,87 ± 2,42 | 13,8 % | 28,5 % | 57,8 % | 59 (26,2 %) | 72 (32,0 %) | 122 (54,2 %) |
| denní dávka warfarinu < 2,5 mg | 41 | 2,02 ± 0,46 | 0 % | 1 % | 23,8 % | 1 (2,4 %) | 9 (22,0 %) | 13 (31,7 %) |
| denní dávka warfarinu 2,5–7,5 mg | 218 | 4,69 ± 1,41 | 12,8 % | 13,6 % | 46,6 % | 70 (32,1 %) | 76 (34,9 %) | 131 (60,1 %) |
| denní dávka warfarinu 7,5–10 mg | 21 | 9,10 ± 0,86 | 0,9 % | 6,8 % | 7,6 % | 4 (19,0 %) | 9 (42,9 %) | 11 (52,4 %) |
| denní dávka warfarinu > 10 mg | 10 | 13,32 ± 3,24 | 3,6 % | 8,1 % | 5,5 % | 0 | 2 (20,0 %) | 2 (20,0 %) |
| váha pod 60 kg | 27 | 4,56 ± 3,24 | 33,4 % | 30,9 % | 53,3 % | 4 (14,8 %) | 8 (29,6 %) | 12 (44,4 %) |
| váha nad 100 kg | 38 | 6,23 ± 2,59 | 5,7 % | 54,1 % | 57,8 % | 10 (26,3 %) | 3 (7,9 %) | 23 (60,5 %) |

SD – směrodatná odchylka

Tab. 5. Porovnání přesnosti jednotlivých algoritmů – publikovaná data a naše ověření přesnosti.

| Algoritmus | Derivační kohorta – medián věku ± SD (rozmezí), [roky] | Derivační kohorta – počet pacientů, kavkazská rasa [%] | Validační kohorta – medián věku [roky] ± SD, kavkazská rasa [%] | Přesnost na derivační kohortě – koeficient determinace – R2, (počet pacientů, n) | Přesnost na naší kohortě – 280 pacientů – koeficient determinace – R2 |
|---------------------|--|--|---|--|---|
| Sconce et al [8] | 67 (26–89) | 297 (100 %) | 54,2 % | R2 nepublikováno, Pearsonovo r = 0,80, p < 0,001, (n = 38) | 58,4 % |
| Gage et al [22] | 65 ± 14 | 1 015 (83 %) | 57 %* | 55 % (n = 242)** | 23,8 % |
| Anderson et al [21] | 71 ± 12 (28–100) | 213, převážně kavkazského původu | nepublikováno | 47 %*** | 21,9 % |

SD – směrodatná odchylka, *výsledek z 83 % derivační kohorty kavkazského původu, **derivační kohorta 242 pacientů kavkazského původu, ***kohorta publikovaná Carlquistem et al bez udání algoritmu, algoritmus vypočten z derivační kohorty podle Carlquista a upraven podle literárních údajů, definitivní verze publikována v práci Anderson et al [21].

mem tvorby algoritmu. Mezi analyzované údaje souboru patřilo i měření plazmatické hladiny warfarinu a výpočet clearance obou enantiomerů warfarinu, což jistě snížilo vliv non-compliance a zpřesnilo selekci pacientů i údajů pro regresní analýzu. Vzorec podle Andersona byl vytvořen literárně blíže autory neupřesněným způsobem – kombinací dat z deri-

vační kohorty z práce Carlquista et al [23] a literárních údajů, což jistě může přispět k horší replikovatelnosti dat. Vzhledem k velmi vysoké závislosti denní dávky warfarinu na etnickém původu pro odlišnou distribuci variantních polymorfizmů mezi jednotlivými etniky je také klíčový původ derivační kohorty. Česká populace vykazuje z populačního hlediska obdobné pa-

rametry jako všechny dosud publikované kohorty populací indoevropských etnik. Z hlediska složení kohort stran etnického původu, na kterých byly jednotlivé algoritmy vytvořeny, byla anglická (100 % kavkazská populace) Sconceové nejbližší naší české kohortě. V případě Gage et al bylo jen 83 % kohorty kavkazské etnicity a Anderson přesně vůbec etnicitu

neuváděl. Obdobná práce amerických autorů na souboru 71 pacientů (z toho jen 66 % bylo kavkazského původu) [24] dospěla k obdobným výsledkům v případě algoritmu podle Sconceové ($R^2 = 54\%$). Nejlepší přesnosti dosáhl v této práci algoritmus podle Gage ($R^2 = 66\%$), který na našem souboru dosahoval jen 23,8 %. Odlišné výsledky mohou být způsobeny opět zejména etnickými rozdíly účinku warfarinu. Z toho jasně plyne potřeba ověření, popřípadě vývoj nového algoritmu pro každou lokální populaci. Je smutné, že jedna z nejcitovanějších zaslepených randomizovaných studií porovnávacích farmakogenetické a klasické empirické dávkování používala právě algoritmus podle Andersona a její negativní výsledky, spolu s nástupem nových léčiv, vedly ke snížení zájmu o tuto oblast [21]. Nicméně přesná predikce dávky warfarinu a možnost selekce pro warfarin rizikových pacientů (tři nebo čtyři variantní alely nebo variantní homozygot *CYP2C9*) jsou jistě pro klinickou praxi přínosem i na základě dostupných publikovaných dat. Rozdíly mezi warfarinem a antikoagulačními léky nové generace tak lze díky farmakogenetice minimalizovat, a tudíž léčit pacienty efektivně a bezpečně v omezených ekonomických poměrech našeho zdravotnictví.

Literatura

- Wallentin L, Yusuf S, Ezekowitz MD, Alings M, Flather M, Franzosi MG et al. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *Lancet* 2010; 376(9745): 975–983.
- Higashi MK, Veenstra DL, Kondo LM, Wittkovsky AK, Srinouanprachanhto SL, Farin FM et al. Association between *CYP2C9* genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA* 2002; 287(13): 1690–1698.
- International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009; 360(8): 753–764.
- Joffe HV, Xu R, Johnson FB, Longtine J, Kucher N, Goldhaber SZ. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost* 2004; 91(6): 1123–1128.
- Meckley LM, Wittkovsky AK, Rieder MJ, Rettie AE, Veenstra DL. An analysis of the relative effects of *VKORC1* and *CYP2C9* variants on anticoagulation related outcomes in warfarin patients. *Thromb Haemost* 2008; 100(2): 229–239.
- Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ, Daly AK. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 *CYP2C9* with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; 353(9154): 717–719.
- Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, Brancaccio V, Ciampa A, Grandone E et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000; 84(5): 775–778.
- Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP et al. The impact of *CYP2C9* and *VKORC1* genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106(7): 2329–2333.
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL et al. Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352(22): 2285–2293.
- Veenstra DL, Blough DK, Higashi MK, Farin FM, Srinouanprachan S, Rieder M et al. *CYP2C9* haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 77(5): 353–364.
- Wadelius M, Chen LY, Downes K, Ghori J, Hunt S, Eriksson N et al. Common *VKORC1* and *GGCX* polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005; 5(4): 262–270.
- Schwarz UI, Ritchie MD, Bradford Y, Li C, Dudek SM, Frye-Anderson A et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008; 358(10): 999–1008.
- Limdi NA, McGwin G, Goldstein JA, Beasley TM, Arnett DK, Adler BK et al. Influence of *CYP2C9* and *VKORC1* 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 83(2): 312–321.
- Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz H et al. Mutations in *VKORC1* cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427(6974): 537–541.
- Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A, Geisen C, Müller-Reible C, Watzka M. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant *VKORC1* and *CYP2C9* alleles. *Thromb Haemost* 2007; 98(3): 570–578.
- Finkelmann BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE. Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(5): 612–618.
- Tomek A, Matoska V, Eisert C, Serebruany VL. Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. *Am J Ther* 2011; 18(3): e55–e66.
- Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE, Grosso L, Eby C, Deych E et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007; 110(5): 1511–1515.
- Horne BD, Lenzini PA, Wadelius M, Jorgensen AL, Kimmel SE, Ridker PM et al. Pharmacogenetic warfarin dose refinements remain significantly influenced by genetic factors after one week of therapy. *Thromb Haemost* 2012; 107(2): 232–240.
- Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84(3): 326–331.
- Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116(22): 2563–2570.
- Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 2004; 91(1): 87–94.
- Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, Lappé DL, Whiting BM, Kolek MJ et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, *CYP2C9*, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22(3): 191–197.
- Shaw PB, Donovan JL, Tran MT, Lemon SC, Burgwinkle P, Gore J. Accuracy assessment of pharmacogenetically predictive warfarin dosing algorithms in patients of an academic medical center anticoagulation clinic. *J Thromb Thrombolysis* 2010; 30(2): 220–225.

Optimization of Anticoagulation with Warfarin for Stroke Prevention: Pharmacogenetic Considerations

Ales Tomek, MD,^{1,2} Vaclav Matoska, MD,² Christian Eisert, BS, MPH,³
and Victor L. Serebruany, MD, PhD^{3*}

Warfarin is a cornerstone of oral anticoagulation for stroke prevention. Anticoagulation with warfarin in patients with atrial fibrillation is over twice as effective in secondary prevention of stroke as any other tested alternatives, including all other antithrombotic drugs or surgical interventions. General belief is that warfarin is capable of preventing 20 ischemic strokes for every hemorrhagic one it causes. However, warfarin is one of the most feared agents as a result of its woeful safety profile and difficulties in maintaining the proper daily dose. Recent research in pharmacogenetics predominantly focused on elucidating the influence of individual genetic predispositions to administered warfarin. Although the incorporation of genotype information improves the accuracy of adequate dose prediction, an improvement in anticoagulation control or a reduction in hemorrhagic complications has not been yet convincingly demonstrated. It is clear that identifying an individual patient's risk for hemorrhage on warfarin will require more broad clinical and genetic studies. Future research focused on patients with stroke should concentrate on defining the possible differences, especially focusing on predicting bleeding events in general and intracranial hemorrhages in particular. The purpose of this review is to summarize the existing evidence about pharmacogenetics of warfarin in general, especially focusing on stroke prevention.

Keywords: Warfarin, stroke prevention, pharmacogenetics

INTRODUCTION

Warfarin is the most commonly used vitamin K antagonist for treatment and prevention of arterial and venous thromboembolism and currently is an oral anticoagulant of choice for stroke prevention. Considering the fact that stroke represents the third leading cause of death in developed countries and is responsible for mortality of approximately 10% of the world population, optimization of warfarin therapy is indeed important. Oral anticoagulation is

recommended after ischemic stroke of cardioembolic origin (either with or without atrial fibrillation) and in some specific clinical scenarios after noncardioembolic ischemic stroke such as cervical artery dissection, patent foramen ovale in the presence of proven embolic source or atrial septal aneurysm, aortic atheromas, and fusiform aneurysms of basilar artery.^{1,2} Anticoagulation may also be beneficial and is commonly used in treatment of cerebral sinus thrombosis.³

Anticoagulation with warfarin in patients with atrial fibrillation is over twice as effective in secondary prevention of stroke than any other tested alternatives, including all other antithrombotic drugs or surgical interventions. It is generally believed that warfarin is capable of preventing 20 ischemic strokes for every hemorrhagic one it causes. In patients with non-valvular atrial fibrillation, warfarin reduces stroke (primary prevention) by approximately 60%, ie, by 40% more efficiently than antiplatelet therapy,⁴ with a relative risk reduction of 67% for secondary prevention of stroke in patients with atrial fibrillation.⁵

¹Neurology Department, Charles University, 2nd Medical School, Prague, Czech Republic; ²Laboratory of Molecular Diagnostics, Hospital Na Homolce, Prague, Czech Republic; and ³HeartDrug™ Research Laboratories; Johns Hopkins University Baltimore, MD. *Address for correspondence: HeartDrug™ Research Laboratories, Osler Medical Center, 7600 Osler Drive, Suite 307, Towson, MD 21204. E-mail: Heartdrug@aol.com

On the other hand, warfarin is one of the most feared agents as a result of its woeful safety profile and difficulties in maintaining the proper daily dose. Some scientific evidence has been generated in the last couple of years with regard to pharmacogenetics of warfarin. Recent research in this field is predominantly focused on elucidating the influence of individual genetic predispositions to administered warfarin. Better understanding of pharmacogenetics is probably one of the most promising chances to make warfarin safer for patients and friendlier for physicians. The purpose of this review is to summarize the existing evidence about pharmacogenetics of warfarin in general, especially focusing on stroke prevention.

Dose response variability

Required daily dose of warfarin is dependent on genetic and nongenetic factors.

Nongenetic factors are responsible for approximately 40% to 50% of dose variability. For the purpose of dose estimation with the help of pharmacogenetic algorithms, we can divide nongenetic factors into quantifiable and definable: age, sex, body size (responsible for 10%–20% of dose variability), and relatively non-quantifiable or fluctuating: vitamin K intake, state of renal and hepatic metabolism, drug interactions, actual balance of hemostasis, patient compliance, and physicians' adherence to treatment control (30%–40% of dose variability).^{6,7}

Genetics

Individual genetic profile explains 40% to 60% of warfarin dose variability. The research in the field of warfarin pharmacogenetics is explosive. There are currently more than 30 gene suspects under scrutiny, polymorphisms of which may influence dose variability. Conclusive impact was demonstrated just for two of them, CYP2C9 and VKORC1, explaining approximately 40% of warfarin dose variability.^{7,8}

CYP2C9

Gene CYP2C9 coding for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 9 isoenzyme has been known since 1995. Within the CYP2C9 gene family, 40 alleles are currently recognized by the P450 Nomenclature Committee (www.cypalleles.ki.se). Just two of them, CYP2C9*2 and *3, significantly influence warfarin dose variability and clinical outcomes. Allele CYP2C9*1 (wild-type) is being the most frequent (approximately 80%–90% of the population depending on ethnicity). The carriers of alleles CYP2C9*2 and *3 have decreased biotransformation and require less warfarin (Table 1).

American Journal of Therapeutics (2010) 0(0)

Polymorphisms in CYP2C9 account for 6% to 16% of warfarin dose variability.^{6–9}

VKORC1

Warfarin causes inhibition of vitamin K epoxide reductase by blocking the vitamin K cycle. VKORC1 is the gene encoding the warfarin target enzyme, vitamin K epoxide reductase complex subunit-1, studied in connection to warfarin dose variation since 2005.⁸ Rieder et al have identified nine VKORC1 haplotypes, H1 to H9, with 10 most common non-coding single-nucleotide polymorphisms and used them to triage patients to A/A (low-dose), A/B, and B/B (high-dose) haplotype groups (see Table 1 for details). Polymorphisms in VKORC1 account for 21% to 32% of warfarin dose variability.^{6–9}

Other genes

Warfarin is a racemic mixture of two enantiomers, S-warfarin and R-warfarin, with a ratio of S/R = 0.5:1. The mixture undergoes stereoselective metabolism by isoenzymes of cytochrome P450. Five times more potent S-warfarin is metabolized mainly by CYP2C9 and less potent R-warfarin by CYP1A2 and CYP2C19. The effect of CYP1A2 and CYP2C19 on dose requirement is not significant.¹⁰

There is growing evidence for contribution of a third gene with a minor effect on warfarin dose, which is CYP4F2. Patients with described polymorphisms are likely to have elevated hepatic levels of vitamin K₁.¹¹ Between 4% and 7% of dose variance is explained by CYP4F2 polymorphisms.^{12,13} Nevertheless, the current data are still not significantly validated by prospective clinical studies. Other previously reported encouraging data with GGCX, APOE, PROC, EPHX1, and ORM1-2 genes were not confirmed in later reports or are still lacking confirmatory clinical studies.^{10,14–16} It seems probable that the inclusion of mentioned genes might explain approximately 10% of warfarin dose variability, which is currently unaccounted for.

Pharmacogenetics and clinical outcomes

CYP2C9

The CYP2C9*2 and *3 variant alleles are significantly associated with lower warfarin dose requirements,^{6,17} above range international normalized ratios (INRs), and probability of overdosing,^{17,18} longer time above therapeutic INR range,¹⁹ longer time to reach dose stabilization,¹⁷ and higher risk of bleeding complications.^{17,20,21}

The major genetic marker for predicting bleeding appears to be a variant polymorphism of CYP2C9 gene: alleles *2 and *3. Homozygosity for variant

www.americantherapeutics.com

Table 1. The Effect of genotype on warfarin dose and Its ethnic distribution.

| Warfarin metabolism and sensitivity | Genotype | Warfarin dose change (mg; %) | Frequency in populations (%) |
|---|------------------------|---------------------------------------|--|
| Wild-type, normal metabolism | CYP2C9*1 | Reference for CYP2C9 | Whites 61–81 ^{7,39,43} Asians 90–91 ^{42,44} Blacks 90–94 ^{27,39,43} |
| Intermediate metabolism | CYP2C9*2 | 17% | Whites 13–26 ^{7,39,43} |
| | CYP2C9*1/*2 | 19.6% | Asians less than 1 ^{42,44} |
| | CYP2C9*2/*2 | 36.0% | Blacks 2–9 ^{27,39,43} |
| Low metabolism | CYP2C9*3 | 37% | Whites 61–81 ^{7,39,43} |
| | CYP2C9*1/*3 | 33.7% | Asians 9–10 ^{42,44} |
| | CYP2C9*2/*3 | 56.7% | Blacks less than 1–3 ^{27,39,43} |
| | CYP2C9*3/*3 | 78.1% | |
| High sensitivity, low dose | AA haplotype VKORC1 | 27.3% (~3.2 mg/day) | Whites 9–15 ^{7,26,43} Asians 77–84 ^{42,44} Blacks less than 1 ^{26,27,43} |
| Intermediate sensitivity, intermediate dose | AB haplotype VKORC1 | Reference for VKORC1 (~4.4 mg/day) | Whites 45–50 ^{7,26,43} Asians 16–21 ^{42,44} Blacks 14–28 ^{26,27,43} |
| Low sensitivity, high dose | BB haplotype VKORC1 | +38.6% (~6.1 mg/day) | Whites 36–43 ^{7,26,43} Asians less than 1.5 ^{42,44} Blacks 72–85 ^{26,27,43} |

CYP2C9 alleles increased risk of overanticoagulation during initiation of warfarin (hazard ratio, 21.84; 95% confidence interval, 9.46–50.42).⁷ The exact knowledge of how much higher the risk of major or life-threatening bleeding for variant allele carriers is still missing. Different authors use different definitions of bleeding seriousness. The more reliable and comparable are data for total bleeding complications; in meta-analysis done by Sanderson et al, the relative risk of bleeding was 1.91 (1.16–3.17) for carriers of allele *2, 1.77 (1.07–2.91) for allele *3, and 2.26 (1.36–3.75) for alleles *2 or *3.²² Similar increased risk of bleeding was described for carriers of alleles *2 or *3 (hazard ratio, 3.18; 95% confidence interval, 1.30–7.78).¹⁹

VKORC1

Variant alleles (haplotype A) of the VKORC1 gene are significantly associated with the required warfarin dose^{8,23–25} and less strongly with shorter time to achieve therapeutic INR and probability of overanticoagulation.^{19,26} The risk of bleeding for carriers of the VKORC1 variant polymorphism (A/A haplotype, low dose) was reported to be slightly higher or not different when compared with noncarriers.^{19,26,27}

www.americantherapeutics.com

Set aside from common polymorphisms in VKORC1 affecting the warfarin dose inside the normal range are very rare mutations (point mutations at codons 29, 45, 58, 66, 128) that lead to a condition of pharmacodynamic type of warfarin resistance (usually defined as daily dose exceeding 25 mg and increased serum level of warfarin).^{28,29} The precise population frequencies are not known and only individual cases and their families were published.

CYP2C9 versus VKORC1

Apparently, the effect of VKORC1 on warfarin dose variability is more pronounced than the effect of CYP2C9, whereas the impact on clinical characteristics (overanticoagulation, time above INR range, risk of bleeding) is less remarkable for VKORC1 than CYP2C9. The reason for this difference can be caused by the longer half-life of warfarin in carriers of CYP2C9*2 and *3 variant alleles³⁰ and less controllable pharmacokinetics usually unexpected by physicians.

The differences in daily warfarin dose among various ethnic groups are mainly attributed to distribution of variant polymorphisms of the VKORC1 gene (A/A the most frequent haplotype in Asians, A/B

American Journal of Therapeutics (2010) 0(0)

in whites, and B/B in African descent populations) and less by CYP2C9 (lower frequency of wild-type CYP2C9*1 allele in whites, relatively higher frequency of CYP2C9*3 allele in Asian populations, and CYP2C9*2 allele in populations of African descent) (Table 1).

Clinical use

There are at least two emerging roles for pharmacogenetics of warfarin advancement in clinical practice. First, pharmacogenetic data could be pivotal to estimate appropriate daily dose of warfarin before the initiation of actual treatment. This advanced technique may identify high-risk patients who might benefit from conservative induction regimens and lower maintenance doses. Second, pharmacogenetic testing may assess the individual risk (eg, bleeding risk) in patients already receiving warfarin. Such a constructive approach will lead to more emphasis on clinical and laboratory monitoring of warfarin therapy and/or assist us to choose therapy in borderline scenarios; patients with indications for anticoagulation by the guidelines but with some hindrance to safe treatment because of high risk of bleeding. In case of the presence of variant alleles, we might prefer other therapeutic options (eg, antiplatelet agents). This second hypothesis is still a subject to be confirmed in large clinical studies and currently is not ready to be integrated into clinical practice.

Putting aside the choice of DNA assay, and its reliable quality control, the most important issue in clinical practice is a turnaround time from sample collection to obtaining a valid result. Ideally, it should take less than 24 hours so the clinician can make fast treatment decisions about warfarin initiation.³¹

Dosage

The standard of care in the initiation of warfarin treatment is to start with 5 to 10 mg for the first 1 or 2 days with subsequent dosing based on INR monitoring. In elderly patients or patients with malnutrition, liver disease, and congestive heart failure, use of a lower starting dose of 5 mg or less is recommended.³² The current guidelines do not include individual characteristics such as body size for selecting initial dose. Antecedent to pharmacogenetic dosing algorithms were clinically driven.³³⁻³⁵ However, past clinical algorithms omitted at least 40% of genetic dose variation and in most cases did not identify the dose for the days before the first INR results.

The challenge of foretelling the future dose became possible with the advent of pharmacogenetics. Regression models based on genetic and clinical data of a sample population stabilized on warfarin therapy led

to development of prediction algorithms for daily warfarin dose. The described algorithms can be divided into two groups. First, prediction models used before the beginning of warfarin therapy incorporating genotype data and defined nongenetic factors (eg, age, weight, height, concomitant medications).^{6,7,9,10,23,36-44} Second, prediction models used after the initiation of warfarin therapy that combine genotype data and defined nongenetic factors with coagulation response to warfarin therapy. The best parameter for coagulation assessment seems to be INR obtained during the third or fourth day of therapy. This addition helps to include otherwise unknown genetic and unquantifiable nongenetic factors, which are affecting the INR.^{45,46}

Unfortunately, the predictive algorithms reported in the literature are based on relatively small patient cohorts, use diverse clinical variables, and their validity and accuracy were not yet properly tested (Tables 2 and 3).

There is no consensus on one universal algorithm; therefore, different formulas are available (Table 2). Accuracy of prediction of respective algorithms can be expressed in the value of coefficient of determination (R^2 , value from 0 to 1 = 100%). The value of R^2 of published algorithms is in the range from 31% to 79%. The different algorithms perform respectively in patient cohorts of different ethnicity, so it is important to select the appropriate algorithm matching it with the appropriate race.

Nonrandomized evaluation of published algorithms

The largest study (4043 patients algorithm development, 1009 patients validation cohort) conducted by the International Warfarin Pharmacogenetics Consortium⁶ concluded that the use of a pharmacogenetic algorithm for estimating the initial dose of warfarin produces recommendations that are significantly closer to the required stable therapeutic dose than those derived from a clinical algorithm or a fixed-dose approach. The greatest benefits were observed in 46% of the population that required less than the average dose (21 mg or less per week) or higher than the average dose (49 mg or more per week) of warfarin.⁶ The study suggested the benefits of pharmacogenetics for nearly half of anticoagulated patients and what is important that those patients were outliers outside the expected dosage with the highest risk of adverse events (overdose or underdose) with standard warfarin dosing regimens. The drawback of this study was that it did not report the pharmacodynamic end points (eg, time spent in the therapeutic range, time to reach stable anticoagulation, and so on) and complications of anticoagulation.

Table 2. Comparison of pharmacogenetic dosing algorithms.

| Number and ethnicity of patients in derivation cohort | Genes included in algorithm | Nongenetic factors | Validation of algorithm | Coefficient of determination (R^2) | Source |
|---|----------------------------------|--|---|--|--|
| 369 (261 whites, 108 blacks) | CYP2C9 | Age, race, sex, body surface area, drug interactions | Statistical modeling bootstrap method ($R^2 = 38.6\%$) ³⁸ | 39% | Gage et al, 2004 ³⁸ |
| 453 (ethnicity not defined, mostly white) | CYP2C9 | Age, body surface area, sex, comorbidity, clinical indication | Randomized prospective, 38 whites, R^2 not given ⁴⁷ | 33.7% | Hillman et al, 2004 ⁴⁰ |
| 297 whites | CYP2C9, VKORC1 | Age, height | Retrospective and nonrandomized, 38 whites, (correlation coefficient predicted versus real dose 0.80) ²³ | 54.2% | Sconce et al, 2005 ²³ |
| 213 (ethnicity not defined, predominantly white) | CYP2C9, VKORC1 | Age, weight, sex | Prospective and randomized, 206 patients (189 white) ($R^2 = 47\%$) ³⁷ | 44.6% | Carlquist et al, 2006 ³⁶ |
| 107 Asians (Chinese, Malay, Indian) | CYP2C9, VKORC1 | Age, weight | Retrospective and nonrandomized, 108 Asians (correlation coefficient predicted versus real dose 0.73) | 60.2% | Tham et al, 2006 ⁴¹ |
| 92 (79 whites, 13 blacks) | CYP2C9, VKORC1 | INR before and third day of therapy, smoking, blood loss | Not validated | 79% | Millican et al, 2007 ⁴⁵ |
| 178 Chinese 1015 (838 whites, 153 blacks) | CYP2C9, VKORC1 CYP2C9, VKORC1 | Age, weight Age, race, sex, body surface area, drug interactions, smoking, deep vein thrombosis, pulmonary embolism | Not validated Prospective and nonrandomized, 292 patients (242 whites, 45 blacks), ($R^2 = 54\%$ total, $R^2 = 55\%$ whites, $R^2 = 40\%$ blacks) ³⁹ | 62.8% 53.1% total, (57% whites, 31% blacks) | Miao et al, 2007 ⁴² Gage et al, 2008 ³⁹ |
| 132 (131 whites) | CYP2C9, VKORC1 | Age, body surface area, S-warfarin and R-warfarin enantiomer ratio after 14 hours or INR Day 4 | Not validated | 51% | Michaud et al, 2008 ⁴⁶ |

continued on next page

Table 2. (continued).

| Number and ethnicity of patients in derivation cohort | Genes included in algorithm | Nongenetic factors | Validation of algorithm | Coefficient of determination (R^2) | Source |
|---|---------------------------------------|--|---|---|--------------------------------------|
| 390 Brazilian (196 white Brazilians, 76 black Brazilians) | CYP2C9, VKORC1 | Age, weight, drug interactions, clinical indication | Not validated | 50.4% total, (51% white Brazilians, 52% black Brazilians) | Perini et al, 2008 ⁹ |
| 259 (112 blacks, 147 whites) | CYP2C9, VKORC1, APOE, factor VII (F7) | Age, body mass index, alcohol intake, drug interactions, history of deep vein thrombosis | Crossvalidation in derivation cohort ⁴³ | 31% total (28% blacks, 43% whites) | Schelleman et al, 2008 ⁴³ |
| 1496 (ethnicity not given, predominantly Swedish) | CYP2C9, VKORC1 | Age, sex, drug interactions | Retrospective and nonrandomized, 181 patients predominantly Swedish ($R^2 = 53%$) ⁷ | 59% | Wadelius et al, 2009 ⁷ |
| 266 Chinese | CYP2C9, VKORC1 | Age, body surface area | Prospective randomized: 121 patients ($R^2 = 45.4%$) ⁴⁴ | 54.1% | Huang et al, 2009 ⁴⁴ |
| 4043 (2233 white, 1229 Asian, 353 black, 228 other) | CYP2C9, VKORC1 | Age, race, sex, height, weight, drug interactions | Retrospective nonrandomized: 1009 patients (562 white, 300 Asian, 97 black, 50 other) ($R^2 = 43%$ total, 39.5% white, 34.2% Asian, 19.2% black, 47.3% other) ⁶ | 47% (44.9% white, 32.9% Asian, 25.9% black, 35.5% other) | IWPGC, 2009 ⁶ |

INR, international normalized ratio.

Table 3. Randomized controlled trials comparing pharmacogenetic and standard warfarin dosing.

| Study | Hillman et al, 2004 ⁴⁷ | | Anderson et al, 2007 ³⁷ | | Caraco et al, 2008 ⁴⁸ | | Huang et al, 2009 ⁴⁴ | |
|--|---|-----------------------|---|-----------------------|---|------------------------------------|--|--|
| Genes included in pharmacogenetic algorithm | CYP 2C9 | | CYP 2C9, VKORC1 | | CYP 2C9 | | CYP 2C9, VKORC1 | |
| Size of study (subjects included in data analysis) | 38 total (18 pharmacogenetic versus 20 standard dosing) | | 200 total (101 pharmacogenetic versus 99 standard dosing) | | 191 total (95 pharmacogenetic versus 96 standard dosing) | | 121 total (61 pharmacogenetic versus 60 standard dosing) | |
| Time of follow up | 28 days | | Maximum 3 months or until the end of warfarin therapy | | Until stabilization was reached (two consecutive INR in range, 7 days apart, without dose alteration) | | 50 days | |
| Induction strategy for control group | 5 mg | | 10 mg first 2 days, then 5 mg | | 5 mg | | 2.5 mg | |
| | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group |
| Pharmacodynamic end points | | | | | | | | |
| Time to reach the first therapeutic I NR (days) | NA | NA | NA | NA | 4.80 (SD 1.46) | 7.53 (SD 3.06) <i>P</i> < 0.001 | NA | NA |
| Time to reach stable anticoagulation (days) | NA | NA | NA | NA | 14.1 (SD 6.9) | 32.2 SD 21.1 <i>P</i> < 0.001 | NA | NA |
| Median time to reach stable dose (days) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 24 | 35 <i>P</i> = 0.001 |
| Time spent in therapeutic range (%) | 41.7 (SD 25.4) NS | 41.5 (SD 24.9) NS | 69.7 (SD 23.4) | 68.6 (SD 24.3) NS | 80.4% (SD 20.0) | 63.4 (SD 22.1) <i>P</i> < 0.001 | 56.2% (28.1 days. SD 9.6) | 43.8% (21.9 days. SD 9.8) <i>P</i> < 0.001 |
| Safety outcomes | | | | | | | | |
| Incidence of all bleeding (% patients) | 2 episodes | 4 episodes NS | NA | NA | 3.2% | 12.5% <i>P</i> < 0.02 | 3.3% | 4.9% NS |

continued on next page

Table 3. (continued).

| | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group | Pharmacogenetic dosing group | Standard dosing group |
|--|------------------------------|-----------------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------|-----------------------|
| Incidence of major bleeding* | NA | NA | NA | NA | 1.1% | 0 | 0 | 0 |
| Thromboembolic adverse events (% patients) | 0 | 2 episodes | NA | NA | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Percent of patients above 4.0 | 33.3% | 30% NS | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| Time spent at INR greater than 3 (days) | NA | NA | NA | NA | 1.77 (SD 2.79) | 6.58 (SD 7.33) <i>P</i> < 0.001 | NA | NA |
| All adverse outcomes (bleeding, venous thrombosis, INR greater than 3.5) | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 11.5% | 13.3% NS |
| All Clinical adverse events (bleeding + thromboembolic) | 11.2% | 20% NS | 4% | 5.1% NS | 3.2% | 12.5% <i>P</i> < 0.02 | 3.3% | 4.9% NS |
| Clinical adverse events + INR 4.0 or greater | NA | NA | 34.7% | 42.4% NS | NA | NA | NA | NA |

INR, international normalized ratio; SD, standard deviation; NS, nonsignificant; NA, not available.

The published nonrandomized cohorts used largely noncomparable outcome measures but demonstrated potential of pharmacogenetics to identify individuals predisposed to complications when anticoagulated.

Randomized controlled trials

Four prospective randomized trials comparing standard clinical and pharmacogenetic dosing have been completed up to date with insufficient power for all planned end points and only with woefully small sample sizes (38–200 patients)^{39,44,47,48} (Table 3). The effect of pharmacogenetic-guided dosing in the general population was demonstrated to be smaller than previously hypothesized. However, in all reported randomized controlled trials, the pharmacogenetic-guided cohort spent more time within the therapeutic INR range (a known surrogate measure of the quality of anticoagulation, calculated by linear interpolation method^{37,48} or the method was not given^{44,47}) than the cohort with standard dosing, the result either being statistically significant^{44,48} or just a positive trend toward it.^{37,47} The pharmacogenetic approach did decrease the relative risk of bleeding complications significantly⁴⁹ or with a positive trend^{37,44,47} (Table 3).

The situation is changed when results of randomized controlled trials are analyzed by respective genotypic subsets. Much larger and significant differences favoring pharmacogenetic dosing were noted for multiple variant allele carriers compared with wild-type (or one single variant allele carriers). Pharmacogenetic dosing was more effective in predicting the higher required dose in wild-type patients ($P = 0.001$) and the lower doses in multiple variant allele carriers ($P < 0.001$).³⁷ Variant allele carriers acquired stable doses more quickly in the pharmacogenetics group compared with the standard dosing group ($P = 0.003$ for VKORC and $P = 0.199$ for CYP2C9*3).⁴⁴ Multiple variant carriers were at significantly increased risk of an INR 4.0 or greater (46% compared with 29% of other genotypes, $P = 0.029$). Excess risk for INR 4.0 or greater was noted primarily for patients with both CYP 2C9 and VKORC1 variant alleles with 53% of them experiencing the event.³⁷

At least five prospective randomized clinical trials comparing clinical and pharmacogenetic dosing are currently underway worldwide (www.ClinicalTrials.gov; NCT00700895, NCT00927862, NCT00654823, NCT00247702, NCT00162435).

Stroke specifics

Because pharmacogenetic-based dosing of warfarin is an increasingly documented topic in the literature, only few studies reported clinical outcomes in patients after ischemic stroke.

Most of these small pilot studies did not describe the history of previous stroke(s) or included just a fraction of stroke patients and their outcomes.^{43,46} Kimura et al published the paper done exclusively in patients with stroke; however, no relevant clinical outcome data were provided.⁴⁹

Most likely, there are differences between published pharmacogenetic cohorts (mainly based on atrial fibrillation without stroke history, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, valve replacement, or orthopedic surgery) and poststroke patients. The poststroke cohorts have a higher incidence of proven risk factors for nonadherence to prescribed medications. Those include a higher incidence of cognitive impairment (vascular dementia),⁵⁰ depression,⁵¹ and older age.⁵² Other factors possibly influencing adverse outcomes of anticoagulation are more frequent in stroke survivors: falls (vestibular or cerebellar lesions, motoric deficits), intracranial bleeding (leucoaraiosis, cerebral microbleeds), and risk of recurrent stroke. This potential difference should be addressed by further studies in patients with stroke in whom the outcomes of pharmacogenetic profiling could be different (eg, more frequent complication rate because of effect of above range INRs on intracerebral bleeding resulting from microvascular brain lesions).

Benefits and risk assessment

Extra bleeding risks are especially dangerous in stroke survivors. However, patients with stroke supposedly being at higher risk of intracranial bleeding complications should benefit the most among all anticoagulated patients from pharmacogenetic-justified dosing avoiding above the range INRs. Pharmacogenetics could also help to direct our therapeutic decisions in border zone cases. In patients in whom the risks and benefits of therapy are similar, we can use the knowledge of individual genotype (ie, patient with variant genotype not treated with warfarin).

Despite the compelling clinical evidence favoring vitamin K antagonist, not all patients requiring stroke prophylaxis receive warfarin anticoagulation.⁵³ Notwithstanding patients' unwillingness to take warfarin, which is known to be the most frequent reason for not receiving indicated anticoagulation therapy,⁵⁴ is also important to physicians' reluctance to initiate treatment as a result of apprehension about possible bleeding complications and the need for frequent testing. Pharmacogenetics could offer a way to heighten the percentage of treated patients. Supposedly, a potential to select the minority of patients with stroke in the highest risk for warfarin-related complications (eg, patient variant for CYP2C9 and VKORC1) would improve outcomes.

Initiation of warfarin

There is controversial discussion and insufficient evidence with regard to when to start oral anticoagulation after major stroke. The guidelines are not clear on this issue as a result of insufficient evidence.² The most common approach is to postpone the initiation of warfarin for 2 to 4 weeks depending on individual risk of bleeding (ie, presence of substantial necrosis prone to hemorrhagic complications). There is an open opportunity for guiding the initiation of warfarin by pharmacogenetics. The presence of variant alleles may be a helpful indicator of higher bleeding risk and can lead to delaying the initiation. This delayed initiation can also be a logistic advantage as a result of having an extended time for completing the DNA analysis.

Limitations

It should be noted that widespread enthusiasm for genotype-based dosing of warfarin must be balanced against the potential shortcomings.

First, it will require additional evidence yielded from randomized trials that such an approach offers clinical advantage, including protection against a variety of negative anticoagulation complications, especially severe bleeding. This concern is expressed in the American College of Chest Physicians guidelines³² suggesting that pharmacogenetically based initial dosing is not recommended (Grade 2C). Indeed, the current rules for pharmacogenetics implementation in clinical practice are not unified or included in guidelines and are used in different ways by various institutions. The controversy regarding the evidence for use of pharmacogenetics of warfarin in routine clinical practice can be illustrated on the US example. In 2007, the US Food and Drug Administration updated the warfarin package insert with the possibility to include pharmacogenetic testing in the initiation of therapy. The testing was after the US Food and Drug Administration update spreading into daily clinical practice even without proper evidence of significant benefits on clinical outcomes. The situation will probably change now because of the Centers for Medicare and Medicaid Services' refusal in May 2009 to reimburse its recipients for the testing.

Second, limitations include the optimal composition of test panels (various genes and polymorphisms are used), especially with regard to ethnical background of respective patients (Tables 1 and 2). Published algorithms for daily dose are significantly less effective in nonwhite cohorts (especially of African origin) because much less data are available.

Third is the cost-effectiveness of the genomics assay. The latest reports are not as optimistic as previous

reports published before completion of any randomized trials. In fact, 44 patients need to be screened for CYP2C9 genotype before benefits in excess of costs begin to accrue by the avoidance of one adverse event.⁵⁵ On the basis of current knowledge and cost of testing (approximately \$400), there is only a 10% chance that genotype-guided dosing is likely to be cost-effective.⁵⁶ On the other hand, the published analyses^{56,57} were based on woefully limited numbers of patients mainly with nonvalvular atrial fibrillation from completed randomized trials that used various clinical outcomes and algorithms.^{37,47,48} It is possible that the cost-effectiveness will be much more beneficial when focused on cohorts with distinct bleeding risk profiles (eg, patients with stroke with higher bleeding risk). Eckman et al stated that warfarin pharmacogenetic testing would become cost-effective when meeting the following criteria: prevent greater than 32% of major bleeding events, be available within 24 hours, and cost less than \$200.⁵⁶

CONCLUSIONS

Although the incorporation of genotype information improves the accuracy of adequate dose prediction, an improvement in anticoagulation control or a reduction in hemorrhagic complications has not been yet convincingly demonstrated. It is clear that identifying an individual patient's risk for hemorrhage on warfarin will require more broad clinical and genetic studies. Future research focused on patients with stroke should concentrate on defining the possible differences, especially focusing on predicting bleeding events in general and intracranial hemorrhages in particular.

Warfarin is still the first choice in oral anticoagulation, despite the efforts of the pharmaceutical industry to develop a safer oral anticoagulant with the similar anticoagulation effectiveness as warfarin. We will have to rely on warfarin for at least some time before clinical studies with direct inhibitors of activated factor X (rivaroxaban, LY517717, YM150, DU-176b, apixaban, betrixaban) and direct thrombin inhibitors (dabigatran) will be completed. Indeed, the pharmacogenetics of warfarin matter in stroke prevention, but more research is urgently needed for better and safer clinical use.

REFERENCES

1. Adams RJ, Albers G, Albers MJ, et al. Update to the AHA/ASA recommendations for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack. *Stroke*. 2008;39:1647-1652.

2. Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008;25:457–507.
3. Stam J, de Bruijn SSFTM, deVeber G. Anticoagulation for cerebral sinus thrombosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;4:CD002005.
4. Hart R, Pearce L, Aguilar M. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med.* 2007;146:857–867.
5. Hankey GJ, Warlow CP. Treatment and secondary prevention of stroke: evidence, costs, and effects on individuals and populations. *Lancet.* 1999;354:1457–1463.
6. International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med.* 2009;360:753–764.
7. Wadelius M, Chen L, Lindh J, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood.* 2009;113:784–792.
8. Rieder M, Reiner A, Gage B, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med.* 2005;352:2285–2293.
9. Perini J, Struchiner C, Silva-Assunção E, et al. Pharmacogenetics of warfarin: development of a dosing algorithm for Brazilian patients. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;84:722–728.
10. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet.* 2007;121:23–34.
11. McDonald M, Rieder M, Nakano M, et al. CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: an explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant. *Mol Pharmacol.* 2009;75:1337–1346.
12. Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, et al. A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000433.
13. Borgiani P, Ciccacci C, Forte V, et al. CYP4F2 genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics.* 2009;10:261–266.
14. Rieder M, Reiner A, Rettie A. γ -Glutamyl carboxylase (GGCX) tagSNPs have limited utility for predicting warfarin maintenance dose. *J Thromb Hemost.* 2007;5:2227–2234.
15. Kimmel SE, Christie J, Kealey C, et al. Apolipoprotein E genotype and warfarin dosing among Caucasians and African Americans. *Pharmacogenomics J.* 2008;8:53–60.
16. Wang T, Li H, Tjong W, et al. Genetic factors contribute to patient-specific warfarin dose for Han Chinese. *Clin Chim Acta.* 2008;396:76–79.
17. Higashi M, Veenstra DL, Kondo LM, et al. Association between CYP2C9 genetic variants and anticoagulation-related outcomes during warfarin therapy. *JAMA.* 2002;287:1690–1698.
18. Joffe H, Xu R, Johnson F, et al. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost.* 2004;91:1123–1128.
19. Meckley L, Wittkowsky A, Rieder M, et al. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin patients. *Thromb Haemost.* 2008;100:229–239.
20. Aithal G, Day C, Kesteven P, et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet.* 1999;353:717–719.
21. Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost.* 2000;84:775–778.
22. Sanderson S, Emery J, Higgins J. References Cyp2c9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGEnet systematic review and meta-analysis. *Genet Med.* 2005;7:97–104.
23. Sconce E, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood.* 2005;106:2329–2333.
24. Veenstra D, Blough DK, Higashi MK, et al. CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;77:353–364.
25. Wadelius M, Chen LY, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J.* 2005;5:262–270.
26. Schwarz U, Ritchie M, Bradford Y, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med.* 2008;358:999–1008.
27. Limdi NA, McGwin G, Goldstein J, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83:312–321.
28. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature.* 2004;427:537–541.
29. Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A, et al. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb Haemost.* 2007;98:570–578.
30. Linder M, Looney S, Adams J, et al. Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis.* 2002;14:227–232.
31. Lyon E, McMillin G, Melis R. Pharmacogenetic testing for warfarin sensitivity. *Clin Lab Med.* 2008;28:525–537.
32. Ansell J, Hirsh J, Hylek E, et al. Pharmacology and management of the vitamin K Antagonists: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, 8th ed. *Chest.* 2008;133:S160–S198.
33. Kovacs MJ, Cruickshank M, Wells PS, et al. Randomized assessment of a warfarin nomogram for initial oral

- anticoagulation after venous thromboembolic disease. *Haemostasis*. 1998;28:62–69.
34. Fennerty A, Dolben J, Thomas P, et al. Flexible induction dose regimen for warfarin and prediction of maintenance dose. *BMJ*. 1984;288:1268–1270.
 35. Shine D, Patel J, Kumar J, et al. A randomized trial of initial warfarin dosing based on simple clinical criteria. *Thromb Haemost*. 2003;89:297–304.
 36. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB, et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis*. 2006;22:191–197.
 37. Anderson J, Horne B, Stevens S, et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation*. 2007;116:2563–2570.
 38. Gage BF, Eby C, Milligan PE, et al. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost*. 2004;91:87–94.
 39. Gage B, Eby C, Johnson J, et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84:326–331.
 40. Hillman MA, Wilke RA, Caldwell MD, et al. Relative impact of covariates in prescribing warfarin according to CYP2C9 genotype. *Pharmacogenetics*. 2004;14:539–547.
 41. Tham LS, Nafziger A, Guo J, et al. A warfarin-dosing model in Asians that uses single-nucleotide polymorphisms in vitamin K epoxide reductase complex and cytochrome P450 2C9. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:346–355.
 42. Miao L, Yang J, Huang C, et al. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2007;63:1135–1141.
 43. Schelleman H, Chen J, Chen Z, et al. Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84:332–339.
 44. Huang S, Chen H, Wang X, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2009;19:226–234.
 45. Millican E, Lenzini P, Milligan P, et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood*. 2007;110:1511–1515.
 46. Michaud V, Vanier MC, Brouillette D, et al. Combination of phenotype assessments and CYP2C9–VKORC1 polymorphisms in the determination of warfarin dose requirements in heavily medicated patients. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:740–748.
 47. Hillman M, Wilke R, Yale S, et al. A prospective, randomized pilot trial of model-based warfarin dose initiation using CYP2C9 genotype and clinical data. *Clin Med Res*. 2005;3:137–145.
 48. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:460–470.
 49. Kimura R, Miyashita K, Kokubo Y, et al. Genotypes of vitamin K epoxide reductase, γ -glutamyl carboxylase, and cytochrome P450 2C9 as determinants of daily warfarin dose in Japanese patients. *Thromb Res*. 2007;120:181–186.
 50. Salas M, In't Veld BA, van der Linden PD, et al. Impaired cognitive function and compliance with antihypertensive drugs in elderly: the Rotterdam study. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;70:561–566.
 51. Cruess DG, Localio AR, Platt AB, et al. Patient attitudinal behavioral factors associated with warfarin non-adherence at outpatient anticoagulation clinics [published online ahead of print July 5, 2009]. *Int J Behav Med*. doi:10.1007/s12529-009-9052-6.
 52. Lummis HL, Sketris IS, Gubitza GJ, et al. Medication persistence rates and factors associated with persistence in patients following stroke: a cohort study. *BMC Neurol*. 2008;8:25.
 53. Vidaillet H, Granada JF, Chyou PH, et al. A population-based study of mortality among patients with atrial fibrillation or flutter. *Am J Med*. 2002;113:432–435.
 54. Howitt A, Armstrong D. Implementing evidence based medicine in general practice: audit and qualitative study of antithrombotic treatment for atrial fibrillation. *BMJ*. 1999;318:1324–1327.
 55. Higashi MK, Veenstra DL. Managed care in the genomics era: assessing the cost effectiveness of genetic tests. *Am J Manag Care*. 2003;9:493–500.
 56. Eckman M, Rosand J, Greenberg S, et al. Cost-effectiveness of using pharmacogenetic information in warfarin dosing for patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med*. 2009;150:73–83.
 57. You J, Tsui K, Wong R, et al. Potential clinical and economic outcomes of CYP2C9 and VKORC1 genotype-guided dosing in patients starting warfarin therapy [published online ahead of print July 1, 2009]. *Clin Pharmacol Ther*. doi:10.1038/clpt.2009.104.

Farmakogenetické vyšetření a antikoagulační léčba warfarinem

Aleš Tomek / Václav Maňoška / Tereza Kumstýřová

MUDr. Aleš Tomek,^{1,2}
MUDr. Václav Maňoška,²
MUDr. Tereza Kumstýřová²

¹ Neurologická klinika 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

² Laboratoř molekulární diagnostiky, oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Praha

SOUHRN

Klíčová slova:

SUMMARY

Key words:

ÚVOD

Antikoagulační terapie je vzhledem k celkovému stárnutí naší populace a loňskému rozšíření indikace antikoagulační léčby warfarinem v primární prevenci tromboembolismu při fibrilaci síní Evropskou kardiologickou společností indikována u stále většího množství pacientů. Podle údajů SÚKL z roku 2010 bylo v České republice spotřebováno celkem 40 milionů denních dávek warfarinu. Zároveň je ale warfarin jedním z nejnebezpečnějších léčiv pro svůj nízký terapeutický index, značnou interindividuální variabilitu dávky a možné závažné krvácivé komplikace. Díky finanční situaci v našem zdravot-

nictví zřejmě nedojde k významnějšímu omezení používání warfarinu ani po nástupu nových antikoagulačních léčiv (přímých inhibitorů trombinu – dabigatranu, přímých inhibitorů aktivovaného faktoru X – rivaroxabanu a apixabanu). V naší klinické praxi tedy budeme muset maximalizovat naše úsilí o bezpečnou léčbu warfarinem. Prokazatelně největší přínos má důsledné vedení léčby – snaha o co nejvyšší podíl času v terapeutickém rozmezí za využití častých kontrol nebo automonitorace ve specializovaných centrech.

Právě farmakogenetika, která zkoumá vliv genetické výbavy jedince na podaný lék, nabízí další možnost, jak s warfarinem léčit bezpečněji. První možností

aplikace farmakogenetických dat je výpočet denní dávky warfarinu pro jednotlivé pacienty ještě před zahájením vlastní terapie. Druhou možností je vyšetřování již warfarinizovaných pacientů, z nichž můžeme vyčlenit jedince s rizikovým genotypem, a ty pak léčit přísněji a častěji u nich kontrolovat INR. Právě zhodnocení současných možností farmakogenetiky v těchto dvou oblastech je věnován následující článek.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ DÁVKU WARFARINU

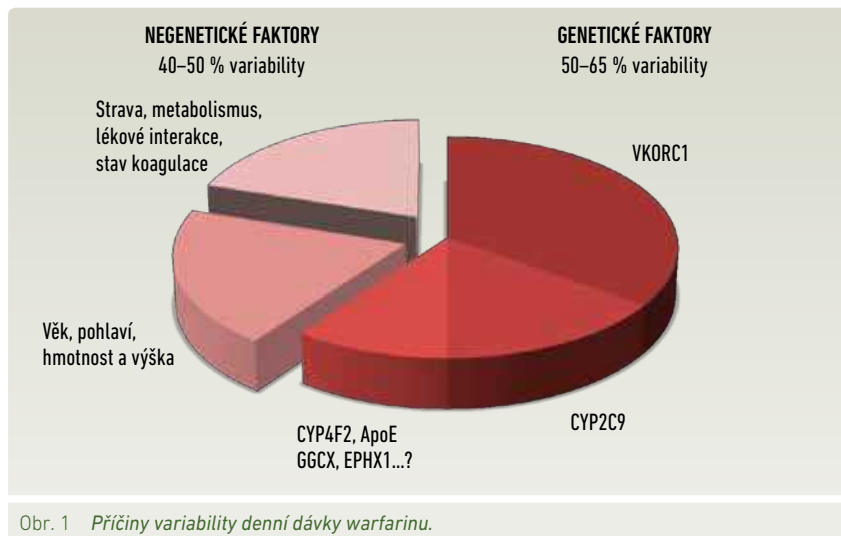
Dávka warfarinu potřebná k dosažení účinné antikoagulace má velmi význam-

nou intraindividuální, ale zejména inter-individuální variabilitu. Velikost dávky je závislá na genetické dispozici a na faktorech negenetických.

Negenetické faktory jsou dle jednotlivých studií zodpovědné zhruba za 40–50 % variability v odpovědi na warfarin. Pro účely farmakogenetických výpočtů je můžeme rozdělit na relativně kvantifikovatelné a stabilní (věk, pohlaví, váha a výška pacienta – tvoří zhruba 10–20 % celkové variability dávky) a hůře kvantifikovatelné a více proměnné (aktuální obsah vitamínu K v potravě, stav jaterního a renálního metabolismu a jeho ovlivnění dalšími léčivými složkami potravy, aktuální stav poměru anabolismus/katabolismus, celkový stav hemostázy, compliance pacienta a v neposlední řadě adherence k vedení léčby lékařem), které zodpovídají až za 30–40 % variability.

Intraindividuální variabilita se projevuje jednak klesající dávkou se stoupajícím věkem, jednak ovlivněním jaterního metabolismu při změně medikace nebo po stimulaci přechodnou konzumací alkoholu (typicky kolem životního jubilea při protražovaných oslavách – iniciálně nutná vyšší dávka, která následně může být příliš vysoká), podle aktuálního obsahu vitamínu K v potravě (sezónní zvýšení dávky v letních měsících se zvýšeným příjmem zeleniny), při septických stavech apod.

Genetická dispozice vysvětluje 45–60 % interindividuální variability v dávkování warfarinu. V současnosti je známo více než 30 genů s tisíci popsány polymorfismy, které by mohly ovlivňovat některou z fází účinku warfarinu. Zásadní vliv je však přisuzován pouze dvěma z nich: genu CYP2C9 pro biotransformační enzym cytochromu P450 CYP2C9 a genu VKORC1 pro cílový enzym blokovaný warfarinem – podjednotky 1 enzymového komplexu vitamin K-epoxid-reduktázy. Dalším rozšířením spektra vyšetřovaných genů (CYP4F2, PROC, EPHX1, GGCX, ORM1-2) se zdá, že bude možné vysvětlit navíc asi 10 % variability dávky.¹ Nicméně na rozdíl od genů CYP2C9 a VKORC1 chybí validace těchto dat na větších souborech pacientů nebo se jejich vliv uplat-



Obr. 1 Příčiny variability denní dávky warfarinu.

ňuje jen u některých – většinou u nebělošské populace (obr. 1).

FARMAKOGENETIKA A KLINICKÉ PARAMETRY

CYP2C9

Variantní alely *2 a *3 genu CYP2C9 jsou signifikantně spojeny s nižší dávkou warfarinu, než je obvyklé,^{1,2} častější hodnotou INR nad terapeutickým rozmezím, vyšší pravděpodobností předávkování,^{1,3} delším časem nad terapeutickým rozmezím,⁴ delším časem k dosažení stabilizace dávky¹ a vyšším rizikem krvácivých komplikací.^{1,5,6}

VKORC1

Variantní haplotyp genu VKORC1 (haplotyp A, vysoká senzitivita na warfarin) je významně spojen s nižší dávkou warfarinu,^{7–10} a méně významně s kratším časem k dosažení terapeutického rozmezí s pravděpodobnějším předávkováním.^{4,11} Riziko krvácivých komplikací pro nosiče haplotypu A je v různých studiích nevýznamně vyšší oproti nosičům nejčastějšího haplotypu indoevropské populace AB nebo je shodné.^{4,11,12} Vzácné bodové mutace genu VKORC1 (kodony 29, 45, 58, 66 a 128) jsou zodpovědné za farmakodynamický typ rezistence na warfarin, který je obvykle definován denní dávkou > 25 mg a současně zvýšenou sérovou koncentrací

warfarinu pro dosažení terapeutického rozmezí.^{13,14} Populační frekvence těchto mutací není přesně známa, ale jde o velmi vzácný stav popsáný jen v individuálních případech.

CYP2C9 versus VKORC1

Je zajímavé, že vliv genu VKORC1 na variabilitu dávky warfarinu je významnější než vliv genu CYP2C9, ale naopak nosičství variantních alel genu CYP2C9 má významnější vliv na důležité sledované klinické parametry (předávkování, čas nad terapeutickým rozmezím, riziko krvácení). Jedním z možných vysvětlení tohoto faktu je významné prodloužení poločasu warfarinu u nosičů variantních alel CYP2C9 *2 a *3¹⁵ a z toho plynoucí a lékařem neočekávané reakce pacientů při změnách denní dávky (zvýšíme-li dávku, jak je zvykem, když pacient stále nedosahuje účinné léčby, dojde po sečtení pozdního vlivu u pomalých metabolizátorů a nově a předčasně navýšené dávky k předávkování). Rozdílná potřeba dávky warfarinu u jednotlivých etnik je přičítána nejvíce rozdílnému zastoupení variantních polymorfismů genu VKORC1 (nejčastější haplotypy A/A u Asiatů, A/B u bělošské populace a B/B u černochů). Rovněž variantní polymorfismy genu CYP2C9 jsou mezi jednotlivými etniky zastoupeny odlišně (nižší frekvence wild type alely CYP2C9*1 u bělošské populace, a re-

lativně vyšší zastoupení variantní alely CYP2C9*3 u Asiátů, a naopak alely CYP2C9*2 u černošské populace.

FREKVENCE JEDNOTLIVÝCH GENOTYPŮ V NAŠÍ POPULACI

Česká populace vykazuje z populačního hlediska obdobné parametry jako všechny dosud publikované kohorty populací indoevropských etnik. Vzhledem k počtu jednotlivých kombinací polymorfismů CYP2C9 (*1, *2 a *3) a haplotypů VKORC1 (AA, A/B a B/B), může mít každý pacient jednu z 18 možných kombinací. Toto rozdělení na 18 podskupin je však dosti nepraktické, a je proto snaha o zjednodušení využitelné v klinické praxi. Podíváme-li se na počet variantních alel obou genů (CYP2C9 a VKORC1), můžeme pak rozdělit všechny pacienty podle jejich celkového počtu. Logicky tak má každý pacient 0–4 variantní alely (dvě kopie každého genu od obou rodičů). Nejvíce redukovanou dávkou warfarinu – typicky kolem 1 mg denně – mají nosiči čtyř variantních alel. Tento genotyp je ale naštestí dost vzácný, v našem souboru 1 026 pacientů byl přítomen jen u tří jedinců (0,3 %). Z hlediska atypicky nízké dávky (obvykle 2–3 mg denně) a vyššího rizika krvácivých komplikací léčby jsou dále ohroženi jedinci s třemi variantními alelami, kterých je v našem souboru 6,1 %. Průměrně má naše populace jednu variantní alelu vzhledem k nejčastějšímu haplotypu genu VKORC1 – A/B (více viz tabulku 1).

KLINICKÉ APLIKACE FARMKOGENETIKY

Výpočet denní dávky před zahájením terapie

Vzorce na výpočet denní dávky warfarinu, které byly dosud publikovány, jsou většinou vytvořeny na základě relativně malých kohort pacientů, používají odlišné parametry pro vlastní výpočet a jejich validita a přesnost byla jen omezeně ověřována.

Tab. 1 Populační zastoupení jednotlivých genotypů CYP2C9 a VKORC1 v české populaci. Dosud nepublikovaná data 1 026 pacientů vyšetřených v Laboratoři molekulární diagnostiky OKBHI Nemocnice Na Homolce

| CYP 2C9 | VKORC1 | Počet variantních alel obou genů | |
|--|--------------------------|----------------------------------|--------------|
| Nevariantní genotyp, wild type (*1/*1) | AA (low dose) haplotype | 0 VA | 304 (29,7 %) |
| *1/*2 | AB haplotype | 1 VA | 417 (40,8 %) |
| *1/*3 | BB (high dose) haplotype | 2 VA | 237 (23,2 %) |
| *2/*2 | | 3 VA | 62 (6,1 %) |
| *2/*3 | | 4 VA | 3 (0,3 %) |
| *3/*3 | | | |
| Nosič alely *2 | | | |
| Nosič alely *3 | | | |
| Nosič alely *2 nebo *3 | | | |

Neexistuje tedy jeden univerzálně akceptovaný výpočet, ale celá řada různých vzorců. Přesnost predikce jednotlivých vzorců je nejčastěji vyjádřena hodnotou koeficientu determinace (R^2 , který má hodnotu 0–1, resp. 0–100 %). Hodnota R^2 dosud publikovaných vzorců se pohybuje v rozmezí od 31 do 79 %. Jednotlivé vzorce mají navíc různou přesnost podle etnického složení kohorty pacientů, na kterou byly vytvořeny, a tak je důleži-

té vybrat adekvátní vzorec pro vlastní pacienty. Dále existuje řada faktorů, které omezují přesnost predikce denní dávky warfarinu podle výpočtů (viz tabulku 2).

Nerandomizované ověřování přesnosti farmakogenetických výpočtů

Mezinárodním konsorciem (International Warfarin Pharmacogenetics Consortium) byla provedena největší studie, kte-

Tab. 2 Faktory limitující přesnost farmakogenetického výpočtu

| Nezapočítatelné vlivy proměnné v čase u jednotlivého pacienta | |
|---|--|
| Vitamin K | Aktuální množství v potravě + stav produkce ve střevě |
| Naladění koagulačního systému | Počínající infekce, konzumpce a elevace koncentrací koagulačních faktorů – závislých i nezávislých na podávání warfarinu, kolísání sérových koncentrací albuminu, septický stav, katabolismus/anabolismus |
| Aktuální funkce jater a ledvin | Kolísání funkce – zejména u pacientů s hraniční funkcí |
| Omezený distribuční prostor | Pacienti po amputacích dolních končetin |
| Chybné dávkování warfarinu | |
| Nemožnost podat přesně vypočtenou dávku | Omezená dostupnost síly tablet warfarinu i přes jejich půlení a čtvrcení |
| Nestejný obsah dávky warfarinu při nepřesném půlení a čtvrcení tablet | Může se uplatnit u velmi malých dávek warfarinu a zejména u starších a rizikových pacientů |
| Chyby vzorců a laboratorních výsledků | |
| Významně horší přesnost výpočtu u pacientů mladších 40 let | Všechny publikované vzorce byly vytvořeny na kohortách obsahujících „typické warfarinované pacienty“ s jen minimálním zastoupením mladších jedinců a už vůbec ne dětí. Predikce je špatná oběma směry – výsledná dávka získaná empiricky je stejně často vyšší i nižší než vypočtená dávka |
| Odchylka měření INR | Typická chyba $\pm 0,2$ a z toho plynoucí následný postup lékaře na výsledek, je-li INR mimo interval 1,7–3,3 |

rá použila údaje 4 043 pacientů pro vývoj vzorce a 1 009 pacientů jako validizační kohortu.² Studie srovnávala začátek podávání warfarinu třemi taktikami: podle farmakogenetického výpočtu, podle klinického algoritmu bez znalosti genetiky (zahrnoval výpočet s negenetickými parametry) a začátek podávání fixní dávky (tj. standardní taktika klinické praxe). Studie závěrem konstatovala, že použití farmakogenetického výpočtu významně lépe předpovídalo definitivní dávku warfarinu, které bylo dosaženo empiricky. Studie dále potvrdila jasný přínos farmakogenetiky pro takřka polovinu všech pacientů, a to zejména pro pacienty, kteří potřebují netypicky nízkou, nebo naopak vysokou dávku warfarinu. Výhody farmakogenetického výpočtu se logicky stírají u průměrných pacientů, tj. kteří potřebují přesnou denní dávku 5 mg, která je správně a podle odborných doporučení podávána všem i bez výpočtu a nákladnější analýzy DNA.²

Randomizované studie zahájení léčby warfarinem podle farmakogenetiky ve srovnání s klasickým empirickým postupem

Nejméně pět prospektivních randomizovaných studií bylo na toto téma dokončeno a publikováno s nedostatečnou statistickou silou pro plánované cíle (38–230 pacientů).^{16–20} Vliv výpočtu denní dávky warfarinu podle farmakogenetiky byl v provedených studiích menší, než se původně předpokládalo, a tak jejich výsledky nebyly statisticky významné. Nicméně ve všech publikovaných studiích kohorty pacientů s dávkou warfarinu podle farmakogenetického výpočtu vykazovaly statisticky významně vyšší^{18,19} nebo alespoň jasný trend^{16,17,20} k delší době strávené v terapeutickém rozmezí (TTR, time in the therapeutic INR range). Využití farmakogenetiky rovněž vedlo ke snížení počtu krvácivých komplikací – a to významnou redukcí relativního rizika krvácení¹⁹ nebo alespoň jasným pozitivním trendem v tomto parametru.^{16–18}

Positivní vliv farmakogeneticky vedeného dávkování warfarinu se jasně pro-

jevil u analýz zařazených pacientů podle jednotlivých variantních genotypů. Při srovnání nosičů variantních genotypů proti pacientům s wild type genotypem (bez variantních alel, tj. CYP2C9 *1 a VKORC1 haplotyp A) farmakogenetický výpočet efektivně předpovídal vyšší potřebnou dávku warfarinu u wild type pacientů ($p = 0,001$) a nižší potřebnou dávku u variantních pacientů ($p < 0,001$).¹⁷ Variantní pacienti dosáhli stabilizace dávky warfarinu významně rychleji s využitím farmakogenetiky než bez ní ($p = 0,003$ pro VKORC a $p = 0,199$ pro CYP2C9 *3).¹⁸

V neposlední řadě byla nevýhodou všech provedených studií skutečnost, že i pacienti s dávkou podle standardního režimu byli léčeni ve specializovaných antikoagulačních centrech s důrazem na velmi přísnou kontrolu INR s dobře propracovaným systémem vedení terapie.

Aktuálně jsou prováděny nejméně dvě zásadní randomizované studie navržené s dostatečnou statistickou silou – americká COAG a evropská EU-PACT, jejich výsledky však můžeme očekávat nejdříve koncem roku 2012.

FARMAKOGENETIKA WARFARINU JAKO DALŠÍ FAKTOR K POSOUZENÍ RIZIKA KRVÁCENÍ

Genetický marker s dosud nejsilnějšími důkazy pro zvýšení rizika krvácivých komplikací je nosičství variantních alel genu CYP2C9 (alely *2 a *3), zejména v homozygotní formě. Homozygoti pro variantní alely genu CYP2C9 mají podle našich nepublikovaných i podle již publikovaných dat oproti ostatní populaci až 20krát vyšší riziko předávkování warfarinem, a tedy i následujících krvácivých komplikací.²¹ U heterozygotních nosičů variantních alel genu CYP2C9 je riziko krvácení zhruba 2–3krát vyšší než u ostatní populace.^{4,22} Vzhledem k jejich relativní četnosti (asi 30 % naší populace, viz tabulku 1) jde o významný a dosud přehlížený rizikový faktor pro léčbu warfarinem.

ZÁVĚR

Obecně můžeme z naší vlastní více než tříleté zkušenosti s touto metodikou konstatovat, že i přes omezený počet důkazů pro její využití má své místo v rutinní klinické praxi specializovaných antikoagulačních center zejména u rizikových podskupin pacientů. Vzhledem k její dostupnosti a stávající znalosti by mohla být využívána zejména při zahájení léčby warfarinem u pacientů s vysokým rizikem krvácení (např. HAS-BLED skóre > 3 body nebo u pacientů s akutním mozkovým infarktem). Pacienti s rizikovým profilem (3 nebo 4 variantní alely) jistě budou vhodnými kandidáty na léčbu novými antikoagulancii.

LITERATURA

- Higashi M, Veenstra DL, Kondo LM, et al. Association Between CYP2C9 Genetic Variants and Anticoagulation-Related Outcomes During Warfarin Therapy. *JAMA* 2002;287:1690–1698.
- International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, et al. Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data. *N Engl J Med* 2009;360:753–764.
- Joffe H, Xu R, Johnson F, et al. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost* 2004;91:1123–1128.
- Meckley L, Wittkowsky A, Rieder M, et al. An analysis of the relative effects of VKORC1 and CYP2C9 variants on anticoagulation related outcomes in warfarin patients. *Thromb Haemost* 2008;100:229–239.
- Aithal G, Day C, Kesteven P, et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999;353:717–719.
- Margaglione M, Colaizzo D, D'Andrea G, et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost* 2000;84:775–778.
- Sconce E, Khan TI, Wynne HA, et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005;106:2329–2333.
- Rieder M, Reiner A, Gage B, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005;352:2285–2293.
- Veenstra D, Blough DK, Higashi MK, et al. CYP2C9 haplotype structure in European American warfarin patients and association with clinical outcomes. *Clin Pharmacol Ther* 2005;77:353–364.
- Wadelius M, Chen LY, Downes K, et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005;5:262–270.
- Schwarz U, Ritchie M, Bradford Y, et al. Genetic determinants of response to warfarin during initial anticoagulation. *N Engl J Med* 2008;358:999–1008.
- Limdi NA, McGwin G, Goldstein J, et al. Influence of CYP2C9 and VKORC1 1173C/T genotype on the risk of hemorrhagic complications in African-American and European-American patients on warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:312–321.

13. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004;427:537–541.
14. Oldenburg J, Bevans CG, Fregin A, et al. Current pharmacogenetic developments in oral anticoagulation therapy: the influence of variant VKORC1 and CYP2C9 alleles. *Thromb Haemost* 2007;98:570–578.
15. Linder M, Looney S, Adams J, et al. Warfarin dose adjustments based on CYP2C9 genetic polymorphisms. *J Thromb Thrombolysis* 2002;14:227–232.
16. Hillman M, Wilke R, Yale S, et al. A prospective, randomized pilot trial of model-based warfarin dose initiation using CYP2C9 genotype and clinical data. *Clin Med Res* 2005;3:137–145.
17. Anderson J, Horne B, Stevens S, et al. Randomized Trial of Genotype-Guided Versus Standard Warfarin Dosing in Patients Initiating Oral Anticoagulation. *Circulation* 2007;116:2563–2570.
18. Huang S, Chen H, Wang X, et al. Validation of VKORC1 and CYP2C9 genotypes on interindividual warfarin maintenance dose: a prospective study in Chinese patients. *Pharmacogenet Genomics* 2009;19:226–234.
19. Caraco Y, Blotnick S, Muszkat M. CYP2C9 genotype-guided warfarin prescribing enhances the efficacy and safety of anticoagulation: a prospective randomized controlled study. *Clin Pharmacol Ther* 2008;83:460–470.
20. Burmester JK, Berg RL, Yale SH, et al. A randomized controlled trial of genotype-based Coumadin initiation. *Genet Med* 2011;13(6):509–518.
21. Wadelius M, Chen L, Lindh J, et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 2009;113:784–792.
22. Sanderson S, Emery J, Higgins J. Cyp2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005;7:97–104.

Využití farmakogenetiky při léčbě warfarinem

A. Tomek^{1,2}, V. Maťoška¹, T. Kumstýřová¹, L. Táborský¹

¹ Laboratoř molekulární diagnostiky Oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie Nemocnice Na Homolce Praha, přednosta prim. MUDr. Luděk Táborský

² Neurologická klinika dospělých 2. lékařské fakulty UK a FN Motol Praha, přednosta doc. MUDr. Martin Bojar, CSc.

Souhrn: Warfarin je i přes svůj nízký terapeutický index, značnou interindividuální variabilitu dávky léku a možné závažné krvácivé komplikace klíčovým lékem v terapii a prevenci tromboembolických příhod. Aplikace farmakogenetiky při vyšetření individuálních polymorfizmů genu určujícího farmakokinetiku warfarinu (CYP 2C9) a senzitivitu na warfarin (VKORC1) je slibnou taktikou pro bezpečnost antikoagulační terapie. První možností aplikace farmakogenetických dat je vypočtení denní dávky warfarinu pro jednotlivé pacienty ještě před zahájením vlastní terapie. Druhou možností je vyšetřování již warfarinizovaných pacientů, kde můžeme zjistit pacienty s rizikovým genotypem, u kterých je předpokládáno vyšší riziko krvácení. Právě zhodnocení současných možností farmakogenetiky a prvním výsledkům autorů v těchto dvou oblastech je věnován následující článek.

Klíčová slova: warfarin – farmakogenetika – CYP 2C9 – VKORC1

Application of warfarin pharmacogenetics

Summery: Even with its narrow therapeutic index, interindividual variability in daily dose and possible serious bleeding complications, is warfarin the mainstay of therapy and prevention of thromboembolic disease. The application of pharmacogenetics in testing individual polymorphisms of two genes CYP 2C9 (pharmacokinetics of warfarin) and VKORC1 (sensitivity on warfarin) is promising tactics leading to a safe anticoagulation. The first of two applications of pharmacogenetics is assesment of the daily dose of warfarin for individual patients even before starting the therapy. The second is the risk stratification of already warfarinized patients: The carriers of variant genotype are in a greater risk of bleeding complications. The following article is dedicated to the evaluation of literature and our own laboratory and clinical experience with these applications in clinical practise.

Key words: warfarin – pharmacogenetics – CYP 2C9 – VKORC1

Úvod

Antikoagulační terapie warfarinem je indikována u širokého spektra onemocnění, jak v terapii, tak v sekundární prevenci systémových tromboembolických příhod. Zároveň je ale warfarin jedním z nejnebezpečnějších léčiv pro svůj nízký terapeutický index, značnou interindividuální variabilitu dávky léku a možné závažné krvácivé komplikace. Warfarin zůstává i přes značné snahy farmaceutického průmyslu o vývoj stejně efektivních, bezpečnějších a uživatelsky příjemnějších antikoagulancií lékem první volby. A nejméně několik dalších let, než budou dokončeny klinické studie řady přímých inhibitorů aktivovaného faktoru X (rivaroxaban, LY517717, YM150, DU-176b, apixaban, betrixaban) a perorálních přímých inhibitorů trombinu (dabigatran) se budeme nuceni spoléhat jen na warfarin.

Právě farmakogenetika, která zkoumá vliv genetické výbavy jedince na po-

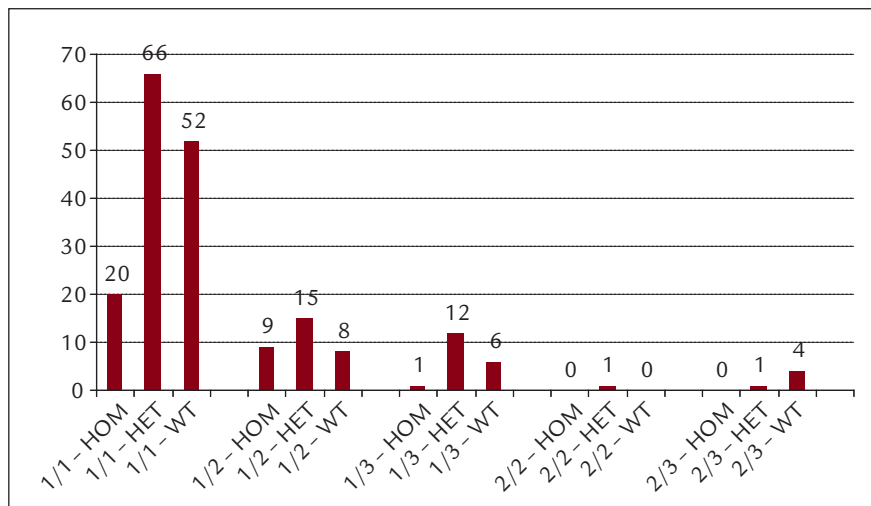
daný lék, nabízí možnost, jak s warfarinem léčit bezpečněji. První možností aplikace farmakogenetických dat je vypočtení denní dávky warfarinu pro jednotlivé pacienty ještě před zahájením vlastní terapie. Druhou možností je vyšetřování již warfarinizovaných pacientů, kde můžeme zjistit pacienty s rizikovým genotypem, u kterých pak můžeme rigorózněji a častěji kontrolovat INR. Právě zhodnocení současných možností farmakogenetiky v těchto dvou oblastech je věnován následující článek.

Co ovlivňuje individuální dávku warfarinu?

Velikost dávky je závislá na negenetických faktorech a na genetické dispozici. Negenetické faktory jsou zodpovědné zhruba za asi 50 % variability v odpovědi na warfarin v jednotlivých studiích. Můžeme je rozdělit na relativně kvantifikovatelné a stabilní (věk,

pohlaví, váha a výška pacienta, zhruba 10–20 % celkové variability dávky) a hůře kvantifikovatelné a více proměnné (aktuální obsah vitamínu K v potravě, stav jaterního a renálního metabolismu a jeho ovlivnění dalšími léky a složkami potravy, aktuální stav poměru anabolismus a katabolismus, celkový stav hemostázy, compliance pacienta a v neposlední řadě adherence k vedení léčby lékařem), které zodpovídají až za 30–40 % variability. Rozdělení faktorů majících vliv na denní dávku warfarinu podle kvantifikovatelnosti nabývá na důležitosti právě při naší snaze odhadnout denní dávku výpočtem.

Individuální genetická výbava vysvětluje 45–60 % interindividuální variability v dávkování warfarinu. Výzkum na poli genů ovlivňujících účinek warfarinu je velmi explozivní. V současnosti je známo více než 30 genů s tisíci popsanými polymorfizmy, které by mohly



Graf 1. Rozložení jednotlivých kombinací alel genů CYP2C9 a VKORC1 v české populaci. Data 195 pacientů vyšetřených v naší laboratoři. Alely genu CYP2C9 jsou v grafu označeny číselnými symboly – tj. 1/1 je nositel dvou alel CYP2C9*1, genotyp genu VKORC1 je vyjádřen zkratkami WT (nosič dvou wild type alel, haplotypy H7-H9), HOM (nosič dvou alel citlivých na warfarin, haplotypy H1 a H2) a HET (heterozygot s jednou alelou H7-9 a druhou H1 nebo H2).

ovlivňovat některou z fází účinku warfarinu. Zásadní vliv je však přisuzován pouze 2 z nich: **genu CYP2C9** pro biotransformační enzym cytochromu P450 CYP2C9 (klinicky studován od roku 1995) a **genu VKORC1** pro cílový enzym blokováný warfarinem – podjednotky 1 enzymového komplexu vitamin K-epoxidreduktázy (klinicky studován od roku 2004). Dalším rozšířením spektra vyšetřovaných genů (PROC, EPX1, GGCX, ORM1–2) se zdá, že bude možné vysvětlit navíc asi 10% variability dávky [1]. Nicméně na rozdíl od CYP 2C9 a VKORC1 chybí validizace těchto dat na větších souborech pacientů.

CYP2C9

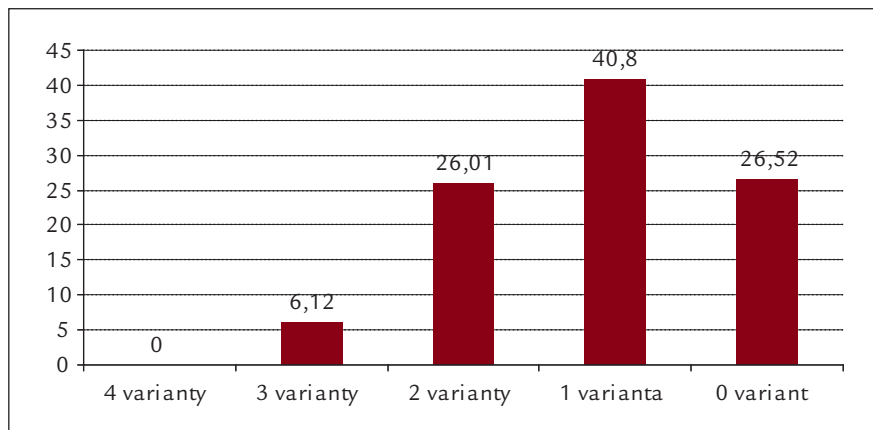
Warfarin je racemickou směsí dvou izomerů S a R (poměr S/R = 0,5 : 1), které jsou metabolizovány izoenzymy cytochromu P450. Zhruba 5krát účinnější S-warfarin je metabolizován izoenzymem CYP2C9, méně účinný R-warfarin zejména izoenzymy CYP1A2 a CYP2C19, které však nemají významný vliv na účinnou denní dávku [1]. Na individuální senzitivitu na warfarin se nejvíce uplatňují alelické varianty biotransformačního enzymu cytochromu P450 CYP2C9. U izoen-

zymu CYP2C9 je známo přes 130 polymorfizmů, na rozdílné rychlosti biotransformace S-warfarinu se klinicky významně uplatňují alelické varianty CYP2C9*1 (rychlí metabolizátoři), CYP2C9*2 (intermediální metabolizátoři) a CYP2C9*3 (pomalí metabolizátoři). Právě nositelé alel *2 a *3 mají sníženou biotransformaci, a tedy i nutnost nižší dávky warfarinu. Četnost u populace kavkazského původu je udávána 79,9% pro CYP2C9*1, 12,2% pro CYP2C9*2 a 7,9% pro CYP2C9*3 [2]. V české populaci je stav obdobný: 81,9% pro CYP2C9*1, 12,2% pro CYP2C9*2 a 5,9% pro CYP2C9*3 [3]. Warfarinizovaní pacienti s alelou CYP2C9*2 potřebovali ve srovnání s nosiči wild-type (wt) alely CYP2C9*1 průměrně o 0,85 mg/den warfarinu méně (17% redukce dávky), ještě výraznější redukce denní dávky bylo třeba u pacientů s alelou CYP2C9*3 (o 1,92 mg méně, 37% redukce) [2]. Celkově se odhady podílu těchto polymorfizmů na celkové variabilitě dávky warfarinu pohybují od 6 do 10% [4]. Je známo, že jedinci s rizikovými alelami jsou během prvních 4 týdnů léčby ve větším riziku INR nad 4,0, a tedy i krvácení. U rizikových genotypů CYP2C9*2 a CYP2C9*3 bylo popsáno vyšší relativní riziko krvá-

cích komplikací 1,91 (1,16–3,17) pro *2 a 1,77 (1,07–2,91) pro *3 [2]. Dále bylo u těchto pacientů popsáno 2–10krát vyšší riziko „přestřelení“ nad terapeutické INR rozmezí [2–3] v prvních dvou týdnech léčby [5,6] při použití doporučeného nasazovacího schématu s úvodní denní dávkou 5–10 mg warfarinu.

VKORC1

Vlastní antikoagulační efekt warfarinu je dán ireverzibilní blokadou vitamin K-epoxidreduktázy a warfarin-senzitivní chinonreduktázy, kdy v organismu vzniká deficit hydrochinonové formy vitamínu K, a tedy jeho chybění v karboxylaci glutamátu v molekulách koagulačních faktorů II, VII, IX, X, proteinu C, S a Z. Na variabilitě individuální senzitivity na warfarin se nejvíce uplatňují alelické varianty cílového enzymu blokováného warfarinem – vitamin K-epoxidreduktázy, podjednotky 1 enzymového komplexu, kódované genem VKORC1 [7,8]. U genu VKORC1 se klinicky významně uplatňují zejména nekódující polymorfizmy s prokázaným přímým vlivem na úroveň transkripce mRNA genu VKORC1 [4]. Jako nejvýše jeví haplotypizace za použití 10 polymorfizmů signifikantně ovlivňující dávku warfarinu u populací kavkazského původu (pozice 381, 861, 2653, 3673, 5808, 6009, 6484, 6853, 7566 a 9041 v genu VKORC1, GenBank AY587020), kdy můžeme probandy rozdělit na 2 skupiny podle 10 haplotypů: skupina s vyšší (obvyklou) denní dávkou warfarinu 4,8–6,0 mg (haplotypy H7–H9) a skupina s nižší denní dávkou 2,9–3,0 mg (haplotypy H1 a H2, 42,3% redukce denní dávky warfarinu). Toto prediktivní schéma bylo použitelné pro 99% vyšetřované populace indoevropského typu [4]. Z praktického hlediska stačí vyšetřovat jeden z polymorfizmů na pozicích 381, 3673, 6486, 6853 nebo 7566 genu VKORC1, které jsou každý stejně informativní jako plná haplotypizace [4]. Pacienti homozygotní pro haplotyp H1 a H2 mají signifikantně nižší



Graf 2. Rozložení počtu rizikových alel v české populaci. Data 195 pacientů vyšetřených v naší laboratoři. Rizikovými alelami je míněna přítomnost jedné variantní (non wild type alely), tj. alel *2 a *3 genu CYP2C9 a haplotypu H1 nebo H2 genu VKORC1.

čas k dosažení prvního terapeutického INR ($p = 0,02$) i k dosažení prvního INR nad 4 ($p = 0,003$), a tedy i vyšší riziko krvácivých komplikací [9]. Celkově je udáván podíl vlivu genu VKORC1 na celkové variabilitě odpovědi na warfarin od 21 do 30% [10]. Při společné analýze vlivu polymorfizmů genů CYP2C9 a VKORC1 je pozorován aditivní efekt, vysvětlují takřka polovinu variability ve srovnání s vlivy negenetickými [11].

Data o populačním výskytu jednotlivých alel genů CYP2C9 a VKORC1 samy o sobě neříkají, jak je kdo citlivý na warfarin. Klíčová je kombinace alel obou genů u jednotlivých osob, počet rizikových alel (žádná až 4) těchto dvou genů – alel *2 a *3 genu CYP2C9 a alel haplotypů H1 a H2 genu VKORC1. Kombinace jednotlivých alel zastoupené v české populaci v kohortě 195 pacientů vyšetřených v naší laboratoři uvádíme v grafu 1 – 93 žen, 102 mužů, indikace vyšetření léčba warfarinem, metoda: CYP 2C9 restriční analýza podle Taubeho [12], VKORC1 high resolution melting analýza navržená podle [4]. Nejde tedy o jasné rozdělení na jedince citlivé a relativně rezistentní na warfarin, spíše o plynulé spektrum redukce dávky dle počtu rizikových alel. V našem souboru (195 pacientů) 26,52% pacientů nebylo nosičem žádné rizikové alely, 40,8% mělo jednu rizikovou alelu, 26,01% dvě rizikové alely, 6,12% tři ri-

zikové alely, žádný vyšetřený pacient neměl čtyři rizikové alely (graf 2). Literatura uvádí zastoupení pacientů bez rizikových alel od 20,4% do 39% populace [13]. Redukce dávky u pacientů s více než 3 rizikovými alelami (zhruba 10% populace) je značná, a nesou tak vyšší riziko příliš vysokého INR při standardním nasazování warfarinu. Průměrná týdenní dávka warfarinu u pacientů se 4 rizikovými alelami byla v Andersonově studii pouze 8 mg, naproti tomu pacienti bez rizikových alel (wild type) užívali 44,7 mg warfarinu [13].

Výpočet denní dávky warfarinu podle farmakogenetiky

Pokusy o vytvoření exaktních pravidel při nasazování a vedení terapie warfarinem jsou staršího data. Korekce faktory, jako je věk pacienta či jeho tělesná hmotnost a výška, však nemohly být příliš úspěšné, negenetické vlivy mohou vysvětlit jen asi 50% variability denní dávky warfarinu. Po spojení negenetických a genetických vlivů do jednoho výpočtu můžeme dosáhnout významně vyšší přesnosti v odhadu denní dávky warfarinu.

Vyšetření polymorfizmů genů CYP2C9 a VKORC1 je již prováděno celosvětově v řadě laboratoří, zejména poté, co Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (FDA) doporučil v aktualizaci příbalové informace warfarinu vyšetření těchto dvou genů k optimalizaci

léčby. V současnosti však neexistuje jeden všeobecně uznávaný a akceptovaný vzorec výpočtu denní dávky, který by byl obecně doporučován. Žádný z dosud publikovaných vzorců nebyl validizován na opravdu statisticky významném počtu pacientů.

Publikované vzorce můžeme rozdělit na 2 skupiny. První nám umožňuje stanovit denní dávku ještě před zahájením léčby warfarinem pouze stanovením genotypu a korekcí negenetickými faktory [11,13–17]. Druhý přístup je zahájení terapie warfarinem a následná korekce dávky podle prvních výsledků INR korigovaných podle genetických údajů [18], který eliminuje nutnou chybu při odhadu negenetických faktorů (např. vliv tělesné výšky a hmotnosti nebo aktuálního nastavení hemostázy na metabolismus a účinek warfarinu) a také zmenší nezapočitatelný vliv nevyšetřených nebo dosud neznámých genetických faktorů. Přesnost jednotlivých vzorců získaných mnohonásobnou regresní analýzou je udávána hodnotou koeficientu determinace (R^2), která může nabývat hodnoty od 0 do 1 (100%) a udává procentuální úspěšnost vzorce ve výpočtu skutečné denní dávky warfarinu. R^2 se pohybuje u jednotlivých vzorců od 39% do 79% (tab. 1).

Zatím jedinou větší dokončenou randomizovanou studií srovnávající nasazení warfarinu klasickou empirickou cestou podle kontrolních hodnot INR s farmakogenetickým modelem je studie Andersona et al [13], která validizovala dříve vytvořený vzorec publikovaný Carlquistem [11]. Do studie bylo zařazeno 206 pacientů, 101 z nich bylo nasazeno podle farmakogenetického výpočtu, 99 pacientů bylo nasazeno standardně empiricky podle kontrol INR. Během prvních 3 měsíců terapie warfarinem bylo potřeba u farmakogenetické skupiny menšího počtu korekcí dávky (3 proti 3,6, $p = 0,035$) o menší množství léku (7,1 mg týdenní dávka proti 11,5 mg, $p = 0,002$). Nicméně primární cíl nebyl splněn, procentuální poměr měření INR mimo

Tab. 1. Přehled jednotlivých publikovaných vzorců na výpočet denní dávky warfarinu a jejich přesnost v odhadu denní dávky.

| Publikace | Vyšetřované geny | Započtené negenetické faktory | Koeficient determinace (R ²) | Velikost vyšetřovaného souboru pro tvorbu vzorce | Metoda validizace |
|---------------------------|--|--|---|--|---|
| Gage et al 2004 [14] | CYP2C9 | věk, rasa, pohlaví, povrch těla (BSA), užívání amiodaronu a simvastatinu | 39 % | 369 | retrospektivní již léčených a stabilizovaných pacientů, prospektivně neprovedeno |
| Gage et al 2008 [15] | CYP2C9, VKORC1 | věk, rasa, pohlaví, povrch těla (BSA), užívání amiodaronu a simvastatinu, kouření, přítomnost hluboké žilní trombózy nebo plicní embolie | 57 % u Indoevropanů, 31 % u Afroameričanů | 1 015 | prospektivní nerandomizovaná studie u 292 pacientů zahajujících warfarinizaci [15]; finálně dosažená dávka byla vysvětlena výpočtem R ² = 54 % |
| Sconce et al 2005 [16] | CYP2C9, VKORC1 | věk, výška | 54,2 % | 297 | prospektivní nerandomizovaná studie u 38 pacientů zahajujících warfarinizaci [16] |
| Carlquist et al 2006 [11] | CYP2C9, VKORC1 | věk, hmotnost, pohlaví | 44,6 % | 213 | prospektivní randomizovaná studie u 206 pacientů srovnávající farmakogenetické s klasickým nasazovacím algoritmem [13] |
| Wadelius et al 2007 [17] | CYP2C9, VKORC1, PROC, EPHX1, GGX, ORM1 | věk, hmotnost, lékové interakce (rozdělení pouze na léky snižující a zvyšující účinek warfarinu) | 73 % | 201 | retrospektivní již léčených a stabilizovaných pacientů, prospektivně neprovedeno |
| Millican et al 2007 [18] | CYP2C9, VKORC1 | INR před léčbou a 3. den léčby warfarinem, ztráta krve při operačním zákroku, kouření | 79 % | 92 | retrospektivní již léčených a stabilizovaných pacientů, prospektivně neprovedeno |

cílové rozmezí sice byl menší u farmakogenetické skupiny, ale statisticky nevýznamně – 30,7 % proti 33,1 % ($p = 0,47$). Srovnání genotypově určené s empiricky zjištěnou nasazovací dávkou warfarinu tedy zatím není jednoznačně uzavřeno. První dokončená studie byla limitována statisticky nevýznamným závěrem, nicméně trendy byly ve prospěch dávkování warfarinu založeného na genotypizaci jedince. Definitivně zřejmě potvrdí výhodnost farmakogenetiky při zahájení léčby warfarinem až zřejmě publikace výsledků právě probíhajících studií.

Farmakogenetické vyšetření během udržovací léčby warfarinem

Význam genetického vyšetření těchto dvou genů byl částečně dokázán pro

úvodní fázi léčby a je již na řadě pracovišť ve světě součástí běžné klinické praxe. Nadějnou a zatím nepřilíš prozkoumanou oblastí je farmakogenetické vyšetření již léčených pacientů. Ojedinelá data svědčí pro vyšší riziko krvácení u geneticky rizikových pacientů i během dlouhodobé udržovací léčby. Předpoklad je, že krvácení by mělo být více. V práci Aithala et al měli nosiči CYP2C9*1 (běžná populace, wild type) riziko závažného krvácení 2,25%/1 pt.yr. Nosiči CYP2C9*2 a *3 (rizikovní) měli totéž riziko 8,28%/1 pt.yr., tj. 3,68krát vyšší riziko krvácení při rizikovém genotypu [19]. Genetické vlivy (zvýšená senzitivita na warfarin u nosičů variantních alel VKORC1 a snížená úroveň metabolismu warfarinu u nosičů variant-

ních alel CYP 2C9) samozřejmě nejsou jedinými rizikovými faktory pro krvácivé komplikace při antikoagulační léčbě. Nejčastěji potvrzenými jsou: vyšší věk, noncompliance při užívání medikace a docházení na kontroly INR, nestabilní INR a INR vyšší než 3. Některé tyto faktory, stanovené v éře před nástupem farmakogenetiky warfarinu, mohou být do jisté míry na rizikovém genotypu závislé, nejvíce ohrožení a nejvíce se projevují právě u pacientů s nízkou efektivní dávkou warfarinu při rizikovém genotypu. Důvodem by mohla být nižší dávka léku, a tedy i větší citlivost na zevní vlivy. Tento fakt však nebyl zatím spolehlivě prokázán a hlavně v citované práci byl vyšetřován jen první (CYP 2C9) ze dvou známých genů. Praktickým výstupem

výzkumu v této otázce, vyjde-li předpoklad vyššího počtu krvácení u rizikového genotypu během udržovací léčby, by mohlo být častější provádění kontrol INR u rizikových pacientů dle genetiky (např. místo 1krát za měsíc 1krát za 2 týdny) a vůbec celkově vyšší důraz na vedení léčby warfarinem (důslednější sledování změn vyvolaných konkomitantní medikací apod.).

Závěrem lze shrnout, že farmakogenetika warfarinu je perspektivní metodikou, která však musí být dále dopracována a validizována správně navrženými randomizovanými studiemi.

Literatura

1. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007; 121: 23–34.
2. Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med* 2005; 7: 97–104.
3. Buzková H, Pechandová K, Slanař O et al. Genetický polymorfismus cytochromu CYP2C9 v české populaci. *Klin Biochem Metab* 2007; 15: 102–105.
4. Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med* 2005; 352: 2285–2293.
5. Lindh JD, Lundgren S, Holm L et al. Seven-fold increase in risk of overanticoagulation by CYP2C9 mutations. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 540–550.
6. Peyvandi F, Spreafico M, Siboni SM et al. CYP2C9 genotypes and dose requirements during the induction phase of oral anticoagulant therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 198–203.
7. Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V et al. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 2004; 427: 537–541.
8. 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: 645–649.
9. 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.
10. Wadelius M, Chen LY, Downes K et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J* 2005; 5: 262–270.
11. Carlquist JF, Horne BD, Muhlestein JB et al. Genotypes of the cytochrome p450 isoform, CYP2C9, and the vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 conjointly determine stable warfarin dose: a prospective study. *J Thromb Thrombolysis* 2006; 22: 191–197.
12. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; 96: 1816–1819.
13. Anderson JL, Horne BD, Stevens SM et al. Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116: 2563–2570.
14. Gage BF, Eby C, Milligan PE et al. Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin. *Thromb Haemost* 2004; 91: 87–94.
15. Gage BF, Eby C, Johnson JA et al. Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin. *Clin Pharmacol Ther* 2008; 84: 326–331.
16. Sconce EA, Khan TI, Wynne HA et al. The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen. *Blood* 2005; 106: 2329–2333.
17. Wadelius M, Chen LY, Eriksson N et al. Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism. *Hum Genet* 2007; 121: 23–34.
18. Millican EA, Lenzini PA, Milligan PE et al. Genetic-based dosing in orthopedic patients beginning warfarin therapy. *Blood* 2007; 110: 1511–1515.
19. Aithal GP, Day CP, Kesteven PJ et al. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet* 1999; 353: 717–719.

MUDr. Aleš Tomek

www.homolka.cz

e-mail: ales.tomek@gmail.com

Doručeno do redakce: 25. 9. 2008

Přijato po recenzi: 3. 2. 2009

www.mhwa.cz

CI=1.49 to 15.78, p=.009 respectively). Change in NYHA class and change in cognitive performance was positively correlated, but not significant. Severe cognitive impairment was more prevalent in patients with preserved LVEF (20.9%) compared to patients with systolic dysfunction (6.7%) at 18 months (p=.000). N-BNP levels were not associated with severe cognitive impairment. Conclusion – Patients with more severe CHF are at increased risk for severe cognitive impairment compared to those with less severe CHF. Future research is suggested to extend follow-up time and neuropsychological assessment. When the cardiologist is able to bring down the severity of heart failure, this might also induce cognitive improvements.

8 Heart and brain

9:40 - 9:50

Occult atrial fibrillation in patients with cryptogenic stroke: A pilot study for detecting atrial fibrillation by insertable cardiac monitors

M.A. Ritter¹, F. Reinke², T. Duning¹, S. Kochhäuser², C. Pott², D.G. Dechering², L. Eckardt², E.B. Ringelstein¹

Department of Neurology, University Hospital Münster, Münster, GERMANY¹, Division of Experimental and Clinical Electrophysiology; Department of Cardiology and Angiology, Münster, GERMANY²

Background: In about 20% of all ischemic strokes the etiology remains unknown despite thorough clinical work-up (cryptogenic strokes). It is hypothesized that a significant number of these cases have intermittent atrial fibrillation (iAF), however episodes are too rare to be detected within standard diagnostic procedures. In the setting of acute stroke, the current standard of AF detection is ECG on admission and a 24h-Holter-ECG as well as observation of the cardiac rhythm during monitoring on a Stroke Unit. Other tested diagnostic procedures such as 7 day Holter ECG or 30 day cardiac monitors have shown to increase the detection rate of iAF. We aimed to disclose the detection rate of iAF of insertable cardiac monitors (ICM).

Methods: Patients presenting with acute stroke classified as “cryptogenic” after standard evaluation including admission ECG, transesophageal echocardiography, 24h-Holter ECG, and 72h-monitoring on the stroke unit were included. An ICM (Reveal XT®, Medtronic Inc. Meerbusch, Germany) which continuously monitors cardiac rhythm was implanted. Patients sent daily seven-minute ECG-samples via telephone. All patients also received a 7day Holter-ECG after standard diagnostics.

Results: 42 patients (60+/-11 years; 19 female) were included. The ICM was implanted 35 (+/-37) days after the initial event. In all patients, the 7d-ECG showed no iAF. In three patients (7.1%) aged 67, 68 and 70 years, iAF was detected by the ICM after a mean follow-up of 62 (+/-29) days.

Conclusion: Preliminary results show that the detection rate of iAF with an ICM in patients with cryptogenic stroke is higher than after 7d Holter ECG. In the course of a large single centre study (TRACK-AF) we will soon acquire additional data to substantiate the results that allow the identification of patients benefitting from an intensified search for iAF.

9 Heart and brain

9:50 - 10:00

The Effect of Factor VII Level on Pharmacogenetic Guided Warfarin Dosing

A. Tomek¹, V. Matoska², T. Kolarova², M. Sramek¹, I. Sarbochova¹, L. Taborsky², M. Bojar¹

Neurology Department of Charles University, 2nd School of Medicine and University Hospital Motol, Prague, CZECH REPUBLIC¹, Molecular Genetics Laboratory, Hospital Na Homolce, Prague, CZECH REPUBLIC²

Background: Even after the advent of newer anticoagulation agents there is still a place for a well-conducted warfarin therapy. The main hindrance is a great dose variability that could be partially overcome by using pharmacogenetics. The level of anticoagulation is assessed with the prothrombin time expressed as International Normalized Ratio (INR). INR is mainly affected by plasmatic level of factor VII, less by the levels of factors I, II, V and X. The level of factors is highly variable in population and also during the time in individual patients.

Hypothesis: The level of factor VII before the initiation of warfarin treatment affects the precision of pharmacogenetic dosing algorithm, i.e. the patient with higher level of factor VII would need higher dose than estimated.

Methods: Prospective single center study. Consenting patients initiated on warfarin were analyzed for the level of factor VII before the initiation of treatment. Included patients were genotyped for CYP2C9 and VKORC1 and the dose was estimated with published algorithm. Patients were followed up for 90 days to achieve dose stabilization.

Results: 43 cardio-embolic stroke patients were included in the study (mean age 68,2 years, 20 men). The initial mean level of factor VII was 109% (61-191). The quartiles of factor VII were: < 89%, 89% – 109%, 109% - 118% and >118%. The difference of the estimated to the observed final stable dose for each quartile was: lower -0,35 mg, -0,13 mg, -0,06 mg and upper 0,13 mg (p=0,699). There was a strong correlation between the estimated and the final stable warfarin dose (r2 = 0,852, p < 0,001).

Conclusion: We have observed a non-significant trend for the effect of the initial level of factor VII on the final estimated dose. Patients with higher initial level of factor VII needed more than estimated dose. The incorporation of the levels of factor VII before the warfarin treatment could improve the accuracy and efficiency of pharmacogenetic guided dosing.

Heart and brain

1 Heart and brain

WARFARIN LOADING DOSE GUIDED BY PHARMACOGENETICS IS EFFECTIVE AND SAFE IN CARDIOEMBOLIC STROKE PATIENTS

A. Tomek¹, V. Mat'ová², T. Kumstýřová², M. Šrámek¹, I. Šarbochová¹, K. Št'ovíčková¹, K. Ružinová¹, L. Táborská², M. Bojar¹

¹Charles University, 2nd Medical Faculty, Neurology Department, Prague, Czech Republic; ²Hospital Na Homolce, Department of clinical biochemistry, hematology and immunology, Laboratory of molecular genetics, Prague, Czech Republic

Background: The clinical practice of starting the warfarin treatment with fixed loading dose driven by an effort to shorten hospitalization time is discouraged by the current guidelines but is nonetheless very prevalent. Specific group at risk of more frequent bleeding complications are patients after recent ischemic stroke.

Aim: To compare safety and efficiency of warfarin loading dose compared to maintenance dose guided with pharmacogenetics in the initiation of warfarin treatment. Primary end point was time in the treatment range (TTR, fraction of INR in range in the first 10 days). Secondary end points were: Time to the first INR in range, time to the first INR above range, the proportion of patients with serious adverse events (INR>4, bleeding, thromboembolic events, death).

Methods: Consenting cardioembolic stroke patients being initiated on warfarin were randomized to loading dose group (LDG) or maintenance dose group (MDG). Treatment was initiated either with loading dose for the first 3 days (double the estimated dose) or directly from day 1 with estimated dose. Included patients were genotyped for CYP 2C9 and VKORC1 polymorphisms and dose was estimated with published algorithm. Patients were followed up for 90 days. International normalized ratio (INR) was measured routinely on days 0-10,15,20,30 and 90. The target INR range was set as 1.8 to 3.2.

Results: 25 patients were included (13 in LDG, 12 in MDG). TTR during the first 10 days was significantly higher for the LDG (0.46 vs. 0.33 in MDG, p=0.003). Time to the first INR in range was shorter for LDG 5.4 vs. 7.6 days, ns. INR above range was reached only in 2 patients in LDG (after mean 4.5 days) and in 5 patients in MDG (21.4 days, p<0.001). The number of patients with serious adverse events was not significantly different (2 LDG, 3 MDG).

Conclusion: Warfarin loading dose guided by pharmacogenetics improved the efficiency of warfarin dose initiation without increasing the risk of adverse events.

2 Heart and brain

CONTINUOUS STROKE UNIT ECG MONITORING DETECTS INTERMITTENT ATRIAL FIBRILLATION MORE SENSITIVELY THAN 24 H HOLTER ECG AFTER ACUTE STROKE AND TIA

R. Veltkamp¹, T. Rizos¹, J. Güntner², E. Jenetzky³, C. Reichardt¹, T. Hepp⁴, R. Reinhardt⁴, L. Marquardt¹, P.A. Ringleb⁵, W. Hacke⁵

¹Department of Neurology, University Heidelberg, Heidelberg, Germany; ²Department of Neurology, Univ. Heidelberg, Heidelberg, Germany; ³Department of Epidemiology, DKFZ Heidelberg, Heidelberg, Germany; ⁴Apoplex Technologies, Pirmasens, Germany; ⁵Department of Neurology, Heidelberg, Germany

Background and Purpose: The effectiveness of stroke prevention with anticoagulants has been firmly established in stroke/TIA patients suffering from atrial fibrillation (AF). Although detection of intermittent AF (iAF) in this high-risk population is important, the optimal diagnostic work-up is currently unclear. The aim of the present study was to compare the effectiveness of continuous ECG monitoring (CEM) with 24h Holter ECG for detection of iAF.

Methods: A prospective, consecutive single-center study enrolling all patients with ischemic stroke or TIA admitted to our stroke unit (SU) was performed between March 2010 and January 2011. All patients received a 12-channel ECG upon admission, and 24h Holter ECG was started within 48h. CEM consisted of 2 modes.

In the conventional mode, diagnosis of AF was based on the frequency-triggered arrhythmia alarm of the monitor system confirmed by 12 channel ECG. In the automatic mode, monitoring data were transferred via internet to a central server where a dedicated AF detection software based on heart rate dynamic analysis (SRAclinic®) generated AF diagnosis.

Results: Of the 824 patients admitted to the stroke unit, 564 patients fulfilled all predefined criteria for entering the data analysis. Mean age was 69±13 years, 60.1% were male. 81.1% of patients had a stroke, 18.9% a TIA. Prevalence of all AF based on documentation on the SU was 21.9%. AF was sustained in 12.6% and intermittent in 9.3% of the study population. Intermittent AF was detected by admission ECG in 34.6%. Additional CEM detected intermittent AF significantly more frequently (96.2%) than additional 24 h Holter ECG (61.5%) (p<0.01, McNemar).

Conclusions: Prevalence of iAF detected in stroke unit patients is high. CEM including an automatic dedicated AF analysis software and ECG data storage for physician review is more sensitive and sufficiently specific to replace 24 h Holter ECG for detection of iAF on stroke units.

Disclosure: Investigator-initiated study, support by ApoplexTechnologies.

3 Heart and brain

PROGNOSIS OF CEREBRAL INFARCTION ACCORDING TO CORONARY ARTERY DISEASE STATUS

P.C. Lavallée¹, J. Labreuche¹, P.G. Steg², P. Amarenco¹, AMISTAD Group
¹Bichat Stroke Center, Paris, France; ²Department of Cardiology, Bichat hospital, Paris, France

Background: there is no large study on the risk of cardiovascular events in patients with recent cerebral infarction according to presence/absence of silent coronary artery disease (CAD).

Objective: to stratify the risk of vascular event recurrence in BI patients according to CAD subgroups (no disease, silent coronary stenosis <50%, silent coronary stenosis ≥50%, and known symptomatic CAD).

Method: From June 2005 and December 2008, 378 consecutive acute BI patients regardless of stroke subtype underwent coronary angiography (n=315, median delay from stroke onset, 8 days) except if they had known CAD (n=63). Follow-up was 4 years. Follow-up visits were scheduled between three and six months after enrolment and every year thereafter. All patients had carotid and femoral artery, thoracic, and abdominal aorta ultrasound examinations at baseline. All patients signed informed consent and the study was approved by local ethics committee.

Main outcome measure: Two-year rate of a composite of vascular death, cardiac events (myocardial infarction, resuscitation after cardiac arrest, hospitalisation for unstable angina or cardiac insufficiency), stroke or peripheral arterial disease.

Results: In December 2010, the median follow-up was 37 months (interquartile range, 27 to 49); 32 patients died (20 before the two-year contact) and 6 patients had no follow-up information. At two-year, a total of 40 patients had at least 1 vascular event giving an overall estimated risk of 11.2% (95%CI, 8.3-14.9). According to the CAD subgroups at baseline, vascular event risk was 3.6% in 119 patients with no CAD, 8.4% in 112 patients with silent coronary stenosis <50%, 16.7% in 80 patients with silent coronary stenosis ≥50%, and 23.4% in 61 patients with known CAD (log-rank, p<0.0001). Using patients with no CAD as reference, the age-gender-adjusted HR (95%CI) of vascular events was 2.10 (0.63-6.96) for silent coronary stenosis <50%, 4.41 (1.36-14.27) for silent coronary stenosis ≥50% and 6.63 (2.06-21.35) for known CAD.

Conclusion: In patients with cerebral infarction, silent CAD is a strong predictor of any future cardiovascular events within two years after stroke onset.

4 Heart and brain

HIGH SENSITIVE TROPONIN (HSTNI) IN ACUTE STROKE PATIENTS

B. Anders, A. Alonso, M. Bolognese, T. Menzel, C. Schwarzbach, M. Kablau, D. Artemis, A. Förster, M.G. Hennerici, M. Fatar
Department of Neurology, UniversitätsMedizin Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

with no significance (CCB co-treated 233.49±95.41, not-treated 208.43±90.01; Statin co-treated 220.85±100.46, not-treated 210.90±74.19).

Conclusion: Our study showed patient with CYP2C19*2 and CYP2C19*3 allele polymorphism (intermediate and poor metabolizer group) had clopidogrel resistance measured by PRU value. There was no statistical correlation between CCB and statin with clopidogrel resistance in this study.

942 Stroke prevention

MULTI-NATIONAL COMPARISON OF SECONDARY STROKE PREVENTION IN THE COMMUNITY

E.L. Heeley, J. Wei, C.S. Anderson

The George Institute for International Health, Sydney, Australia

Background: Evidence is well established regarding the efficacy of secondary stroke prevention measures also of variability in the uptake of such treatments. We compared the degree of variability in uptake of secondary stroke prevention therapies across different countries.

Methods: We compared data from our study of primary care in Australia, AusHEART, and a hospital register in China, ChinaQUEST, with published studies in other countries identified through searches in PubMed. The aim was to identify studies examining the uptake of secondary prevention therapies in stroke patients in primary care or at 12 months post-discharge from hospital.

Results: In AusHEART (n=527 stroke/TIA patients), there was a large treatment gap in with only 64% of stroke patients receiving blood pressure (BP) lowering treatment, which was similar to the ChinaQUEST stroke registry (n=4133) where 61% of 12 month stroke survivors were prescribed such therapy. However, a study in rural India has reported such treatment in only 53% of such patients. Other studies in Canada and Sweden have shown BP lowering use to be better at 88% and 74%, respectively. Antiplatelet use was highest in Sweden (87%) and lowest in India (12%). Uptake of lipid lowering therapies varied considerably across the studies, being 75%, 53%, 41%, 17%, and 1% in Canada, Australia, Sweden, China and India, respectively. In the AusHEART study, patients with a history of coronary artery disease (CAD) were nearly twice as likely to be prescribed the combination of BP lowering, lipid lowering and antiplatelet, than stroke/TIA patients (adjusted RR 1.91 [1.60, 2.27]).

Conclusions: Use of secondary prevention measures is apparently low for stroke patients across in many communities, and as shown in Australia, much worse than for patients with CAD. Efforts need to be made to improve the implementation of proven secondary prevention measures to reduce the global burden of stroke.

943 Stroke prevention

PRECISION OF PHARMACOGENETICS ALGORITHMS FOR ESTIMATION OF WARFARIN DAILY DOSE

A. Tomek¹, V. Mat' oška², T. Kumstýřová², Z. Lacinová², L. Táborský², M. Bojar¹

¹Department of Neurology, Charles University, 2nd Faculty of Medicine, Praha, Czech Republic; ²DNA Laboratory, Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology, Hospital Na Homolce, Praha, Czech Republic

Background: Warfarin is the first choice in oral anticoagulation, despite its safety profile and difficulties to initiate and maintain the therapeutic anticoagulation due to the wide individual variability in daily dose. Individual genetic profile (mainly CYP2C9, VKORC1 genes) explains up to 60% of dose variability and could help us to estimate daily dose before the initiation of treatment using pharmacogenetics algorithms. There is no consensus on one algorithm; therefore, different formulas are available.

Accuracy of prediction of respective algorithms can be expressed in the value of coefficient of determination (R², value from 0 to 100%).

Objective: To compare empirically determined warfarin daily dose with dose predicted by three published algorithms [1-3] in our cohort of patients divided by age.

Methods: We selected patients from our database with empirically determined stable warfarin dose (dose constant at least 3 months with 3 consecutive INR in therapeutic range). All patients were genotyped for polymorphisms of CYP2C9 (*1, *2, *3) and VKORC1 (haplotypes A, B) genes. Warfarin dose was predicted using three algorithms [1-3] for each patient, R² were calculated for each algorithm.

Results: 131 patients with stable anticoagulation were included - median time from last dose change 6 (3-84) months, median time of treatment 22.5 (4-276) months. The values of R² for respective algorithms were 63,58% [1], 37,59% [2] and 33,82% [3]. In 21 patients aged 39 or younger: 15,38% [1], 6,12% [2] and 10,42% [3]. In 109 patients older than 40 years: 73,29% [1], 34,22% [2] and 48,88% [3].

Conclusion: Pharmacogenetic prediction is clinically useful in patients older than 40 years, the most precise was algorithm [1].

- References:** 1. Sconce E et al. Blood 2005;106:2329-33.
2. Carlquist JF et al. J Thromb Thrombolysis 2006;22:191-7.
3. Gage B et al. Clin Pharmacol Ther 2008;84:326-31.

944 Stroke prevention

DEMOGRAPHIC PREDICTORS OF STROKE AWARENESS IN DENMARK

T. Truelsen, L.H. Krarup

Department of Neurology, Herlev Copenhagen, Denmark

Background: The knowledge in the general population about major stroke symptoms and risk factors is essential for fast treatment, and for improving stroke prevention. This is the first-ever study about stroke knowledge in a large Danish population.

Methods: A total of 3,520 subjects were invited to participate in the study using a web-based, (closed-) questionnaire about major stroke symptoms and risk factors for stroke. The recruitment was stratified by region, age, and gender to represent the composition of the general Danish population aged 25+ years. Enrolment was competitive with a pre-defined target of 800 responses. Multivariate ordinal logistic regression analyses were used.

Results: From Dec 12 to Dec 17 (2008), a total of 811 subjects were included, mean age was 58 (SD 11) years of which 405 (50%) were women. Women had better knowledge of major stroke symptoms compared with men 1.37 (1.16-1.53), p=0.001, and increasing age was also associated with better knowledge of stroke symptoms, OR= 1.18 (1.04-1.35), p=0.013. Similarly, female gender and increasing age was also associated with better knowledge of major stroke risk factors, OR= 1.41 (1.18-1.58), p=0.002 and 1.31 (1.12-1.53), p=0.001, respectively. Association for age was attenuated when adjusted for history of cardio-vascular disease. Place of living and years of education was not significantly associated with knowledge of stroke symptoms and risk factors for stroke.

Conclusions: Women, increasing age, and history of cardio-vascular disease is associated with better knowledge of stroke symptoms and risk factors for stroke.

945 Stroke prevention

QUALITY OF SECONDARY PREVENTION AFTER MINOR STROKE AND TIA IN A GERMAN STROKE UNIT SETTING. THE COURSE OF PATIENTS WITH MINOR STROKE AND TIA STUDY (COPAMISTIA)

S. Leistner¹, C.H. Nolte¹, A. Ziegler¹, G. Nieweler¹, G.J. Jungehulsing², P.U. Heuschmann², H.J. Audebert¹

¹Center for Stroke Research, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany; ²Center for Stroke Research, Charité Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Background: Patients after stroke or TIA are at high risk for vascular re-events. Effective secondary prevention measures comprise risk factor control, life style modifications and antithrombotic treatment. Little data exist about quality of pharmacological and non-pharmacological secondary prevention in unselected hospital cohorts.

Methods: We assessed frequency of risk factors, lifestyle habits and quality of secondary prevention in consecutive patients admitted to two stroke centers in Berlin.

Patients with minor stroke (mRS<2 at time of screening) or TIA (complete symptom remission <24h) and at least one modifiable risk factor were included and followed up over 6 months. Willingness of patients to participate in a support program for intensified secondary prevention was assessed before hospital discharge.

Results: 303 consecutive patients were screened. 234 patients (62% male, median age 66y [24-87]) fulfilled the inclusion criteria and were included between January and September 2009. Frequencies of known risk factors were: Hypertension: 71%; diabetes: 17%; atrial fibrillation: 15%; hypercholesterolemia: 62%; smoking: 30%; overweight (BMI 25-29): 45%; obesity (BMI≥30): 19%. Only 46% reported physical activity (≥30 minutes) at least 2 times per week. 89% stated that they would like to participate in a support program. Quality of secondary prevention during follow-up regarding risk factor control, medication compliance and lifestyle will be presented at the ESC 2010.

Conclusions: Most minor stroke or TIA patients admitted to acute Stroke Units have modifiable risk factors and could benefit from lifestyle changes. The vast majority of these patients are interested in a support program for intensified secondary prevention.

3 Heart & brain

CEREBRAL AUTOREGULATION IS IMPAIRED IN TYPE I DIABETIC PATIENTS WITH CARDIOVASCULAR AUTONOMIC NEUROPATHY

N. Nasr¹, F. Arevalo¹, S. Boukhris², S. Fontaine³, M. Czosnyka⁴, B. Guidolin¹, A. Pavy-Le Traon³, H. Hanaire³, V. Larrue¹

¹Service de Neurologie Vasculaire, Hôpital Rangueil, CHU de Toulouse, Toulouse, France; ²Service de Médecine, Centre hospitalier de Brive, Brive la Gaillarde, France; ³Service de Diabétologie, Hôpital Rangueil, CHU de Toulouse, Toulouse, France; ⁴Academic Neurosurgical Unit, Addenbrooke's Hospital, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; ⁵Service d'Explorations Fonctionnelles respiratoires, Hôpital de la Cavale Blanche, CHU de Brest, Brest, France

Introduction: A cardiovascular autonomic neuropathy (CAN) has been shown to contribute to the increased stroke risk of diabetic patients. An association between CAN and impaired cerebral autoregulation might explain this increased stroke risk. We tested the hypothesis that CAN correlates with impaired cerebral autoregulation in patients with type I diabetes.

Methods: Dynamic cerebral autoregulation (DCA) was assessed in type I diabetic patients with no history of cerebrovascular disease using the index (Mx). Mx is a moving correlation coefficient derived from the spontaneous variations of cerebral blood flow velocity and mean arterial blood pressure (ABP) which were monitored using transcranial Doppler and finger plethysmography. More positive Mx values indicate weaker DCA. Mx > 0.3 indicates impaired DCA. Postural changes of ABP were assessed during passive and active standing. Orthostatic hypotension (OH) was defined as a drop of more than 20mmHg for systolic ABP or 10mmHg for diastolic ABP. Heart rate variability was measured on deep controlled breathing, Valsalva manoeuvre (Valsalva ratio) and initiation of active standing (30/15 ratio). CAN was confirmed when a minimum of two of afore mentioned tests indicated pathological response.

Results: Forty-six patients were recruited (M/F: 23/23; mean age: 46±11). DCA was impaired in 27 patients. Thirty-two patients had CAN and 12 patients had OH. No difference was found between patients with normal DCA and patients with impaired DCA as for age, sex, duration of diabetes, HbA1c, smoking, hyperlipemia, hypertension and body mass index. DCA impairment correlated with CAN (p=0.001; Fisher test) and with OH (p=0.008; Fisher test). Mx values were higher indicating weaker autoregulation in patients with CAN as compared with patients without CAN (Median Mx: 0.39 vs. 0.185; p=0.003, Mann-Whitney U test).

Conclusion: DCA is impaired in diabetic patients who have CAN. This might contribute to the increased stroke risk of these patients.

4 Heart & brain

COMMON CAROTID DUPLEX-BUBBLE TEST FOR PATENT FORAMEN OVALE

B. Censori, T. Partziguian, M. Poloni
Ospedali Riuniti di Bergamo, Bergamo, Italy

Background: We have assessed if Duplex study of the common carotid artery (CCA) can be used in the place of trans-cranial Doppler (TCD) to carry out the bubble test to detect a patent foramen ovale (PFO).

Methods: A consecutive series of patients studied with TCD for PFO underwent a simultaneous Duplex study of the common carotid artery ipsilateral to the insonated middle cerebral artery, in a longitudinal projection. The TCD probe was fixed with an elastic band; the Duplex probe was manually held. For the CCA Duplex a GE Logiq7 machine was used, with a pulsed wave Doppler frequency of 5.0 MHz. The sample volume covered the entire diameter of the CCA. The bubble test was carried out with standard methods, once in the basal condition, and twice with a Valsalva maneuver (VM). All tracings were recorded on video tape and later read by a neurologist. The number of microembolic signals (MES) was classified as: absent, class 1 (1 to 10), class 2 (11 to 20), class 3 (21 to 30), class 4 (31 to 50), class 5 (>50 or shower pattern).

Results: We studied 100 patients, with a mean age of 51.0±16.0 yrs. One hundred basal and 200 VM bubble tests were analyzed. With TCD, 70 basal and 84 Valsalva tests did not show any MES; all of them also scored class 0 with CCA Duplex. With TCD, 58 VMs scored class 5; of these, 54 scored class 5 (93.1%) with CCA Duplex, 1 class 4 (1.7%), 2 class 3 (3.4%), and 1 class 2 (1.7%). Of 146 TCD tests with at least 1 MES, 11 did not show any MES with CCA Duplex (7.5%). For all of them the TCD class was 1. Duplex MES of the CCA were often less prominent than TCD signals, both visually and acoustically.

Conclusions: Despite lower sensitivity than TCD, Duplex study of the common carotid artery may be used for PFO detection. This may help in patients without a cranial bone window, and may greatly increase the diffusion of the bubble test,

because Duplex machines for neck vessels are much more common than TCD machines.

5 Heart & brain

RELATIONSHIP BETWEEN MIGRAINE, STROKE AND RIGHT-TO-LEFT SHUNT: TRANSCRANIAL DOPPLER AND MRI EVIDENCE AGAINST A MICROEMBOLIC PATHOGENETIC MECHANISM

G. Nuzzaco¹, M. Rocca², M. Sessa¹, P. Annovazzi¹, B. Colombo¹, V. Barcella¹, M. Absinta¹, G. Giacalone³, A. Falini⁴, G. Fanelli¹, M. Filippi², G. Comi¹, F. Minicucci¹

¹Department of Neurology, Institute of Experimental Neurology - IRCCS San Raffaele, Milano, Italy; ²Neuroimaging Research Unit, Institute of Experimental Neurology - IRCCS San Raffaele, Milano, Italy; ³Department of Neurology, Vita-Salute University - IRCCS San Raffaele, Milano, Italy; ⁴Neuroradiology Unit and CERMAC - IRCCS San Raffaele, Milano, Italy

Background: Migraine has been associated with an increased risk of stroke. Available data suggest that both migraine and cryptogenic stroke are associated with the persistence of right-to-left shunt (RLS), indicating that such a condition might play a role in triggering migraine and causing brain ischemia, possibly through paradoxical embolism. These findings have led to the hypothesis that MRI white matter lesions (WMLs) in migraineurs might be the footprints of paradoxical microembolic events in the brain. Aim of this study was to investigate the association between WMLs and RLS in migraine patients.

Methods: Migraineurs and healthy controls were screened for the persistence of RLS with transcranial Doppler and for the presence of WMLs using a 3.0 Tesla MRI scanner. RLS was categorized into 4 grades according to the number of microbubbles detected. The presence, number and volume of WMLs were determined on FLAIR and T2-weighted MRI scans and related to the type of migraine and presence/absence of RLS by univariate statistics.

Results: Forty-eight subjects were enrolled: 17 migraineurs with aura, 20 migraineurs without aura, and 11 controls. Our data confirmed the higher prevalence of shunt in migraine subjects. WML load was higher in migraineurs than in controls, but difference did not reach statistical significance. The total number and volume of WMLs in patients with and without shunt were not significantly different. There was no significant correlation between the entity of RLS and lesion load. At logistic regression analysis, only age was associated with WMLs (p<0.001).

Conclusions: The presence of RLS does not increase WML load in patients with migraine. Albeit the nature of the association between WML, RLS and migraine, and how migraine might be a risk factor for stroke remain unknown, our findings highlight the need for further studies to investigate possible pathogenetic mechanisms other than paradoxical embolism.

6 Heart & brain

THE RISK OF BLEEDING COMPLICATIONS IN MAINTENANCE THERAPY WITH WARFARIN IS ASSOCIATED WITH VARIANT POLYMORPHISMS IN THE CYP2C9 AND VKORC1 GENES

A. Tomek¹, V. Matoska², T. Kumstyrova², L. Taborsky²
¹Charles University, 2nd School of Medicine, Neurology Department, Prague, Czech Republic; ²Na Homolce Hospital, Department of Clinical Biochemistry, Hematology and Immunology, DNA Laboratory, Prague, Czech Republic

Background: Warfarin is the most effective drug in the secondary prevention of cardioembolic stroke but its use is hindered by risk of bleeding complications. The main reason for warfarin risk is a narrow therapeutic index and great interpersonal variability in daily dose. 30-50% of this variability is based on different genetic background (polymorphisms of CYP2C9 - pharmacokinetics and VKORC1 - pharmacodynamics) compared to only 20% variability from clinical factors. The warfarin pharmacogenetics is being studied as a method to lessen complications in the induction phase of therapy (dosing algorithms). Less is known about the influence of genetic factors during the stable maintenance phase of warfarin therapy.

Aim of pilot study: What is the frequency of variant alleles (VA) of genes CYP2C9 and VKORC1 in patients with bleeding complications during maintenance phase of warfarin therapy?

Methods: 48 consecutive consenting patients treated and stabilized on warfarin for more than 1 year were included. Average length of treatment was 2 years and 11 months (1-20 years). All were genotyped for polymorphisms in genes CYP2C9 (*1, *2, *3) and VKORC1 (haplotype A and B), variant alleles resulting in lower warfarin dose (*2, *3; haplotype A) were counted. Detailed history aimed at bleeding complications (included only bleedings after 3 months of therapy), compliance, concomitant medication and other possible variables was taken.

Results: 9 patients had history of bleeding complications (3 major, 6 minor). 1 (11,1%) had 0 VA, 2 (22,2%) had 1 VA, 3 (33,3%) had 2 VA and 3 (33,3%) had 3 VA. 39 patients had no history of bleeding. 14 (35,8%) had 0 VA, 16 (41%) had 1 VA, 8 (20,5%) had 2 VA and 1 (2,6%) had 3 VA.

Conclusion: There is a trend for higher risk of bleeding in patients with variant alleles of genes CYP2C9 and VKORC1 even during the maintenance phase of warfarin therapy. This can lead to more emphasis and more frequent controls in these patients.

Léčba warfarinem - má stále smysl a jak na to?

...nebo...

Jak a proč vůbec léčit warfarinem?

Aleš Tomek^{1,2}, Václav Mat'oška²

- 1) Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06
- 2) Laboratoř molekulární diagnostiky, oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Roentgenova 2, Praha 5, 150 30

Souhrn: Warfarin zůstává podle úhradových pravidel pojišťoven v České republice antikoagulačním lékem první volby. Nutnou podmínkou je však pečlivá klinická praxe se snahou o vysoký čas v terapeutickém rozmezí - adekvátní zahajovací dávka, správná frekvence kontrol INR a optimálního dávkovacího schématu - a optimálně i využití pokročilejších technik - farmakogenetika a self-monitoring. Rozdíly mezi warfarinem a antikoagulačními léky nové generace (dabigatran, rivaroxaban a apixaban) lze tímto postupem minimalizovat a léčit tak pacienty efektivně a bezpečně v omezených ekonomických poměrech našeho zdravotnictví.

Klíčová slova: Warfarin, dabigatran, rivaroxaban, apixaban, CYP2C9, VKORC1

Proč stále léčit warfarinem?

Warfarin je stále v podmínkách českého zdravotnictví lékem první volby při volbě perorálního antikoagulancia i přes rychlý nástup a masivní kampaň výrobců nových antikoagulačních léků. Proč tomu tak je a je to dobře?

Důvod první - úhrada a cena:

Pravidla úhrady již schválených perorálních antikoagulancií ze zdravotního pojištění (dabigatran a rivaroxaban) v indikaci prevence cévní mozkové příhody a systémové embolie u dospělých pacientů s nevalvulární fibrilací síní vyžadují kontraindikaci warfarinu než můžeme nasadit nové léky. Kontraindikace jsou definovány jako a) nemožnost pravidelných kontrol INR b) nežádoucí účinky při léčbě warfarinem c) nemožnost udržet INR v terapeutickém rozmezí 2,0 - 3,0; tzn. 2 ze 6 měření nejsou v uvedeném terapeutickém rozmezí d) rezistence na warfarin, tj. nutnost podávat denní

dávku více než 10 mg. To znamená, že musíme každého indikovaného pacienta nasadit nejprve na warfarin a teprve po jeho selhání bude pojišťovna hradit nový lék. Pokud léčíme warfarinem efektivně, s rozmyslem a s využitím všech moderních možností (farmakogenetika, selfmonitoring INR), pak jen zhruba necelá čtvrtina pacientů bude splňovat pravidla definovaná pojišťovnou pro úhradu dabigatranu a rivoraxabanu. Ostatně dalším důvodem je i nemalý cenový rozdíl ve prospěch warfarinu a tedy i zátěž rozpočtů našich ambulancí. Cena měsíční léčby warfarinem i se započtením jedné kontroly INR (asi 200 Kč bez doplatku pro pacienta) je takřka desetkrát nižší než cena nových antikoagulancií (asi 2100 Kč navíc s doplatkem pro pacienta).

Důvod druhý - efektivita léčby

Primárním cílem všech studií s novými antikoagulanciemi bylo prokázat noninferioritu (nepodřadnost) proti warfarinu v prevenci systémové embolizace a cévních mozkových příhod. Podíváme-li se na jejich výsledky detailněji vidíme několik základních problémů. Absolutní rozdíl mezi novými léky a warfarinem je poměrně malý (i když statisticky významný pro velký počet pacientů zařazených do studií). Většinou šlo o rozdíly v řádu jednotlivců maximálně jednotlivých desítek pacientů z tisíce. Tím neříkáme, že nová antikoagulancia nenesou žádné výhody - naopak jsou všechny prokazatelně neinferiorní, tj. minimálně stejně efektivní jako warfarin a dokonce v případě srovnání dabigatranu v dávce 2x 150mg denně superiorní v prevenci cévních mozkových příhod a systémové embolizace (1) a v případě apixabanu v prevenci všech cévních mozkových příhod a systémových embolizací (ne však samostatně ischemických cévních mozkových příhod) (2). To ostatně odráží i recentní doporučení Evropské kardiologické společnosti pro prevenci embolických komplikací u pacientů s nevalvulární fibrilací síní, kdy je preferována nová generace antikoagulancií (3). Významná většina pozitivních rozdílů v účinnosti i bezpečnosti se však projevila (a byla součástí celkového výsledku studií) při srovnání nových antikoagulancií s podskupinami pacientů léčených warfarinem s horší kontrolou léčby (4). Efektivita warfarinu významně stoupá se vzrůstajícím časem v terapeutickém rozmezí (TTR), tj. čase, kdy je pacient naměřenou hodnotou antikoagulačního efektu podle INR mezi 2,0 až 3,0. Pro ilustraci v analýze studií SPORTIF III a V byla roční mortalita pacientů s nízkým TTR (< 60%) vysokých 4,2% a závažná krvácení u 3,85% ročně. Oproti tomu u dobře antikoagulovaných pacientů (TTR > 75%) byla roční mortalita jen 1,69% a závažná krvácení 1,58% ročně (5). Stejně tak i roční výskyt cévních mozkových příhod (2,1% proti 1,07%) i infarktů myokardu (1,38% proti 0,62%) byl významně rozdílný. Rozdíly v účinnosti a bezpečnosti léčby mezi dobře a špatně warfarinizovaným pacientem je pak mnohem větší než mezi pacientem léčeným novým lékem a dobře warfarinizovaným pacientem. Proto stále zůstává obecně doporučovaným pravidlem nepřevádět pacienty dobře kontrolované na warfarinu (s vysokým TTR) na nové léky. Jsme-li tedy schopni u pacienta dosáhnout vysokého TTR od nasazení warfarinu i během udržovací léčby, pak není tedy chybou pacienty dále

nasazovat na warfarin jako první volbu. Zásadní není rozhodnutí, zda pacienta nasadit na nový lék či warfarin, ale to, zda bude vůbec antikoagulován. Protože samotný fakt nasazení antikoagulace je populačně nejpřínosnější z hlediska redukce mortality i morbidity.

Důvod třetí - možnost monitorace léčby

Tolik vyzdvihovaná přednost nových léků tj. odpadnutí nutnosti monitorace antikoagulačního efektu, se stává zásadní nevýhodou při krizových situacích - závažné krvácení, nutnost urgentního operačního zákroku, selhání léčby ve smyslu proběhlé embolizace (např. otázka indikace intravenózní trombolýzy při ischemické cévní mozkové příhodě), podezření na předávkování, identifikace pacientů se zvýšeným rizikem krvácení při možné interakce s jinými léky nebo při kolísajících a hraničních renálních funkcí a v neposlední řadě při sporné compliance pacienta. Metody spolehlivě schopné vyšetřit úroveň antikoagulačního efektu po podání dabigatranu (modifikované vyšetření trombolastinového času - test Hemoclot) nebo rivaroxabanu (Hodnoty protrombinového času stanoveného Neoplastinem) nejsou zdaleka všeobecně dostupné, zatím jen v největších laboratořích krajského typu. Doporučované testování pomocí dostupných standardních testů (pro dabigatran APTT, pro rivaroxaban anti faktor Xa chromogenní) je většinou je orientační a zejména při mezních hodnotách může být bez adekvátní zkušenosti zcela zavádějící. Oproti tomu warfarin je rutinně testován v režimu 24/7 a to ať v každé laboratoři nebo dokonce i samotným pacientem s použitím POCT přístroje.

Důvod čtvrtý - krvácivé komplikace

V případě vzniku nejobávanější komplikace antikoagulace - závažného krvácení - máme v případě léčby warfarinem padesátiletou zkušenost literární a většina z nás i osobní, klinickou. Existují jasné algoritmy kodifikované v různých odborných doporučeních, které lze aplikovat. V případě závažného krvácení máme emergentní možnost korekce koagulace optimálně podáním koncentráту faktorů protrombinového komplexu (zhruba do 30 minut) nebo podáním mražené plazmy v kombinaci s vitamínem K (v rámci hodin podle únosné rychlosti podání plazmy podle kardiální funkce pro nebezpečí kardiální selhání). Pokud není stěžejní rychlost korekce, pak podání vitamínu K koriguje velmi levně koagulaci v rámci 6 hodin. Oproti tomu, u nových antikoagulancií máme minimální zkušenost, a to včetně literární. U dabigatranu je sice možnost urgentní dialýzy (hodiny podle dostupnosti), ale podání koncentráту faktorů protrombinového komplexu nebo rekombinantního faktoru VII je sporné bez přesvědčivých důkazů v laboratorních studiích (6). Specifické antidotum je zatím v klinickém vývoji a nedostupné pro klinickou

praxi. V případě rivaroxabanu je očekáván podle laboratorních dat lepší efekt koncentráту faktorů, nicméně klinické zkušenosti se počítají na jednotlivé kazuistiky.

Důvod pátý - adherence k léčbě a rychlost nástupu účinku

Adherence je rozsah, ve kterém se pacientovo chování shoduje s radami zdravotníka. Ze všech studií sledujících adherenci pacientů vyplývá, že pouze zhruba polovina až tři čtvrtiny pacientů dodržuje režim dostatečně k dosažení cíleného terapeutického efektu a redukcii morbidit a mortality. Obecně je uváděno, že nová generace antikoagulancií bude přínosem pro zvýšení adherence k antikoagulaci. Ale jsou zde jistá úskalí vyplývající z krátkého poločasu nových léků. Je známo, že pacient spíše lék zapomene vzít, než že by si vzal více dávek. Vyzdvihovaná výhoda nových léků (tj. rychlý nástup účinku nových léků při zahájení léčby) se pak stává smrtící nevýhodou pro vysoké riziko selhání léčby ve smyslu vzniku embolizační cévní příhody již po vynechání jedné či dvou dávek (pacient jeden den zapomene). Warfarin pro svůj poločas blízký se dvěma dny udrží antikoagulační efekt i při několikanásobném vynechání. Dále je za velkou nevýhodou warfarinu považována nutnost omezení diety - příjmu vitamínu K. Nicméně řada studií prokázala, že drastické omezení příjmu potravin s obsahem vitamínu K vede k nestabilní kontrole antikoagulace a tedy i nízkému TTR. Není tedy nezbytné zcela omezit vitamín K, stačí vynechat nejvýznamnější zdroje a dodržovat alespoň přibližnou pravidelnost v příjmu vitamínu K kontrolou porcí zeleniny (např. podle stejné velikosti misky stejné dny v týdnu) a následně adekvátní úpravy dávky warfarinu. Nutnost pravidelných kontrol INR u warfarinu, která by se mohla podílet u pacientů na odporu k léčbě, by naopak mohla vést k častějšímu kontaktu pacienta s lékařem a tedy i větší možnosti pozitivního ovlivnění adherence. V neposlední řadě je známý efekt závislý na nastavení pacienta, kdy známý lék je i přes jeho omezení, známým a méně obávaným, oproti nové léčbě zahrnujícím strach z neznámého.

Jak tedy správně léčit warfarinem?

Mimo klasických a dobře známých kontraindikací warfarinu uvedených v SPC bychom rádi upozornili na následující klíčové momenty a na stále v rutinní klinické praxi přetrvávající chyby.

Nasazení warfarinu

Klíčovým momentem warfarinizace, kdy je velký prostor pro zásadní komplikace, je čas hledání správné dávky warfarinu a její stabilizace. Můžeme použít tři základní strategie: 1) Empirické nasazení základní dávkou (2,5, 5 nebo 10mg) v prvních dnech s následnými

korekcemi podle INR; 2) Odhad dávky podle algoritmu využívajícího klinická data pacienta (věk, komorbidit atp.) a 3) odhad dávky podle algoritmu využívajícího navíc ke klinickým datům, ještě individuálního farmakogenetického profilu pacienta (zejména polymorfismů v genech určujících rychlost odbourávání warfarinu - CYP2C9 a citlivost na warfarin - VKORC1). Vyšetření je dostupné v několika desítkách genetických laboratoří v ČR a hrazené pojišťovny. I přes jen částečné klinické důkazy pro farmakogenetické algoritmy, dané menším počtem pacientů ve studiích, je zřejmé, že zahrnutí genetického profilu zodpovědného za 50 až 60% individuální variability v dávce, je přínosné (7). Hlavní skupinou pacientů, která profituje jsou nosiči více variantních alel určujících nižší denní potřebu warfarinu. V genu CYP2C9 jsou to alely *2 a *3 a u genu VKORC1 haplotyp B/B, který je často laboratořemi uváděn pouze jako polymorfismus VKORC1 -1639/3673 AA, -1173 TT nebo -6853 CC. Tito pacienti jsou ohroženi nečekaně vysokým INR po podání standardní dávky warfarinu. Pro ilustraci dva modeloví pacienti: Muž, 60 let, váha 70 kg, normální renální a hepatální funkce. Jeden má "standardní genotyp" jako 35% české populace: CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 haplotyp A/B (= -1639/3673 AG) a druhý má variantní genotyp - např.: CYP2C9 *1/*3 + VKORC1 haplotyp A/B (= -1639/3673 AG), který má ve 3 ze 4 alel obou genů asi 7% české populace. Podáme-li těmto dvěma pacientům při zahájení léčby první 3 dny 10 mg warfarinu a dále budeme pokračovat dávkou 5mg denně, pak standardní pacient dosáhne maximálně INR 2,8 šestý den léčby (viz obr. 1). Oproti tomu variantní pacient dosáhne šestý den velmi vysokého a nebezpečného INR nad 6 (viz obr. 2).

Řešení bez farmakogenetiky: Zahajujeme vždy adekvátně klinické situaci a stavu pacienta. U mladších pacientů bez komorbidit v primární prevenci fibrilace či léčbě hluboké žilní trombózy lze zahájit 10 nebo 5mg denně. Lze použít loadovací vyšší dávku maximálně první dva dny - např. 10mg. U starších pacientů s významnými komorbiditami a zejména po recentně prodělané ischemické cévní mozkové příhodě volíme dávku 2,5 nebo 5mg denně v prvních dnech a určitě vynecháváme vyšší loadovací dávku.

Řešení s využitím farmakogenetiky: Optimálně léčíme s využitím farmakogenetiky. Pokud laboratoř nevypočte přímo denní dávku warfarinu lze pro přesný výpočet využít zdarma dostupných algoritmů (např. na <http://warfarindosing.org>) kam zadáme genetická a klinická data nebo volba významně nižší zahajovací dávky u nosičů variantních polymorfismů (např. 2,5 mg a méně denně). U těchto pacientů také musíme počítat s významně delším poločasem warfarinu a tedy nečekaně pomalou reakcí INR na naši změněnou dávku - tj. kontrolujeme je častěji a zejména déle po nasazení v kratších intervalech (např. týdně po první dva měsíce) než pacienty s běžným genetickým profilem.

Schéma denní dávky

Warfarin známý svým dlouhým poločasem (kolem 40 hodin) je často dávkován různě jednotlivé dny v týdnu podle celkové týdenní dávky. Nezřídka se setkáme v klinické praxi s dávkováním jako např.: Pondělí, středa a pátek 5mg a ostatní dny 2,5mg. K čemu takové dávkování vede? Při kolísavém dávkování je hladina warfarinu undulující - kolísá sice v terapeutickém rozmezí (jeden den např. INR 2,1, druhý den např. INR 2,9) a pacient je tak antikoagulován efektivně každý den. Nicméně po zásahu vnějšího vlivu (chyba v dávkování, infekce atp.) dojde k významnějšímu vychýlení hladiny léku a snáz, tak může pacient opustit terapeutické rozmezí a být tak v riziku buď krvácení nebo embolizace.

Řešení: Dávkujeme optimálně stejnou dávkou každý den - raději volíme složitější rozlamování tablet nebo kombinace více sil tablet či jejich částí zároveň, než různé dávky v různé dny. Pokud musíme podávat různé dávky v různé dny, pak dávky volíme s co nejmenším rozdílem a zcela se vyvarujeme dnů (např. sudých) zcela bez warfarinu.

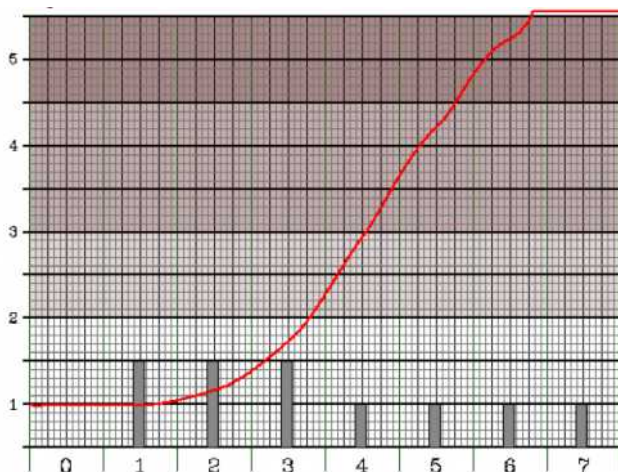
Frekvence kontrol

Otázka správné frekvence kontrol je klíčová pro udržení vysokého TTR. Ovšem příliš vysoká frekvence vede k odmítání účinného léku pacientem a nakonec i zátěži ambulance. Příliš nízká frekvence pak zasáhne k vyšším rizikům ischemických i hemoragických komplikací. Adherenci a efektivitu kontroly léčby významně zvyšuje zapojení pacienta do vedení léčby s využitím self-monitoringu.

Řešení: V naší praxi používáme iniciálně první dva týdny po nasazení kontroly denně - maximálně obden, pak snižujeme frekvenci na jednou týdně do doby nejméně osmi týdnů nebo do stabilizace dávky (přísná definice 3 po sobě jdoucí měření v rozmezí INR 2,0 až 3,0). Po stabilizaci dávky zveme pacienty maximálně s odstupem čtyři týdny mezi jednotlivými kontrolami INR. Dále je pacienta potřeba edukovat o situacích, kdy musí dorazit na kontrolu i častěji, mezi plánovanými termíny - jako např. počínající infekce, výměna léků jiným lékařem, nárůst drobných a jinak nevýznamných krvácení - modřiny atp. Snažíme se u pacienta zahájit self-monitoring.

Závěrem lze konstatovat, že warfarin má stále významné místo v našem antikoagulačním armamentáriu. Jeho vysoká účinnost a naše dlouhá klinická zkušenost s jeho komplikacemi, nám s využitím všech moderních dostupných technik, ale hlavně pečlivé klinické praxe, umožňuje s ním léčit efektivně a s nízkými náklady.

Obrázek 1. Vývoj INR u pacienta s variantním genotypem (CYP2C9 *1/*3 + VKORC1 haplotyp A/B) léčeného warfarinem po loadovací dávce 10mg denně první 3 dny s následnou pokračovací dávkou 5mg denně. (osa x - dny léčby, osa y - INR, simulace vytvořena na on-line simulátoru: <http://warfarissimo.corlan.net>).



Obrázek 2. Vývoj INR u pacienta se "standardním" = wildtype genotypem (CYP2C9 *1/*1 + VKORC1 haplotyp A/B) léčeného warfarinem po loadovací dávce 10mg denně první 3 dny s následnou pokračovací dávkou 5mg denně. (osa x - dny léčby, osa y - INR, simulace vytvořena na on-line simulátoru: <http://warfarissimo.corlan.net>).



Použitá literatura

1. Connolly S, Ezekowitz M, Yusuf S, et al. Dabigatran versus warfarin in patients with atrial fibrillation. *New England Journal of Medicine* 2009;361(12):1139.
2. Granger CB, Alexander JH, McMurray JJV, et al. Apixaban versus Warfarin in Patients with Atrial Fibrillation. *The New England journal of medicine* 2011 Sep 15;365(11):981-92.
3. Camm AJ, Lip GYH, De Caterina R, et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: An update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation * Developed with the special

contribution of the European Heart Rhythm Association. *European Heart Journal* 2012 Nov 01;33(21):2719-47.

4. Wallentin L, Yusuf S, Ezekowitz MD, et al. Efficacy and safety of dabigatran compared with warfarin at different levels of international normalised ratio control for stroke prevention in atrial fibrillation: an analysis of the RE-LY trial. *The Lancet* 2010 Sep 18;376(9745):975-83.

5. White HD, Gruber M, Feyzi J, et al. Comparison of outcomes among patients randomized to warfarin therapy according to anticoagulant control: results from SPORTIF III and V. *Archives of internal medicine* 2007;167(3):239.

6. Freyburger G, Macouillard G, Labrousse S, et al. Coagulation parameters in patients receiving dabigatran etexilate or rivaroxaban: Two observational studies in patients undergoing total hip or total knee replacement. *Thrombosis Research* 2011 Jun 01;127(5):457-65.

7. Tomek A, Matoska V, Eisert C, et al. Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. *American journal of therapeutics* 2011 May 1;18(3):e55-66.

Warfarinizace po kardioembolické cévní mozkové příhodě - komentovaná kazuistika

Aleš Tomek^{1,2}, Ivana Šarbochová¹, Barbora Urbanová¹, Hana Magerová¹, Václav Maňoška²

- 1) Neurologická klinika 2. LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 150 06
- 2) Laboratoř molekulární diagnostiky, oddělení klinické biochemie, hematologie a imunologie, Nemocnice Na Homolce, Roentgenova 2, Praha 5, 150 30

Antikoagulační terapie je indikována vzhledem k celkovému stárnutí naší populace spojenému s nárůstem fibrilace síní a zároveň tedy i kardioembolických ischemických cévních mozkových příhod (CMP) u stále většího množství pacientů. Zároveň je ale warfarin jedním z nejnebezpečnějších léčiv pro svůj nízký terapeutický index, značnou interindividuální variabilitu dávky léku a možné závažné krvácivé komplikace. Díky finanční situaci v našem zdravotnictví zřejmě nedojde k významnějšímu omezení používání warfarinu ani nyní s nástupem nových antikoagulačních léčiv (přímých inhibitor trombinu – dabigatran, přímé inhibitory aktivovaného faktoru X – rivaroxaban, apixaban). Budeme tedy muset v naší klinické praxi maximalizovat naše úsilí o bezpečnou léčbu warfarinem **(1)**. Prokazatelně největší přínos má důsledné vedení léčby s využitím moderních technologií – zahájení warfarinizace podle farmakogenetických algoritmů **(2)**, snaha o co nejvyšší podíl času v terapeutickém rozmezí za využití častých kontrol nebo automonitorace ve specializovaných centrech.

Z hlediska rizika léčby warfarinem je jistě nejvýznamnější právě skupina pacientů po prodělané cévní mozkové příhodě. Tito pacienti jsou rizikováni vyšším počtem selhání léčby stran vyššího počtu embolizačních komplikací, ale i krvácivých komplikací včetně smrtících krvácení intrakraniálních. Na příkladu následující kazuistiky z naší cerebrovaskulární poradny chceme demonstrovat několik zásadních bodů v použití warfarinu po prodělané kardioembolické cévní mozkové příhodě.

Kazuistika 1.

Žena 81 let, přijata před 3 dny s akutní ischemickou CMP. Vstupně na nativním CT mozku pouze starší gliové změny bilaterálně periventrikulárně, na CT angiografii uzávěr pravostranné střední mozkové tepny (MCA) v M2 úseku (jinak jen nevýznamné aterosklerotické změny na intra- i extrakraniálních mozkových tepnách), klinicky těžký neurologický nálezný - levostranná hemiplegie, taktilní a speciální neglect syndrom (nevnímá doteky na levé polovině těla a celkově podněty z levé strany prostoru), paréza pohledu doleva, levostranná hemihyesthesie (celkové NIHSS skóre 17). Anamnesticky zjištěna před 2 lety symptomatická paroxysmální fibrilace síní - přechodná levostranná kardiální insuficience - paroxysmy se poslední 2 roky klinicky neprojevovaly, srdeční funkce adekvátní věku, preventivně léčena jen 100mg ASA denně. Dále statinem léčená dyslipidémie (atorvastatin 20mg denně) a dobře korigovaná hypertenze (kombinace ACEI, diuretikum a betablokátor). Ostatní anamnéza byla nevýznamná. Pro nepřítomnost absolutních kontraindikací (věk nad 80 let je již jen relativní kontraindikací) byla podána v čase 160 minut od začátku příznaků intravenózní trombolýza rtPA. Transkraniální dopplerovská monitorace během trombolýzy prokázala rekanizaci tepny, proto nebyla

indikována následná (rescue) endovaskulární mechanická léčba. Pacientka se následně během 24 hodin postupně zlepšila na pouze lehkou levostrannou hemiparézu (NIHSS 5), kontrolní CT mozku po 24 hodinách jen s rozvojem menšího ischemického ložiska ve středu povodí MCA v oblasti bazálních ganglií (do 15 mm v maximálním rozměru) bez známek krvácivých komplikací. Kardiopulmonálně byla pacientka kompenzovaná, při přijetí sinusový rytmus, druhý den hospitalizace zachycen 5 minutový běh fibrilace síní s rychlou odpovědí komor (120 - 140/minutu), který nebyl pacientkou subjektivně pocíťován. V etiologickém dovyšetření doplněna ultrasonografie extrakraniálních úseků karotického a vertebrálního řečiště (potvrzuje nález bez stenóz ze vstupního CTA), roentgenový snímek hrudníku (mírně rozšířen stín srdeční, jinak bez patologického nálezu), transthorakální echokardiografie (mírná dilatace levé síně, dobrá srdeční funkce - normální ejekční frakce levé komory, bez chlopenních vad). Doplněn laboratorní screening, kde LDL 2,1 mmol/l, HDL 1,18, triglyceridy 1,75, homocystein 18,9, NTproBNP 1753, d-dimer 423 - ostatní včetně renálních, hepatálních parametrů v normě. CHADS2 skóre je 4, je tedy zřejmé, že pacientka je indikována na trvalou antikogulační léčbu. Nyní stojíme před několika otázkami:

1) Jaký preparát zvolit?

První volbou mezi perorálními antikoagulacii zůstává podle úhradových pravidel zdravotních pojišťoven v ČR warfarin. Pouze při jeho selhání indikujeme v druhé volbě nová antikoagulancia. Dosud pouze hypotetickou, avšak na našem pracovišti používanou strategií volby antikogulancia je využití farmakogenetiky warfarinu. Je dokázáno, že pacienti s variantními alelami v genech zodpovědných za warfarin mají vyšší riziko krvácivých komplikací, vyšší riziko přesáhnutí INR nad 3,0 i nižší čas v terapeutickém rozmezí (TTR) **(2)**. Při nosičství 3 nebo 4 variantních alel ze 4 možných (2 geny po dvou kopiích od každého rodiče) je riziko závažného krvácení podstatné - v námi publikovaném souboru bylo riziko pro nosiče 3 variantních alel 4.34x vyšší (HR = 4,34, 95% CI 1.95–9.65, p < 0.001) **(3)**. Naopak platí, že pacient s příznivým genetickým profilem - bez variantní alely v genu CYP2C9 má významně nižší riziko obávaných krvácivých komplikací (HR = 0,51, 95% CI 0,28-0,93, p = 0,027) **(3)**. Vezmeme-li v úvahu sice statisticky významné, ale relativně malé absolutní rozdíly mezi warfarinem a novými antikoagulacii v klinických studiích, pak můžeme jen spekulovat, jak by dopadla studie selektující pacienty do warfarinových větví těchto studií podle farmakogenetiky - lze předpokládat, že výsledky by zřejmě nevyzněly ve prospěch nových substancí. Proto se držíme - i přes doporučení Evropské kardiologické společnosti (ESC) z roku 2012 **(4)** a úhradová pravidla platná aktuálně v ČR - zásady, že nasazujeme na warfarin pacienty s příznivým genetickým profilem (0 - 2 variantní alely) a rovnou začínáme s novými antikoagulacii u pacientů s 3 nebo 4 variantními alelami. Takových pro warfarin rizikových pacientů je v naší populaci 6,7% (3 variantní alely) a pouze 0,65% se 4 variantními alelami (data 1972 pacientů vyšetřených naší laboratoří) **(5)**. Protože pacientka byla léčena dosud jen ASA, měla příznivý farmakogenetický profil (1 variantní alela, viz dále) a nebyl zároveň předpoklad nemožnosti správného vedení warfarinizace, byl námi zvolen jako první volba warfarin.

2) Kdy zahájit warfarinizaci?

U pacientky byla zahájena antitrombotická léčba druhý den od vzniku příznak, 24 hodin po trombolýze. Iniciálně volíme nízkomolekulární heparin v nižší dávce, jeho efekt na našem pracovišti rutinně měříme pomocí antiXa testu, kdy se snažíme o udržení dolního

rozmezí účinné antikoagulace (0,3 - 0,4 IU/ml). Tuto léčbu jsme ponechali v případě popsané kazuistiky po dobu prvního týdne, pak po doplnění třetího kontrolního CT (které vyloučilo hemoragickou transformaci ložiska) byla zahájena léčba warfarinem.

Obecně čas zahájení warfarinizace určujeme podle rozsahu čerstvých ischemických změn (**6**) - nejsou-li žádné (šlo o TIA i podle CT či MR mozku), pak můžeme zahájit prakticky od prvního dne. U změn menšího rozsahu se doporučuje warfarinizovat zhruba po prvním týdnu. U rozsáhlých změn se doporučuje odstup nejméně dvou týdnů. Přesná velikost, které ložisko je malé či velké není arbitrárně žádným doporučením stanovena. Na našem pracovišti za malé změny považujeme změny typicky lakunárního rozsahu - tj. do 15 mm velikosti v typické perforátorové lokalizaci (bazální ganglia), za velké změny považujeme teritoriální infarkty - celé povodí větší mozkové tepny podlehlé nekróze (např. celé povodí MCA). Specifickou situací je hemoragická transformace - prokrvácení ischemického ložiska. Zde záleží na individuálním riziku daného pacienta - poměru rizika dalšího prokrvácení a rizika časně recidivy ischemie/embolizace, obecně však volíme odstup delší než 2 týdny - tj. 3 až 4 týdny.

Jak zahájit warfarinizaci?

U pacientky bylo druhý den hospitalizace odesláno farmakogenetické vyšetření warfarinu. Již další den jsme měli k dispozici genotypizaci polymorfizmů genu CYP2C9 (dvě alely *1 - tj. genotyp *1/*1 = standardní metabolizér warfarinu) a haplotyp genu VKORC1 (AB = intermediární citlivost na warfarin). Současně byl vypočten podle farmakogenetického profilu s dosazením dalších údajů: věku, výšky pacientky (162 cm), užívání konkomitantních léků (neužívá amiodaron, užívá atorvastatin), odhad denní dávky warfarinu, který byl stanoven pro INR 2,5 jako 3,68 mg warfarinu denně. Léčba byla zahájena dávkou 3 mg denně, nebyla použita vyšší loadovací dávka. Šestý den podávání této dávky pacientka dosáhla INR 2,1, byl vysazen nízkomolekulární heparin a pacientka následující den dimitována v dobrém výsledném stavu (NIHSS = 2 body, mRS = 1).

Můžeme použít tři základní strategie nasazení warfarinu - empirické nasazení základní dávkou, u naší kazuistiky typicky 5 mg/den s následnými korekcemi podle INR; - odhad dávky podle algoritmu využívajícího pouze klinická data pacienta nebo odhad dávky podle individuálního farmakogenetického profilu a klinických parametrů pacienta. Poslední strategie sice nemá literárně nejvyšší úroveň důkazu podle pravidel medicíny založené na důkazech, ale jeví se nám jako vysoce perspektivní v rutinní praxi i k dalšímu výzkumu, navíc jí podporuje i názor amerického lékového regulátora FDA vyjádřený v souhrnu údajů k přípravku.

Použitá literatura

- 1) Tomek A, Maťoška V. Jak a proč vůbec léčit warfarinem. *Causa Subita* 2012; 15(5): 202-206.
- 2) Tomek A, Matoska V, Eisert C, Serebruany VL. Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. *American Journal of Therapeutics* 2011; 18(3): 55-66.
- 3) Tomek A, Maťoška V, Kolářová T, Neumann J, Šrámek M, Šarbochová I, Táborský L, Bojar M, Goetz P, Serebruany VL. The Bleeding Risk During Warfarin Therapy is Associated with Number of Variant Alleles of CYP2C9 and VKORC1 Genes. *Cardiology*

2013, v tisku.

4) Camm J, Lip GYH, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH et al. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: An update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *European Heart Journal* (2012) 33, 2719–2747.

5) Tomek A, Kolářová T, Martinková S, Lacinová Z, Šrámek M, Šarbochová I, Neumann J, Táborský L, Mařoška V. Přesnost farmakogenetických algoritmů pro výpočet denní dávky warfarinu. *Cesk Slov Neurol N* 2013, v tisku.

6) Guidelines for management of ischaemic stroke and transient ischaemic attack 2008. *Cerebrovasc Dis.* 2008; 25: 457–507.