

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

Autoreferát disertační práce



Farmakogenetika warfarinu

Aleš Tomek

Praha 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie

Předseda oborové rady: Prof. RNDr. Stanislav Zadražil, DrSc.

Školící pracoviště: Ústav biologie a lékařské genetiky 2. LF UK a FN Motol

Autor: MUDr. Aleš Tomek

Školitel: Prof. MUDr. Petr Goetz, CSc.

Oponenti:

Autoreferát byl rozeslán dne:

Obhajoba se koná dne: v hod.

kde:

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

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 limitováno jeho nízkým terapeutickým indexem a významnou interindividuální variabilitou 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 nízký terapeutický index a zásadní vliv genotypu na velikost dávky 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 a 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 kohorta pro tvorbu vlastního algoritmu (n = 175), který byl následně ověřen na validační kohortě (n = 223). Pro stanovení rizika krvácení byla sebrána kohorta se závažnými krvácivými komplikacemi (n = 51) a jejich kontrolní skupina bez krvácivých komplikací (n = 143).

Výsledky: Nejvyšší přesnost predikce z posuzovaných publikovaných algoritmů dosáhl u naší české kohorty algoritmus podle Sconceové (koeficient determinace, $R^2 = 58,4\%$), další porovnávané algoritmy měly jasně nižší přesnost predikce - podle Andersona (21,9%) a podle Gage (23,8%). Námi vytvořený algoritmus dosáhl u validační kohorty vysoké hodnoty přesnosti predikce (62,3%), vyšší než algoritmus dle Sconceové (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 krvácení bylo nejvyšší pro nosiče 3 variantních alel. Toto riziko je navíc statisticky významné během celého časového průběhu léčby warfarinem. Naopak pro wild type pacienty (genotyp *1/*1) v genu CYP2C9 jsme prokázali významně nižší riziko krvácení.

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, gatransy) jako lékem první volby. 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 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 significantly lower dose of warfarin resulting in higher risk of overcoagulation with higher risk of major bleeding complications. Due to its low therapeutic index and significant influence of individual genotype on clinical outcomes is warfarin ideal for pharmacogenetic testing.

Aim: To assess clinical utility of warfarin pharmacogenetic warfarin 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 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 cohort of 280 subjects. 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 warfarin daily dose in our cohort of Czech patients had 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 validation cohort with coefficient of determination 62,3% - higher then previously published algorithms in general and also in our validation cohort (Sconce 55,3%). Regarding bleeding risk according individual genotype we proved higher risk in carriers of at least one variant allele in 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 the initiation and also 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 is still an effective and safe alternative to new oral anticoagulants.

Obsah

1 Úvod	6
1.1 Koncept farmakogenetiky.....	6
1.2 Charakteristika warfarinu	6
1.3 Farmakogenetika warfarinu	7
1.3.1 <i>CYP2C9</i>	7
1.3.2 <i>VKORC1</i>	7
1.4 Klinické aplikace farmakogenetiky.....	8
1.4.1 <i>Výpočet denní dávky před zahájením terapie</i>	8
1.4.2 <i>Odhad rizika krvácení během léčby warfarinem</i>	9
2 Cíle práce	9
3 Metodika.....	10
3.1 Soubor pacientů	10
3.2 Metodika DNA diagnostiky.....	10
3.3 Metodika farmakogenetického vyhodnocení.....	10
3.3.1 <i>Zavedení farmakogenetického algoritmu</i>	10
3.3.2 <i>Posouzení vztahu genotypu a krvácivých komplikací při léčbě warfarinem</i>	11
4 Výsledky	12
4.1 Genotypy <i>CYP2C9</i> a <i>VKORC1</i> v české populaci.....	12
4.2 Selektce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu	13
4.3 Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu.....	14
4.4 Riziko závažného krvácení podle genotypu <i>CYP29</i> a <i>VKORC1</i>	15
5 Diskuse	18
5.1 Přesnost výpočtu podle farmakogenetického algoritmu	18
5.2 Vlastní vytvořený algoritmus.....	19
5.3 Krvácivé komplikace a farmakogenetika	19
5.4 Warfarin s využitím farmakogenetiky ve srovnání s novými perorálními antikoagulancii	21
6 Závěr	22
6.1 Přesnost výpočtu podle publikovaných farmakogenetických algoritmů.....	22
6.2 Vlastní farmakogenetický algoritmus.....	22
6.3 Krvácivé komplikace a farmakogenetika	23
6.4 Zhodnocení významu farmakogenetiky warfarinu	23
7 Seznam použité literatury	24
8 Seznam použitých zkratk.....	26
9 Seznam vlastních publikací	26

1 Úvod

1.1 Koncept farmakogenetiky

Po podání léčiva dochází v organismu k celé řadě pochodů, které určují výsledný léčebný efekt. Významná část variability výsledného terapeutického efektu je podmíněna genotypem jedince, individuálním zastoupením polymorfismů v genech, jejichž produkty se podílí na účinku daného léčiva. Právě tímto vztahem mezi genotypem jedince a odpovědí na léčivo se zabývá vědní disciplína farmakogenetiky, která je dominantní disciplínou konceptu personalizované medicíny. Genotypizace a analýza exprese genomu a jejich vlivu na farmakokinetiku a farmakodynamiku léčiva umožňuje identifikaci rizikových pacientů s možností úpravy dávky či případnou změnu terapie ještě před možným poškozením pacienta nežádoucím účinkem léku. O praktickém využití lze uvažovat zejména u polymorfismů, které mají dramatický efekt na koncentraci léčiva a jeho aktivních metabolitů, kdy existuje jednoznačný vztah mezi koncentrací léčiva a kýženým efektem a kdy jsou přítomné koncentračně závislé závažné nežádoucí účinky. Právě všechny tyto předpoklady jsou splněny v případě možného využití farmakogenetiky warfarinu.

1.2 Charakteristika warfarinu

Warfarin je syntetický derivát dikumarolu. 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).

Warfarin je antikoagulační lék, ze skupiny antagonistů vitamínu K. Podkladem účinku warfarinu je inhibice enzymu vitamín K-epoxidreduktázy (VKOR1), kdy dochází k narušení cyklu vitamínu K a následně k poklesu tvorby aktivovaných koagulačních faktorů závislých na vitamínu K (faktor II, VII, IX, X, protein C, S a Z). Jeho klinická efektivita v prevenci tromboembolických komplikací byla prokázána mnoha klinickými studiemi (1-3). Antikoagulační terapie je indikována v prevenci a léčbě arteriálních tromboembolických komplikací (kardioembolické cévní mozkové příhody) a u pacientů s hlubokou žilní trombózou a/nebo po prodělané plicní embolizaci. I po šedesáti letech klinického využití je stále celosvětově nejužívanějším perorálním antikoagulanciem, podle údajů SÚKL z roku 2010 bylo jen v ČR spotřebováno celkem 40 miliónů denních dávek warfarinu.

Farmakodynamický účinek R-warfarinu a S-warfarinu je odlišný, kdy S-warfarin vykazuje zhruba 2 až 3x větší hypotrombinemický efekt než R-warfarin. Metabolizace se rovněž liší mezi oběma enantiomery. S-warfarin je více než z 85% hydroxylován izoenzymem CYP2C9 cytochromového systému P450. Metabolizace R-enantiomeru je komplikovanější, je rozdělena mezi více enzymů cytochromového systému (4, 5).

1.3 Farmakogenetika warfarinu

Dávka warfarinu potřebná k dosažení účinné antikoagulace má velmi významnou interindividuální variabilitu. Užívaná denní dávka se může pohybovat od 0,5 mg do 25 mg denně a je závislá na genetické dispozici a na negenetických faktorech. Genetická dispozice vysvětluje 45 – 60% interindividuální variability v dávkování warfarinu. Zásadními jsou dva geny - gen pro izoenzym cytochromu P450 CYP2C9 a gen pro enzym vitamín K epoxid reduktázu VKORC1 (Vitamin K Epoxide Reductase Complex, Subunit 1). Ostatní studované geny - mj. CYP4F2, GCX-1, ORM1 nemají klinicky použitelný vliv na denní dávku warfarinu.

Negenetické faktory jsou zodpovědné zhruba za 40 až 55% variability v odpovědi na warfarin. 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, lékové interakce, celkový stav hemostázy, compliance), které zodpovídají až za 30-40% variability.

1.3.1 CYP2C9

Izoenzym CYP2C9 se podílí zásadní měrou na metabolizaci účinnějšího ze dvou enantiomerů - S-warfarinu. Gen CYP2C9 je lokalizován na chromosomu 10 (10q23.33) a má 9 exonů. Gen CYP2C9 je vysoce geneticky polymorfní, aktuálně je popsáno a v nomenklatuře zahrnuto 64 alel genu CYP2C9 s významnými funkčními rozdíly v metabolizaci léčiv.

Většinou alelou v kavkazské populaci je referenční alela CYP2C9*1. Klinicky nejvíce využitelné z pohledu farmakogenetiky warfarinu jsou dvě alely se sníženou funkcí - CYP2C9*2, rs1799853 (R144C) a CYP2C9*3, rs1057910 (I359L).

Vliv jednotlivých alel na denní dávku warfarinu a jejich populační frekvence u kavkazského etnika je následující: CYP2C9*1/*1 - 100% dávky, 61-81% populace; CYP2C9 nosiči alely *2 - 17% redukce dávky (heterozygoti - 19,6%, homozygoti 36%), 13-26% populace a nosiči alely CYP2C9*3 - 37% dávky (heterozygoti - 33,7%, homozygoti 78,1%), 6-13% populace (6-8).

Variantní alely *2 a *3 genu CYP2C9 jsou signifikantně spojeny s nižší než obvyklou dávkou warfarinu (9, 10), častějším INR nad terapeutickým rozmezím, vyšší pravděpodobností předávkování (9, 11), delším časem nad terapeutickým rozmezím (12), delším časem k dosažení stabilizace dávky (9) a vyšším rizikem krvácivých komplikací (13, 9).

1.3.2 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 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 (14). 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. 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 a je považován za klinicky nejvýznamnější z hlediska snížení senzitivity na podaný warfarin (6). 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 (15). Byly popsány dva systémy vyhodnocení haplotypů genu VKORC1 podle jednotlivých detekovaných polymorfizmů genu VKORC1, kdy užívanější je systém podle Riedera. Haplotypy H1 až H9 jsou pro praktické klinické hodnocení seskupené podle citlivosti na podaný warfarin na kombinace haplotypů: A a B, v populaci pak tedy existují následující kombinace: A/A (nízká dávka), A/B (intermediální dávka) a B/B (vysoká dávka) (15).

Celkově lze vliv jednotlivých haplotypů na denní dávku warfarinu zhodnotit podle průměrné denní dávky jedinců s daným haplotypem. V práci Riedera to bylo $2,7 \pm 0,2$ mg pro haplotyp A/A, $4,9 \pm 0,2$ mg pro A/B a $6,2 \pm 0,3$ mg pro B/B (15).

Variantní haplotyp genu VKORC1 (haplotyp A, vysoká senzitivita na warfarin) je významně spojen s nižší dávkou warfarinu (15-18), a méně významně s kratším časem k dosažení terapeutického rozmezí s pravděpodobnějším předávkováním (12, 19). Riziko krvácivých komplikací pro nosiče haplotypu A je v různých studiích nevýznamně vyšší nebo shodné oproti nosičům nejčastějšího haplotypu indoevropské populace AB (20, 12, 19).

1.4 Klinické aplikace farmakogenetiky

1.4.1 Výpočet denní dávky před zahájením terapie

S využitím farmakogenetických algoritmů vytvořených na základě klinických a genetických dat lze predikovat výslednou užívanou denní dávku warfarinu ještě před zahájením vlastní terapie. Přesnost predikce jednotlivých algoritmů je nejčastěji vyjádřena hodnotou koeficientu determinace (R^2), hodnota R^2 dosud publikovaných vzorců se pohybuje od 31% do 79% (21). Publikované algoritmy 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. 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 a také zmenší nezapočitatelný vliv nevyšetřených nebo dosud neznámých genetických faktorů.

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 (22-26). 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 warfarin podle farmakogenetického výpočtu vykazovaly statisticky významně vyšší (24, 25) nebo alespoň jasný trend (22, 23, 26) podílu času stráveného v terapeutickém rozmezí. Využití farmakogenetiky vedlo k snížení počtu

krvácivých komplikací – a to významně (24) nebo alespoň jasným pozitivním trendem (22, 23, 25). 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 farmakogenetický výpočet efektivně predikoval vyšší potřebnou dávku u wild type pacientů ($p=0,001$) a nižší potřebnou dávku u variantních pacientů ($p<0,001$) (23).

Recentní randomizované klinické studie publikované po roce 2012 již byly navrženy s větší statistickou silou na průkaz významného rozdílu. Studie CoumaGen-II prokázala významný prospěch farmakogenetického dávkování stran vyššího procenta času v terapeutickém rozmezí v porovnání se standardní klinickou praxí bez využití genetiky (27). Evropská studie EU-PACT tento rozdíl potvrdila - průměrný čas v terapeutickém rozmezí byl 67,4% ve farmakogenetické kohortě oproti jen 60,3% v kontrolní skupině ($p < 0,001$) (28). Americká studie COAG však tento rozdíl nepotvrdila, nicméně měla řadu metodických chyb - zejména velkou etnickou různorodost, celková přesnost predikce farmakogenetického algoritmu pak byla u minoritních populací nízká, (R^2 21%) a nemohla tak prokázat superioritu farmakogenetického dávkování (29).

1.4.2 Odhad rizika krvácení během léčby warfarinem

Jako nejvýznamnější farmakogenetický marker rizika závažného krvácení během léčby warfarinem je udáváno nosičství variantních alel *2 a *3 genu CYP2C9. 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) (9) do 3,18 (95% CI, 1,30 to 7,78) (12). Variantní (low dose, A/A) haplotyp genu VKORC1 dosud v žádné studii nevyšel jako statisticky významný rizikový faktor krvácení, byly zaznamenány jen nevýznamné trendy v tomto směru (12).

2 Cíle 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.

- selekcí nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu pro naši validační kohortu českých pacientů

- tvorbou a validací vlastního farmakogenetického algoritmu

2) Během již zavedené terapie warfarinem:

Stanovením vztahu individuálního genotypu a výskytu závažných krvácivých komplikací při léčbě warfarinem

3 Metodika

3.1 Soubor pacientů

Pro účely této práce byly vytvořeny postupně celkem čtyři částečně se překrývající kohorty pacientů - 1) první validační kohorta pacientů stabilizovaných na warfarinu pro selekci optimálního publikovaného farmakogenetického algoritmu 2) druhá validační kohorta pro tvorbu vlastního farmakogenetického algoritmu, 3) kohorta pacientů se závažnými krvácivými komplikacemi během léčby warfarinem a 4) jejich kontrolní skupina. Pro potřeby projektu byla vytvořena komplexní databáze klinických a genetických dat s více než 250 datovými položkami. Pacienti do souboru byli referováni z osmi spolupracujících klinických pracovišť - majoritně z Neurologické kliniky 2. LF UK a FN Motol a Kardiocentra Nemocnice Na Homolce. Všichni pacienti zařazení do projektu byli plně informováni a vyjádřili písemný souhlas s vyšetřením DNA. Klinická data pacientů byla do projektu získána následujícími postupy: cíleným klinickým vyšetřením s vyplněním strukturovaného dotazníku během pravidelné kontroly lékařem, pravidelné telefonické kontroly s periodicitou 1 roku s vyplněním strukturovaného dotazníku a kontrolou dokumentace obsažené v nemocničním informačním systému u pacientů referovaných z FN Motol a Nemocnice Na Homolce.

3.2 Metodika DNA diagnostiky

Pro praktickou klinickou aplikaci farmakogenetiky warfarinu je nezbytné získání výsledků DNA analýzy v co nejkratším časovém rámci. Z tohoto důvodu a také z důvodu nižší ekonomické náročnosti byla zvolena High Resolution Melting (HRM) analýza. Genomová DNA byla izolována z žilního náběru pomocí izolačního kitu (PUREGENE – Blood Kit, Qiagen Inc., Chatsworth, California, USA), následně 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), komerčně dostupného kitu pro detekci alel *2 a *3 genu CYP2C9 a polymorfizmu -1639-A>G genu VKORC1 (Kat. č. HRLS-ASY-007, HRLS-ASY-0010, HRLS-ASY-0011, Idaho Technology Inc., Utah, USA).

3.3 Metodika farmakogenetického vyhodnocení

3.3.1 Zavedení farmakogenetického algoritmu

3.3.1.1 *Selekce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu*

Do souboru pro vlastní analýzu přesnosti algoritmů byli zařazení pacienti s kompletními klinickými údaji, kteří navíc splňovali kritérium stabilizace na léčbě (léčba nejméně 90 dnů a zároveň poslední dva následné náběry INR v odstupu nejméně 30 dnů v terapeutickém rozmezí).

Volba mezi dostupnými farmakogenetickými algoritmy pro porovnání přesnosti byla učiněna na základě jejich publikované hodnoty R^2 na jejich validačním souboru a jeho etnicity. Finálně byly zvoleny tři algoritmy: podle Sconceové (16), podle Gage (6) a podle Andersona (23).

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);
- 3) porovnáním přítomnosti skutečně užívané dávky v pásmu predikovaném na základě výpočtu pro dávku warfarinu pro INR rozmezí 1,7 až 3,3;
- 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).

Statistické analýzy byly provedeny v softwaru GraphPad Prism, v.6.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) a SPSS Statistics, v.18.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA).

3.3.1.2 Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu

Pro vytvoření vlastního farmakogenetického algoritmu byla využita klinická a genetická dat pacientů z druhé validační kohorty. Model byl tvořen s využitím hierarchické vícečetné lineární regresní analýzy. 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, relevantní onemocnění
- 4) Konkomitantní chronicky užívaná medikace ovlivňující dávku warfarinu

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

3.3.2 Posouzení vztahu genotypu a krvácivých komplikací při léčbě warfarinem

Tato část práce byla designována jako prospektivní s částečným využitím retrospektivních dat, srovnávající dvě kohorty pacientů - se závažnými krvácivými komplikacemi a soubor kontrol. Primární konečný cíl studie bylo závažné krvácení během léčby warfarinem. Jako sekundární cíle byly určeny následující - závažné

krvácení během léčby warfarinem hodnocené zvláště během úvodní a udržovací fáze léčby, rizika podle jednotlivých genotypů, podle počtu variantních alel v obou genech dohromady: 0 až 4 variantní alely.

Do studie byli zařazeni pacienti s kompletními klinickými i genetickými údaji starší 18 let. Do kontrolní skupiny byli zařazeni pouze pacienti léčení warfarinem déle než 12 měsíců. Odhad velikosti souboru byl proveden na základě grafického nomogramu publikovaného Altmanem (30). Pro dosažení statisticky významného výsledku se minimální velikost vzorku pohybuje mezi 40 a 175 pacienty se závažným krvácením.

Pro porovnání mezi skupinou s krvácením a skupinou kontrol byl u kategorických proměnných použit χ^2 test nebo Fisherova exaktního testu, pro spojitě proměnné byl použit Mann-Whitneyho U test. Pro zjištění možné míry asociace mezi genotypem, jednotlivými klinickými charakteristikami pacientů souboru a závažným krvácením byl použit Coxův model poměrných rizik (Cox proportional hazards model). Byl vypočten poměr rizik (hazard ratio, HR) 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 (31), kdy počet testovaných podskupin podle rizika (risk groups number) byl odhadnut podle Mayové a Hosmera (32). 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. Všechny statistické analýzy byly provedeny na softwaru PASW Statistics 18.0 (SPSS, Inc., Chicago, USA) a STATA version 13 (StataCorp LP, College Station, USA).

4 Výsledky

4.1 Genotypy CYP2C9 a VKORC1 v české populaci

Rozložení genotypů CYP2C9 a VKORC1 v české populaci získané analýzou 1972 pacientů je uvedeno v tabulce 4.1. 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 zastoupení jen v 1,1%. 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 dávkou 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.: Rozložení jednotlivých genotypů v genech CYP2C9 a VKORC1 v kompletní geneticky vyšetřené kohortě (n = 1972). Počet variantních alel (VA) odlišen barevně - fialová = 0 VA, modrá = 1 VA, zelená = 2 VA, žlutá = 3 VA, červená = 4 VA.

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%)	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%)

4.2 Selektce nejvhodnějšího publikovaného farmakogenetického algoritmu

Porovnání přesnosti jednotlivých farmakogenetických algoritmů bylo provedeno na kohortě 280 pacientů se známou stabilní dávkou warfarinu. 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.). 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. Poddávkováno (vypočtená nižší než skutečně užívaná) bylo 41 (14,6%) pacientů, a to průměrně $2,79 \pm 2,18$ mg. U 46,3% poddávkových byla chyba do 2 mg. Algoritmus podle Andersona správně předpověděl dávku u 91 (32,5%) pacientů, algoritmus podle Gage správně předpověděl dávku u 103 (36,7%) pacientů.

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, $p = 0,020$).

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%).

Tabulka 4.2.: Porovnání přesnosti jednotlivých algoritmů - publikovaná data a naše ověření přesnosti (SD - směrodatná odchylka).

Algoritmus	Derivační kohorta: počet pacientů (kavkazská rasa %)	Přesnost na derivační kohortě - koeficient determinace - R^2	Přesnost na validační kohortě - koeficient determinace - R^2	Přesnost na naší kohortě 280 pacientů - koeficient determinace - R^2
Sconce et al (16)	297 (100%)	R^2 nepublikováno, Pearsonovo $r = 80\%$	54,2%	58,4%
Gage et al (6)	1015 (83%)	57%	54%	23,8%
Anderson et al (33, 23)	213 (převážně kavkazského původu)	47%	nepublikováno	21,9%

4.3 Tvorba vlastního farmakogenetického algoritmu

Derivační soubor pro tvorbu vlastního farmakogenetického algoritmu čítal 175 pacientů a kohorta pro jeho validaci zahrnula celkem 223 pacientů se známou stabilizovanou denní dávkou warfarinu a kompletními klinickými daty.

Do hierarchické lineární regresní analýzy byly zařazeny následující proměnné, které dosáhly statistické významnosti $p < 0,1$ a splnily lineární vztah k závislé proměnné (skutečně užívaná denní dávka warfarinu): 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. Parametry zařazené do definitivního modelu byly: věk, hmotnost, výška, genotyp VKORC1 a CYP2C9 a užívání amiodaronu, které statisticky významně predikují výslednou denní dávku warfarinu $F(7, 167) = 66,120$, $p < 0,001$. Vytvořený algoritmus je následující:

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

Výsledný model byl testován na vzájemnou nezávislost reziduí v modelu testem podle Durbina a Watsona, kdy výsledek 2,016 znamená vynikající nezávislost pozorování. Nemuseli jsme řešit přítomnost outlierů, žádný případ predikce nepřesáhnul hodnotou standardizovaného residua ± 3 směrodatné odchylky (SD). Rezidua vytvořeného modelu splnila předpoklady na přítomnost homoskedasticity a jejich normality.

Výsledný model dosahuje vysoké hodnoty predikce - hodnota neadjustovaného koeficientu determinace je R^2 73,5%, adjustovaný koeficient je 72,4%. U validační kohorty bylo dosaženo přesnosti podle koeficientu determinace R^2 62,3%. Pro srovnání jsme vypočetli u stejné kohorty podle publikovaných algoritmů - podle Andersona 50,1% a podle Sconceové 55,3%.

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). Předávkováno by 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.

4.4 Riziko závažného krvácení podle genotypu CYP29 a VKORC1

Celkem 194 pacientů (51 pacientů se závažným krvácením a 143 jako kontrolní skupina) splnilo vstupní kritéria a bylo zařazeno do závěrečné analýzy. 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, $p = 0.033$). Většina pacientů ve studii byla léčena v primární (28,9%) nebo sekundární (30,4%) prevenci tromboembolických komplikací fibrilace síní (celkem 59,3%). Průměrná doba sledování celého souboru byla 45,7 měsíce (3 roky a 9 měsíců). V komorbiditách pacientů obou skupin nebyl významný rozdíl, mimo častější anamnézy ischemické cévní mozkové příhody v kontrolní skupině (23,5% vs. 39,9%, $p = 0.036$). 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. 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, $p = 0,004$. 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 spíše celkově hodnocena jako stabilizovaná méně často - jen v 54,9% proti 69,9% ($p = 0,052$).

Celkem do studie bylo zařazeno 51 pacientů se závažným krvácením během léčby warfarinem. Většina krvácení proběhla v intrakraniální lokalizaci - 5 spontánních netraumatických subdurálních krvácení a 18 intracerebrálních krvácení do mozkového

parenchymu. Při srovnání pacientů s krvácením s kontrolní skupinou jsme prokázali významné rozdíly stran zastoupení jednotlivých genotypů. 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 kohorty s krvácením (23,5%, $p = 0,012$). Překvapivě jsme našli u skupiny s krvácením 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 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%, $p = 0,045$).

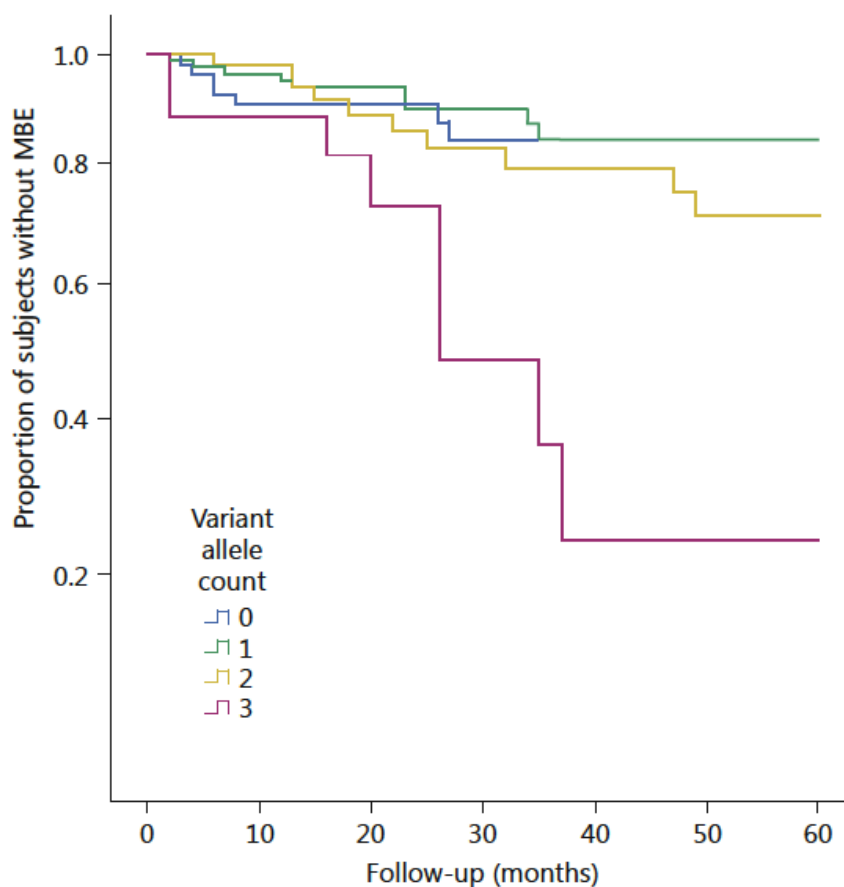
V primárním neupraveném (unadjusted) Coxově modelu proporčního rizika jsme jednotlivě zhodnotili všechny sledované rizikové faktory krvácení při léčbě warfarinem. Při návrhu protokolu studie a selekci parametrů sledování souboru jsme zařadili všechny zásadní literárně udávaná rizika - jako např. hypertenzi, stav po prodělané cévní mozkové příhodě, renální a hepatální insuficienci, nicméně 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 $4,4$).

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). 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, tak se odhady rizika staly 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, $p = 0,029$). 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, $p < 0,001$). Existují 2 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 ($HR_{adj 2VA CYP2C9 1VA VKORC1} = 9,54$, CI 95% 2,65 až 34,40, $p = 0,001$; $HR_{adj 1VA CYP2C9 2VA VKORC1} = 3,0$, CI 95% 1,19 to 7,51, $p = 0,02$) (detaily viz tabulka 4.4). Riziko závažného krvácení bylo pro pacienty s 3 VA významně vyšší po celou dobu léčby - ve fázi iniciační i ve fázi udržovací. 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, $p = 0,004$).

Obrázek 4.1: Čas k závažnému krvácení. Kaplan-Meierovy křivky podle počtu variantních alel (VA) v genech CYP2C9 a VKORC1. Log-rank test byl $\chi^2 = 8,494$, $p = 0,004$. Osa y - procento pacientů bez závažného krvácení, osa x - délka sledování v měsících.



Tabulka 4.4: 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
CYP2C9 *1/*1	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 nosič	0,236	1,509	0,764	2,978
CYP2C9 *3 nosič	0,040	2,089	1,035	4,217
CYP2C9 *2 a/nebo *3 nosič	0,027	1,962	1,080	3,563
CYP2C9 *2 a/nebo *3 homozygot	0,011	4,103	1,382	12,176
VKORC1 AA (low dose)	0,060	1,841	0,974	3,479
VKORC1 AB	0,964	1,013	0,570	1,801
VKORC1 BB (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 CYP2C9 + 2x VKORC1)	0,020	2,989	1,190	7,508
3 VA (2x CYP2C9 + 1x VKORC1)	0,001	9,542	2,647	34,396

5 Diskuse

5.1 Přesnost výpočtu podle farmakogenetického algoritmu

Námi zjištěná přesnost jednotlivých algoritmů na vzorku české populace odpovídala publikované přesnosti v případě vzorce podle Sconceové. Udávaná hodnota R² pro validační kohortu byla 54,2%, pro derivační kohortu Paersono r = 0,80. Náš soubor dosáhl podobného výsledku (R² = 58,4%; Pearsonovo r = 0,76). Naopak v případě algoritmů podle Gage a Andersona se naše výsledky posouzení přesnosti významně liší (23,8% a 21,9% proti 55% a 47%), Rozdíl mezi algoritmy v přesnosti lze vysvětlit zřejmě rozsahem sledovaných klinických parametrů jednotlivých souborů a také odlišnostmi v etnickém zastoupení kohort. Vyšší přesnost algoritmu Sconceové lze vysvětlit 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. 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) (34) 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%. Z toho jasně plyne potřeba ověření popřípadě vývoj nového algoritmu pro každou lokální populaci.

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 kohortě jsme dosáhli přesnosti predikce podle koeficientu determinace R^2 62,3% ($p < 0,001$). Srovnáme-li výsledky našeho algoritmu s přesností publikovaných algoritmů u stejné validační kohorty - podle Andersona 50,1% (23) a podle Sconceové 55,3% (16), pak náš algoritmus má jednoznačně nejvyšší přesnost predikce. 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 kohorty. Chyba ve smyslu poddávkování byla nejen častější, ale i významnější stran chybné velikosti dávky - chyba nad 2 mg byla zaznamenána u 46,8% poddávkovanych pacientů, tj. u 26,4% všech pacientů validační kohorty. Uspokojivé hodnoty predikce použitelné v klinické praxi jsme dosáhli s použitím našeho algoritmu i u pacientů s nad 80 let věku (52,7%), s tělesnou hmotností > 100 kg (57,7%) i u pacientů s hmotností < 50 kg (97,7%).

Jedinou slabinou námi vyvinutého algoritmu je nižší přesnost predikce u pacientů mladší 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. 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 obu studovaných genů (CYP2C9 a VKORC1), navíc lze předpokládat, že ještě vyšší riziko

budou mít pacienti se čtyřmi variantními alelami, kteří díky své nízké populační frekvenci (< 0,5%) nebyli pro analýzy k dispozici. 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 (20, 12).

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 (12, 8) jsme nepozorovali větší množství krvácení během úvodních 3 měsíců léčby. Navíc náš soubor pacientů ve srovnání s obdobnými publikovanými kohortami měl delší čas sledování - průměrně 3,8 roku - proti 3,4 roku (12) a 6 měsícům (8). Jedinou prací se srovnatelným výsledkem je studie Higashiho a kolektivu (9), kdy doba sledování byla průměrně 5,7 roku, ale vyšetřen byl pouze gen CYP2C9. První tři měsíce léčby bylo pozorováno pro nosiče variantního genotypu 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 (9). 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.

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) (9) do 3,18 (1,30 až 7,78) (12). Recentní metaanalýza (35) 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, zejména 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 (9, 20, 12). Naše práce ve shodě s výše citovanými autory také nepotvrdila významnou vazbu nezávažných krvácení s rizikovým genotypem.

Je potřeba zmínit některé limitace 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. 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.

5.4 Warfarin s využitím farmakogenetiky ve srovnání s novými perorálními antikoagulancii

S 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 a přímé inhibitory aktivovaného faktoru X - apixaban a rivaroxaban. Všechny léky prokázaly svojí noninferioritu a v některých případech i superioritu v primárních konečných cílech relevantních klinických studií ve srovnání s warfarinem v prevenci tromboembolických komplikací u pacientů s nevalvulární fibrilací síní (studie RE-LY, ARISTOTLE a ROCKET-AF) i v indikaci léčby hluboké žilní trombózy a plicní embolizace (studie RE-COVER, AMPLIFY a EINSTEIN). Ve všech těchto studiích byly celkové rozdíly v efektivitě warfarinu a NOAC sice statisticky významné, ale v absolutních číslech relativně malé. Na základě závěrů studií RE-LY, ARISTOTLE a ROCKET-AF pak řada odborných společností uvádí NOAC jako první volbu v prevenci tromboembolismu u pacientů s fibrilací síní. Nicméně ve všech studiích testujících NOAC nebylo vůbec zařazeno využití farmakogenetiky ani jiných novějších technik vedení antikoagulace jako např. domácí automonitorace. Lze předpokládat relativně lepší výsledek warfarinu při využití farmakogenetiky. Jako příklad použijme studii RE-LY srovnávající dabigatran 110 mg a 150 mg proti warfarinu (36).

Naše výsledky stran rizika krvácení podle individuálního genotypu v genech CYP2C9 a VKORC1 můžeme aplikovat na kohortu ze studie RE-LY následujícími dvěma taktikami. 1) Vyřadíme všechny pacienty s 3 nebo 4 variantními alelami ještě před zahájením léčby warfarinem. Při námi zjištěné populační frekvenci vyřadíme celkem 7,35% pacientů. U pacientů se závažným krvácením, pak víme, že tito pacienti tvoří 19,6% všech krvácení na warfarinu a že bychom teoreticky zabránili 19,6% krvácivým komplikacím jejich vyřazením. 2) 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.

Podíly šancí (odds ratio) mezi warfarinem a dabigatranem 110 mg na primární konečný cíl (všechny CMP a periferní embolizace) vypočtené na základě těchto dat se pak stávají statisticky nevýznamnými. 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). 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. 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, $p < 0,001$).

V porovnání s rivaroxabanem ve studii ROCKET-AF (37) by byl efekt zařazení farmakogenetiky warfarinu ještě markantnější. 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.

6 Závěr

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 1,8 a 4x větší šanci oproti dalším algoritmům, že vypočtená dávka bude uvnitř pásma od skutečně užívané.

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.

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 na naší validační kohortě byla nejvyšší i ve srovnání s 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 předávkových 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.

7 Seznam použité literatury

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Wadelius, M., Chen, L., Lindh, J. et al. The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood*, 2009; 113: 784-792.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Joffe, H., Xu, R., Johnson, F. et al. Warfarin dosing and cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Thromb Haemost*, 2004; 91: 1123-1128.
- 12) 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.
- 13) Margaglione, M., Colaizzo, D., D'Andrea, G. et al. Genetic modulation of oral anticoagulation with warfarin. *Thromb Haemost*, 2000; 84: 775-778.
- 14) Owen, R. P., Gong, L., Sagreiya, H. et al. VKORC1 pharmacogenomics summary. *Pharmacogenet Genomics*, 2010; 20 (10): 642-644.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.

- 18) Wadelius, M., Chen, L. Y., Downes, K. et al. Common VKORC1 and GGCX polymorphisms associated with warfarin dose. *Pharmacogenomics J*, 2005; 5: 262-270.
- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) Tomek, A., Matoska, V., Eisert, C. et al. Optimization of anticoagulation with warfarin for stroke prevention: pharmacogenetic considerations. *Am J Ther*, 2011; 18 (3): 55-66.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 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.
- 25) 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.
- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) Altman, D. G. *Practical Statistics for Medical Research* 1991, Chapman and Hall.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) 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.

35) 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.

36) 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.

37) 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.

8 Seznam použitých zkratek

Seznam použitých zkratek

CI - confidence interval, konfidenční interval

CMP - cévní mozková příhoda

CYP - cytochrom P450

DNA - kyselina deoxyribonukleová

dsDNA - double stranded DNA

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

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

9 Seznam vlastních publikací

Publikace, které jsou podkladem této práce s IF

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).

Publikace, které jsou podkladem této práce bez IF

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.

Tomek A. Fibrilace síní a cévní mozková příhoda. *Postgraduální medicína* 2011, 13, suppl.1:18-23.

Urbanová B, **Tomek A**. Prevence tromboembolických komplikací pohledem neurologa. s. 151-161. v: Táborský M et al.: Fibrilace síní – novinky v léčbě 2013. Axonite, Liberec, 2013. ISBN 978-80-904899-3-6.

Tomek A. Fibrilace síní a cévní mozková příhoda. In Táborský M et al. Fibrilace síní. Praha: Mladá Fronta 2011 (ISBN 978-80-204-2572-0).

Bojar M, **Tomek A**. Prevence nemocí nervového a myoskeletálního systému. In Fait T, Vrablík M, Češka R et al. Preventivní medicína. 2, vydání. Praha: Maxdorf 2011 (ISBN 978-80-7345-327-7).

Bojar M, **Tomek A**. Prevence nemocí nervového a myoskeletálního systému. In Fait T, Vrablík M, Češka R et al. Preventivní medicína. Praha: Maxdorf 2008 (ISBN 978-80-7345-160-8).

Přednášky 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, 21. 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, Mařoška 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.

Tomek A, Mařoška V, Kumstýřová T, Lacinová Z, Táborský M, Bojar M. Riziko závažných krvácivých komplikací při udržovací léčbě warfarinem a variantní polymorfismy genů VKORC1 a CYP2C9. *Cesk Slov Neurol N* 2009; 72/105 (Suppl 2):S11.

Tomek A. Farmakogenetika a rezistence na antitrombotickou léčbu v sekundární prevenci CMP. VII. Olomoucký workshop cévní neurologie, 11. Neurosonologické dny – „Pokroky v neurosonologii“. 23.-24. 6. 2011, Olomouc. *Cesk Slov Neurol N* 2011; 74/107(3): 371.

Postery na základě této disertační práce s publikovaným abstraktem

Tomek A, Mařoška 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.

Vybrané publikace bez vztahu k tématu disertační práce s IF

Honěk J, Šrámek M, Šefc L, Januška J, Fiedler J, Horváth M, **Tomek A**, Novotný Š, Honěk T, Veselka J. Effect of Catheter-Based Patent Foramen Ovale Closure on the Occurrence of Arterial Bubbles in Scuba Divers. *JACC: Cardiovascular Interventions*. Accepted 1/2014, in print. (IF = 6,55)

Urbanová B, **Tomek A**, Mikulík R, Magerová H, Hořínek D, Hort J. Neurosonological examination: A non-invasive approach for the detection of cerebrovascular impairment in AD. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 2014 Jan 21;8:4. (IF = 4,758)

DiNicolantonio JJ, **Tomek A**. Misrepresentation of Vital Status Follow-up: Challenging the Integrity of the PLATO Trial and the Claimed Mortality Benefit of Ticagrelor Versus Clopidogrel. *International Journal of Cardiology* 2013, Oct 30;169(2):145-6. (IF = 7,078)

DiNicolantonio JJ, **Tomek A**. Inactivations, Deletions, Non-Adjudications, and Downgrades of Clinical Endpoints on Ticagrelor: Challenging the integrity of the PLATO trial. *International Journal of Cardiology* 2013. Oct 9;168(4):4076-80. (IF 2011 = 7,078)

DiNicolantonio JJ, D'Ascenzo F, **Tomek A**. Clopidogrel is Safer Than Ticagrelor in Regards to Bleeds: A Closer Look at the PLATO Trial. *International Journal of Cardiology* 2013. Oct 3;168(3):1739-44. (IF 2011 = 7,078)

Bhatti SK, DiNicolantonio JJ, Captain BK, Lavie CJ, **Tomek A**, O'Keefe JH. Neutralizing the Adverse Prognosis of Coronary Artery Calcium. *Mayo Clinic Proceedings* 2013, 88(8):806-812. (IF 2011 = 5,698)

Serebruany VL, DiNicolantonio JJ, Can MM, Duhanin A, **Tomek A**. Mortality after clopidogrel in the non-invasive PLATO cohort and TRILOGY ACS trial: Another

mismatched death paradox. *International Journal of Cardiology* 2013, Sep 30;168(2):640-2. (IF 2011 = 7,078)

DiNicolantonio JJ, Serebruany V, **Tomek A**. Refuting the Ticagrelor-Aspirin Black Box Warning: And Proposing a Ticagrelor Early-PCI Black Box Warning. *International Journal of Cardiology* 2013, Oct 3;168(3):1721-3. (IF 2011 = 7,078)

Urbanová B, **Tomek A**, Mikulík R, Magerová H, Sheardová K, Hořínek D, Hort J. Vztah vaskulárních rizikových faktorů a Alzheimerovy choroby. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/ 108(5): 694–699. (IF 2011 = 0,279).

Hořínek D, Hoza D, **Tomek A**, Hort J, Häckel M, Tichý M. Lumbar pressure and transcranial Doppler sonography in children with scaphocephaly. *Br J Neurosurg* 2008;22(2):219-23. (IF 2008 = 0,764)

Hoza D, Hořínek D, Tichý M, Novák M, Vaculík M, **Tomek A**, Blažková J, Škodová I, Hort J, Šrámek M, Krásničanová H. Využití transkraniálního doppleru k průkazu intrakraniální hypertenze u dětí se skafocelíí. *Cesk Slov Neurol N* 2007; 70/103(1):43-48. (IF 2007 = 0,037)

Bauer PO, Kotliarova SE, Matoska V, Musova Z, Hedvicakova P, Boday A, **Tomek A**, Nukina N, Goetz P. Fluorescent multiplex PCR-fast method for autosomal dominant spinocerebellar ataxias screening. *Russian Journal of Genetics (Genetika)* 2005; 41(6):830-837. (IF 2005 = 0,240)

Tomek A, Mařoška V, Goetz P, Hedvičáková P, Boday A, Bauer P. Molekulární etiopatogeneze SMA. *Cesk Slov Neurol N* 2003; 65/98(5):313-320. (IF 2003 = 0,047)

Vybrané publikace bez vztahu k tématu disertační práce bez IF

Tomek A. Hematologické aspekty rekanalizační léčby. in Školoudík D, Šaňák D et al.: Rekanalizační terapie akutní ischemické cévní mozkové příhody. Maxdorf Praha 2013. (ISBN: 978-80-7345-360-2).

Tomek A. et al. Neurointenzivní péče - praktická příručka. Praha: Mladá Fronta, edice Postgraduální medicína 2012. 479 stran. Hlavní editor 28-členného autorského kolektivu a autor/spolupřispěvatel 16 kapitol. (ISBN 978-80-204-2659-8).

Tomek A. Používání koncentráту protrombinového komplexu brzdí terapeutický nihilismus. *Vnitřní lékařství* 2012; 58(12):963-965.

Mařoška V, Libertínová J, Kumstýřová T, Zajac M, Meluzínová E, Lacinová Z, **Tomek A**, Táborský L. Korelace exprese MxA mRNA s hladinami neutralizačních protilátek proti IFN-beta u pacientů s rozstroušenou sklerózou. *Neurologie pro praxi* 2011; 12(6):430-433.

Urbanová B, **Tomek A**, Hort J. Antihypertenziva v prevenci Alzheimerovy nemoci. *Causa Subita* 2011; 14(4):150-152.

Tomek A. Fibrilace síní a cévní mozková příhoda. *Postgraduální medicína* 2011, 13, suppl.1:18-23.

Šroubek J, Kovář M, **Tomek A**, Plný R, Vymazal J. Extra-intrakraniální bypass při uzávěru arteria carotis interna. *Neurol. pro praxi*, 2010; 11(1): 45-49.

Veselka J, Zimolová P, Stanka P, Martinkovičová L, Černá D, Fiedler J, Hájek P, Malý M, Zemánek D, Adlová R, Tesař D, **Tomek A**, Šrámek M. et al. Implantace stentů do významných stenóz karotických tepen s použitím protektivního systému FilterWire EZ TM. *Cor Vasa* 2009; 51 (4): 255-259.

Veselka J, Zimolová P, Černá D, Stanka P, **Tomek A**, Šrámek M. Carotid Artery Stenting in Asymptomatic and Surgically High-Risk Patients: Single-Center, Single-Operator Results. *Int J Angiol* 2008; 17:207-210.

Tomek A, Šrámek M. Současné možnosti léčby ischemické cévní mozkové příhody. Kardioforum. KF (Kardioforum) 2007; 5(2):18-22.

Tomek A, Šrámek M. Diagnostika pravo-levého srdečního zkratu pomocí transkraniální dopplerovské sonografie. Neurologie pro praxi 2007; 8 (4): 215-218.

Honek T, Veselka J, **Tomek A**, Sramek M, Januska J, Šefc L, Kerekes R, Novotny S. Paradoxical embolization and patent foramen ovale in scuba divers: screening possibilities. Vnitr Lek 2007; 53(2):143-146.

Honěk T, **Tomek A**, Šrámek M et al. Foramen ovale patens jako příčina paradoxní embolizace u potápěčů. Možnosti screeningu, terapeutická a preventivní doporučení. Prakt Lek 2007; 87(1):48-51.

Honěk T, **Tomek A**, Šrámek M, Januška J, Šefc L, Kerekeš R, Novotný Š, Veselka J. Dekompresní příhoda u potápěčů a vyšetření PFO. Cor Vasa 2006; 48(7-8):286-288.

Tomek A, Šrámek M. Neodkladná terapie cévní mozkové příhody. Urgentní medicína 2005; 6(2):13-17.

Kozáková S, Zamrazil V, **Tomek A**, Charvát J, Kvapil M. Centrální pontinní myelinolýza u DM 1. typu. Kazuistiky v diabetologii 2003; 1(2):28-30.