

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

MAJA ŠKERJANEC

**VPLIV POLIMORFIZMA V433M V GENU *CYP4F2* NA
ZDRAVLJENJE Z VARFARINOM**

**INFLUENCE OF POLYMORPHISM V433M IN GENE *CYP4F2*
ON TREATMENT WITH WARFARIN**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2012

ZAHVALA

Mentorici, prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., iskrena hvala za izkazano zaupanje, razumevanje, nudenje strokovnih usmeritev, pripravljenost pomagati v vsakem trenutku in vzpodbudo pri delu.

Najlepša hvala doc. dr. Barbari Ostanek, mag. farm., za vso pomoč pri laboratorijskem delu, potrpežljivost in vodenje pri delu.

Zahvaljujem se doc. dr. Igorju Locatelliju, mag. farm., za dragocene nasvete in pripombe pri statistični obdelavi podatkov.

Sam. strok. sodelavkam na katedri, Mateji Benčina, Manji Cedilnik in Petri Ferkov se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri reševanju težav, ki so se pojavljale tekom laboratorijskega dela. Petri Ferkov se še dodatno zahvaljujem za pomoč pri izolaciji DNA.

Velika zahvala gospodu Borutu Stravniku, dr.med., specialistu interne medicine za sodelovanje pri nalogi, kolegici Nini iz antikoagulantne ambulante in sodelavkam Diagnostičnega laboratorija ZD Velenje za podporo in pomoč pri zbiranju vzorcev in podatkov.

Posebno zahvalo namenjam vsem prostovoljcem, ki so bili pripravljeni sodelovati v raziskavi.

Iz srca hvala mojim domačim za podporo in spodbudne besede pri nastajanju magistrske naloge.

IZJAVA

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za klinično biokemijo. Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem..

Ljubljana, julij 2012

Maja Škerjanec

Predsednik komisije: prof. dr. Janko Kos

Članica komisije: doc. dr. Mojca Kerec-Kos

KAZALO

ZAHVALA	2
IZJAVA	2
KAZALO	3
POVZETEK	5
ABSTRACT	7
SEZNAM OKRAJŠAV	9
SEZNAM SLIK, PREGLEDNIC IN GRAFOV	10
1. UVOD	12
1.1. VARFARIN	12
1.1.1. <i>Mehanizem delovanja</i>	12
1.1.2. <i>Farmakokinetika varfarina</i>	13
1.1.3. <i>Farmakodinamika</i>	15
1.1.4. <i>Neželeni učinki</i>	16
1.1.5. <i>Dejavniki, ki vplivajo na odmerek varfarina</i>	17
1.1.6. <i>Laboratorijsko spremljanje zdravljenja</i>	18
1.2. FARMAKOGENETIKA	18
1.2.1. <i>Farmakogenetika varfarina</i>	19
1.2.1.1. <i>Skupina encimov citokrom P450</i>	21
1.2.1.1.1. <i>Encim CYP4F2</i>	21
1.2.1.1.1.1. <i>Polimorfizem CYP4F2 in vpliv na zdravljenje z varfarinom</i>	22
1.2.1.1.2. <i>Encim CYP2C9</i>	23
1.2.1.1.2.1. <i>Vloga encima CYP2C9 v metabolizmu varfarina</i>	23
1.2.1.1.3. <i>Encim VKORC1</i>	24
1.2.1.1.3.1. <i>Polimorfizem VKORC1 in vpliv na zdravljenje z varfarinom</i>	25
1.2.1.1.4. <i>Raziskave o medsebojnem vplivu genskih polimorfizmov na interindividualno variabilnost pri zdravljenju z varfarinom</i>	25
2. NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ	27
3. PREISKOVANCI IN UPORABLJENE METODE	28

3.1	PREISKOVANCI	28
3.2	IZOLACIJA DNA	28
3.2.1	<i>Ocena količine in čistote DNA</i>	29
3.2.2	<i>Redčenje osnovne raztopine DNA</i>	29
3.3	GENOTIPIZACIJA Z METODO ALELNE DISKRIMINACIJE S HIDROLIZIRAJOČIMI SONdami	29
3.3.1	<i>Postopek genotipizacije polimorfizmov v genih CYP4F2, CYP2C9, VKORC1</i>	31
3.4	STATISTIČNA ANALIZA	35
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1.	PREISKOVANA SKUPINA	36
4.2.	GENOTIPIZACIJA	37
4.2.1.	<i>Pogostnost proučevanih genotipov</i>	37
4.2.2.	<i>Hardey-Weinbergova porazdelitev</i>	39
4.2.3.	<i>Ocena vpliva genetskih dejavnikov na variabilnost povprečnih tedenskih odmerkov varfarina</i>	40
4.2.4.	<i>Spremljanje povprečnih tedenskih odmerkov varfarina v odvisnosti od proučevanih genov</i>	44
4.2.4.1	<i>CYP4F2</i>	44
4.2.4.2	<i>CYP2C9</i>	46
4.2.4.3	<i>VKORC1</i>	48
4.3.	SEZONSKO NIHANJE INR	50
4.3.1.	<i>Sezonsko nihanje INR</i>	50
4.3.2.	<i>Primerjava pomladno-poletne in jesensko-zimske sezone v nihanju INR, odmerku varfarina in njunem količniku</i>	52
4.3.3.	<i>Vpliv genotipov na nihanje INR, odmerku varfarina in njunega količnika</i>	54
5.	SKLEP	59
6.	LITERATURA	60
7.	PRILOGE	63

POVZETEK

Varfarin je najpogosteje in najboljše proučen peroralni antikoagulant. Zdravljenje z varfarinom je zahtevno, saj ima zelo ozko terapevtsko območje na eni strani ter veliko interindividualno variabilnost v odmerkih za doseg terapevtskega INR na drugi strani. K interindividualni razliki pomembno prispevajo genetski polimorfizmi. Farmakogenetika pomaga pri oceni aktivnosti encimov, ki sodelujejo pri presnovi zdravilne učinkovine in s tem omogoča napoved kliničnega odziva preiskovanca ter posamezniku prirojeno zdravljenje kot del osebne medicine (*»personalized medicine«*). V magistrski nalogi smo proučevali enonukleotidni polimorfizem (SNPs) V433M v genu *CYP4F2*. Dokazali so, da polimorfizem V433M v genu *CYP4F2* zmanjša aktivnost encima v jetrih, posledično pa se zmanjša metabolizem vitamina K1. Zvišane vrednosti vitamina K1 v jetrih zahtevajo višje odmerke varfarina za doseganje ustreznega antikoagulacijskega učinka. V številnih raziskavah v tujini so dokazali, da so polimorfizmi v genih *CYP2C9* in *VKORC1* (*gen za vitamin K epoksid reduktazo C1*) skupaj z ostalimi kliničnimi dejavniki odgovorni za okoli 50 % variabilnosti odmerka varfarina. Zato smo v nalogi poleg polimorfizma V433M proučevali tudi polimorfizme v genih *CYP2C9* in *VKORC1*. Polimorfizmi v genu *CYP2C9* (aleli *CYP2C9*1,*2* in **3*) upočasnijo metabolizem varfarina, podaljšajo čas do stabilizacije INR in znižujejo vzdrževalne odmerke. Polimorfizem v genu *VKORC1* (alel *VKORC1* -1639G>A) pa zmanjša občutljivost encima na varfarin, zato se kljub varfarinu aktivnost encima ne zmanjša, nadaljuje se recikliranje reducirane oblike vitamina K, ki je potreben za sintezo koagulacijskih faktorjev in strjevanje krvi. V raziskavo smo vključili 198 preiskovancev, ki so bili na rednem/vzdrževalnem zdravljenju z varfarinom. Določili smo jim genotipe in izračunali njihovo pogostnost. Pogostnosti genotipov za gena *CYP2C9* in *VKORC1* so primerljive s pogostnostmi genotipov v drugih raziskavah po svetu in doma, medtem ko so bile pogostnosti za spremenjene oblike gena *CYP4F2* v naši skupini preiskovancev nižje. Dokazali smo tudi, da v povprečnem tedenskem odmerku varfarina ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *CYP4F2*1*1*, skupino z genotipom *CYP4F2*1*3* in skupino z genotipom *CYP4F2*3*3* ($p=0,332$). Ugotovili smo, da naš glavni proučevani gen prispeva le 0,1 – 1,7% delež v variabilnosti povprečnega tedenskega odmerka varfarina v celotni skupini preiskovancev. Na podlagi teh rezultatov smo zaključili, da polimorfizem V433M v genu *CYP4F2* ne vpliva značilno na zdravljenje z varfarinom. V nadaljevanju smo pokazali, da je nihanje INR tekom leta značilno veliko,

vendar ni klinično pomembno. To smo pokazali v skupini preiskovancev, katerih odmerki se tekom leta ni spreminjal, pri tem pa nihanje povprečnih mesečnih vrednosti INR ni preseglo mej terapevtskega intervala 2 – 3. Ugotovili smo, da obstajajo značilne razlike med dvema sezonama, pomladno-poletno sezono in jesensko-zimsko sezono. Razlika med povprečjem količnikov INR/odmerek za april – september in povprečjem količnikov INR/odmerek oktober-marec je statistično značilna ($p < 0,0001$). Sezonsko nihanje INR oz. količnika INR/odmerek se je razlikovalo med genotipi in sicer smo največje sezonsko nihanje dokazali pri genotipu *CYP2C9*1*1*. Pri genotipih *CYP4F2*3*3*, *CYP2C9*1*2*, *CYP2C9*1*3*, *CYP2C9*2*2*, **2*3*, **3*3* in *VKORC1AA* značilnih razlik ni bilo, kar nakazuje na relativno neodvisnost teh genotipov od sezone. Posameznike s temi genotipi lahko celo leto zdravimo s praktično enakimi odmerki varfarina.

Število obiskov posameznega preiskovanca v laboratoriju za določitev INR ni statistično značilno različno med genotipi. To dokazuje, da geni ne vplivajo na sezonsko nihanje INR oziroma na občutljivost posameznika na vpliv prehrane na INR tekom leta.

ABSTRACT

Warfarin is the most commonly used and the best examined oral anticoagulant. Treatment with warfarin is complex due to its narrow therapeutic range on the one side, and a great interindividual variability in dosage requirements to achieve the therapeutic international normalized ratio (INR) on the other side. Gene polymorphisms have an important impact on the interindividual variability. Pharmacogenetics helps us assess the activity of enzymes taking part in the metabolism of drug, allowing the clinical response to be foreseen, and the drug therapy individualized accordingly, as part of the »*personalized medicine*«. The master thesis examines the single nucleotide polymorphism (SNPs) V433M in the gene *CYP4F2*. It was proven that polymorphism V433M in the gene *CYP4F2* reduces the activity of the enzyme in liver which results in impaired metabolism of vitamin K1. Higher values of vitamin K in liver require higher doses of warfarin to reach the desired anticoagulant effect. In many surveys abroad, researchers have shown that polymorphisms in genes *CYP2C9* and *VKORC1* (gene for vitamin K epoxide reductase C1), together with other clinical factors, account for around 50% of the variability in the warfarin dosage. This is why the present master thesis examines not only the polymorphism V433M, but also polymorphisms in genes *CYP2C9* and *VKORC1*. Polymorphisms in gene *CYP2C9* (alleles *CYP2C9**1, *2 and *3) slow down the warfarin metabolism, increase the time of INR stabilization, and lower the maintenance dosage. Polymorphism in gene *VKORC1* (allele *VKORC1* -1639G>A) reduces the sensitivity of enzymes to warfarin. Consequently, the enzyme activity is not reduced despite warfarin, and the recycling of the reduced form of vitamin K, required for the synthesis of coagulating factors and clotting, continues. We have included 198 patients subject to warfarin maintenance therapy. We have determined their genotypes and calculated their frequencies. Genotype frequencies for gene *CYP2C9* and *VKORC1* are comparable with genotype frequencies in other surveys made abroad and at home, while the genotype frequencies for the gene *CYP4F2* were lower in our group of patients. We have demonstrated that as regards the average weekly dose of warfarin, there are no statistically significant differences between the group of patients with genotype *CYP4F2**1*1, the group of patients with genotype *CYP4F2**1*3, and the group of patients with genotype *CYP4F2**3*3 ($p=0,332$). In the total group of patients we have determined that the major gene that was examined contributes only 0.1 – 1.7% share in the variability of the average weekly warfarin dosage. Based on these results, we concluded that

polymorphism V433M in gene *CYP4F2* has no significant impact on the warfarin treatment. We have also demonstrated that the INR oscillation is statistically significant, but not clinically important. This was demonstrated in the group of patients with unchanged warfarin dosage throughout the year, while the oscillation of their average INR monthly values did not exceed the therapeutic interval 2–3. We have observed significant differences between two seasons, namely the spring-summer, and the autumn-winter season. The difference between the average quotient of INR/dose for April – September and the average quotient of the INR/dose October – March is statistically important ($p < 0,0001$). The seasonal oscillation of INR or the quotient of the INR/dose varied among the genotypes, with a maximum seasonal oscillation in the genotype *CYP2C9*1*1*. In genotypes *CYP4F2*3*3*, *CYP2C9*1*2*, *CYP2C9*1*3*, *CYP2C9*2*2,*2*3,*3*3*, and *VKORC1AA*, there were no significant differences that would indicate that these genotypes are relatively independent of the season. Individuals with these genotypes can be treated with practically the same warfarin doses throughout the year.

Statistically, the number of laboratory visits of individual patients to determine the INR did not vary among genotypes. This proves that genes do not affect the seasonal oscillation of INR, or the individuals' sensitivity to the food impact on the INR in the course of the year.

SEZNAM OKRAJŠAV

DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl.: deoxyribonucleic acid)
EM	obsežen/dober matabolizator (angl.: extensive metabolizer)
EPF	fluorescenca na koncu postopka (angl.: endpoint fluorescence)
FII	faktor II – protrombin
FV	faktor V - proakcelerin
FVII	faktor VII - prokonvertin
FIX	faktor IX – antihemofilni faktor B
FX	faktor X – Stuart-Prowerjev faktor
FDA	ameriški vladni urad za zdravila (angl.: Food and Drug administration)
GGCX	γ -glutamilkarboksilaza
GI trakt	gastrointestinalni trakt
HWE	Hardy-Weinbergovo ravnotežje
IM	srednji metabolizator (angl.: intermediate metabolizer)
INR	mednarodno umerjeno razmerje (angl.: international normalized ratio)
ISI	mednarodni kazalec občutljivosti (angl.: international sensitivity index)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
NTC	slepa kontrola (angl.: nontemplate control)
dNTP	deoksiribonukleotid trifosfatov
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl.: polymerase chain reaction)
PČ	protrombinski čas
PM	počasen/slab metabolizator (angl.: poor metabolizer)
RNA	ribonukleinska kislina
SD	standardna deviacija
SE	standardna napaka
SNPs	enonukleotidni polimorfizem (angl.: single nucleotide polymorphism)
dTTP	deoksitimidin trifosfat
UEM	izrazito močan metabolizator (angl.: ultraextensive metabolizer)
VKORCI	vitamin K epoksid reduktaza, podenota 1
ZD	zdravstveni dom
ZDA	Združene države Amerike

SEZNAM SLIK, PREGLEDNIC IN GRAFOV

Slika 1: Varfarin v ciklu vitamina K

Slika 2: Mehanizem delovanja in metabolizma varfarina

Slika 3: Priporočen dnevni odmerek varfarina glede na genotip *CYP2C9* in *VKORC1*

Slika 4: Vloga *CYP4F2* v hemostazi vitamina K1

Slika 5: Specifičnost hidrolizirajočih sond

Slika 6: Rast fluorescence posameznega barvila glede na alelno obliko

Slika 7: Rezultati genotipizacije posameznega genotipa (*CYP2C9*2*) v obliki grafa

Slika 8: Rezultati genotipizacije posameznega genotipa (*CYP2C9*2*) v obliki tabele

Preglednica I: Reagenčni kompleti oligonukleotidnih začetnikov in sond

Preglednica II: Kontrolne raztopine DNA z znanimi genotipi

Preglednica III: Sestava reakcijske zmesi

Preglednica IV: Pogoji reakcije PCR

Preglednica V: Opis preiskovane skupine

Preglednica VI: Pogostnost genotipov za *CYP4F2*, *CYP2C9* in *VKORC1*, n (%)

Preglednica VII: Pogostosti alelov v HWE ravnotežju

Preglednica VIII: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti tedenskega odmerka varfarina

Preglednica IX: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti tedenskega odmerka varfarina

Preglednica X: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti povprečnega tedenskega odmerka varfarina na izbrani skupini preiskovancev (n=87)

Preglednica XI: Povprečni tedenski odmerki varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih po genskem polimorfizmu in % odstopanja tedenskega odmerka varfarina po posameznih skupinah od skupine preiskovancev z normalnim homozigotnim genom

Preglednica XII: Statistične značilnosti razlik med povprečjem količnikov INR/odmerek za april – september v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih in povprečjem količnikov INR/odmerek oktober-marec v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih, posamezno tudi za INR in odmerek

Graf 1: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *CYP4F2*

Graf 2: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *CYP2C9*

Graf 3: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *VKORC1*

Graf 4: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali le ta ni odstopal za več kakor 1SD (n=90)

Graf 5: Razlika povprečij INR april-september in oktober-marec v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali le ta ni odstopal za več kakor 1SD (n=90)

Graf 6: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP4F2* in povprečje za celotno skupino

Graf 7: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP4F2* in povprečje za celotno skupino

Graf 8: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu *VKORC1* in povprečje za celotno skupino

Graf 9: Razlika povprečij INR april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev

Graf 10: Razlika povprečij odmerkov april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev

Graf 11: Razlika povprečij količnikov INR/odmerek april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev

1. UVOD

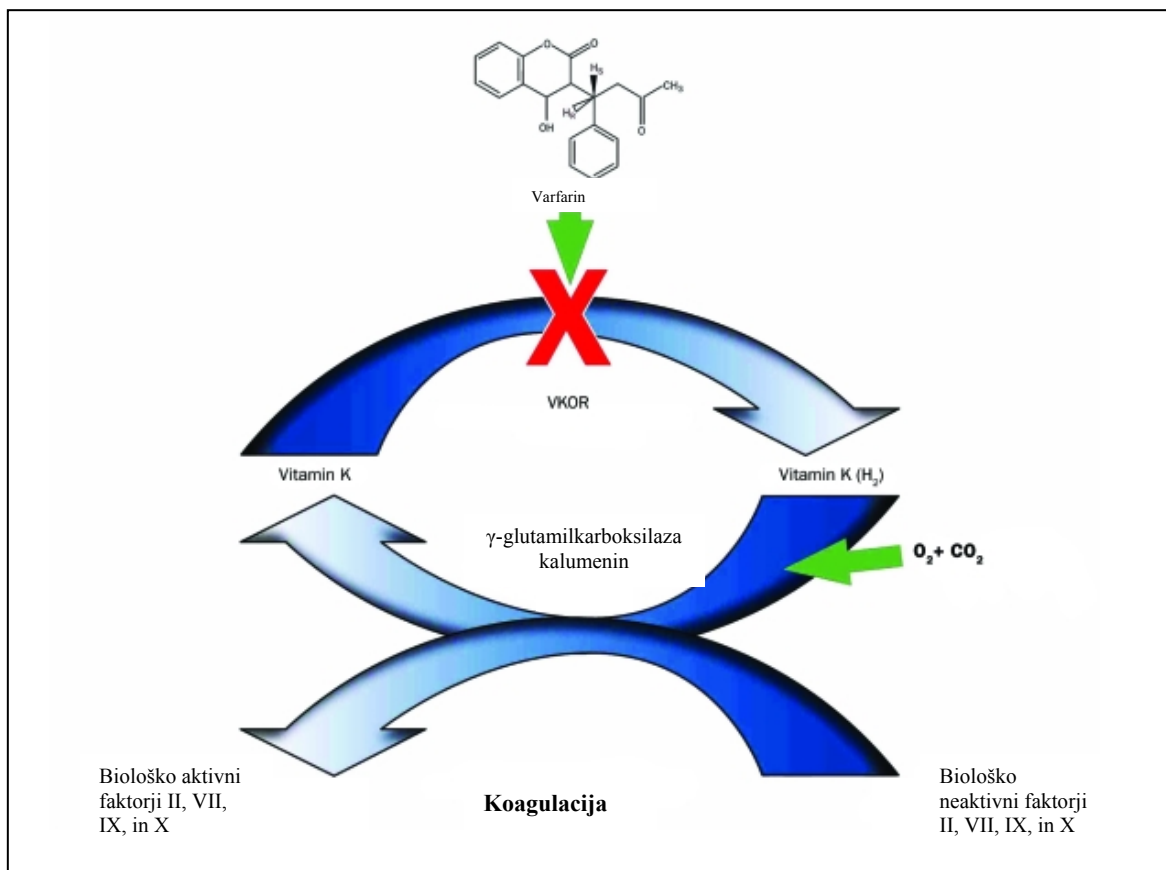
1.1. VARFARIN

Že več kakor 40 let antagonisti vitamina K, vključno z varfarinom, predstavljajo zlati standard za preprečevanje in zdravljenje venske tromboembolije, ter za preprečevanje infarkta in atrijske fibrilacije (1). Zdravljenje in preprečevanje bolezni z varfarinom je zahtevno, saj ima varfarin zelo ozko terapevtsko območje na eni strani ter veliko interindividualno variabilnost v odmerku, potrebnem za doseg terapevtskega INR na drugi strani. Ustrezno odmerjanje varfarina je ključnega pomena, saj lahko previsoki odmerki vodijo v hemoragične krvavitve, medtem ko prenizki odmerki ne zagotavljajo zadovoljive zaščite pred nastankom strdkov (2).

1.1.1. Mehanizem delovanja

Kumarini, v skupino katerih sodi tudi varfarin, so antagonisti vitamina K in omogočajo antikoagulacijski učinek tako, da vplivajo na ciklično interkonverzijo vitamina K in njegovih 2,3 epoksidov (vitamin K epoksid). Vitamin K je kofaktor encima, ki omogoča postranslacijsko karboksilacijo ostankov glutamata v γ -karboksilglutamat.

Koagulacijski faktorji II, VII, IX in X potrebujejo γ -karboksilacijo za biološko aktivnost. Kumarini delujejo antikoagulantno tako, da inhibirajo interkonverzijo vitamina K znotraj cikla. Tako kumarini povzročijo, da jetra proizvajajo delno karboksilirane in dekarboksilirane koagulacijske faktorje z zmanjšano prokoagulacijsko aktivnostjo (Slika 1). Dodatno pa antagonisti vitamina K inhibirajo karboksilacijo regulatornih antikoagulacijskih proteinov C in S. Tako izvajajo prokoagulacijski učinek. V prisotnosti kalcijevih ionov, karboksilacija povzroči konformacijske spremembe v koagulacijskih faktorjih, kar spodbudi vezavo na kofaktorje, ki so na fosfolipidnih površinah. Reakcija karboksilacije lahko poteče le ob prisotnosti reducirane oblike vitamina K (vitamin KH_2), kisika in ogljikovega dioksida. Pri tem pride do oksidacije vitamina KH_2 v vitamin K epoksid. Vitamin K epoksid se nato »reciklira« v vitamin KH_2 z redukcijo v dveh korakih. Prvi korak, ki je občutljiv na antagoniste vitamina K, reducira vitamin K epoksid v vitamin K_1 (naravna oblika vitamina K iz hrane), medtem ko drugi korak, ki je relativno neobčutljiv na antagoniste vitamina K, dodatno reducira vitamin K_1 v vitamin KH_2 . Terapija z antagonisti vitamina K ovira redukcijo in nastanek vitamina KH_2 in posledično zmanjšuje γ -karboksilacijo od vitamina K odvisnih koagulacijskih proteinov. Tako lahko učinek kumarinov nevtraliziramo z vitaminom K_1 , ki smo ga vnesli bodisi s hrano ali pa zaradi terapevtskih potreb (2).

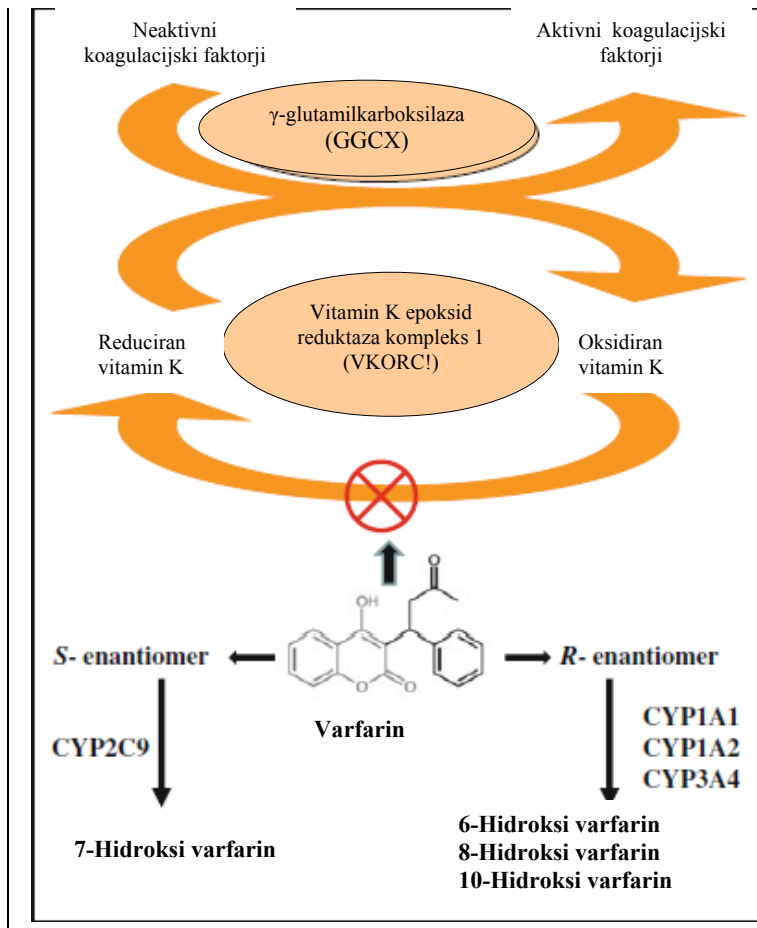


Slika1: Varfarin v ciklu vitamina K (11)

1.1.2. Farmakokinetika varfarina

Varfarin je racemat, sestavljen iz dveh optično aktivnih izomer, to sta R in S oblika. Ima visoko biološko uporabnost in se hitro absorbira iz gastrointestinalnega trakta (GI trakt) (2). Biološka uporabnost peroralnega varfarina je več kot 90 %, največjo plazemsko koncentracijo pa doseže po 1,2 uri. Sočasno zaužit obrok hrane upočasni absorpcijo, vendar ne zmanjša količine absorbiranega varfarina. Delno poteka tudi enterohepatična cirkulacija (3). Razpolovna doba varfarina je od 36 do 42 ur. Po telesu kroži vezan na plazemske proteine (v glavnem albumine) in se kopiči v jetih (2). Varfarin se močno veže na serumski albumin, delež prostega varfarina pa variira med 0,5 % in 3 %. Volumen porazdelitve je približno 0,14 l/kg. Varfarin prehaja skozi placentno, vendar se ne izloča v materino mleko (3). Na odziv telesa na odmerek varfarina vplivajo tako genetski kakor tudi drugi dejavniki iz okolja, vključno z mutacijami genov. Dodatno pa na odziv na odmerek zdravila pri zdravem posamezniku, poleg že omenjenih znanih in neznanih genetskih dejavnikov, vplivajo različna bolezenska stanja, zdravila in prehrana. Na antikoagulantni učinek zdravila varfarin vplivajo tudi farmakokinetični faktorji, vključno z

interakcijami z drugimi zdravili, ki posledično vplivajo na absorpcijo in metabolizem varfarina in farmakodinamični faktorji, ki spreminjajo odziv hemostaze na dane koncentracije varfarina. Variabilnost v odzivu zdravega posameznika na varfarin izvira tudi iz netočnosti laboratorijskih rezultatov, nesodelovanja pacientov pri jemanju zdravila in pacientovega nerazumevanja navodil, ki mu jih da zdravnik. Druga zdravila, ki jih pacient sočasno jemlje, lahko vplivajo na farmakokinetiko varfarina tako, da zmanjšajo absorpcijo varfarina v GI traktu ali pa tako, da motijo procese presnovnih očistkov varfarina. Klinično je pomembnejša inhibicija metabolizma S-izomere, ker je ta izomera kot vitamin K antagonist 5-krat bolj močna v primerjavi z R-izomero. Očistek S-izomere varfarina zavirajo fenilbutazone, sulfinpirazone, metronidazol in trimetoprim – sulfametazol in posledično potencirajo učinek varfarina na protrombinski čas. Na drugi strani pa imata zdravila kot sta cimetidin in omeprazol, ki inhibirata očistek R-izomere varfarina, le manjši vpliv na protrombinski čas. Amiodaron inhibira tako očistek S-izomere kakor tudi R-izomere in tako okrepi antikoagulantni učinek varfarina. Antikoagulantni učinek varfarina inhibirajo barbiturati, rifampicin in karbamazepin tako da spodbudijo oksidativno aktivnost jeter in s tem povečajo očistek varfarina. Tudi dolgotrajno uživanje alkohola poveča očistek varfarina preko podobnega mehanizma (2). Varfarin se torej izloča z jetrnim metabolizmom (3). *CYP2C9* omogoča hidrosilacijo S-varfarina, *CYP1A2*, *CYP3A* in *CYP2C19* pa sodelujejo pri metabolizmu R-varfarina (2). Nastajajo neaktivni metaboliti, ki se izločajo z urinom. Razpolovna doba eliminacije S-varfarina je od 18-35 ur, R-varfarina pa 20-70 ur (3).



Slika 2: Mehanizem delovanja in metabolizma varfarina (1)

1.1.3. Farmakodinamika

Varfarin ali 4-hidroksikumarin je antikoagulant, ki preprečuje od vitamina K odvisno sintezo faktorjev strjevanja krvi. S-varfarin je približno 5-krat aktivnejša izomera varfarina kot R-varfarin. Učinkovitost temelji na sposobnosti varfarina, da prepreči redukcijo in delovanje vitamina K pri sintezi faktorjev strjevanja FII, FVII, FIX in FX. V terapevtskih odmerkih varfarin zmanjša sintezo faktorjev strjevanja za 30 do 50 %, zmanjša pa tudi njihovo biološko aktivnost. Poln učinek se doseže po 2 do 7 dneh, ko se faktorji strjevanja, ki so že v krvnem obtoku, izločijo (3).

Pacienti z genetsko pogojeno rezistenco na varfarin potrebujejo 5 do 20-krat večje odmerke varfarina, da dosežejo želen antikoagulantni učinek. Ta nepravilnost je posledica spremenjene afinitete receptorja za varfarin, medtem ko so plazemske koncentracije varfarina zvišane. Redke, v 1,5% populacije, so mutacije v propeptidu FIX, ki povzročajo krvavitve tudi, ko protrombinski čas ni podaljšan. Posamezniki, ki so že dolgo časa na terapiji z varfarinom, so

občutljivi na nihanje nivoja vitamina K, ki ga v telo vnesemo s prehrano. Pretežno gre za vitamin K1 - filokinon, ki ga vnesemo v telo z rastlinsko hrano (2). Največ ga je v solati, špinači, cvetači, brokoliju, ohrovtu, zelju, soji in jetrih, nekaj pa tudi v sojinem in olivnem olju (7). Povečan vnos vitamina K, ki je v takšnih količinah, da vpliva na antikoagulantno terapijo, se lahko pojavi pri posameznikih, ki so na dieti z namenom zmanjšanja telesne teže in dieta temelji na uživanju pretežno zelene zelenjave, pri posameznikih, ki uživajo prehranska nadomestila, ki vsebujejo vitamin K ali pa pri bolnikih, ki prejemajo intravenozno prehranske nadomestke in le ti vsebujejo vitamin K. Obratno, lahko zmanjšan vnos vitamina K potencira učinek varfarina pri bolnikih, ki se zdravijo z antibiotiki, pri bolnikih, ki se zdravijo z antibiotiki in poleg tega prejemajo intravenozno prehranske nadomestke, ki ne vsebujejo vitamina K ali v primeru bolnikov z maščobno malabsorpcijo. Disfunkcija jeter potencira odziv telesa na varfarin zaradi zmanjšane sinteze koagulacijskih faktorjev. Hipermetabolična stanja, ki so posledica zvišane telesne temperature, ali hipertiroidizem povečajo učinek varfarina kot posledica povečanega katabolizma od vitamina K odvisnih koagulacijskih faktorjev. Zdravila vplivajo na farmakodinamiko varfarina z inhibicijo sinteze in povečanim izločanjem od vitamina K odvisnih koagulacijskih faktorjev ali pa z interferencami na drugih delih procesa hemostaze. Ta zdravila so: cefalosporini, klofibrati, salicilati, acetaminofen, heparin (v terapevtskih odmerkih potencira učinek antikoagulantnega delovanja varfarina in povzroči le rahlo podaljšanje PČ), acetilsalicilna kislina, nesteroidna protivnetna zdravila, penicilini, moksolaktam (inhibirajo delovanje trombocitov). Ob visokih odmerkih acetilsalicilne kisline in intenzivni terapiji z varfarinom, ko je pričakovan INR med 3,0 in 4,5, se lahko poveča tveganje za krvavitve v GI traktu. Smiselno je pogostejše merjenje PČ ob uvajanju in ukinjanju dodatnega zdravila pacientom, ki so na antikoagulantni terapiji (2).

1.1.4. Neželeni učinki

Pogosti (1-10 %) neželeni učinki, o katerih so poročali pri zdravljenju z varfarinom, so zapleti zaradi krvavitve. Skupen odstotek vseh krvavitvev je 8 % na leto, od tega manjše krvavitve (6 % na leto), hude krvavitve (1 % na leto) in smrtne (0,25 % na leto). Najpogostejši faktor tveganja za nastanek intrakranialnih krvavitvev je nezdravljena ali nenadzorovana hipertenzija. Verjetnost krvavitvev se povečuje s signifikantnim naraščanjem INR nad ciljno vrednost. Če se krvavitve pojavijo, ko je INR znotraj ciljnega območja, je običajno prisotno še drugo obolenje, ki ga je treba raziskati (3). Tveganje za krvavitve, ki se pojavijo kot posledica neželenih učinkov terapije z varfarinom, je tekom prvih nekaj mesecev terapije 10 krat višje kakor po enem letu

terapije. Najpogosteje se pojavljajo krvavitve v gastrointestinalnem traktu, mehkem tkivu in urinskem traktu (2).

Nekroza, ki je značilna za kumarine, je redek (< 0,1 %) zaplet pri zdravljenju z varfarinom. Na začetku se pokaže kot otekanje s temnimi kožnimi lezijami običajno na spodnjih okončinah ali zadnjici, lahko pa se pojavi tudi drugje. Kasneje postanejo lezije nekrotične. 90 % bolnikov je žensk. Lezije se pojavijo med 3. do 10. dnevom zdravljenja, vzrok za njihov nastanek pa je lahko relativno pomanjkanje antitrombotičnih proteinov C in S. Prirojeno pomanjkanje teh proteinov lahko povzroči nagnjenje k zapletom. Zato je treba zdravljenje z varfarinom pri teh bolnikih začeti sočasno s heparinom in uporabiti nizke začetne odmerke varfarina. Če se pojavijo zapleti, je treba zdravljenje z varfarinom prekiniti, zdravljenje s heparinom pa nadaljevati, dokler se lezije ne zacelijo ali zabrazgotinijo. Sindrom modro-vijoličnega palca je še redkejši zaplet pri zdravljenju z varfarinom. Bolniki so običajno moški z arteriosklerozo. Varfarin naj bi povzročal krvavitve na ateromatoznih plakih, kar vodi do mikroembolije. Na koži palcev in podplatih se pojavijo simetrične modro-vijolične lezije, ki povzročajo pekočo bolečino. Zdravljenje z varfarinom je treba prekiniti in kožne lezije običajno počasi izginejo (3).

1.1.5. Dejavniki, ki vplivajo na odmerek varfarina

Dejavnike, ki vplivajo na odmerjanje varfarina lahko najprej razdelimo po skupinah na demografske dejavnike, sočasno prisotne bolezni, interakcije med zdravili in genetske dejavnike. Med demografske dejavnike uvrščamo spol in starost. Z naraščanjem starosti se povečuje občutljivost za varfarin, zato so potrebni nižji odmerki varfarina tako ob uvajanju terapije kakor tudi za vzdrževanje terapije. Mehanizem tega pojava ni popolnoma pojasnjen. Z vidika farmakokinetike ni nobenih posebnosti, ki bi bile posledica staranja, z vidika farmakodinamike, pa bi nižje odmerke varfarina z naraščanjem starosti lahko pripisovali bodisi zmanjšanemu vnosu vitamina K s hrano, zmanjšano absorpcijo vitamina K ali pa zmanjšani kapaciteti skladiščenja vitamina K, ki je potreben za sintezo koagulacijskih faktorjev. (8) Vpliv BMI na odmerek varfarina prav tako ni pojasnjen. Obstaja možnost, da gre za sočasen vpliv in povezavo med BMI, starostjo in količino serumskih albuminov, saj so opazili nižji BMI in količino serumskih albuminov z naraščanjem starosti (8). Ostale dejavnike smo omenili že v farmakodinamiki in farmakokinetiki varfarina, v nadaljevanju pa bomo podrobneje opisali genetske dejavnike.

1.1.6. Laboratorijsko spremljanje zdravljenja

Za spremljanje peroralnega antikoagulacijskega zdravljenja uporabljamo koagulacijsko preiskavo protrombinski čas (PČ). S PČ merimo aktivnost faktorjev, ki so odvisni od vitamina K (FII, FVII, FX), kot tudi FV in fibrinogena. Antagonisti vitamina K povzročijo funkcionalne spremembe pri sintezi FII, FVII, FIX in FX ter zaviralcev koagulacije, proteina S in proteina C. PČ test je specifičen za pomanjkanje FVII, faktor zunanje poti, ni pa specifičen za koagulacijske faktorje skupne poti: FII, FV, FX in fibrinogen. *In vivo* se prične aktiviranje zunanjega dela koagulacijskega sistema s sproščanjem tkivnega tromboplastina iz poškodbe. Tkivni tromboplastin, kompleks tkivnega faktorja, glikozilirane membranske beljakovine in negativno nabitih fosfolipidov, aktivira FVII. FVIIa aktivira FX v FXa, ta pa protrombin v trombin. Poleg tega FVIIa sproži notranji del koagulacije tako, da aktivira FIX v FIXa. *In vitro* dosežemo aktivacijo FVII z dodajanjem tromboplastinskega reagenta. Plazmi dodamo optimalno količino tkivnega tromboplastina in kalcijevih ionov, kar povzroči pretvorbo protrombina v trombin in polimerizacijo fibrinogena v fibrin. Merimo čas do nastanka fibrina (strdka). Rezultate sporočamo kot mednarodno umerjeno razmerje (INR). Različni tromboplastinski reagenti so namreč različno občutljivi na različne koagulacijske faktorje in na spremembe, ki jih povzročijo antagonisti vitamina K. Zato so rezultati PČ, če jih izražamo v odstotkih ali kot razmerje, različni. Razmerje popravimo z mednarodnim kazalcem občutljivosti (ISI) uporabljenega tromboplastinskega reagenta in izrazimo kot INR. ISI dobimo pri kalibraciji uporabljenega tromboplastinskega reagenta z referenčnim tromboplastinskim reagentom Svetovne zdravstvene organizacije. ISI komercialno dostopnih tromboplastinskih reagentov določijo že proizvajalci. ISI blizu 1,0 pomeni, da je občutljivost tromboplastinskega reagenta podobna občutljivosti referenčnega tromboplastinskega reagenta.

Terapevtsko območje pri bolnikih, ki dobivajo antagoniste vitamina K je od 2,0 – 3,5 INR (4).

1.2. FARMAKOGENETIKA

Farmakogenetika proučuje individualne genetske dejavnike, ki imajo svoj vpliv na učinkovitost zdravila in njegovo toksičnost (9). Večina pacientov kaže visoko interindividualno variabilnost v odzivu na zdravilo in v toksičnosti zdravila. To se kaže tako, da se pacienti na zdravilo ne odzovejo ali pa je odziv le delen oziroma tako, da pogosto doživijo neželene učinke zdravila. Variabilnost lahko pripisujemo tudi drugim dejavnikom, medtem ko je dokazano, da lahko genetskim dejavnikom pripišemo od 15 - 30% interindividualnih razlik v metabolizmu zdravila

in odzivu posameznika na zdravilo (10). Genotipizacija je diagnostični postopek ugotavljanja in identifikacije polimorfizmov v genu. Gre za preučevanje DNA zapisa gena, ki kodira proteine/encime, vključene v metabolizem zdravila. O polimorfizmu v genu lahko govorimo takrat, ko se mutirana oblika gena pojavlja pri več kakor 1% populacije. Te mutacije vključujejo genske spremembe, ki se izražajo z določenim fenotipom. Fenotip vpliva na farmakokinetične parametre (absorpcija, metabolizem, vezava na proteine in eliminacija) in na farmakodinamične parametre najpogosteje določene z receptorskim mestom, s tem pa posledično vpliva na terapijsko učinkovitost zdravila. Polimorfizem v genu določa različne vrste fenotipov glede na farmakoterapijski odgovor oziroma glede na intenzivnost metabolizma zdravila:

- a) fenotip obsežnega/dobrega metabolizma (angl. *extensive metabolizer* – EM). To je pričakovana lastnost največjega dela populacije z obema popolnoma funkcionalnima aleloma (normalni homozigot, angl. *wild type, wt/wt*);
- b) fenotip počasnega/slabega metabolizma (angl. *poor metabolizer* – PM). Avtosomna je recesivna lastnost, ki je nastala z mutacijo in/ali delecijo obeh alelov, ki se fenotipsko izraža s kopičenjem zdravila – substrata zaradi zmanjšane ali odpravljene aktivnosti encimov (mutirani homozigot);
- c) fenotip izrazito močnega metabolizma (angl. *ultraextensive metabolizer* – UEM). Avtosomna je dominantna lastnost, ki je posledica pomnoževanja gena, ki nosi zapis za pospešeno razgradnjo zdravila – substrata;
- d) fenotip srednjega metabolizma (angl. *intermediate metabolizer* – IM). Najdemo ga pri heterozigotih z enim mutiranim in drugim funkcionalnim alelom, prenaša se avtosomno recesivno in je lahko metabolizem zdravila normalen ali zmanjšan.

Rezultati farmakogenetične analize z genotipizacijo polimorfni alelov in natančnim določanjem fenotipa, omogočajo izbiro optimalnega odmerka zdravila, s čimer lahko preprečimo neželene učinke, ki bi bili posledica prevelikih ali premajhnih odmerkov zdravila. Na ta način dosežemo optimizacijo in individualizacijo ustrezne terapije skupaj z doseganjem želenega terapevtskega učinka s čim manjšim tveganjem za neželene učinke zdravila (10).

1.2.1. Farmakogenetika varfarina

Varfarin sodi med zdravila, za katera se priporoča farmakogenetično vodenje terapije, saj so študije potrdile, da je vpliv genov velik in da lahko vplivu genov pripisujemo znaten del variabilnosti odmerka varfarina (9). V ta namen je bilo po svetu izvedenih veliko raziskav, vendar je pred nekaj leti Ansell s sod. (12), ko je predstavil priporočila za prakso, kako voditi

bolnike na terapiji z antagonisti vitamina K (varfarin in drugi), v imenu *American College of Chest Physicians*, ki niso bila v podporo farmakogenetiki varfarina, odsvetoval uporabo genotipizacije pri vodenju bolnikov, ki so na terapiji z varfarinom za toliko časa, dokler ne bodo randomizirane, prospektivne raziskave pokazale in potrdile koristi genotipizacije. Takšne raziskave trenutno potekajo v številnih akademskih centrih v ZDA in Evropi (13-15). Nedavno pa so številni akademski centri ponudili v uporabo algoritme za odmerjanje varfarina, ki upoštevajo tudi informacijo o genomu, za pomoč pri določanju optimalnega odmerka varfarina (*Linder MW, personal communication, 2009*). Eden od teh algoritmov je na voljo vsem zdravnikom na spletni strani www.warfarindosing.org, ki vključuje podatke o starosti, spolu, teži, etični pripadnosti, indikacijo, kajenje, prejemanje amiodarona ali statinov, ciljni INR in alelne variante *VKORC1* in *CYP2C9*, ob upoštevanju ocene potrebnega dnevnega odmerka varfarina (16). Nenazadnje pa je že leta 2007 ameriški vladni urad za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration - FDA*) priporočila upoštevanje genetičnih podatkov pri odmerjanju zdravil, kar so prikazali na primeru varfarina in s tem podali nove smernice v individualizaciji terapije za posameznega bolnika. Po teh navodilih bi bilo potrebno razmisliti o nižjih začetnih odmerkih varfarina pri bolnikih, ki imajo določene genske variacije. Za vzpostavitev algoritma odmerjanja varfarina so priporočili določitev genotipa *CYP2C9* in *VKORC1* (17). Poenostavljena shema priporočil za odmerjanje varfarina glede na genotip je prikazana na Sliki 3.

VKORC Haplotype	CYP2C9 Genotype					
	Rapid Metabolism, *1/*1	Intermediate Metabolism, *1/*2	Poor Metabolism			
			*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
High dose (BB)	6.7	5.4	4.5	4.4	3.6	3.0
Medium dose (AB)	4.8	3.9	3.2	3.2	2.6	2.2
Low dose (AA)	3.5	2.8	2.3	2.3	1.9	1.6

Data are daily doses (mg).
 INR = international normalized ratio; BB = wild-type; AB = heterozygote for variant allele; and AA = homozygote for variant allele.
 Doses are derived from a warfarin dosing algorithm with the following parameters: age = 65 years, body surface area = 1.96 m² (weight = 180 lbs, height = 5'8"), nonsmoker, target INR = 2.75, and taking no other drugs.⁶⁵

Source: Pharmacotherapy © 2008 Pharmacotherapy Publications

Slika 3. Priporočen dnevni odmerek varfarina glede na genotip *CYP2C9* in *VKORC1*(17)

1.2.1.1. Skupina encimov citokrom P450

Sistem citokroma P450 predstavlja najpomembnejši encimski oksidativni sistem, ki je vključen v biotransformacijo prve faze metabolizma številnih zdravil. To je skupina hem proteinov, ki imajo v reducirani obliki visoko afiniteto do ogljikovega monoksida, pri čemer nastaja reducirani kompleks citokrom P450-CO, ki po spektralnih lastnostih doseže absorpcijski maksimum pri 450nm, po čemer je tudi poimenovan. Po definiciji *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* so citokromi P 450 skupina hem proteinov z biosintezo, katero upravlja super družina genov. Ti proteini predstavljajo skupino encimov, ki katalizirajo reakcije monoooksigenacije velikega števila encimov in endogenih snovi (18). Večinoma se nahajajo v membranah endoplazemskega retikuluma jeter, vendar pa jih lahko najdemo tudi v drugih tkivih (črevesje, ledvica, placenta, pljuča in možgani). Fiziološki pomen encimskega sistema citokromov P450 je v katalitičnem delovanju pri reakcijah biosinteze, razgradnje in biotransformacije številnih endogenih snovi, ksenobiotikov in zdravil. Ti encimi imajo pomembno vlogo v regulaciji učinka in trajanju aktivnosti zdravila, v detoksikaciji eksogenih snovi in njihovi aktivaciji v potencialno toksične in rakotvorne metabolite z inhibicijo CYP. Poznamo preko 50 encimov CYP, manjši del je tistih, kateri metabolizirajo skoraj 90% zdravil (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5). Polimorfizem v genu, ki kodira to skupino encimov, je povezan s štirimi glavnimi fenotipskimi variantami, posledica katerih so razlike v metabolizmu, s tem pa tudi v koncentraciji zdravila in potrebnim odmerkom za vzdrževanje zelenega terapijskega učinka (19).

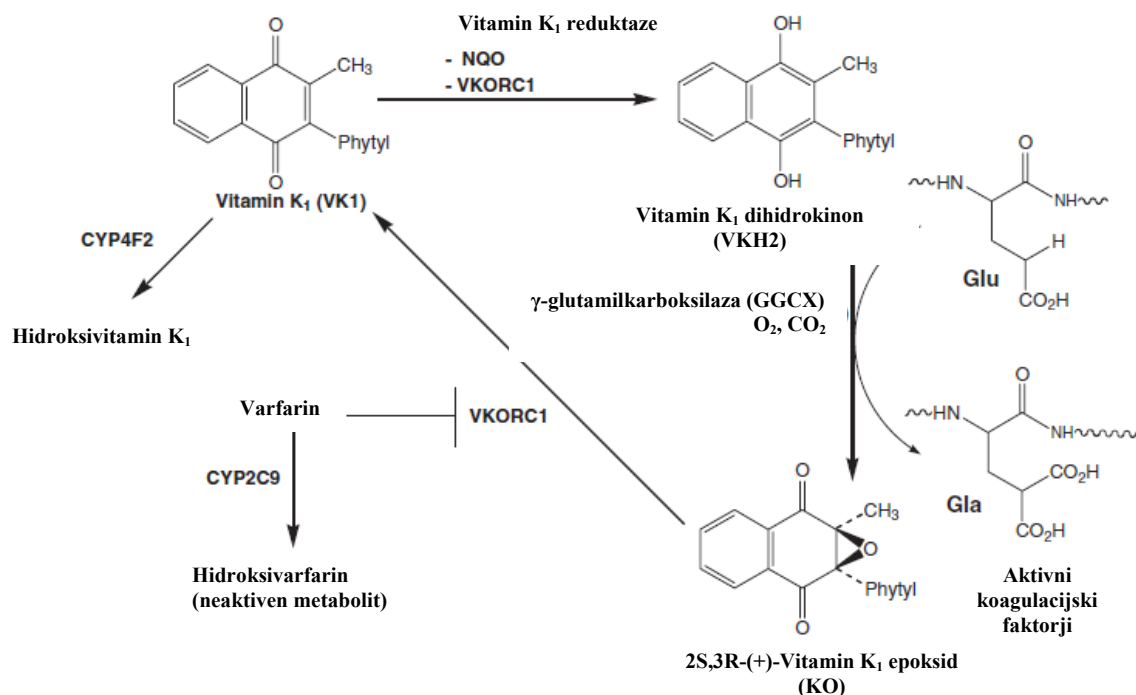
1.2.1.1.1. Encim CYP4F2

Citokrom P450 4F2 spada v CYP4 družino encimov, katerih funkcija je ω -hidroksilacija širokega spektra maščobnih kislin, medtem ko ima CYP4F poddružina večjo afiniteto do dolgih verig ($C_{16} - C_{26}$) maščobnih kislin. *CYP4F2* je primarni humani encim, ki je odgovoren za ω -hidroksilacijo tokoferolov (vitamin E), katerih raznolike strukture sestavljajo ciklična skupina (glava), ki je pripeta na stransko verigo treh linearnih izoprenilnih enot (ki so podobne vitaminu K1) in na pitanično kislino, ki pa je v bistvu stranska veriga vitamina K1 brez menadionske skupine. Vitamin K1 je s svojo, v večini nasičeno stransko verigo, sestavljen iz štirih linearno povezanih izoprenilnih enot in je zato zelo izpostavljen tveganju za s *CYP4F2*–posredovano ω -hidroksilacijo. *CYP4F2* torej deluje kot vitamin K1 monoooksidaza, ki najverjetneje ustvarja ω -hidroksi derivate substrata. DNA oblika (rs2108622; V433M; C>T nukleotidna zamenjava) v citokromu P450 4F2 povzroča zmanjšano kapaciteto za metabolizem vitamina K1 in

zmanjšanje ravnovesne (angl. *steady-state*) jetrne koncentracije encima. Zaradi tega, imajo pacienti z rs2108622 polimorfizmom zvišane vrednosti vitamina K1 v jetrih in tako potrebujejo višje odmerke varfarina za doseganje ustreznega antikoagulantnega učinka (30).

1.2.1.1.1.1. Polimorfizem CYP4F2 in vpliv na zdravljenje z varfarinom

Enonukleotidni polimorfizmi (SNPs) so DNA oblike, v katerih se ena nukleotidna sekvenca razlikuje od drugih v istem genomu, kar vodi v nastajanje različnih alelnih oblik gena. Vlogo CYP4F2 rs210862 SNPs pri odmerjanju varfarina je prvi opisal Caldwell leta 2008. Pri treh skupinah belcev iz ZDA so dokazali, da CYP4F2 rs210862 SNP vpliva na odmerek varfarina toliko, da je razlika v potrebnem dnevnem odmerku varfarina približno 1 mg/dan med skupino z dvema C aleloma in skupino z dvema T aleloma. Izračunali so tudi, da so klinični dejavniki skupaj s CYP2C9 in VKORC1 genotipi odgovorni za približno 54% variabilnosti, medtem ko je CYP4F2 genotip dodatno zvišal odstotek na 56% variabilnosti. Rs210862 polimorfizem v CYP4F2 se kaže tako, da vpliva na aktivnost encima (31). Zmanjšana aktivnost jetrnih encimov je povezana s potrebo po višjih odmerkih varfarina, kar so dokazali tako v ZDA kakor tudi med Švedi. Tudi v Italiji so dokazali, da so pacienti, ki so bili nosilci CYP4F2*1*1 genotipov, potrebovali nižje odmerke varfarina kakor tisti, ki so bili nosilci CYP4F2*1*3 heterizigotnih genotipov ali *3*3 homozigotnih genotipov (32).



Slika 4: Vloga CYP4F2 v hemostazi vitamina K1(30)

1.2.1.1.2. Encim CYP2C9

Eden najpomembnejših izomer poddružine CYP2C je *CYP2C9*. Gen, ki kodira protein *CYP2C9*, se pri ljudeh nahaja na kromosomu 10q24.2. Značilen je polimorfizem v družini *CYP2C9* in ker vemo, da se preko njega metabolizira vsaj 20% zdravil, je to izjemno pomembno upoštevati za njihov farmakoterapijski učinek in potencialno toksičnost. *CYP2C9* metabolizira pomembna zdravila, med katerimi je tudi varfarin in predstavlja substrat teh encimov. Odkritih je več kakor 30 alelnih oblik za *CYP2C9*, med katerimi je najpogostejši alel Arg144/Ile359 (*CYP2C9*1*), ki ga uvrščamo kot normalen homozigot (angl. *wild type-wt*). Z zamenjavo citozina s tiaminom (C>T) na nukleotidu 430 nastaja alelna oblika Cys144/I1359 (*CYP2C9*2*), pri zamenjavi adenozina s citozinom (A>C) na nukleotidu 1075 pa nastaja alelna oblika Arg144/Leu359 (*CYP2C9*3*). Ti aleli ustvarjajo šest različnih genotipov: *1/*1 (wt/wt), *1/*2, *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3. Najbolj pogost je normalen homozigot *CYP2C9*, ki ima normalen metabolični fenotip (NM). Alela *2 in *3 pa sta povezana z značilnim zmanjšanim metabolizmom različnih substratov *CYP2C9* v primerjavi z normalnim homozigotom in ju uvrščamo med pomembne dejavnike tveganja, odgovorne za podaljšan antikoagulantni učinek varfarina. Populacijske raziskave genotipizacije navajajo različno etično zastopanost posameznih alelnih oblik. Divji tip je najbolj zastopan v 85-95% prebivalcih Azije (Japonska, Koreja, Kitajska) in med Afro-američani. Alelna oblika *CYP2C9*2* se pojavlja med 10-12% belcev in je redka med Afro-američani (<1%). Alelna oblika *CYP2C9*3* je bolj redka in se pojavlja med 6-10% belcev in je skoraj nepoznana med Afro-američani (1-3%). Lee je s sodelavci leta 2002 ugotovil, da se alelni obliki *CYP2C9*2* in *3, odgovorni za fenotip slabih metabolizatorjev (PM), pojavljata pri skoraj 35% belcev, Herman D. pa je s sodelavci ugotovil, da se ti dve alelni obliki pojavljata pri 31% Slovencev, medtem ko je pogostnost homozigotov relativno majhna v populaciji belcev (1-2%) in tudi med Slovenci, ki je okoli 5% (19,20). Raziskave v Italiji so pokazale, da je pogostnost alela *1 pri približno 80% populacije, alela *2 pri približno 11% in alela *3 pri 3,9%, medtem ko je bila pogostost mutiranih alelov večja v populaciji španskih prebivalcev z deležem 14,2% za alel *2 in 16,2% za alel *3 (21).

1.2.1.1.2.1. Vloga encima CYP2C9 v metabolizmu varfarina

Zgoraj navedeni genski polimorfizmi *CYP2C9*, ki se lahko pojavijo bodisi v homozigotni ali heterozigotni obliki, imajo na metabolizem varfarina različen učinek v primerjavi z močnimi metabolizatorji - normalni homozigoti. Raziskave so pokazale, da tisti, ki so normalni homozigoti presnavljajo varfarin normalno, medtem ko je pri funkcionalno defektnih

homozigotih *CYP2C9**2 presnova varfarina zmanjšana za 30-50% in pri obliki *CYP2C9**3 za 80-90% (22). To pomeni, da se bo pri pacientih, ki so nosilci alelnih oblik in slabše presnavljajo varfarin, le ta dlje časa zadrževal v krvnem obtoku in bodo potrebni manjši odmerki zdravila za doseganje terapevtskega učinka. Tako so pri nosilcih alelne oblike *2 potrebni 17-19% nižji odmerki varfarina, pri nosilcih vsaj ene alelne oblike *3 (heterozigoti -*1*3) pa so dnevni odmerki varfarina nižji za 33-37%. Klinični učinek fenotipa slabih metabolizatorjev (posebno alela *3 in kombinacije *2*3) se kaže v podaljšanem INR in v daljšem času za doseg ustreznega terapevtskega odmerka, z značilno nižjim vzdrževalnim odmerkom in povečanim tveganjem za krvavitve (18-19). Raziskava Lindha je pokazala, da je bila že v prvem tednu terapije med nosilci alelnih oblik vrednost INR nad terapevtskim intervalom, torej >3. Tako so imeli nosilci alela *3 šestkrat večjo verjetnost in nosilci alela *2 trikrat večjo verjetnost, da bodo njihove vrednosti INR višje od zgornje meje terapevtskega intervala (INR>3) v primerjavi z divjim tipom, že v prvem tednu uvajanja varfarina. Incidenca za INR >3 pri nosilcih *3 alelne oblike je bila 2,2 krat in incidenca za INR pri nosilcih *2 alelne oblike 1,8 krat večja v primerjavi z nosilci divjega tipa v obdobju treh tednov od uvedbe terapije. Po tretjem tednu pa so imeli tako nosilci alelne oblike *2 kot nosilci alelne oblike *3 isto incidenco INR >3 kot nosilci divjega tipa (22). Prav tako lahko prisotnost alelnih oblik, bodisi v homozigotni ali heterozigotni obliki (*CYP2C9* *1/*3, *2/*2, *2/*3, *3/*3) pri nekaterih pacientih, vpliva na podaljšanje časa, ko se vzpostavi optimalni INR v okviru priporočenih odmerkov glede na gensko obliko. Navedene raziskave kažejo na to, da je spremljanje farmakogenetičnega učinka *CYP2C9* najpomembnejše v začetni fazi uvajanja terapije, medtem ko se kasneje ta učinek izgubi zaradi spremljanja INR, kliničnih parametrov in rednega prilagajanja odmerka zdravila (23,24).

1.2.1.1.3. Encim *VKORC1*

Tarčno mesto delovanja peroralnih antikoagulantov je encim vitamin K odvisna epoksid reduktaza, podenota 1. To je multiproteinski kompleks, ki reciklira vitamin K_{2,3}-epoksid v reducirano obliko vitamina K hidrokinon, ki je esencialni kofaktor za posttranslacijsko gama karboksilacijo aktivnih faktorjev koagulacije (faktor II, VII, IX in X). Varfarin svoj antikoagulantni učinek doseže z inhibicijo encima vitamin K epoksid reduktaze podenota 1, ki reciklira reducirani vitamin K (inaktiven) v aktivno oksidirano obliko vitamina K in na ta način prepreči ponovno regeneracijo vitamina K, kar pripelje do inhibicije koagulacije. Encim je poznan od leta 1974, vendar je bil šele leta 2004 odkrit celotni gen, ki encim kodira in je lociran

na kromosomu 16p11.2 ter dolg okoli 4kb. Gen so identificirali med posamezniki znotraj družine, ki so bili odporni na varfarin in so potrebovali izrazito visoke dnevne odmerke (17 – 40mg dnevno) za doseganje antikoagulantnega učinka varfarina, nekateri pa se niso niti odzvali na zdravlilo. Reducirani vitamin K je esencialni faktor za γ -glutamilkarboksilazo (GGCX) in je poznano, da imajo pacienti s kongenitalnimi napakami GGCX in *VKORC1* bolezni hemostaze (25). Rieder je s sodelavci identificiral 10 nekodirajočih SNPs s petimi glavnimi SNPs. Nekaj SNPs v polimorfizmu *VKORC1* se v populaciji pojavlja pogosteje in so odgovorni za občutljivost za varfarin in potreben odmerek. Najpogostejša polimorfizma sta polimorfizem 1173C>T ali 6484/rs9934438/ na intronu 1 in polimorfizem na promotorski regiji 1639G>A ali 3673/rs99232321/. Vplivata na interindividualno razliko v odmerku varfarina. Določamo ju z genotipizacijo za identifikacijo haplotipov *VKORC1* (26).

1.2.1.1.3.1. Polimorfizem VKORC1 in vpliv na zdravljenje z varfarinom

Genski polimorfizem vitamin K epoksid reduktaze, podenota 1 (*VKORC1*), katera je ciljno mesto delovanja varfarina, pomembno vpliva na njegovo farmakodinamiko, saj določa od 30-60% variabilnosti potrebnega odmerka vsakega posameznika. Od 10 odkritih SNPs *VKORC1*, so definirani le štirje SNPs, od katerih je najpogostejši -1639G>A. Alelna oblika A vpliva na občutljivost za varfarin in ocenjujejo, da je za vsak mutirani *VKORC1* alel A potrebno 20-28% znižanje odmerka. Tako nosilci normalnega homozigota (GG) zahtevajo večji dnevni odmerek varfarina. Heterozigotni genotip (GA) zahteva srednji odmerek varfarina. Normalni homozigoti so izpostavljeni tveganju preizkega odmerka varfarina in tveganju ponovnih tromboembolijskih dogodkov. Tekom začetne antikoagulacijske faze, so se genetske oblike *VKORC1* pokazale kot glavne determinante občutljivosti za varfarin, kar je še posebej pomembno za rizične paciente. Ugotovljene so tudi razlike v pogostnosti alela *VKORC1* med rasami. Pri belcih je ocenjena pogostnost haplotipa *VKORC1**2 (prisotna je vsaj ena alelna oblika -1639A) predvidoma okoli 42%, pogostnost *VKORC1**3 okoli 38% in pogostnost *VKORC1* *4 se ocenjuje okoli 20% (28,29).

1.2.1.1.4. Raziskave o medsebojnem vplivu genskih polimorfizmov na interindividualno variabilnost pri zdravljenju z varfarinom

Anderson je v svoji raziskavi leta 2007, v kateri je z uporabo posebnih algoritmov za napoved odmerka varfarina navedel, da je največja korist uporabe farmakogenetičnih algoritmov v skupini tistih pacientov (46%), ki so potrebovali pri uvajanju zdravljenja

manj kakor 21 mg varfarina tedensko ali pa več kakor 49 mg varfarina tedensko za dosego stabilnega vzdrževalnega odmerka, manjša korist pa je bila v skupini pacientov, ki so potrebovali povprečne odmerke varfarina. Raziskava je dokazala tudi, da uporaba kliničnih parametrov skupaj z genetskimi, značilno prispeva k učinkovitosti in varnosti uporabe varfarina pri uvajanju zdravljenja (39).

Lindh je v svoji raziskavi dokazal, da so imeli nosilci alela *CYP2C9*3* 6-krat večjo verjetnost in nosilci alela *CYP2C9*2* 3-krat večjo verjetnost, da bi imeli vrednost INR nad terapevtskim intervalom (> 3) v primerjavi z normalnimi homozigoti v prvem tednu uvajanja varfarina (22). Takeuchi v svoji raziskavi navaja, da je največji neodvisen učinek na vzdrževalni odmerek varfarina povezan s polimorizmom *VKORC1* in je okoli 2-3 krat večji v primerjavo s polimorfizmom *CYP2C9* (35). Raziskave drugih encimov, kot je *CYP4F2* in njegovih alelnih sprememb *CYP4F2* V433M so pokazale, da ima tudi ta polimorfizem vlogo v farmakokinetiki varfarina in so nosilci tega polimorfizma potrebovali večje dnevne odmerke varfarina za doseganje ustreznega antikoagulantnega učinka (30). Pomemben del v variabilnosti odmerka varfarina predstavljajo polimorfizmi v genih *CYP4F2*, *CYP2C9* in *VKORC1* skupaj, od teh največ polimorfizem v genu *VKORC1* ($25 \pm 8\%$), nekaj manj polimorfizem v genu *CYP2C9* ($12 \pm 7\%$) in najmanj polimorfizem v genu *CYP4F2* ($3,3 \pm 2,6\%$) (32).

2. NAMEN DELA IN PREDSTAVITEV HIPOTEZ

Zdravljenje z varfarinom je zahtevno zaradi njegovega ozkega terapevtskega območja na eni strani in njegove velike interindividualne variabilnosti na drugi strani. Številne raziskave so potrdile, da polimorfizmi v genih *CYP2C9* in *VKORC1* predstavljajo pomemben delež v variabilnosti odmerka varfarina. Manj raziskan je vpliv enonukleotidnega polimorfizma v *CYP4F2* genu odkritem pozneje.

Namen našega dela je bil ugotoviti vpliv polimorfizma V433M v genu *CYP4F2* na zdravljenje z varfarinom, in sicer:

- ugotoviti pogostnost tega polimorfizma med prebivalci v Sloveniji,
- ugotoviti njegov delež v variabilnosti povprečnega tedenskega odmerka skupaj s polimorfizmi v genih *CYP2C9* in *VKORC1* ter
- ugotoviti vpliv tega polimorfizma na povprečni tedenski odmerek varfarina.

V nadaljevanju smo želeli ugotoviti:

- ali sezonska prehrana in drugi dejavniki tekom leta vplivajo na nihanje INR v celotni populaciji, neodvisno od genotipov in
- ali obstajajo značilne razlike v INR oziroma v odmerjanju varfarina med dvema sezonama, pomladno-poletno in jesensko-zimsko sezono, ki so odvisne od genotipa posameznika.

3. PREISKOVANCI IN UPORABLJENE METODE

3.1 PREISKOVANCI

V raziskavo smo vključili 238 preiskovancev, ki so redno prihajali v antikoagulantno ambulanto v ZD Velenje na kontrolo INR. V diagnostičnem laboratoriju ZD Velenje določamo vrednost INR iz plazme venske krvi. Preiskovance smo ob odvzemu krvi za redno kontrolo INR vprašali o njihovi volji sodelovanja v raziskavi. Vsi, ki so se strinjali, da njihov vzorec krvi po določitvi INR naprej uporabimo v raziskovalne namene, so podpisali informirani pristanek (Priloga) za uporabo biološkega vzorca. Raziskava je bila odobrena s strani etične komisije (Številka dovoljenja: 23p/10/11). Preko telefona smo jih izprašali o kadilskem statusu, o morebitnih boleznih jeter, o tem, ali jemljejo zdravila za uravnavanje srčnega utripa (amiodaron), statine za zniževanje holesterola, antimikotike (azole) in sulfonamidne antibiotike. Vse podatke o preiskovancih smo zbrali iz laboratorijskega informacijskega sistema, antikoagulantnega programa Trombo in v osebnih telefonskih intervjujih. Iz raziskave smo izključili 39 preiskovancev, za katere smo v intervjuju izvedeli, da jemljejo bodisi statine bodisi amiodaron. Izključili smo tudi enega preiskovanca, pri katerem je bila neuspešna genotipizacije za tri različne polimorfizme. Sklepali smo, da je bila to posledica neuspešne izolacije DNA. Tako smo v raziskavo vključili 198 preiskovancev. Od tega je bilo 87 moških in 111 žensk. Vsi skupaj so bili v povprečju stari 72 let, težki okoli 78 kilogramov in visoki 167,6 cm. Najpogosteje so se z varfarinom zdravili zaradi atrijske fibrilacije.

3.2 IZOLACIJA DNA

Vzorci venske krvi, ki smo jih odvzeli preiskovancem za določitev INR, smo po preiskavi hranili v zaprtih epruveh en teden v hladilniku, nato pa smo jih zamrznili. Zamrznjene smo v inkubatorju na 37°C na hitro odtalili. Tekom odtajanja smo jih trikrat premešali. Odtaljene smo prenesli v ledeno kopel, kjer so počakali le toliko časa, da smo pripravili centrifugirke s pufrom za razgradnjo eritrocitov. Postopek izolacije DNA smo z majhnimi spremembami izvedli po navodilih proizvajalca, katerega komplet za izolacijo DNA smo uporabljali (DNA Isolation Kit for Mammalian Blood, proizvajalca Roche). Spremembe so bile sledeče: izpustili smo korak, ko naj bi suspenziji razgrajenih levkocitov dodali RNaze, saj nadaljnji postopek od nas ni zahteval izolacije čiste DNA brez morebitnih ostankov RNA. Po dodatku raztopine za obarjanje proteinov smo precipitat centrifugirali na 8.500xg 10 minut (proizvajalec navaja 12.000xg 10

minut), saj smo že na teh obratih dosegli nastanek dovolj čvrste proteinske peletke, da smo jih lahko ločili od supernatanta. DNA smo po obarjanju sušili na zraku približno 5 minut. Poleg proizvajalčevih reagentov, ki so v setu smo potrebovali še 100% etanol, 70% etanol, ki je bil ohlajen na -20°C in TE pufer, pH 8.0.

3.2.1 Ocena količine in čistote DNA

Molekule nukleinskih kislin absorbirajo ultravijolično svetlobo pri 260 nm predvsem zaradi heterocikličnih baz, kot njihov sestavni del. Zaradi tega smo lahko s spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 260 nm določili količino DNA. Čistoto DNA pa smo lahko določili z razmerjem absorbanc izmerjenih pri 260 nm in 280 nm (A_{260} / A_{280}), pri čemer zadnja odraža prisotnost aromatičnih aminokislin in proteinov. Vrednost višja kakor 1,8 (1,7-1,9) kaže na minimalno kontaminacijo vzorca s proteini (33). Za merjenje absorbanc pri omenjenih valovnih dolžinah smo uporabili spektrofotometer Nanodrop ND-1000.

3.2.2 Redčenje osnovne raztopine DNA

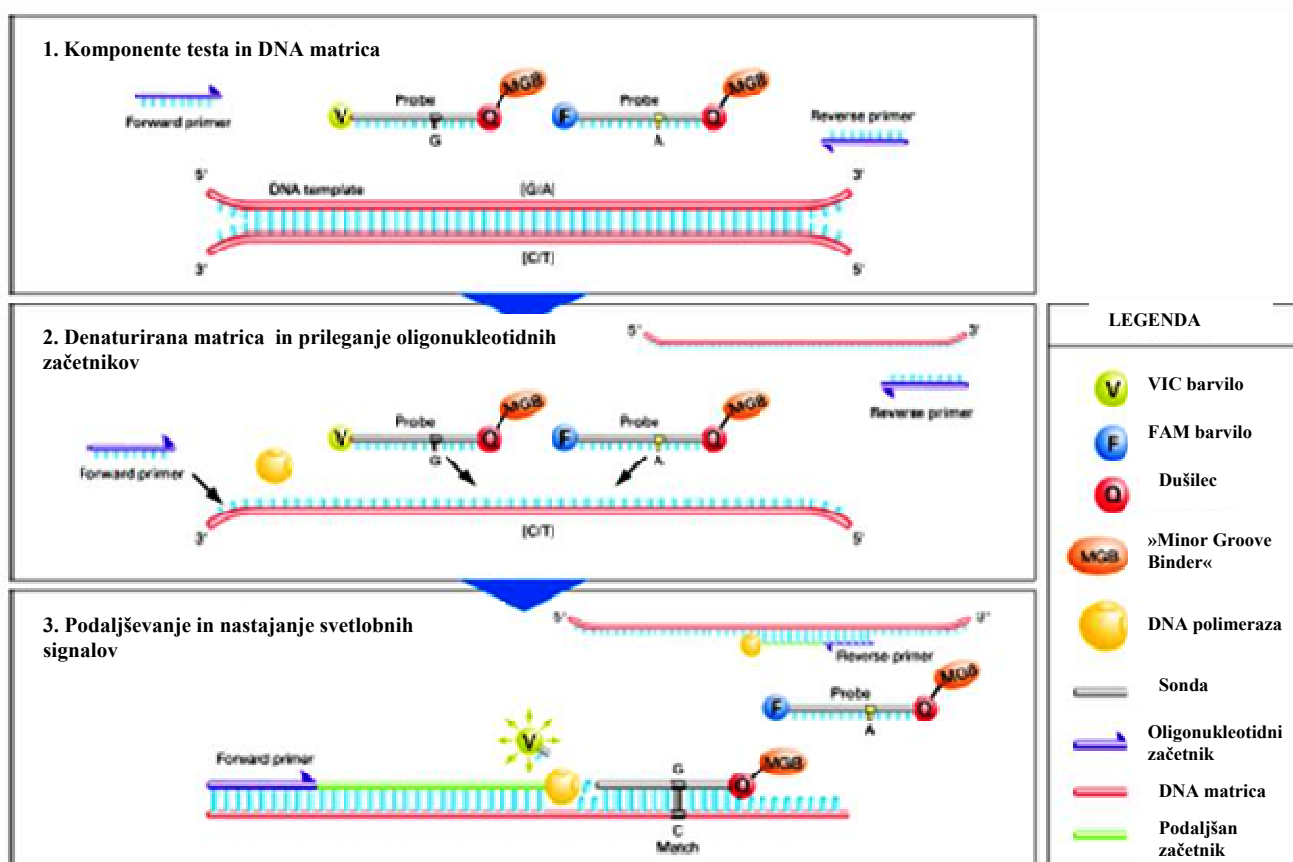
Za izvedbo genotipizacije smo potrebovali vzorce (delovne raztopine) s koncentracijami do 15ng/μl, zato smo osnovne raztopine z višjimi koncentracijami DNA redčili. Pri tem smo uporabili avtoklavirano ultra čisto vodo. Ustrezne redčitve s končnim volumnom vzorca, ki je bil 50 μl, smo pripravili na mikrotitrne plošče.

3.3 GENOTIPIZACIJA Z METODO ALELNE DISKRIMINACIJE S HIDROLIZIRAJOČIMI SONDAMI

Enonukleotidne polimorfizme (SNPs - *single nucleotide polymorphisms*) smo določali z uporabo tehnike alelne diskriminacije. Genotipizacijski sistem v tem primeru predstavlja homogeno tehnologijo, ki temelji na merjenju fluorescence na koncu postopka PCR reakcije. Od tod tudi ime »*Endpoint Genotyping*« ali genotipizacija na koncu. Gre za kompetitivno specifično ločevanje alelov s postopkom PCR v realnem času. Izvajali smo jo s hidrolizirajočimi sondami, s katerimi smo ugotavljali prisotnost oziroma odsotnost mutacije v naših proučevanih genih.

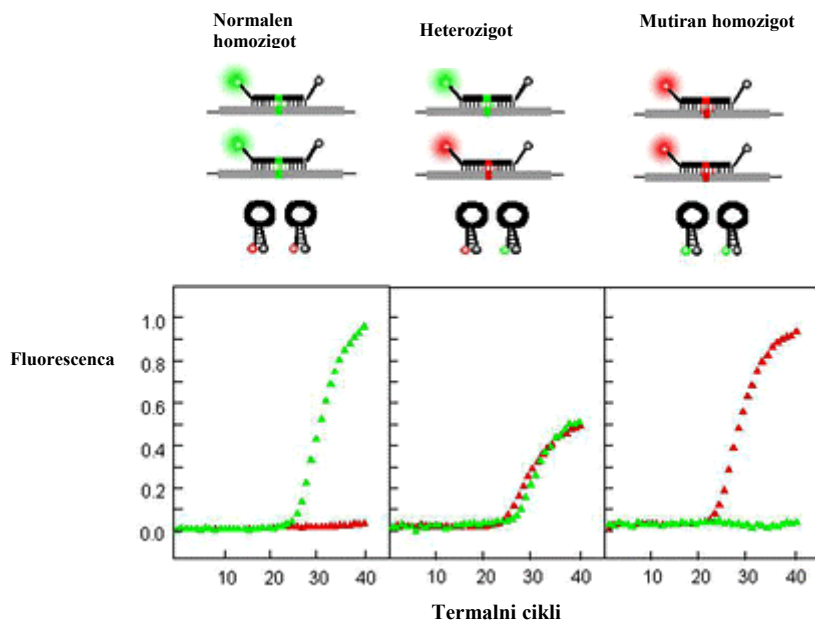
Princip genotipizacije s hidrolizirajočimi sondami temelji na popolnem prileganju sonde označene z barvilom VIC na normalno zaporedje tarčne DNA oziroma na popolnem prileganju druge sonde mutiranemu zaporedju, ki pa je bila označena z barvilom FAM. Vsaka sonda ima poleg svojega barvila vezan tudi dušilec. Zaradi prisotnosti dušilca intaktna sonda ne

fluorescira. Tekom sinteze DNA v postopku PCR povzroči 5'-eksonukleazna aktivnost DNA-polimeraze, hidrolizo sonde. Sonda pri tem razpade in razdalja med fluoroforom in dušilcem se poveča ter tako onemogoči prestrezanje fluorescence barvila VIC ali FAM z dušilcem. Pojavi se fluorescenca, ki jo izmerimo. Če izmerimo samo fluorescenco barvila VIC je preiskovanec homozigot za normalno zaporedje (X), če se pojavi samo fluorescenca FAM je preiskovanec homozigot za mutirano zaporedje (Y), če pa porasteta fluorescenci obeh barvil, je bolnik heterozigot (XY).



Slika 5: Specifičnost hidrolizirajočih sond

Analizator izmeri fluorescenco na koncu postopka PCR reakcije, iz katere nato avtomatično izračuna vrednosti fluorescence na koncu postopka (EPF – *Endpoint fluorescence*). Te vrednosti omogočajo razvrstitev vzorcev v skupine glede na porast fluorescence VIC, FAM ali VIC in FAM (Slika 6).



Slika 6: Rast fluorescence posameznega barvila glede na alelno obliko

3.3.1. Postopek genotipizacije polimorfizmov v genih *CYP4F2*, *CYP2C9*, *VKORC1*

Za vsak vzorec, smo izvedli štiri genotipizacije in jim tako določili alelne oblike za naše proučevane gene. Vzoredno smo analizirali alela *CYP2C9**2 in *CYP2C9**3 ter alelne oblike v genih *CYP4F2* in *VKORC1*. Reakcije smo izvajali na čim večjih serijah vzorcev, saj nam je večja skupina vzorcev omogočala lažje vrednotenje rezultatov iz grafov glede na velike skupine za posamezne alelne oblike. Ko smo pripravili reakcijsko mešanico (Preglednica I) z oligonukleotidnimi začetniki, specifičnimi za posamezno genotipizacijo alelne oblike, s sondami in ultra čisto vodo, količinsko glede na število vzorcev, ki smo jih v seriji analizirali, smo le to z reverznim pipetiranjem nanesli na mikrotitrsko ploščo. Nato smo z multikanalno pipeto previdno nanesli še vzorce z ustrežno koncentracijo raztopljene DNA, glede na, v naprej pripravljeno tabelo z identifikacijskimi številkami vsakega vzorca. V posamezne luknjice smo nanesli še kontrolno raztopino DNA z znano alelno obliko in ultračisto vodo kot negativno kontrolo (NTC – *nontemplate control*). Ploščico smo prekrili z lepljivo folijo, jo 2 minuti centrifugirali pri 1900 obratih in vstavili v analizator. Reakcijo PCR smo izvedli po postopku, opisanem v Preglednici III.

Za izvajanje genotipizacije smo potrebovali:

opremo:

- analizator LightCycler® 1536 Real-Time PCR System (Roche),
- program *LightCycler® 1536 Endpoint Genotyping Analysis Tool* (Roche),

- Centrifugo: CENTRIC 322A (Tehtnica),

kemikalije:

- reagenčne komplete oligonukleotidnih začetnikov in sond za vse štiri polimorfizme (Preglednica I),
- pripravljena reakcijska mešanica ustreznega pufra, encima DNA polimeraza, deoksi(ribo)nukleozid trifosfatov (dNTP-jev) skupaj z dTTP-ji in magnezijevih ionov (5x HOT FIREPol® Probe qPCR Mix Plus (no ROX) (proizvajalca SolisDyne),
- kontrolne raztopine DNA z znanimi genotipi (Preglednica IV).

Preglednica I: Reagenčni kompleti oligonukleotidnih začetnikov in sond

Polimorfizem	Reagenčni komplet
<i>CYP4F2</i> polimorfizem rs2108622	TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 20X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo) C_16179493_40*
<i>CYP2C9*3</i> polimorfizem rs1057910	TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 20X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo) C_27104892_10*
<i>CYP2C9*2</i> polimorfizem rs1799853	TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 20X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo) C_25625805_10*
<i>VKORC1</i> polimorfizem rs9923231	TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix 20X (alelno specifična mešanica za genotipizacijo) C_30403261_20*

*20 X konc. začetnikov in sond, proizvajalca AB Applied Biosystems

V Preglednici II so navedene sestavine in volumen posamezne sestavine za pripravo reakcijske zmesi z optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov katere končni volumen je 5 µl.

Preglednica II: Sestava reakcijske zmesi

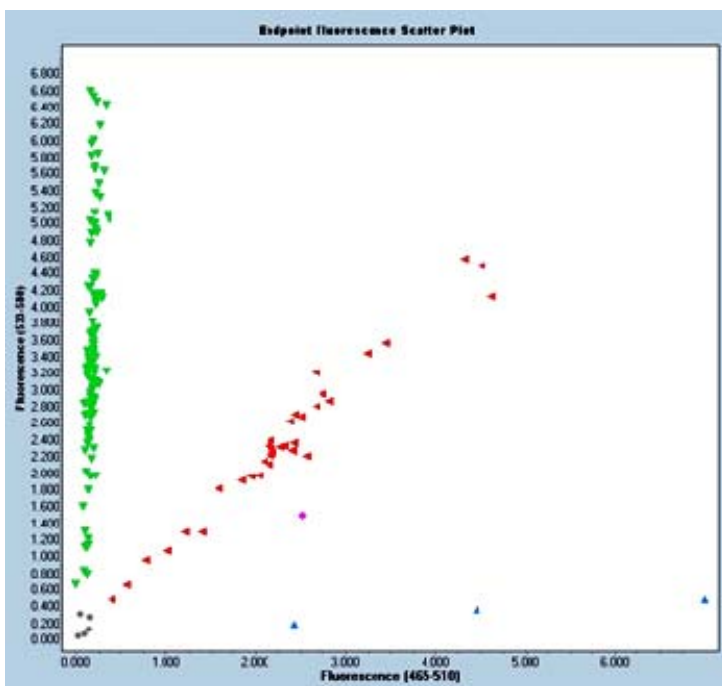
Sestavina	Volumen (µl)
Pripravljena reakcijska mešanica (SolisDyne) 5x	1,0
Komplet začetnikov in sond (AppliedBiosystems) 20x	0,125
Ultra čista H ₂ O	2,875
DNA (15ng/µl)	1
	5

Pogoji, ki smo jih nastavili na analizatorju in so nam omogočali optimalen PCR postopek za izvedbo genotipizacije z uporabo tehnike alelna diskriminacije so navedeni v Preglednici III.

Preglednica III: Pogoji reakcije PCR

Korak	T (°C)	Čas	Število ciklov
Pre-inkubacija	95	15min	1
Pomnoževanje	95	15s	50
	60	1h30min	
Ohlajanje	40	30s	1

Po končani analizi in izračunanih vrednostih fluorescence na koncu PCR postopka, smo dobili rezultate v obliki grafa (Slika 7) ali tabele (Slika 8). Večja kot je bila skupina, lažje in bolj jasno smo določili alelne oblike in ločili normalne homozigote od heterozigotov in mutiranih homozigotov. Vzorce, katerih fluorescenca na koncu PCR reakcije je bila manjša od 1,000, smo ponovili, saj določitev alelnih oblik za te vzorce, zaradi tako nizke fluorescence na koncu reakcije, ni bila zanesljiva. Iz grafa na sliki št. 8 lahko vidimo, da je v skupini vzorcev, obarvanih z zeleno barvo narasla le fluorescenca VIC (533-580), kar predstavlja skupino normalnih homozigotov (alela*1*1), v skupini vzorcev obarvanih z rdečo je narasla tako fluorescenca VIC kakor FAM, kar predstavlja skupino heterozigotov (alela *1*2) in v skupini (le nekaj posameznih vzorcev) vzorcev, obarvanih z modro je narasla le fluorescenca FAM (465-510), kar predstavlja skupino mutiranih homozigotov (alela *2*2). Z vijolično barvo analizator označi tiste vzorce, ki jih glede na svoj program ni znal opredeliti. S sivo barvo pa so označeni vzorci, katerih fluorescenca je bila prenizka in veljajo za negativne.



Slika 7: Rezultati genotipizacije posameznega genotipa (*CYP2C9*2*) v obliki grafa

Results							
Inc	Pos.	Sample Name	Endpoint Fluorescence		Call	Score	Status
			Allele X	Allele Y			
☒	K15	26189	0.15	2.82	Allele Y	1.00	
☒	K16	5104	0.10	1.10	Allele Y	0.92	
☒	K17	6367	0.16	0.25	Negative		
☒	K18	27589	0.17	1.96	Allele Y	0.94	
☒	K19	27376	0.19	3.80	Allele Y	1.00	
☒	K20	KONT1	0.13	3.28	Allele Y	0.98	
☒	M1	27724	0.21	1.96	Allele Y	0.91	
☒	M2	6123	2.17	2.29	Both Alleles	0.98	
☒	M3	6666	4.62	4.12	Both Alleles	0.89	
☒	M4	26307	0.20	4.14	Allele Y	0.99	
☒	M5	27854	0.22	4.15	Allele Y	1.00	
☒	M6	26053	4.31	4.58	Both Alleles	0.97	
☒	M7	6115	2.68	2.81	Both Alleles	0.99	
☒	M8	26734	4.46	0.36	Allele X	0.99	
☒	M9	7215	0.19	2.91	Allele Y	0.98	
☒	M10	26305	0.16	4.23	Allele Y	0.98	
☒	M11	27239	0.20	5.69	Allele Y	0.98	
☒	M12	26309	0.19	5.99	Allele Y	0.97	
☒	M13	25040	0.15	2.38	Allele Y	0.98	
☒	M14	25955	0.14	2.70	Allele Y	1.00	
☒	M15	26256	0.21	3.71	Allele Y	0.99	
☒	M16	26031	2.28	2.31	Both Alleles	0.99	
☒	M17	5090	0.14	1.20	Allele Y	0.89	
☒	M18	25573	0.22	4.92	Allele Y	0.99	
☒	M19	25547	2.44	2.70	Both Alleles	0.94	
☒	M20	KONT2	1.59	1.81	Both Alleles	0.92	

Slika 8: Rezultati genotipizacije posameznega genotipa (*CYP2C9*2*) v obliki tabele

Pri vrednotenju rezultatov genotipizacije smo si pomagali s kontrolnimi raztopinami DNA z znanimi alelnimi oblikami (Preglednica IV). Alelne oblike genov, ki smo jih določili za vsak posamezni vzorec, smo združili in vzorcem določili genotipe (Priloga 2).

Preglednica IV: Kontrolne raztopine DNA z znanimi genotipi

GENOTIP	Normalen homozigot (X)	Heterozigot (Y)	Mutiran homozigot (XY)
<i>CYP4F2</i>	NA17252	NA16688	NA17247
<i>CYP2C9*2</i>	NA07348	NA10835	NA10854
<i>CYP2C9*3</i>	NA10835	NA10855	NA17247
<i>VKORCI</i>	NA10848	NA10850	NA10831

vse proizvajalca Coriell Cell Repositories

3.4. STATISTIČNA ANALIZA

S statističnimi analizami smo ugotavljali pogostost alelov v naši populaciji in ugotavljali skladnost s Hardy-Weinbergovim ravnotežjem (HWE).

Za statistično obdelavo smo uporabili program »SPSS Statistics«. Pred začetkom analize smo vselej preverili ali se spremenljivka porazdeljuje normalno ali ne s Kolmogorov-Smirnov testom. Če je bil $p > 0,05$ smo privzeli ničelno hipotezo, podatki so normalno porazdeljeni. Za podatke, ki so se porazdeljevali normalno, smo v nadaljevanju uporabili parametrične teste. Podatke, katerih porazdelitev pa ni bila normalna, smo korenili in v primeru normalne porazdelitve korenjenih vrednosti nadaljevali statistično obdelavo s parametričnimi testi. Tiste podatke, ki niso bili porazdeljeni normalno tudi po korenjenju, smo statistično obdelali z neparametričnimi testi. Uporabili smo ANOVA test, test Linearne regresije, Kruskal-Walis test, Mann-Whitney test in Wilcoxonov test.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. PREISKOVANA SKUPINA

V raziskavo za določitev genotipov smo vključili 198 preiskovancev, ki so bili na redni terapiji z varfarinom. Od tega je bilo 87 moških in 111 žensk. Stari so bili od 60 do 84 let, njihova teža je v povprečju znašala okoli 78 kilogramov, višina pa 167,6 cm. Najpogosteje so se z varfarinom zdravili zaradi atrijske fibrilacije (74,2%), venske tromboze (22%), pljučne embolije (11%), umetne srčne zaklopke (12%) in drugih bolezni (6%). Vključitveni kriteriji so bili vrednost INR med 2 in 3, uravnano zdravljenje z antikoagulantom – vzdrževalni odmerek varfarina, to je obdobje, ko sta bili vsaj dve zaporedni meritvi INR v razmiku enega tedna znotraj terapevtskega območja 2-3, da niso jemali statinov in drugih zdravil kot so amiodaron, azoli ali sulfonamidni antibiotiki in niso imeli bolezni jeter. Kadilski status smo izključili iz vključitvenih kriterijev, saj je bilo le nekaj posameznikov kadilcev (n=5). Povprečni tedenski odmerek za posameznega preiskovanca smo določili tako, da smo izračunali povprečni tedenski odmerek, ki ga je preiskovanec jemal v obdobju, ko je imel vsaj dve zaporedni meritvi INR znotraj terapevtskega intervala 2-3. 87 preiskovancem smo lahko za izračun izbrali zimske mesece (november, december, januar in februar), ostalim pa druge mesece glede na uravnanost zdravljenja.

Vsem preiskovancem smo za leto 2011 za vseh 12 mesecev izračunali povprečne vrednosti INR in povprečne tedenske odmerke varfarina. Vsi zbrani podatki so prikazani v Prilogi.

Opis preiskovane skupine je zajet v Preglednici V.

Preglednica V: Opis preiskovane skupine

	Frekvenca	
	Število	Delež
Spol		
- moški	87	43,9%
- ženski	111	56,1%
Starost	72,3*	12,1**
Teža (kg)	77,8*	13,2**
Višina (cm)	167,6*	7,5**
Indikacija		
- Venska tromboza	22	11,1%
- Atrijska fibrilacija	147	74,2%
- Pljučna embolija	11	5,6%
- Umetna srčna zaklopka	12	6,1%
- Druge arterijske, koronarne bolezni in bolezni srca	6	3%

***povprečje; **standardna deviacija**

4.2. GENOTIPIZACIJA

4.2.1. Pogostnost proučevanih genotipov

Z določanjem pogostnosti proučevanih genov smo želeli ugotoviti število posameznikov s proučevanimi genotipi med Slovenci in jih primerjati s pogostnostmi istih genotipov v drugih državah. Predvsem so nas zanimale pogostnosti proučevanih polimorfizmov v genu *CYP4F2* in v genu *VKORC1* med Slovenci, ki še niso bile raziskane. Najprej smo za vsak vzorec z genotipizacijo določili alelne oblike genov *CYP4F2* *1 in *3, *CYP2C9* *1, *2 in *3 ter *VKORC1* G in A. Glede na alelno obliko posameznih genov, smo jim določili genotip (Priloga 3). Pri šestih od 198 preiskovancev genotipizacija polimorfizma v genu *CYP4F2* ni bila uspešna. Genotipizacije za gena *CYP2C9* in *VKORC1* smo uspešno naredili za vseh 198 preiskovancev. Vsi rezultati, število in odstotek preiskovancev za posamezni genotip, so navedeni v Preglednici VI.

Preglednica VI: Pogostnost genotipov za *CYP4F2*, *CYP2C9* in *VKORC1*, n (%)

GEN	GENOTIP	VSI PREISKOVANCI (n=198)**	% preiskovancev*
<i>CYP4F2</i>	*1*1 (normalen homozigot)	110	56
	*1*3 (heterozigot)	76	38
	*3*3 (mutiran homozigot)	6	3
<i>CYP2C9</i>	*1*1 (normalen homozigot)	135	68
	*1*2 (heterozigot)	33	17
	*1*3 (heterozigot)	19	9
	*2*2 (mutiran homozigot)	3	2
	*2*3 (mutiran homozigot)	6	3
	*3*3 (mutiran homozigot)	2	1
<i>VKORC1</i>	-1639 G/G (normalen homozigot)	61	31
	-1639 G/A (heterozigot)	95	48
	-1639 A/A (mutiran homozigot)	42	21

*glede na posamezni gen oziroma genotip

**število vseh preiskovancev za gen *CYP4F2* je 192 (n=192)

ANOVA

Med Slovenci je za gena *CYP4F2* in *CYP2C9* največ normalnih homozigotov (za *CYP4F2* 56% in za *CYP2C9* 68%), medtem ko je za gen *VKORC1* največ heterozigotov. Največ mutiranih homozigotov smo določili za gen *VKORC1* (21%), medtem ko je mutiranih homozigotov za gena *CYP4F2* in *CYP2C9* malo (za *CYP4F2* 3% in za *CYP2C9* 6%). Normalnih homozigotov za gen *CYP4F2*, ki smo jih določili v naši raziskavi, je več (56%), kakor v raziskavi, izvedeni v Italiji, kjer so določili 44% normalnih homozigotov (32) ali v ameriški raziskavi, kjer so določili 50% normalnih homozigotov (30). Število posameznih proučevanih polimorfizmov v genu *CYP2C9*, je primerljivo z rezultati, ki so jih predstavili v raziskavi, izvedeni v Sloveniji (35). Določili so 63% normalnih homozigotov, 31% heterozigotov in 6% mutiranih homozigotov. Prav tako so pogostnosti genotipov, ki smo jih določili za gen *CYP2C9* primerljive s pogostnostmi genotipov, ki so jih za ta gen določili drugje po svetu (11). Pogostnost polimorfizmov -1639 G>A v genu *VKORC1* je prav tako primerljiva s pogostnostmi teh genotipov, ki so jih določili med prebivalci Italije (32). Objavljeni podatki o pogostnosti genotipov za ta gen med Kavkazijci so 14% AA, 47% AG in 39% GG in se ujemajo z našimi rezultati (40). Zaključimo lahko, da se naše pogostnosti genotipov ujemajo s podatki iz literature in so primerljive s podatki za kavkazijsko raso. Ker se naši rezultati potrjujejo z rezultati domačih in mednarodnih raziskav, lahko sklepamo na pravilnost postopka

genotipizacije in zaupamo pogostnostim, ki smo jih določili za genotipe, ki v slovenski populaciji še niso bili proučevani.

4.2.2. *Hardey-Weinbergova porazdelitev*

Pogostnost vseh alelov smo primerjali s teoretično (izračunano) pogostnostjo alelov po HW porazdelitvi. Na ta način se ocenjuje spremembe pogostnosti alelov med generacijami. Pri človeku teh sprememb praktično ni, saj ohranjanje HWE sloni na naslednjih lastnostih populacije:

- v populaciji ne sme biti mutacij, da se ne pojavijo novi aleli;
- ni prehoda genov oziroma migracij posameznikov iz ali v populacijo;
- parjenje vseh posameznikov je naključno in vsi posamezniki imajo enako število potomcev;
- populacija mora biti velika, da sprememba gena ne povzroča spremembe frekvence alelov;
- ni prisotne naravne selekcije, da se ne nakopiči samo en alel.

Vsi ti dejavniki vplivajo na populacijo skozi evolucijo tako, da danes enačba praktično omogoča odkrivanje napak pri vzorčenju ali analizne napake. Na to pomislimo v primerih, ko pogostnost v preiskovani skupini alelov ni v HWE. V pripravljeno enačbo smo vnesli število preiskovancev z določeno alelno obliko (normalni homozigoti, heterozigoti, mutirani homozigoti) in pri primerjavi s teoretično HWE pogostnostjo genotipov izračunali vrednost p . Če je bil p večji od 0,05, razlika med našo in teoretično HWE porazdelitvijo genotipov ni bila signifikantna in zaključili smo lahko, da so naše pogostnosti alelov v HWE ravnotežju (Preglednica VII). P vrednosti za vse genotipe so višje od 0,05 in s tem potrdimo skladnost naših proučevanih genov s HWE za vse genotipe, ki smo jih določali, kar pomeni, da predstavlja naš izbor vzorcev naključen vzorec populacije in je zato reprezentativen.

Preglednica VII: Pogostnosti alelov v HWE ravnotežju

GEN	GENOTIP	Ugotovljena pogostnost	Pričakovana pogostnost
CYP4F2	*1*1 (normalen homozigot)	110	114,1
	*1*3 (heterozigot)	76	67,8
	*3*3 (mutiran homozigot)	6	10,1
X² test p vrednost:		0,133401	
CYP2C9*2	*1*1 (normalen homozigot)	149	147,6
	*1*2 (heterozigot)	36	38,9
	*2*2 (mutiran homozigot)	4	2,6
X² test p vrednost:		0,481313	
CYP2C9*3	*1*1 (normalen homozigot)	164	163,0
	*1*3 (heterozigot)	23	25,1
	*3*3 (mutiran homozigot)	2	1
X² test p vrednost:		0,528189	
VKORC1	-1639 G/G (normalen homozigot)	61	59,5
	-1639 G/A (heterozigot)	95	98,1
	-1639 A/A (mutiran homozigot)	42	40,5
X² test p vrednost:		0,736090	

če je p < 0,05, pogostnost alelnih oblik ni v skladu s HWE

4.2.3. Ocena vpliva genetskih dejavnikov na variabilnost povprečnih tedenskih odmerkov varfarina

Delež variabilnosti posameznih genetskih dejavnikov smo določali z namenom, da pokažemo, kako velik vpliv imajo posamezni dejavniki na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina. To smo izračunali s pomočjo statistične obdelave podatkov z multivariabilno linearno regresijo. Pri tem je bila naša odvisna spremenljivka povprečni tedenski odmerek varfarina, ki smo ga določili za posameznega preiskovanca, neodvisne spremenljivke pa so bili z genotipizacijo določene alelske oblike proučevanih genov in dva »negenetska« dejavnika, in sicer telesna masa in starost. Za ostale »negenetske« dejavnike kot so spol, višina in indikacija, smo v predhodni statistični analizi ugotovili, da nimajo statistično značilnega vpliva na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina, zato jih v končno analizo linearne regresije nismo vključili. Te podatke smo pridobili bodisi iz programa Trombo, LIS-a ali pa preko intervjuja. Vse pridobljene podatke smo zbrali v tabelah (Priloga 4) in jih obdelali v statističnem programu SPSS. Ker vrednosti povprečnih tedenskih odmerkov niso bile normalno

porazdeljene, smo jih korenili in s tem omogočili njihovo normalno porazdelitev. Rezultati multivariabilne linearne regresije so zbrani v Preglednici VIII.

Preglednica VIII: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti tedenskega odmerka varfarina

Napovednik	b	SE	statistična značilnost	R ² _{Adj}	Delni R ² _{Adj} %
Konstanta	6,942	0,588	p<0,0001		
CYP4F2*I*3	0,059	0,125	p=0,638	0,000	0,0
CYP4F2*3*3	0,431	0,351	p=0,222	0,001	0,1
CYP2C9*I*2	-0,124	0,166	p=0,458	0,000	0,0
CYP2C9*I*3	-0,492	0,216	p=0,024	0,006	0,6
CYP2C9*2*2, *2*3, *3*3	-1,076	0,246	p<0,0001	0,073	6,7
VKORCI GA	-0,278	0,142	p=0,052	0,104	3,1
VKORCI AA	-1,371	0,172	p<0,0001	0,297	19,3
STAROST (leta)	-0,027	0,005	p<0,0001	0,389	9,2
MASA (kg)	0,009	0,005	p=0,051	0,399	1,0

$$(Odmerek (mg/teden)) = (6,942 + 0,059 \text{ CYP4F2} * I * 3 + 0,431 \text{ CYP4F2} * 3 * 3 - 0,124 \text{ CYP2C9} * I * 2 - 0,585 \text{ CYP2C9} * I * 3 - 1,076 \text{ CYP2C9} * 2 * 2, * 2 * 3, * 3 * 3 - 0,278 \text{ VKORCI GA} - 1,371 \text{ VKORCI AA} - 0,027 \text{ STAROST} + 0,009 \text{ MASA})^2$$

Multivariabilna linearna regresija

Rezultati statistične analize potrjujejo, da model linearne regresije, ki smo ga uporabili, dobro opisuje povezavo med tedenskim odmerkom korenjenih vrednosti in vključenimi neodvisnimi spremenljivkami (p<0,0001). Naši rezultati kažejo, da model opisuje 39,9% delež variabilnosti neodvisnih spremenljivk, od tega so »negenetski« dejavniki (starost, masa) odgovorni za 10% variabilnosti, genetski pa za 30%. V Preglednici VII so navedene vse neodvisne spremenljivke (napovedniki), ki smo jih vključili v model. Vsaka ima tudi svojo p vrednost, ki podaja njeno statistično značilnost, podan je tudi b s standardno napako (SE). Navedeni so po vrstnem redu, kakor smo jih dodajali v model in tako za posamezni napovednik določili pripadajočo vrednost koeficienta determinacije (Adjusted R²). Izračunali smo tudi % delnih R²_{Adj}, za vsako neodvisno spremenljivko posebej.

V Preglednici IX smo za potrditev naredili še »stepwise« model linearne regresije, kjer program iz nabora vseh neodvisnih spremenljivk izbere le tiste, katerih delež variabilnosti je statistično

značilen ($p < 0,05$). Model dobro opisuje povezavo med tedenskim odmerkom (korenjene vrednosti) in vključenimi neodvisnimi spremenljivkami ($p < 0,0001$).

Preglednica IX: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti tedenskega odmerka varfarina

Spremenljivka	b	SE	statistična značilnost	R^2_{Adj}
Konstanta	7,475	0,385	$p < 0,0001$	
<i>VKORC1 AA</i>	-1,267	0,147	$p < 0,0001$	0,214
<i>STAROST</i>	-0,026	0,005	$p < 0,0001$	0,316
<i>CYP2C9*2*2, *2*3, *3*3</i>	-1,083	0,245	$p < 0,0001$	0,372
<i>CYP2C9*1*3</i>	-0,443	0,215	$p = 0,040$	0,383

Odmerek (mg/teden) = $(7,475 - 1,267 \text{ VKORC1 AA} - 0,026 \text{ STAROST} - 1,083 \text{ CYP2C9*2*2, *2*3, *3*3} - 0,443 \text{ CYP2C9*1*3})^2$

Stepwise model multivariabilne linearne regresije

Iz Preglednice IX je razvidno, da imajo izmed genetskih dejavnikov le nosilci genotipov *VKORC1 AA*, *CYP2C9*2*2, *2*3, *3*3* in *CYP2C9*1*3* značilen vpliv na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina. Po drugi strani pa so odmerki varfarina relativno neodvisni od genotipov *VKORC1 GG*, *VKORC1 GA*, *CYP2C9*1*1*, *CYP2C9*1*2* in *CYP4F*1*1*, *CYP4F*1*3*, *CYP4F*3*3*. Izmed »negenetskih« dejavnikov pa je starost tisti dejavnik, ki značilno vpliva na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina.

Ker za celotno skupino preiskovancev nismo mogli določiti povprečnega tedenskega odmerka varfarina v zimskem obdobju, smo se v nadaljevanju statistične obdelave podatkov odločili, da naredimo multivariabilno linearno regresijo na bolj homogeni skupini. V to skupino smo vključili le preiskovance ($n = 87$), katerih povprečni tedenski odmerek smo določili izključno v zimskih mesecih in dobili rezultate podane v Preglednici X.

Preglednica X: Multivariabilna linearna regresija korenjenih vrednosti povprečnega tedenskega odmerka varfarina na izbrani skupini preiskovancev (n=87)

Napovednik	b	SE	statistična značilnost	R ² _{Adj}	Delni R ² _{Adj} %
Konstanta	6,771	0,718	p<0,0001		
<i>CYP4F2</i> *1*3	0,180	0,172	p=0,299	0,000	0,0
<i>CYP4F2</i> *3*3	0,615	0,470	p=0,194	0,017	1,7
<i>CYP2C9</i> *1*2	-0,051	0,250	p=0,838	0,022	0,5
<i>CYP2C9</i> *1*3	-0,912	0,404	p=0,027	0,032	1,0
<i>CYP2C9</i> *2*2,*2*3,*3*3	-1,269	0,338	p<0,0001	0,145	11,3
<i>VKORCI</i> GA	-0,251	0,192	p=0,196	0,157	1,2
<i>VKORCI</i> AA	-1,411	0,247	p<0,0001	0,344	18,7
STAROST (leta)	-0,029	0,007	p<0,0001	0,448	10,4
MASA (kg)	0,012	0,006	p=0,066	0,465	1,7

Multivariabilna linearna regresija

Rezultati statistične analize potrjujejo, da model linearne regresije, ki smo ga uporabili, dobro opisuje povezavo med tedenskim odmerkom korenjenih vrednosti in vključenimi neodvisnimi spremenljivkami (p<0,0001). Rezultati statistične analize, narejene na manjši skupini preiskovancev (n=87) kažejo, da model opisuje 46,5% delež variabilnosti neodvisnih spremenljivk, od tega so »negenetski« dejavniki (starost, telesna masa) odgovorni za 12,1% variabilnosti, genetski pa za 34,4%. V tej manjši skupini smo lahko določili tudi delež variabilnosti za gen *CYP4F2*, ki je 1,7 % za mutiran homozigot (*CYP4F2**3*3). Delež variabilnosti ni statistično značilen, vendar pa je v območju vrednosti, ki so bile določene v različnih raziskavah drugod po svetu ($3,3 \pm 2,6\%$ za *CYP4F2*).

Naši deleži variabilnosti, ki smo jih izračunali za polimorfizme v genih *CYP2C9* (7,3%) in *VKORCI* (22,4%), so nižji od deležev nedavnih raziskav (32, 20), vendar še vedno znotraj mej intervala, ki je bil opredeljen z različnimi tujimi raziskavami ($12 \pm 7\%$ za *CYP2C9*, $25 \pm 8\%$ za *VKORCI*) (32, 35, 36, 37, 38).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizem V433M v genu *CYP4F2*, nima značilnega vpliva na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina.

Ugotovili pa smo velik vpliv proučevanih polimorfizmov v genih *CYP2C9* in *VKORCI*, ki predstavljajo pomembne dejavnike, ki prispevajo k znižanju odmerka varfarina, potrebnega za

doseganje terapevtskega območja. Značilen vpliv na interindividualno variabilnost je imela poleg genetskih dejavnikov tudi starost preiskovancev. Pomembno je upoštevati dokazani vpliv teh genetskih in »negenetskih« dejavnikov na povprečni tedenski odmerek varfarina še posebej ob uvajanju terapije, ko je lahko odmerek varfarina hitro previsok in se s tem zveča tveganje za neželene učinke, ki so posledica previsokih odmerkov zdravila.

4.2.4. Spremljanje povprečnih tedenskih odmerkov varfarina v odvisnosti od proučevanih genov

Ker smo z multivariabilno linearno regresijo določili neznačilen vpliv polimorfizma V433M v genu *CYP4F2* na variabilnost tedenskega odmerka varfarina, smo v nadaljevanju želeli ugotoviti, za koliko se povprečni tedenski odmerki varfarina med posameznimi genotipi tega polimorfizma, torej med heterozigoti, mutiranimi homozigoti in normalnimi homozigoti razlikujejo. Prav tako smo želeli potrditi vpliv genotipov na povprečne tedenske odmerke varfarina za ostale skupine preiskovancev razvrščene glede na genotip in določiti ali so razlike med njimi statistično značilne.

4.2.4.1 CYP4F2

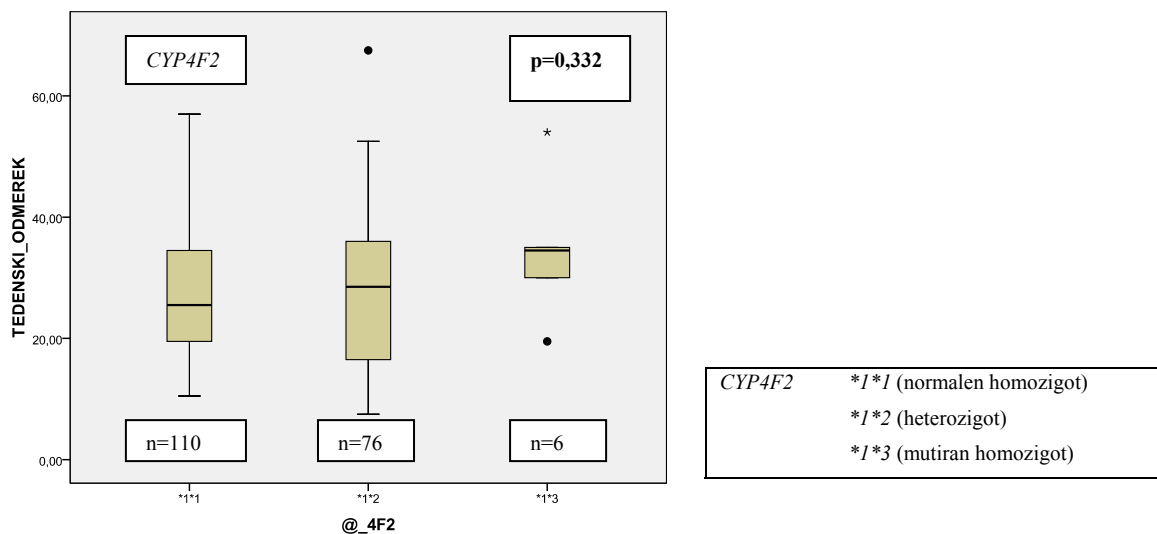
S statistično obdelavo podatkov smo izračunali povprečne tedenske odmerke varfarina za posamezne genotipske podskupine V433M. Skupino preiskovancev z normalnim homozigotom (genotip *CYP4F2*1*1*) smo upoštevali kot referenčno in izračunali odstotek odstopanja povprečnega tedenskega odmerka varfarina za ostali dve skupini, t.j. skupino preiskovancev heterozigotov in skupino preiskovancev mutiranih homozigotov. V preglednici XI vidimo, da je povprečni tedenski odmerek varfarina za 27,5 % višji v skupini mutiranih homozigotov od skupine normalnih homozigotov, kar smo glede na mehanizem delovanja, ki je posledica polimorfizma, pričakovali.

Preglednica XI: Povprečni tedenski odmerki varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na polimorfizem v genu *CYP4F2* in % odstopanja tedenskega odmerka varfarina po posameznih skupinah od skupine preiskovancev z normalnim homozigotnim genom

GEN	GENOTIP	Tedenski odmerek (mg)	% odstopanja
<i>CYP4F2</i>	*1*1	26,5	0
	*1*3	26,7	0,7
	*3*3	33,8	27,5

Ali so razlike povprečnih tedenskih odmerkov varfarina med skupinami z različnimi genotipi statistično značilne smo določili s statističnim programom ANOVA. Iz rezultatov statistične analize smo lahko zaključili, da v povprečnem tedenskem odmerku varfarina ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *CYP4F2**1*1 (26,5 mg), skupino z genotipom *CYP4F2**1*3 (26,7 mg) in skupino z genotipom *CYP4F2* *3*3 (33,8 mg), ($p=0,332$). Kljub temu, da nismo dokazali statistično značilnih razlik med genotipi, pa lahko izračunamo, da je povprečni tedenski odmerek varfarina v skupini z genotipom *CYP4F2**3*3 za 7 mg višji kakor v skupini z genotipom *CYP4F2**1*1, kar se ujema s podatki v raziskavi iz tujine, v kateri so ugotovili, da je razlika v dnevni odmerku varfarina med skupinama genotipov *CYP4F2**1*1 in *CYP4F2**3*3 1 mg/dan (30). Iz spodnjega grafa vidimo, da je povprečni tedenski odmerek varfarina pri heterozigotih malenkost večji kot povprečni tedenski odmerek varfarina pri normalnih homozigotih. Prav tako je povprečni tedenski odmerek varfarina pri mutiranih homozigotih malenkost večji kot povprečni tedenski odmerek varfarina pri heterozigotih. Še večja razlika v povprečnem tedenskem odmerku pa je med normalnimi homozigoti in mutiranimi homozigoti, pri čemer imajo slednji višji povprečni tedenski odmerek varfarina.

Graf 1: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *CYP4F2*



Zaključimo lahko, da razlike v povprečnih tedenskih odmerkih varfarina med genotipi so, vendar so majhne in statistično neznačilne. Njihovo statistično značilnost bi morda lahko dokazali, če bi bila skupina preiskovancev z mutiranim homozigotom številčno večja. Zaradi nizke pogostnosti mutiranih homozigotov, polimorfizem V433M v genu *CYP4F2*, ne predstavlja pomembnega vpliva na variabilnost povprečnega tedenskega odmerka varfarina. Čeprav statistično neznačilno, pa vendar, naši rezultati potrjujejo, da imajo nosilci alelov *CYP4F2* *3 zaradi zmanjšane kapacitete za metabolizem vitamina VK1, zvišane vrednosti vitamina K v jetrih in zato potrebujejo višje odmerke varfarina za doseganje ustreznega antikoagulantnega učinka.

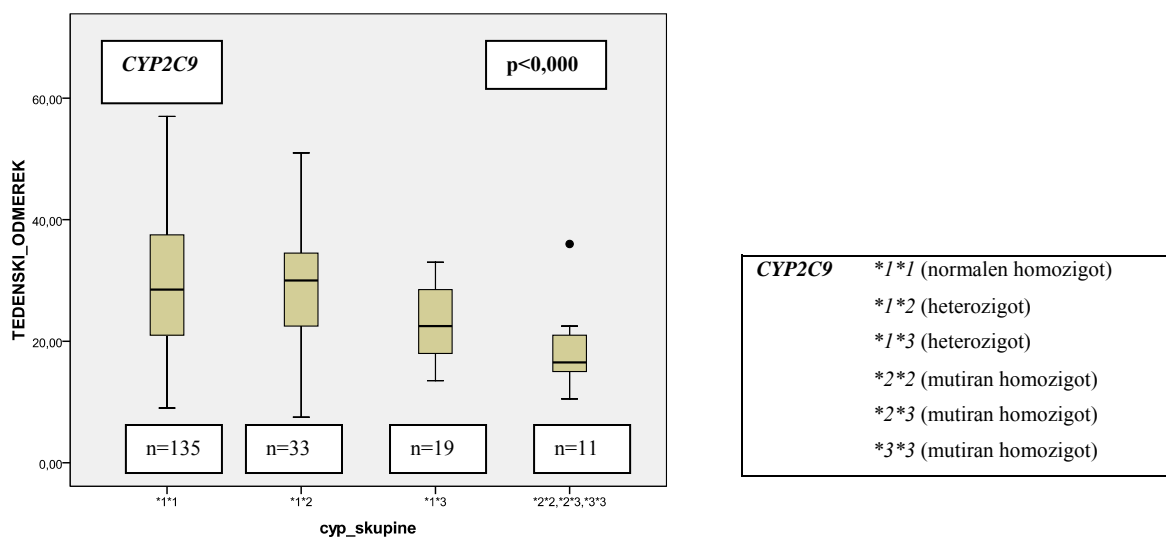
4.2.4.2 *CYP2C9*

Tudi razlike v povprečnih tedenskih odmerkih varfarina med genotipskimi oz. alelskimi podskupinami *CYP2C9* smo določili s statistično analizo ANOVA. Rezultati kažejo, da je razlika v povprečnem tedenskem odmerku varfarina med skupinami preiskovancev, razdeljenih glede na genotip *CYP2C9* statistično značilna ($p < 0,0001$). Povprečni tedenski odmerek varfarina je statistično značilno nižji v skupini z genotipi *CYP2C9**2*2, *CYP2C9**2*3 in *CYP2C9**3*3 (17,3 mg; $p=0,001$) v primerjavi s skupino z nemutiranim genotipom *CYP2C9**1*1 (28,5 mg). Povprečni tedenski odmerek varfarina je statistično značilno nižji v skupini z genotipi *CYP2C9**2*2, *CYP2C9**2*3 in *CYP2C9**3*3 (17,3 mg; $p=0,008$) v primerjavi s skupino z genotipom *CYP2C9**1*2 (27,5 mg). V povprečnem tedenskem odmerku

varfarina ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *CYP2C9**1*2 in skupinama z genotipom *CYP2C9**1*1 ($p=1,000$) ter *CYP2C9**1*3 ($p=0,820$). V povprečnem tedenskem odmerku varfarina ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipi *CYP2C9**2*2, *CYP2C9**2*3 in *CYP2C9**3*3 in skupino z genotipom *CYP2C9**1*3 ($p=0,606$). Naši rezultati so primerljivi z rezultati, ki so jih že objavili v slovenski raziskavi (35) in z rezultati ugotovljenimi v tujini (11). Iz spodnjega grafa vidimo, da sta povprečna tedenska odmerka varfarina pri heterozigotih *1*2 in normalnih homozigotih *1*1 skoraj enaka (3,5% razlika). Večjo razliko lahko vidimo v povprečnem tedenskem odmerku varfarina med heterozigoti *1*3 in normalnimi homozigoti (20%) ali heterozigoti *1*2 (17%). Največja razlika, ki je tudi statistično značilna pa je razlika med normalnimi homozigoti *1*1 in heterozigoti *1*2 na eni strani ter mutiranimi homozigoti *2*2, *2*3, *3*3 na drugi strani (39%).

Zaključimo lahko, da so razlike v povprečnih tedenskih odmerkih varfarina med genotipi gena *CYP2C9* velike in statistično značilne. Heterozigoti z genotipom *CYP2C9**1*3 in vsi mutirani homozigoti pomembno znižajo povprečni tedenski odmerek varfarina (od 5,7 do 11,2 mg/teden).

Graf 2: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *CYP2C9*



Naši rezultati potrjujejo, da so normalni homozigoti močni metabolizatorji in presnavljajo varfarin normalno, medtem ko je pri funkcionalno defektnih homozigotih in heterozigotih presnova varfarina zmanjšana. To pomeni, da se bo pri pacientih, ki so nosilci alelnih oblik, ki slabše presnavljajo varfarin, le ta dlje časa zadrževal v krvnem obtoku in bodo potrebni manjši odmerki zdravila za doseganje terapevtskega učinka. Klinični učinek fenotipa slabih

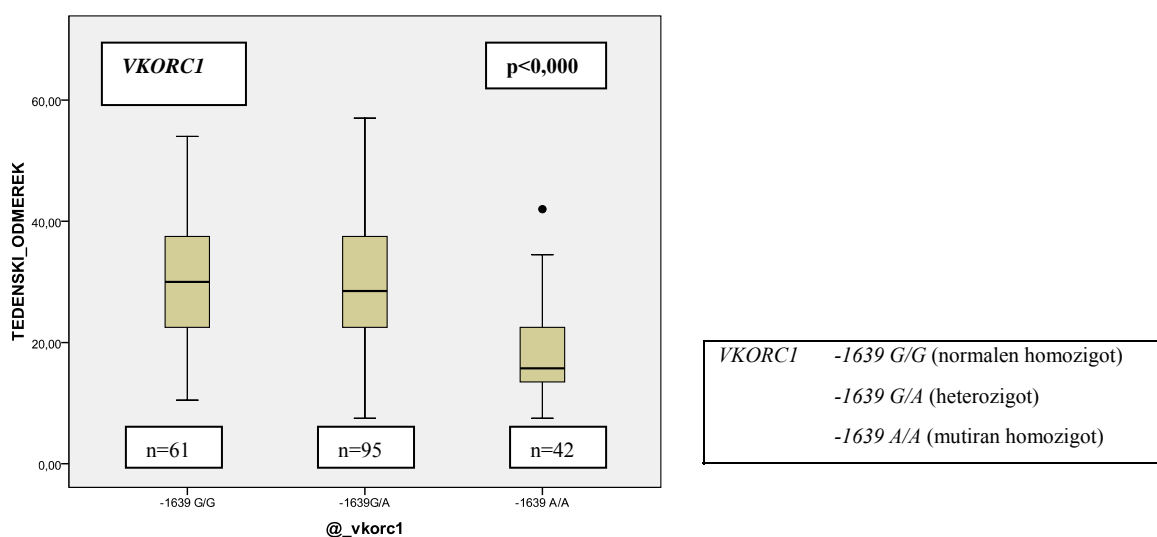
metabolizatorjev se kaže z značilno nižjim vzdrževalnim odmerkom in povečanim tveganjem za krvavitve.

4.2.4.3. *VKORCI*

Razlike v povprečnih tedenskih odmerkih varfarina med genotipskimi podskupinami polimorfizma 1639 G>A v genu *VKORCI* smo določili s statističnim programom ANOVA. Rezultati statistične analize kažejo, da obstaja statistično značilna razlika v povprečnem tedenskem odmerku varfarina med skupinami preiskovancev razdeljenih glede na polimorfizem v genu *VKORCI* ($p < 0,0001$). Povprečni tedenski odmerek varfarina je statistično značilno višji v skupini z nemutiranim genotipom *VKORCI -1639 G/G* (30,5 mg; $p < 0,001$) in skupini heterozigotov z genotipom *VKORCI -1639 G/A* (29,3 mg; $p < 0,001$) v primerjavi s skupino z genotipom *VKORCI -1639 A/A* (17,9 mg). V povprečnem tedenskem odmerku varfarina ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *VKORCI -1639 G/A* (29,3 mg; $p = 1,000$) in skupino z genotipom *VKORCI -1639 G/G* (30,5 mg). Iz spodnjega grafa vidimo, da je povprečni tedenski odmerek varfarina pri mutiranih homozigotih značilno nižji kot povprečni tedenski odmerek varfarina pri heterozigotih (39%) in normalnih homozigotih (41%). Naši rezultati so primerljivi z rezultati raziskav v tujini. Iz tega lahko sklepamo, da sta bila nabor podatkov in zbiranje podatkov ustrezna, pravilna. Naše rezultate lahko potrdimo z razlago, da mutacija zavrže aktivnost encima *VKORCI* in zato so potrebni nižji odmerki varfarina za inhibicijo tega encima. Pri normalnih odmerkih bi pri mutiranih homozigotih tvegali pojav krvavitev oziroma bi lahko normalne homozigote izpostavili tveganju ponovnih tromboembolijskih dogodkov zaradi prenizkega odmerka varfarina.

Zaključimo lahko, da so razlike v povprečnih tedenskih odmerkih varfarina med genotipi *VKORCI 1639 G>A* velike in statistično značilne. Mutirani homozigoti potrebujejo pomembno nižji tedenski odmerek varfarina kot ostali genotipi.

Graf 3: Povprečni tedenski odmerek varfarina v skupinah preiskovancev razdeljenih glede na posamezni polimorfizem v genu *VKORC1*.



Naši rezultati so potrdili povezavo proučevanih polimorfizmov v genih *CYP4F2*, *CYP2C9* in *VKORC1*. Značilno nižji odmerki varfarina so potrebni pri posameznikih z genotipi *CYP2C9* (*1*3, *2*2, *2*3 in *3*3) in pri posameznikih z genotipom *VKORC1* AA. Najvišji povprečni tedenski odmerek so imeli posamezniki z genotipom *CYP4F2**3*3.

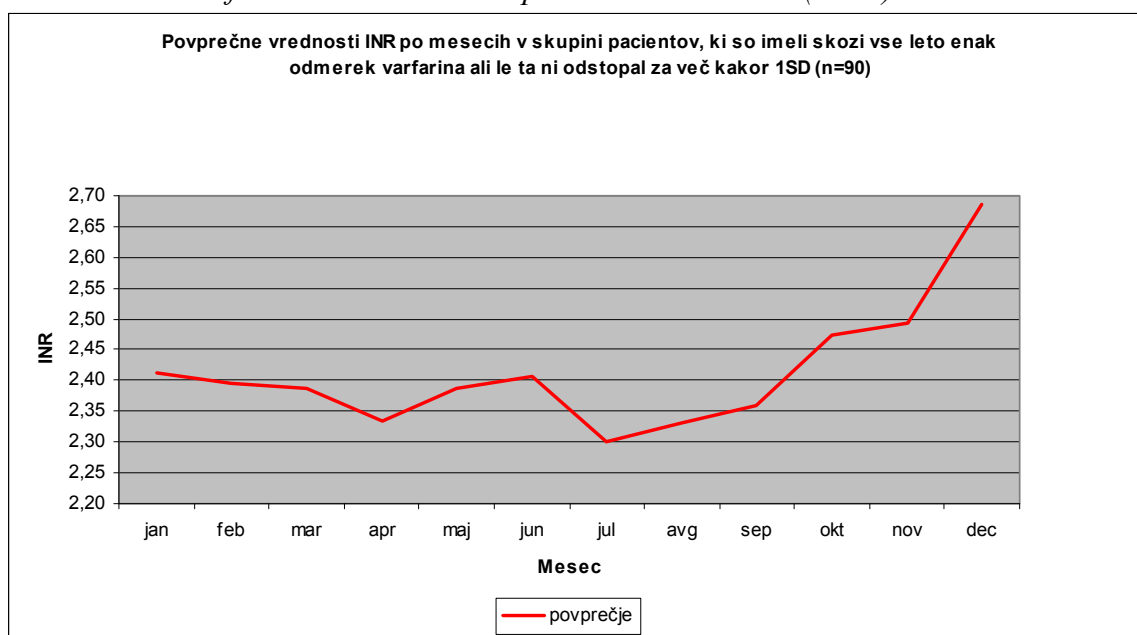
4.3. SEZONSKO NIHANJE INR

Ker v literaturi nismo zasledili podatkov o sezonskem nihanju INR, v praksi pa poročajo o tem, smo v nadaljevanju naloge želeli ugotoviti sezonsko nihanje INR in morebitne razlike v INR med jesensko-zimsko sezono in pomladno-poletno sezono.

4.3.1. Sezonsko nihanje INR

Pacienti, ki pridejo v laboratorij zaradi kontrolnega merjenja INR, večkrat potarnajo, da bo tokrat njihov INR spet narobe ker so jedli preveč regrata. Zato smo se odločili, da bomo poskusili opredeliti vpliv sezone na nihanje INR. V skupini pacientov, ki je imela skozi vse leto enak odmerek varfarina, oziroma le ta ni nihal za več kakor 1SD (n=90), smo določili povprečne vrednosti INR po mesecih ter jih primerjali med seboj. S statistično analizo podatkov smo potrdili, da se v tej skupini preiskovancev povprečni tedenski odmerek varfarina v obdobjih april-september in oktober-marec ni značilno razlikoval (p=0,575). Ob tem pa smo dokazali padec vrednosti INR v mesecu aprilu in juliju (Graf 4). Ker pa ob tem nihanje INR vrednosti ni preseglo terapevtskega območja 2-3, spreminjanje odmerka varfarina ni bilo potrebno. Opazimo lahko tudi velik dvig INR med oktobrom in decembrom, za kar smatramo, da je posledica bodisi zmanjšanja vnosa prehrane z visoko vsebnostjo vitamina K (v solati, špinači, cvetači, brokoliju, ohrovtu, zelju, soji in jetrih, nekaj pa tudi v sojinem in olivnem olju) ali pa interference z zdravili, zaradi okužb, ki so v tem letnem času pogostejše. Vrednost INR ostaja v intervalu 2-3.

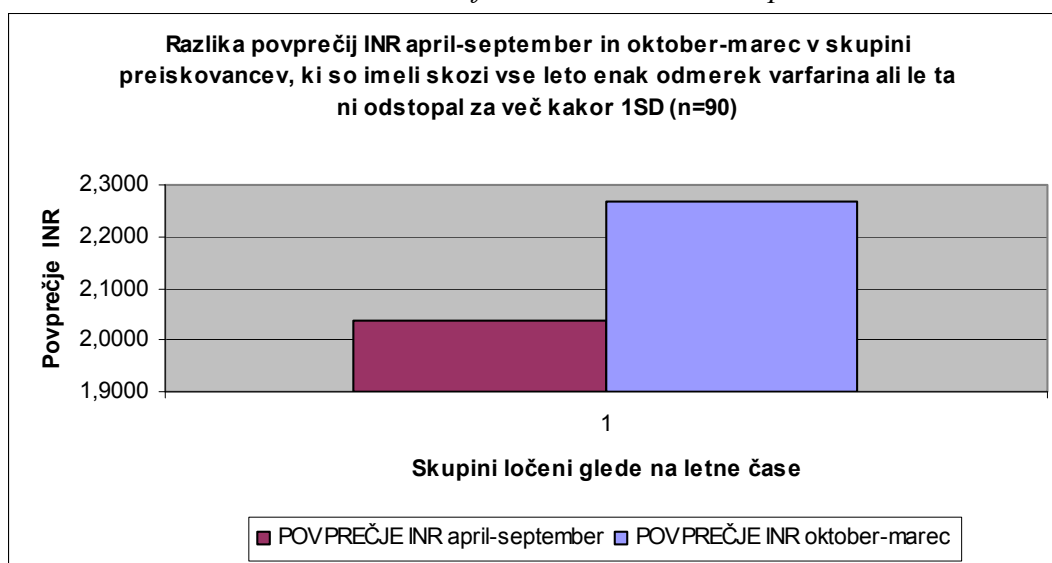
Graf 4: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali le ta ni odstopal za več kakor 1SD (n=90)



S statistično analizo podatkov smo ugotovili, da je razlika med povprečnim INR za obdobje april–september v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina in povprečnim INR za obdobje oktober-marec v enaki skupini preiskovancev statistično značilna ($p < 0,0001$) in je prikazana v Grafu 5. Kot smo pričakovali, je vrednost INR nižja, vendar še znotraj intervala 2-3, v obdobju pomlad-poletje, kar lahko nakazuje na vpliv sezonske prehrane z visoko vsebnostjo vitamina K.

Učinek antikoagulantov, to je inhibicija pretvorbe vitamina K in posledično delne proizvodnje karboksiliranih in dekarboksiliranih proteinov z reducirano prokoagulacijsko aktivnostjo, lahko nevtraliziramo z vitaminom K, ki smo ga vnesli v telo s hrano. Vitamin K je namreč kofaktor pri posttranslacijski karboksilaciji ostankov glutamata v γ -karboksiglutamat. γ -karboksilacijo za svojo biološko aktivnost potrebujejo koagulacijski faktorji II, VII, IX in X, saj le ta v prisotnosti kalcijevih ionov, povzročata konformacijske spremembe v koagulacijskih proteinih, kar spodbudi vezavo na kofaktorje, ki so na fosfolipidnih površinah in s tem omogoča proces koagulacije.

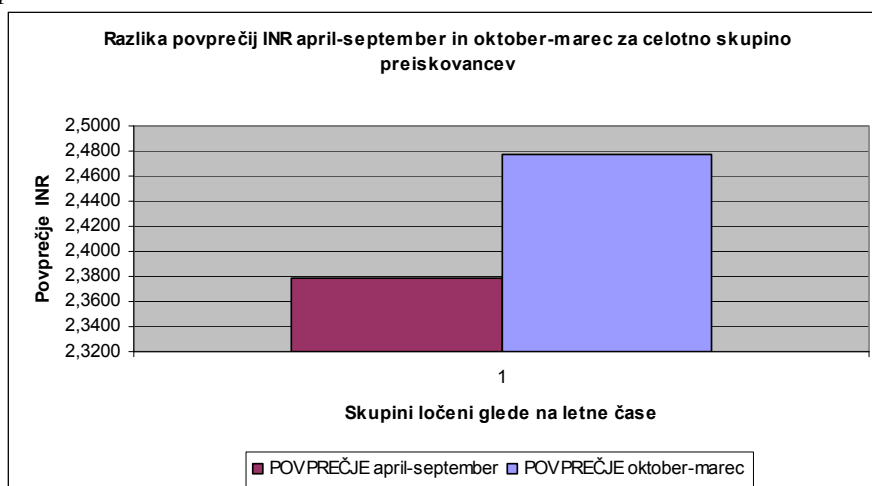
Graf 5: Razlika povprečij INR april-september in oktober-marec v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali le ta ni odstopal za več kakor 1SD ($n=90$)



4.3.2. Primerjava pomladno-poletne in jesensko-zimske sezone v nihanju INR, odmerku varfarina in njenem količniku

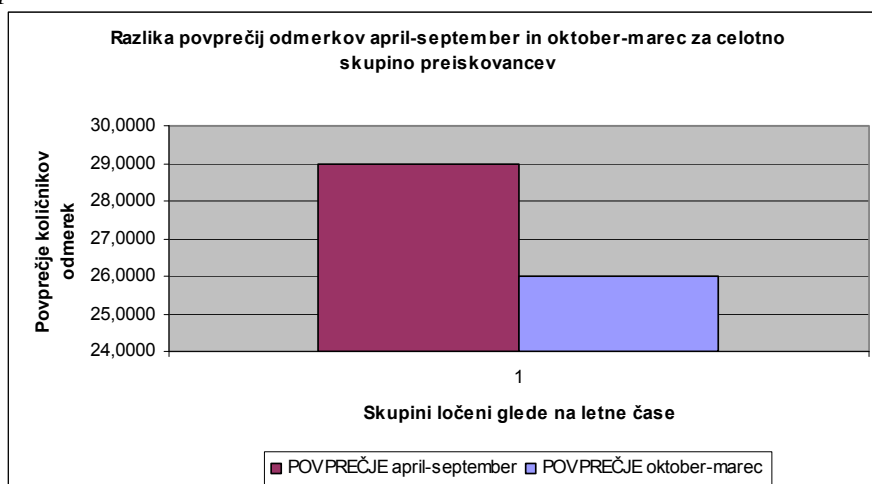
Ker smo dokazali, da obstajajo značilne razlike v INR med dvema sezonama, pomladno-poletno in jesensko-zimsko sezono v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali le ta ni odstopal za več kakor 1SD (n=90), smo želeli ugotoviti, ali so takšne sezonske razlike značilne tudi v celotni preiskovalni skupini. Ugotovili smo, da je razlika med povprečjem INR za april–september v celotni skupini preiskovancev in povprečjem INR oktober-marec v celotni skupini preiskovancev (n=198) statistično značilna (p=0,007) in je prikazana v Grafu 9.

Graf 9: Razlika povprečij INR april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev



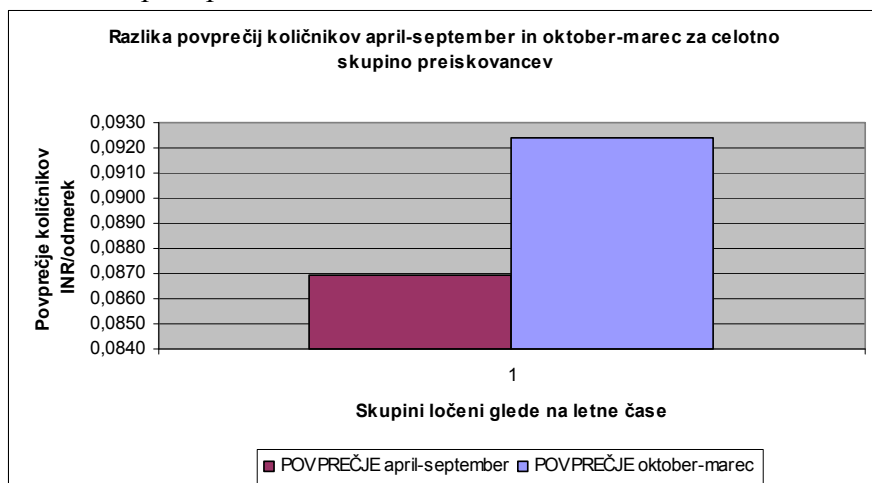
V nadaljevanju nas je zanimalo, ali je tudi razlika med povprečjem tedenskih odmerkov za april–september v celotni skupini preiskovancev in povprečjem tedenskih odmerkov oktober-marec v celotni skupini preiskovancev (n=198). S statistično analizo podatkov smo ugotovili značilno razliko v povprečnih tedenskih odmerkih med dvema sezonama (p<0,0001) in je prikazana v Grafu 10.

Graf 10: Razlika povprečij odmerkov april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev



Ker smo želeli izključiti vpliv odmerka varfarina na nihanje INR, smo izračunali količnike INR/odmerek in s statistično analizo podatkov dokazali, da je razlika med povprečjem količnikov INR/odmerek za april–september in povprečjem količnikov INR/odmerek oktober-marec statistično značilna ($p < 0,0001$) (Graf 11).

Graf 11: Razlika povprečij količnikov INR/odmerek april-september in oktober-marec za celotno skupino preiskovancev



Na podlagi teh podatkov lahko zaključimo, da vrednosti INR med dvema sezonama pomlad-poletje in jesen-zima nihajo neodvisno od odmerka varfarina in kažejo na vpliv sezonske prehrane. To lahko potrdimo tudi z dejstvom, da so odmerki varfarina v obdobju april-september statistično značilno višji kakor odmerki varfarina v obdobju oktober-marec, pa je

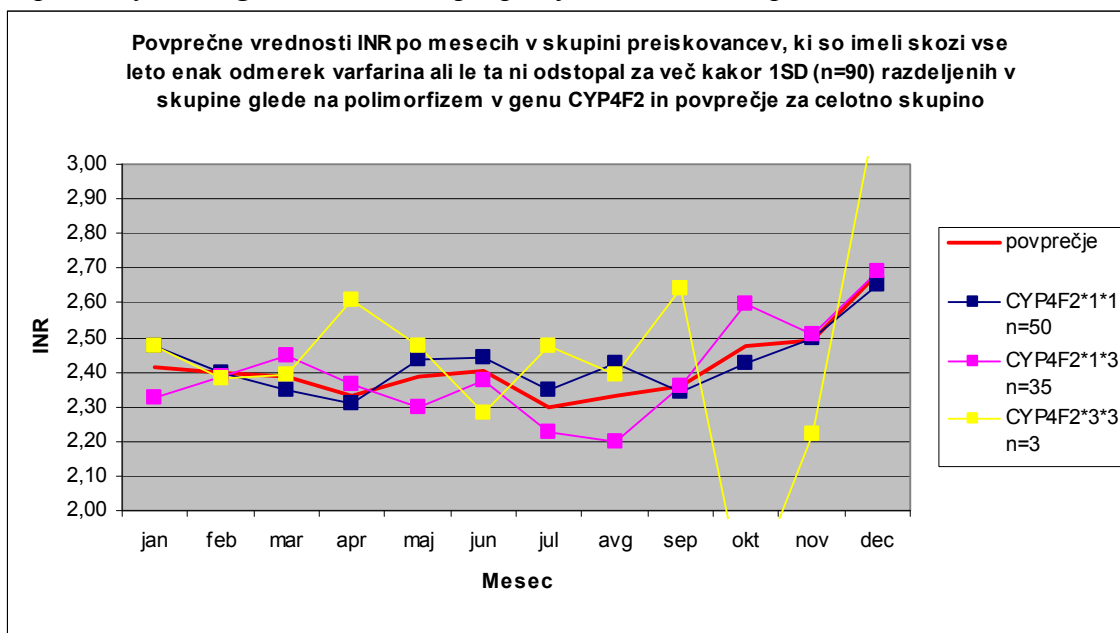
povprečje INR v obdobju april-september kljub temu nižje od povprečja INR v obdobju oktober-marec. Razlog za nižje povprečje INR v obdobju april september, kljub višjim odmerkom varfarina, je lahko v sezonski prehrani.

4.3.3. Vpliv genotipov na nihanje INR, odmerku varfarina in njunega količnika

INR se je pri enakem odmerjanju varfarina spreminjal glede na letno sezono (poglavje 4.3.1). Nas je zanimalo, ali so ta nihanja pri različnih genotipih večja, pri drugih pa manjša kot je to v celotni skupini, ki ni deljena glede na genotip (Graf 6,7,8).

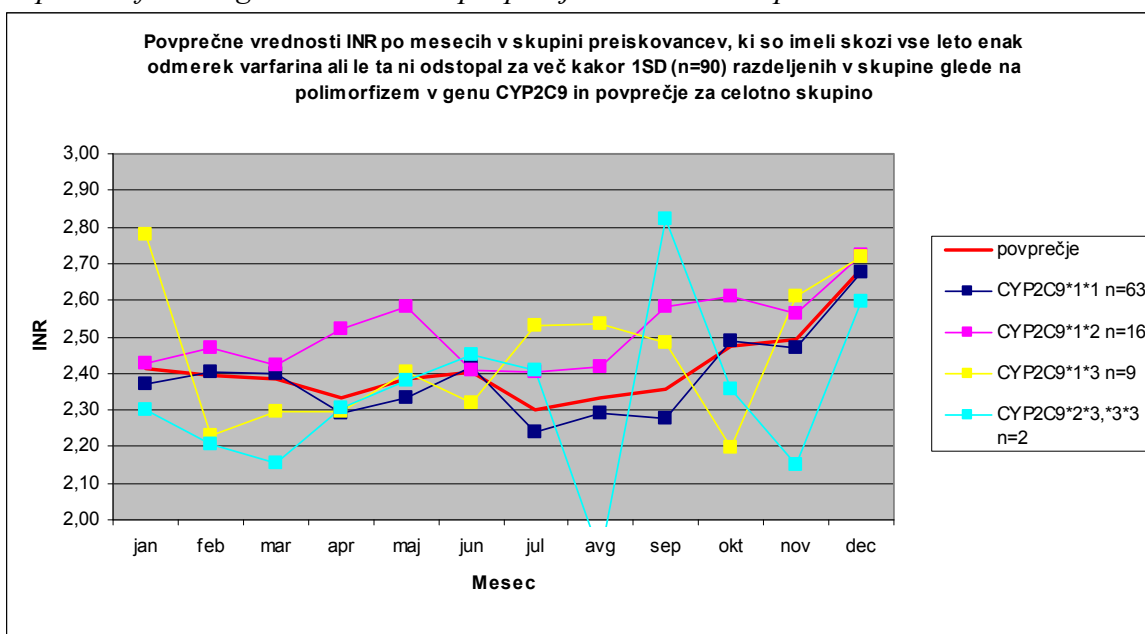
Graf 6 prikazuje nihanje INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina, ki smo jih razdelili v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP4F2* in ga primerjali s povprečjem za celotno skupino ne glede na genotip.

Graf 6: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP4F2* in povprečje za celotno skupino



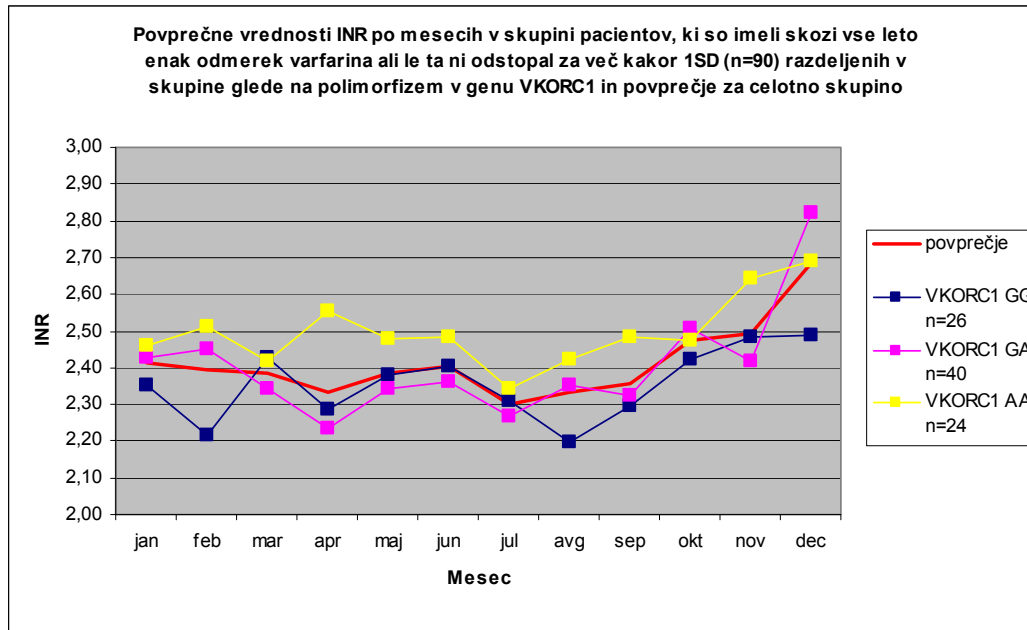
Graf 7 prikazuje nihanje INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, ki smo jih razdelili v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP2C9* in ga primerjali s povprečjem za celotno skupino ne glede na genotip.

Graf 7: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu *CYP2C9* in povprečje za celotno skupino



Graf 8 prikazuje nihanje INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, ki smo jih razdelili v skupine glede na polimorfizem v genu *VKORC1* in ga primerjali s povprečjem za celotno skupino ne glede na genotip.

Graf 8: Povprečne vrednosti INR po mesecih v skupini preiskovancev, ki so imeli skozi vse leto enak odmerek varfarina ali pa le ta ni odstopal za več kakor 1SD, razdeljenih v skupine glede na polimorfizem v genu VKORC1 in povprečje za celotno skupino



Zaključimo lahko, da so nihanja INR iz meseca v mesec pri mutiranih homozigotih za vse tri proučevane gene večja kakor nihanja normalnih homozigotov. Nihanje INR pri mutiranih homozigotih se tudi bistveno razlikuje od nihanja INR, ki prikazuje povprečje za celotno skupino (n=90).

V nadaljevanju naloge smo želeli ugotoviti tudi vpliv genotipov na sezonsko nihanje INR na večji skupini, ki ni imela enakega odmerka varfarina čez celo leto. V nadaljnjo analizo smo torej vključili 198 bolnikov ter podatke o količniku INR/odmerek namesto INR, ki smo ga uporabili pri prejšnji analizi. Izračunali smo statistične značilnosti razlik med povprečjem količnikov INR/odmerek za april–september v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih in povprečjem količnikov INR/odmerek oktober-marec v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih. Ugotovili smo, da statistično značilne razlike količnika INR/odmerek v skupinah preiskovancev, ki so normalni homozigoti ali heterozigoti so, medtem ko v skupini mutiranih homozigotov ni statistično značilnih nihanj (Preglednica XII).

Preglednica XII: Statistične značilnosti razlik med povprečjem količnikov INR/odmerek za april–september v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih in povprečjem količnikov INR/odmerek oktober-marec v skupini preiskovancev z enakimi polimorfizmi v genih, posamezno tudi za INR in odmerek

GENOTIP	N	Količnik INR/odmerek		INR		odmerek	
		z	p	z	p	z	p
CYP4F2*1*1	110	-2,920	0,004	-2,432	0,015	-2,070	0,038
CYP4F2*1*3	76	-2,030	0,042	-2,617	0,009	-1,121	0,262
CYP4F2*3*3	6	-1,153	0,249	-0,105	0,917	-0,730	0,465
CYP2C9*1*1	135	-4,151	<0,0001	-3,648	<0,0001	-2,684	0,007
CYP2C9*1*2	33	-1,206	0,228	-1,680	0,093	-1,117	0,264
CYP2C9*1*3	19	-1,368	0,171	-0,121	0,904	-0,599	0,549
CYP2C9*2*2,*2*3,*3*3	11	-1,156	0,248	-0,356	0,722	-0,840	0,401
VKORC1GG	61	-2,970	0,003	-1,713	0,087	-1,455	0,146
VKORC1GA	95	-2,702	0,007	-3,621	<0,0001	-2,121	0,034
VKORCIAA	42	-1,294	0,196	-0,444	0,657	-0,978	0,328
CYP2C9*1*1,*1*2-VKORC1GG,GA	132	-4,583	<0,0001	-4,337	<0,0001	-2,885	0,004
CYP2C9*1*3,*2*2,*2*3,*3*3-VKORCIAA	67	-1,409	0,294	-0,200	0,842	-0,557	0,577

Wilcoxonov test predznačenih rangov

Takšen rezultat je lahko tudi posledica majhnega števila preiskovancev z dvema mutiranimi aleloma v genu. Vendar lahko to domnevo zanikamo, saj smo izračunali statistično značilne razlike količnika INR/odmerek v skupini preiskovancev, ki so normalni homozigoti ali heterozigoti (*CYP2C9*1*1,*1*2-VKORC1GG,GA*), medtem ko v skupini mutiranih homozigotov (*CYP2C9*1*3,*2*2,*2*3,*3*3-VKORC1AA*) ni statistično značilnih nihanj med dvema sezonama. Glede na rezultate lahko predvidevamo, da geni ne vplivajo na sezonsko nihanje INR, saj verjetno ne spreminjajo občutljivost posameznika na »koagulantni« vpliv prehrane. Tako lahko pacienti s spremenjenimi geni skozi vse leto prejema enak odmerek varfarina, saj sezonsko nihanje INR zanje ni statistično značilno. Pacienti z normalnimi geni so veliko bolj »dovzetni« za vpliv sezone in je njihovo nihanje INR zaradi sezonskega vpliva potrebno uravnavati z odmerki varfarina.

Če bi genotipi prispevali k sezonskemu nihanju INR, bi se število obiskov laboratorija za določitev INR med preiskovanci, razdeljenimi v skupine glede na genotip, razlikovalo (Priloga 5). S statistično analizo smo pokazali, da ni statistično značilnih razlik v številu obiskov laboratorija za določitev INR med genotipskimi podskupinami. S Kruskal-Wallis testom smo izračunali, da v letnem številu laboratorijskih meritev INR ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *CYP4F2*1*1*, skupino z genotipom *CYP4F2 *1*3* in skupino z genotipom *CYP4F2 *3*3* ($p=0,538$). V letnem številu laboratorijskih meritev INR ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *CYP2C9*1*1*, skupino z genotipom *CYP2C9 *1*2*, skupino z genotipom *CYP2C9 *1*3* in skupino z genotipi *CYP2C9*2*2,*2*3,*3*3* ($p=0,574$). V letnem številu laboratorijskih meritev INR ni statistično značilnih razlik med skupino z genotipom *VKORC1 GG*, skupino z genotipom *VKORC1 GA* in skupino z genotipom *VKORC1 AA* ($p=0,125$).

Na osnovi naših rezultatov smo zaključili, da geni ne prispevajo k sezonskemu nihanju INR oziroma povečujejo občutljivost posameznika na vpliv sezonske prehrane na INR tekom leta.

5. SKLEP

Našo raziskavo zaključujemo z naslednjimi sklepi:

- Pogostnosti proučevanih genotipov *CYP4F2*, *CYP2C9* in *VKORC1* se ujemajo s podatki iz literature in so značilne za kavkazijsko raso. Ker se naši rezultati potrjujejo z rezultati domačih in mednarodnih raziskav, lahko sklepamo na pravilnost postopka genotipizacije in zaupamo pogostnostim, ki smo jih določili za genotipe, ki v slovenski populaciji še niso bili proučevani. V slovenski populaciji je 56 % normalnih homozigotov, 38% heterozigotov in 3 % mutiranih homozigotov za polimorfizem V433M v genu *CYP4F2*.
- Polimorfizem V433M v genu *CYP4F2* ne vpliva pomembno na variabilnost tedenskega odmerka varfarina v celotni preiskovalni skupini.
- Ugotovili smo, da je povprečni tedenski odmerek varfarina v skupini z genotipom *CYP4F2**3*3 za 7 mg višji kakor v skupini z genotipom *CYP4F2**1*1.
- Pokazali smo, da se INR tekom leta spreminja in je značilno nižji v pomladno-poletni sezoni. Pri tem sezonsko nihanje povprečnih mesečnih vrednosti INR ni preseglo mej terapevtskega intervala 2 – 3.
- Dokazali smo, da obstajajo značilne razlike med dvema sezonama pomladno-poletno sezono in jesensko-zimsko sezono v nihanju INR in količniku INR/odmerek.
- Pokazali smo, da je prispevek genov k sezonskemu nihanju INR oz. količniku INR/odmerek neznačilen in ne vpliva na občutljivost posameznika na vpliv prehrane ipd.

Na podlagi rezultatov naše raziskave lahko zaključimo, da polimorfizem V433M v genu *CYP4F2* ne vpliva značilno na zdravljenje z varfarinom. To lahko nakazuje na relativno majhen vpliv »inaktivacije« vitamina K z *CYP4F2* v procesu strjevanja krvi. Zaradi relativno majhnega števila mutiranih homozigotov (n=6) v naši raziskavi predlagamo potrditev zaključka na večji skupini preiskovancev.

6. LITERATURA

1. Mahajan P., Meyer K.S., Wall G.C., Price H.J.; Clinical applications of pharmacogenomics guided warfarin Dosing, *Int J Clin Pharm* (2011) 33:10–19.
2. Hirsh J., Dalen J., Anderson D.R., et al.: Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range; *Chest* 119 (Suppl 1.), S8-S21 (2001).
3. SMPC Marevan; datum zadnje revizije besedila, 13.1.2010
4. Stegnar M.; Prepoznavanje motenj hemostaze z laboratorijskimi metodami (2005):74-77.
7. http://sl.wikipedia.org/wiki/Vitamin_K (3.4.2012).
8. White P. J.; Patient Factors That Influence Warfarin Dose Response, *Journal of Pharmacy Practice* 23(3), 194-204, (2010).
9. Donohue M. M., Tirschwell D. L.; Implications of Pharmacogenetic Testing for Patients Taking Warfarin or Clopidogrel, *Curr Neurol Neurosci Rep* 11: 52-60, (2011).
10. Eichelbaum M., Ingelman-Sundberg M., Evans W.E.; Pharmacogenomics and individualized drug therapy; *Annu Rev Med.*; 57:119-137, (2006).
11. Moyer T.P., O'Kane D.J., Baudhuin L.M., Wiley C.L., et al.; Warfarin Sensitivity Genotyping: A Review of the Literature and Summary of Patient Experience
12. Ansell J., Hirsh J., Hylek E., et al.; Pharmacology and management of the vitamin K antagonists; *Chest* 2008; 133 (suppl 6):160S-198S.
13. Kimes M.; Medco's big bio bet: the company that manages your drug benefit also wants to get into your genes; *Fortune* 500 October 24, 2008.
http://money.cnn.com/2008/10/24/news/companies/kimes_medco.fortune/index.htm;
(5.4.2012).
14. Harvard's warfarin dose study will analyze cost/benefit of using gene-based dosing. Genomeweb Pharmacogenomics Reporter Web site;
<http://www.genomeweb.com/dxpgx/harvards-warfarin-dose-study-will-analyze-costbenefit-using-gene-based-dosing>; (5.4.2012).
15. Could genetics improve warfarin dosing? New research says yes for now. National Institute of General Medical Sciences Web site.
<http://www.nigms.nih.gov/News/Results/Warfarin02182009.htm>; (5.4.2012)
16. Gage B.F., Eby C., Johnson J.A., et al.; Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin [published correction appears in *Clin Pharmacol Ther* 2008;84(3):430].

17. 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.
18. Sundberg I. M., Sim A.S., Gomez A. et al.; Influence of cytochrom P450 polymorphisms on drug therapies: Pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics* 2007; 116: 496-526.
19. Pirmohamed M., Park B.K.; Cytochrome P450 enzyme polymorphisms and adverse drug reactions. *Toxicology*. 2003; 192(1):23-32.
20. Herman D., Locatelli I., Grabnar I., Peternel P., Stegnar M., Mrhar A., Breskvar K, Dolzan V.; Influence of *CYP2C9* polymorphisms, demographic factors and concomitant drug therapy on warfarin metabolism and maintainance dose, *The Pharmacogenomics Journal* (2005) 5, 193-202.
21. Schelleman H., Chen J., Chen Z., et al.; Dosing algorithms to predict warfarin maintenance dose in Caucasians and African Americans. *Clin Pharmacol Ther.* 2008; 84:332-9.
22. Lindh J.D., Holm L., Andersson M.L., Rane A.; Influence of *CYP2C9* genotype on warfarin dose requirements- a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2009 Apr; 65(4):365-75.
23. Lenzini P., Grice G., Milligan P., Gatchel S., Deych E., Eby C., Burnett R., Clohisy J., Barrack R., Gage B.; Optimal initial dose adjustment of warfarin in orthopedic patients, *Ann Pharmacother* 2007;41:1798-804.
24. Schwarz U.I., Ritchie M.D., Bradford Y., et al.; Genetic Determinants of Response to Warfarin during Initial Anticoagulation; *N Engl J Med* 2008; 358:999-1008.
25. Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., et al.; Mutations in *VKORC1* cause warfarin and multiple coagulation factor deficiency type 2.; *Nature* 2004; 427: 537-541.
26. Rieder M.J., Reine A.P., Gage B.F., et al.; Effect of *VKORC1* haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose.; *N Engl J Med* 2005; 352: 2285-93.
27. Tham L.S., Goh B.C., Nafziger A., Guo J.Y., Wang L.Z., Soong R., Lee S.C.; 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;80:346-55.
28. D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Di Perna P., et al.; A polymorphism in the *VKORC1* Gene associated with an interindividual variability in the doseanticoagulant effect of warfarin.; *Blood* 2005; 105: 645-649.
29. Osman A., Enstorm C., Arbring K.; Main haplotypes and multinational analysis of vitamin K epoxide reductase (*VKORC1*) in a Swedish population: a retrospective analysis of case records.; *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1723-1729.

30. McDonald M.G., Rieder M.J., Nakano M., Hsia C.K, Rettie A.E.; *CYP4F2* is a Vitamin K1 oksidase: An Explanation for Altered Warfarin Dose in Carriers of the V433M Variant; *Mol Pharmacol* vol. 75, No 6:1337-1346, 2009.
31. Caldwell M.D., Awad T., Johnson J.A., Gage B.F., Falkowski M., Gardina P., Hubbard J., Turpaz Y., Langaee T.Y., Eby C., et al.; *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111:4106–4112, (2008).
32. Zambon C-F., Pengo V., Padrini R., Basso D., Schiavon S., Fogar P., Nisi A., Frigo A.C., Moz S., Pelloso M., Plebani M.; *VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP4F2* genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study, *Pharmacogenomics* (2011) 12(1), 15-25.
33. Burtis C., Ashwood E., Bruns D.; *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Fourth Edition, Chapter 36, 1401.
34. Burtis C., Ashwood E., Bruns D.; *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, Fourth Edition, Chapter 43, 1591.
35. 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.* 5, e1000433 (2009).
36. Caldwell M.D., Awad T., Johnson J.A. et al.; *CYP4F2* genetic variant alters required warfarin dose. *Blood* 111, 4106–4112 (2008).
37. Borgiani P., Ciccacci C., Forte V. et al.; *CYP4F2* genetic variant (rs2108622) significantly contributes to warfarin dosing variability in the Italian population. *Pharmacogenomics* 10, 261–266 (2009).
38. Pautas E., Moreau C., Gouin-Thibault I. et al.; Genetic factors (*VKORC1*, *CYP2C9*, *EPHX1*, and *CYP4F2*) are predictor variables for warfarin response in very elderly, frail inpatients. *Clin. Pharmacol. Ther.* 87, 57–64 (2010).
39. Andreson J.L. et al.; Randomized trial of genotype –guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation. *Circulation* 2007; 116: 2563-2570.
40. Scibona P., Redal M.A., Garfi L.G., Arbelbide J., Argibay P.F., Belloso W.H.; Prevalence of *CYP2C9* and *VKORC1* alleles in the Argentine population and implications for prescribing dosages of anticoagulants; *GMR, Online Journal*, http://www.hospitalitaliano.org.ar/archivos/servicios_attachs/7633.pdf (9.6.2012)

7. PRILOGE

PRILOGA 1

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



NASLOV RAZISKAVE:
VPLIV GENETSKIH DEJAVNIKOV NA USPEŠNOST
ZDRAVLJENJA Z ANTIKOAGULANTI

VODJA RAZISKAVE:
Prof. dr. Janja Marc, mag.farm, spec.med.biokem.

IZVAJALEC:
Maja Škerjanec, dipl.ing.lab.biomed

INFORMIRANI PRISTANEK ZA UPORABO BIOLOŠKEGA VZORCA (VENSKE KRVI)

V raziskavi z gornjim naslovom želimo poiskati genetske spremembe, ki vplivajo na delovanje antikoagulantnih zdravil. Z analizo teh genetskih sprememb bi lahko hitreje in bolj varno določili pravi odmerek antikoagulantnega zdravila, ki ga bolnik mora prejeti. Medicinska sestra/laboratorijski delavec vam je povedal-a, da je v načrtu raziskava, ki bo preučevala vpliv genetskih dejavnikov na uspešnost zdravljenja z antikoagulanti. V ta namen, potrebujemo vensko kri, ki vam jo bodo odvzeli v laboratoriju za spremljanje antikoagulacijskega zdravljenja. Po opravljeni naročeni rutinski preiskavi vzorca venske krvi ne bi zavrgli, ampak bi jo v nadaljevanju uporabili za potrebe naše raziskave.

Prosimo Vas torej za dovoljenje, da za potrebe raziskave uporabimo vaš vzorec krvi, ki po analizi ostane (višek vzorca) in je namenjen uničenju.

Zagotavljamo vam, da bomo za vse vzorce krvi poskrbeli za anonimizacijo vzorcev, ki bodo vstopili v raziskavo. V raziskavi bomo uporabili le laboratorijsko identifikacijsko številko, ki nas bo vodila do rezultatov PČ in vrednosti INR narejenih na istem vzorcu tekom spremljanja antikoagulacijskega zdravljenja. Ostali podatki o bolniku bodo izbrisani.

Nadaljnja uporaba vzorca venske krvi za raziskovalne namene za vas ne pomeni nobenega tveganja.

Pristanek bolnika

S svojim podpisom na tem dokumentu potrjujem, da me je medicinska sestra/laboratorijski delavec seznanil z zgoraj navedenim in se strinjam z uporabo vzorca venske krvi za raziskovalne namene.

Kraj in datum:

Ime in priimek bolnika :

**Ime in priimek medicinske sestre/
laboratorijskega delavca:**

Podpis:

Podpis

PRILOGA 2

PACIENT	4F2	vkorc1	CYP2C9*3	cyp2c9*2	cyp2c9
4571	2	2	1	1	*1/*1
4590	1	1	1	1	*1/*1
4600	1	2	1	1	*1/*1
4670	2	3	1	1	*1/*1
4675	1	2	1	1	*1/*1
4676	2	2	1	1	*1/*1
4697	2	2	1	1	*1/*1
4724	3	1	1	1	*1/*1
4739	2	2	1	1	*1/*1
4762	1	1	1	1	*1/*1
4781	1	2	1	1	*1/*1
4786	1	2	1	1	*1/*1
4790	1	2	1	1	*1/*1
4922	1	2	1	1	*1/*1
4932	1	3	1	1	*1/*1
4933	1	1	1	2	*1/*2
4971	1	3	2	1	*1/*3
4978	2	2	2	1	*1/*3
5021	1	1	1	2	*1/*2
5035	2	1	1	1	*1/*1
5036	1	2	1	1	*1/*1
5038	1	2	1	1	*1/*1
5059	2	3	3	1	*3/*3
5064	2	1	1	1	*1/*1
5065	1	2	1	1	*1/*1
5075	2	2	1	2	*1/*2
5077	1	1	1	2	*1/*2
5090	.	2	1	1	*1/*1
5097	1	3	1	1	*1/*1
5104	.	1	1	1	*1/*1
5118	2	1	2	1	*1/*3
5469	.	2	1	1	*1/*1
5471	1	1	1	1	*1/*1
5491	2	2	1	1	*1/*1
5507	2	2	1	2	*1/*2
5548	1	3	1	1	*1/*1
5557	2	1	1	1	*1/*1
5559	1	2	1	1	*1/*1
5727	1	3	1	1	*1/*1
5798	1	3	1	1	*1/*1
5799	1	2	1	1	*1/*1
5809	2	2	3	1	*3/*3
5821	1	2	1	2	*1/*2
5840	1	2	1	1	*1/*1
5843	1	2	1	2	*1/*2
5850	2	3	1	1	*1/*1
5863	2	1	1	1	*1/*1
5874	2	1	2	1	*1/*3

5892	3	1	1	1	*1/*1
5893	2	2	1	1	*1/*1
5898	1	2	1	1	*1/*1
5901	1	1	2	1	*1/*3
5902	1	1	2	1	*1/*3
6057	1	3	1	1	*1/*1
6079	1	1	2	2	*2/*3
6088	2	3	1	2	*1/*2
6089	2	2	1	1	*1/*1
6092	2	3	1	1	*1/*1
6115	1	3	1	2	*1/*2
6117		1	1	1	*1/*1
6123	3	2	1	2	*1/*2
6128	1	3	1	1	*1/*1
6163	1	2	1	3	*2/*2
6166	2	2	1	1	*1/*1
6314	2	1	1	2	*1/*2
6334	2	2	1	1	*1/*1
6345	1	2	1	2	*1/*2
6366		1	1	1	*1/*1
6373	1	1	1	1	*1/*1
6377	2	3	1	1	*1/*1
6804		1	1	1	*1/*1
6810	2	1	1	2	*1/*2
6813	1	3	2	1	*1/*3
6833	1	3	1	1	*1/*1
6898	1	2	1	1	*1/*1
7046	2	2	1	1	*1/*1
7055	1	3	1	1	*1/*1
7071	1	1	1	1	*1/*1
7084	1	1	1	1	*1/*1
7192	2	1	1	1	*1/*1
7215	1	1	1	1	*1/*1
7235	1	3	1	1	*1/*1
17267	1	1	1	1	*1/*1
17340	2	2	1	1	*1/*1
17341	2	3	1	1	*1/*1
17357	2	1	1	1	*1/*1
17381	2	2	1	2	*1/*2
17382	3	2	1	1	*1/*1
17383	1	2	1	1	*1/*1
17386	1	3	2	1	*1/*3
17394	1	3	1	1	*1/*1
17407	2	3	1	2	*1/*2
17417	1	2	1	2	*1/*2
17419	1	1	1	2	*1/*2
17427	1	3	1	1	*1/*1
17429	3	2	2	1	*1/*3
17433	1	2	1	1	*1/*1
17718	2	1	1	1	*1/*1
24812	1	2	1	1	*1/*1

24844	1	2	1	1	*1/*1
24877	1	1	1	1	*1/*1
24884	1	1	1	1	*1/*1
24897	2	2	1	1	*1/*1
25040	2	2	1	1	*1/*1
25100	1	1	1	2	*1/*2
25110	1	3	1	1	*1/*1
25118	1	2	1	1	*1/*1
25137	2	3	1	2	*1/*2
25390	2	2	2	2	*2/*3
25392	1	2	2	2	*2/*3
25542	1	2	2	2	*2/*3
25547	1	1	2	2	*2/*3
25573	1	1	1	1	*1/*1
25588	2	2	1	1	*1/*1
25594	2	3	1	1	*1/*1
25604	1	2	2	1	*1/*3
25623	1	2	1	1	*1/*1
25644	2	2	2	1	*1/*3
25892	1	2	1	1	*1/*1
25955	1	1	1	1	*1/*1
26031	1	3	1	2	*1/*2
26032	1	2	1	2	*1/*2
26053	1	2	1	2	*1/*2
26055	2	1	1	1	*1/*1
26210	1	2	1	1	*1/*1
26218	2	1	1	1	*1/*1
26219	1	2	1	1	*1/*1
26249	2	2	1	2	*1/*2
26251	1	2	1	1	*1/*1
26256	1	1	1	1	*1/*1
26258	2	1	1	1	*1/*1
26274	2	2	1	1	*1/*1
26305	1	3	2	1	*1/*3
26307	1	1	1	1	*1/*1
26308	2	2	1	1	*1/*1
26309	1	3	1	1	*1/*1
26310	1	1	2	1	*1/*3
26311	2	2	2	1	*1/*3
26312	1	1	2	1	*1/*3
26316	1	2	1	1	*1/*1
26319	1	2	1	1	*1/*1
26324	2	3	1	1	*1/*1
26443	2	2	1	2	*1/*2
26483	2	3	1	1	*1/*1
26499	1	3	1	1	*1/*1
26516	1	2	1	1	*1/*1
26519	1	3	1	1	*1/*1
26530	2	2	1	1	*1/*1
26536	2	2	1	1	*1/*1
26541	2	2	1	1	*1/*1

26548	1	3	1	2	*1/*2
26549	1	2	1	1	*1/*1
26637	1	1	1	2	*1/*2
26671	1	2	1	1	*1/*1
26706	1	1	1	1	*1/*1
26713	2	2	1	1	*1/*1
26734	1	2	1	3	*2/*2
26737	2	1	1	3	*2/*2
26740	1	1	1	1	*1/*1
26993	1	1	1	1	*1/*1
27043	2	2	1	1	*1/*1
27105	2	1	1	2	*1/*2
27149	1	3	1	1	*1/*1
27171	2	1	1	1	*1/*1
27239	1	1	1	1	*1/*1
27304	1	2	1	1	*1/*1
27308	2	1	1	1	*1/*1
27343	1	2	1	1	*1/*1
27344	2	2	1	2	*1/*2
27346	2	2	1	1	*1/*1
27350	1	1	1	1	*1/*1
27352	1	2	1	1	*1/*1
27357	2	2	1	1	*1/*1
27382	3	1	1	1	*1/*1
27517	1	2	1	1	*1/*1
27587	2	3	1	1	*1/*1
27589	2	3	1	1	*1/*1
27591	1	2	1	2	*1/*2
27596	1	2	1	1	*1/*1
27597	2	3	1	3	*2/*2
27616	2	3	1	1	*1/*1
27622	1	3	1	1	*1/*1
27630	2	2	1	2	*1/*2
27631	1	2	1	2	*1/*2
27725	2	2	2	1	*1/*3
27760	1	2	1	1	*1/*1
27786	2	2	1	1	*1/*1
27792	2	2	1	1	*1/*1
27817	1	1	1	1	*1/*1
27821	2	1	2	2	*2/*3
27829	2	1	2	2	*2/*3
27830	1	2	1	1	*1/*1
27832	2	2	1	2	*1/*2
27846	1	1	2	1	*1/*3
27849	1	2	1	1	*1/*1
27854	2	1	1	1	*1/*1
27855	1	2	1	1	*1/*1
27868	1	3	1	2	*1/*2

PRILOGA 3

PACIENT	GENOTIP cyp2c9*2			
4571	1	0.022	4.162	Allele Y
4590	1	0.198	1.747	Allele Y
4600	1			
4657	2	5.623	6.341	Both Alleles
4663	1	0.146	3.342	Allele Y
4670	1	0.139	1.791	Allele Y
4675	1			
4676	1	0.067	8.927	Allele Y
4683	1			
4697	1	0.125	8.605	Allele Y
4724	1	0.153	1.957	Allele Y
4739	1			
4762	1	0.120	2.354	Allele Y
4781	1	0.176	6.336	Allele Y
4786	1			
4790	1	0.039	8.480	Allele Y
4922	1	0.130	1.099	Allele Y
4932	1			
4933	2	2.722	2.318	Both Alleles
4971	1	0.127	2.833	Allele Y
4978	1	0.072	7.976	Allele Y
5010	2	5.946	6.827	Both Alleles
5021	2	1.026	1.062	Both Alleles
5035	1	0.181	2.575	Allele Y
5038	1	0.130	2.596	Allele Y
5036	1			
5045	1	0.165	3.252	Allele Y
5059	1	0.050	7.231	Allele Y
5062	1	0.224	4.885	Allele Y
5064	1	0.212	3.386	Allele Y
5065	1	0.162	2.038	Allele Y
5075	2	0.568	0.653	Both Alleles
5077	2	5.016	5.252	Both Alleles
5088	NEG	0.042		Negative
5090	1	0.140	1.198	Allele Y
5097	1			
5104	1	0.104	1.097	Allele Y
5118	1	0.214	4.108	Allele Y
5120	1	0.113	8.025	Allele Y
5469	1	0.140	1.128	Allele Y
5471	1	0.127	0.785	Allele Y
5491	1			
5507	2	1.950	1.956	Both Alleles
5548	1	0.164	2.099	Allele Y

5552	1	0.103	1.290	Allele Y
5557	1	0.175	6.498	Allele Y
5559	1	0.120	0.484	Allele Y
5727	1	0.188	6.348	Allele Y
5798	1	0.157	5.775	Allele Y
5799	1	0.181	4.584	Allele Y
5807	1	0.144	4.439	Allele Y
5809	1			
5821	2			
5840	1			
5843	2	2.579	2.919	Both Alleles
5845	1	0.119	1.429	Allele Y
5850	1	0.070	5.254	Allele Y
5863	1	0.184	3.607	Allele Y
5874	1	0.103	8.865	Allele Y
5892	1	0.211	4.942	Allele Y
5893	1	0.288	1.294	Allele Y
5898	1	0.232	3.994	Allele Y
5901	1	0.096	2.242	Allele Y
5902	1	0.200	3.429	Allele Y
6008	2	2.196	2.169	Both Alleles
6057	1	0.137	2.159	Allele Y
6079	2	2.503	2.684	Both Alleles
6088	2	3.056	3.650	Both Alleles
6089	1	0.182	4.321	Allele Y
6092	1	0.078	8.348	Allele Y
6115	2	2.682	2.806	Both Alleles
6117	1	0.107	0.084	Negative
6120	1	0.028	8.546	Allele Y
6123	2	2.174	2.288	Both Alleles
6128	1	0.085	7.790	Allele Y
6163	3	0.774	0.959	Both Alleles
6166	1	0.143	1.163	Allele Y
6314	2	2.325	2.322	Both Alleles
6334	1	0.153	3.410	Allele Y
6343	1	0.217	3.091	Allele Y
6345	2	1.532	1.431	Both Alleles
6352	1	0.149	2.569	Allele Y
6354	1	0.106	2.263	Allele Y
6366	1	0.087	0.819	Allele Y
6367	1	0.160	0.252	Negative
6373	1	0.073	8.637	Allele Y
6377	1	0.193	2.292	Allele Y
6804	1	0.047	0.022	Negative

6810	2	2.752	2.945	Both Alleles
6813	1	0.053	8.694	Allele Y
6833	1	0.076	1.722	Allele Y
6838	1	0.166	2.166	Allele Y
6868	2	4.622	4.117	Both Alleles
6898	1	0.167	2.949	Allele Y
7046	1	0.173	2.823	Allele Y
7055	1	0.243	3.070	Allele Y
7071	1	0.202	2.874	Allele Y
7084	1	0.146	2.949	Allele Y
7192	1	0.177	4.572	Allele Y
7193	1			
7215	1	0.192	2.905	Allele Y
7229	1	0.121	2.495	Allele Y
7235	1	0.162	5.318	Allele Y
17267	1	0.149	4.033	Allele Y
17340	1	0.150	3.659	Allele Y
17341	1	0.165	5.353	Allele Y
17351	1	0.159	3.840	Allele Y
17357	1	0.243	5.830	Allele Y
17381	2	1.591	1.763	Both Alleles
17382	1	0.138	2.637	Allele Y
17383	1	0.175	4.407	Allele Y
17386	1	0.183	3.956	Allele Y
17394	1	0.154	3.503	Allele Y
17407	2	2.064	2.167	Both Alleles
17417	2	4.697	4.991	Both Alleles
17419	2	2.652	2.759	Both Alleles
17427	1	0.147	3.031	Allele Y
17429	1	0.166	3.410	Allele Y
17432	1	0.150	2.811	Allele Y
17433	1	0.289	5.317	Allele Y
17449	1	0.134	2.871	Allele Y
17665	1	0.160	3.121	Allele Y
17718	1	0.157	4.753	Allele Y
24812	1	0.196	3.420	Allele Y
24844	1	0.155	2.662	Allele Y
24877	1	0.335	6.419	Allele Y
24884	1	0.183	3.543	Allele Y
24897	1	0.165	2.836	Allele Y
25040	1	0.150	2.382	Allele Y
25100	2	2.164	2.391	Both Alleles
25105	2	2.670	3.211	Both Alleles
25110	1	0.362	5.046	Allele Y
25118	1	0.220	5.363	Allele Y

25137	2	2.829	2.869	Both Alleles
25170	1	0.352	5.104	Allele Y
25390	2	1.221	1.281	Both Alleles
25392	2	2.144	2.324	Both Alleles
25542	2	1.397	1.281	Both Alleles
25547	2	2.437	2.699	Both Alleles
25573	1	0.220	4.919	Allele Y
25588	1	0.054	0.299	Negative
25594	1	0.132	2.431	Allele Y
25604	1	0.195	3.656	Allele Y
25623	1	0.215	4.020	Allele Y
25644	1	0.200	4.385	Allele Y
25955	1	0.139	2.698	Allele Y
26031	2	2.283	2.309	Both Alleles
26032	2	2.164	2.211	Both Alleles
26053	2	4.314	4.577	Both Alleles
26055	1	0.155	3.657	Allele Y
26189	1	0.153	2.820	Allele Y
26199	1	0.191	3.255	Allele Y
26210	1	0.175	5.953	Allele Y
26218	1	0.202	5.127	Allele Y
26219	1	0.303	5.618	Allele Y
26249	2	2.425	2.366	Both Alleles
26251	1	0.151	3.360	Allele Y
26256	1	0.208	3.705	Allele Y
26258	1	0.186	2.997	Allele Y
26273	2	2.163	2.222	Both Alleles
26274	1	0.104	2.696	Allele Y
26305	1	0.156	4.233	Allele Y
26307	1	0.199	4.138	Allele Y
26308	1	0.188	3.535	Allele Y
26309	1	0.192	5.989	Allele Y
26310	1	0.166	3.662	Allele Y
26311	1	0.330	3.216	Allele Y
26312	1	0.087	2.821	Allele Y
26316	1	0.197	2.710	Allele Y
26319	1	0.211	4.067	Allele Y
26324	1	0.277	4.146	Allele Y
26443	2	0.397	0.477	Both Alleles
26483	1	0.184	3.491	Allele Y
26499	1	0.192	3.343	Allele Y
26516	1	0.163	2.778	Allele Y
26519	1	0.158	6.583	Allele Y

26530	1	0.144	3.373	Allele Y
26536	1	0.263	5.305	Allele Y
26541	1	0.170	4.871	Allele Y
26548	2	2.033	1.971	Both Alleles
26549	1	0.193	3.093	Allele Y
26637	2	3.454	3.559	Both Alleles
26671	1	0.212	4.381	Allele Y
26706	1	0.199	4.979	Allele Y
26713	1	0.126	3.161	Allele Y
26728	1	0.230	6.454	Allele Y
26734	3	4.456	0.359	Allele X
26737	3	6.998	0.474	Allele X
26740	1	0.166	3.641	Allele Y
26892	1	0.158	2.962	Allele Y
26993	1	0.112	3.259	Allele Y
27043	1	0.145	3.384	Allele Y
27092	2	1.848	1.905	Both Alleles
27105	2	3.239	3.433	Both Alleles
27132	1	0.207	3.188	Allele Y
27149	1	0.183	2.797	Allele Y
27171	1	0.163	2.910	Allele Y
27239	1	0.202	5.695	Allele Y
27304	1	0.184	3.021	Allele Y
27308	1	0.174	3.687	Allele Y
27343	1	0.286	4.103	Allele Y
27344	2	2.092	2.141	Both Alleles
27346	1	0.175	5.806	Allele Y
27350	1	0.205	4.125	Allele Y
27352	1	0.197	3.589	Allele Y
27357	1	0.222	3.728	Allele Y
27358	1	0.123	3.466	Allele Y
27366	1	0.040	0.027	Negative
27376	1	0.185	3.801	Allele Y
27378	1	0.146	3.239	Allele Y
27382	1		0.644	Allele Y
27517	1	0.146	3.928	Allele Y
27587	1	0.200	5.640	Allele Y
27589	1	0.080	1.592	Allele Y
27591	2	2.563	2.199	Both Alleles
27596	1	0.248	3.063	Allele Y
27597	3	2.520	1.487	Unknown
27616	1	0.208	4.986	Allele Y
27622	1	0.163	2.491	Allele Y
27630	2	4.508	4.490	Both Alleles
27631	2	2.417	2.259	Both Alleles

27724		1	0.211	1.957	Allele Y
27725		1	0.119	2.007	Allele Y
27760		1	0.259	6.167	Allele Y
27774		2	2.414	2.271	Both Alleles
27786		1	0.196	3.472	Allele Y
27792		1	0.195	6.521	Allele Y
27817		1	0.204	3.257	Allele Y
27821		2	2.152	2.107	Both Alleles
27829		2	2.379	2.615	Both Alleles
27830		1	0.221	4.342	Allele Y
27832		2	2.184	2.233	Both Alleles
27846		1	0.248	5.470	Allele Y
27849		1	0.133	4.229	Allele Y
27854		1	0.223	4.148	Allele Y
27855		1	0.172	2.860	Allele Y
27858		1	0.159	5.013	Allele Y
27868		2	0.099	0.049	Negative
KONT 07348	NEG			0.007	Negative
KONT 10835		2	1.235	1.329	Both Alleles
KONT 10854		3	3.465	0.294	Allele X
KONT 10855		2	1.940	2.049	Both Alleles
KONT1		1	0.132	3.284	Allele Y
KONT2		2	1.591	1.809	Both Alleles
KONT3		3	2.429	0.181	Allele X
NTC	NEG			0.037	Negative
SLEPA	NEG		0.007	0.014	Negative
SLEPA	NEG		0.143	0.110	Negative

PRILOGA 4

PACIENT	SPOL	VREDNOST INR	TEDENSKI ODMEREK	LETO ROJSTVA	STAROST	TEŽA	VIŠINA	KADILEC	INDIKACIJA
4571	ž	2	33	1957	54	95	172	NE	VT (gol L)
4590	m	2,4	48	1931	80	74	165	NE	AF kron.
4600	m	2	42	1934	77	74	165	NE	VT (gol L)
4670	m	3	9	1949	62	73	170	NE	AF paroks.
4675	ž	2,4	25,5	1931	80	75	171	NE	Um.aort.zakl. AF PAROKS
4676	ž	2	28,5	1934	77	75	171	NE	AF paroks.
4697	ž	2,2	31,5	1938	73	78	163	NE	PE
4724	m	2,8	18	1945	66	90	170	NE	AF neopred.
4739	ž	2,1	28,5	1944	67	81	171	NE	AF paroks.
4762	ž	2,2	36	1935	76	57	154	NE	AF paroks.
4781	m	2	21	1936	75	95	172	NE	AF paroks.
4786	ž	2,4	51	1940	71	92	165	NE	Mitralna stenoza
4790	ž	2,2	37,5	1937	74	70	168	NE	AU paroks
4922	ž	2,3	24	1939	72	75	171	NE	AF kron.
4932	ž	2,6	18	1958	53	72	165	NE	PE
4933	m	2,8	49,5	1945	66	91	173	NE	AF kron.
4971	m	2,1	28,5	1932	79	76	170	NE	AF paroks.
4978	ž	2,7	33	1934	77	74	169	NE	AF neopred.
5021	ž	2,7	31,5	1925	86	65	169	NE	AF kron.
5035	ž	2	30	1930	81	78	163	NE	AF paroks.
5036	m	2,2	45	1935	76	57	154	NE	AF kron.
5038	m	2	37,5	1939	72	100	172	NE	AF kron.
5059	m	2,6	12	1929	82	64	163	NE	AF paroks.
5064	ž	2,3	42	1933	78	72	166	NE	AF paroks.
5065	m	2,3	27	1946	65	108	170	NE	AF paroks.
5075	m	2,1	22,5	1935	76	85	165	NE	AF kron.
5077	m	2,5	33	1932	79	93	174	NE	AF za EK
5090	ž	2,2	24	1931	80	80	154	NE	AF kron.
5097	ž	2,1	13,5	1937	74	58	162	NE	AF paroks.
5104	ž	2,8	34,5	1929	82	69	170	NE	AF kron.
5118	m	2,7	16,5	1926	85	96	185	NE	VTpopl.L
5469	ž	2	52,5	1983	28	90	170	NE	Embolija a.cent. Ret
5471	ž	2,6	46,5	1936	75	90	163	NE	AF paroks.
5491	ž	2,5	52,5	1972	39	92	165	NE	PE
5507	m	2,6	45	1980	31	88	185	NE	Plastika zaklopke
5548	ž	2,1	19,5	1937	74	76	165	NE	AF kron.
5557	ž	2,1	16,5	1926	85	65	156	NE	AF paroks.
5559	ž	2,5	42	1925	86	68	165	NE	AF kron.
5727	m	2,7	13,5	1939	72	71	170	NE	AF kron.
5798	ž	2,7	12	1927	84	65	155	NE	AF paroks.
5799	ž	2,3	27	1951	60	80	174	NE	PE
5809	ž	2,5	36	1940	71	107	163	NE	AF paroks.
5821	ž	2,4	24	1934	77	70	173	NE	AF kron. AF paroks.
5840	ž	2,5	52,5	1960	51	75	167	NE	VT ilio-fem.L
5843	ž	2,1	36	1943	68	70	160	NE	AF kron.
5850	m	2,2	15	1941	70	78	175	NE	AF kron.
5863	ž	2	31,5	1943	68	81	171	NE	VT (brahialno D)
5874	m	2,8	30	1931	80	78	173	NE	AF kron.

5892	m	2,3	30	1925	86	96	185	NE	AF kron.
5893	ž	2,4	24	1929	82	80	164	NE	AF kron.
5898	m	2,4	42	1948	63	80	170	NE	VT popl.D
5901	m	2,3	30	1953	58	65	175	DA	AF kron.
5902	m	2,4	31,5	1941	70	80	170	NE	VTE-profilaksa
6057	m	2,4	25,5	1944	67	80	173	NE	PAOB-anevrizme
6079	ž	2,5	21	1954	57	71	165	NE	VT (fem.-popl.D)
6088	ž	2,5	15	1941	70	86	167	NE	Um. mitr. zakl.
6089	m	2	16,5	1930	81	72	167	NE	AF paroks.
6092	ž	2,6	16,5	1938	73	71	165	NE	AF paroks.
6115	m	2	30	1963	48	75	175	NE	AF kron.
6117	m	2,1	42	1925	86	79	169	NE	AF kron.
6123	m	2,4	27	1947	64	75	174	NE	AF neopred.
6128	m	2,3	15	1949	62	69	169	NE	VT (fem.-popl.L)
6163	ž	2,4	22,5	1930	81	69	158	NE	AF paroks.
6166	m	2,3	21	1927	84	74	176	NE	AF kron.
6314	ž	2,4	48	1990	21	53	160	NE	Um. aort. zakl.
6334	m	2,1	34,5	1936	75	73	173	NE	AF paroks.
6345	m	2,5	42	1956	55	76	185	DA	Um. aort. zakl.
6366	ž	2	21	1938	73	62	155	NE	AF kron.
6373	m	2,3	30	1936	75	100	190	NE	AF kron.
6377	ž	2	18	1933	78	85	165	NE	AF kron.
6804	ž	2	31,5	1951	60	65	167	NE	AF paroks.
6810	ž	2,1	39	1940	71	70	165	NE	AF paroks.
6813	m	2,5	34,5	1955	56	86	172	NE	VT ilio-fem.L
6833	m	2,8	13,5	1951	60	69	168	NE	AF paroks.
6898	ž	2,2	43,5	1932	79	80	162	NE	AF kron.
7046	ž	2	30	1939	72	65	170	NE	AF kron.
7055	m	2,5	15	1931	80	68	165	NE	AF paroks.
7071	ž	2,4	57	1943	68	78	155	NE	AF kron.
7084	m	2,1	24	1932	79	96	170	NE	AF kron.
7192	ž	2,3	37,5	1940	71	112	172	NE	AF paroks.
7215	m	2,3	46,5	1947	64	80	171	NE	PAOB-by.pass
7235	m	2,1	49,5	1951	60	80	176	NE	VT (fem.-popl.L)
17267	m	2	48	1946	65	87	178	NE	AF paroks.
17340	m	2,5	34,5	1933	78	102	172	NE	VT (fem.-popl.D)
17341	ž	2,2	13,5	1937	74	78	165	NE	AF paroks.
17357	m	2,6	67,5	1950	61	85	170	NE	VT (fem.-popl.D)
17381	m	2,8	24	1939	72	85	185	NE	um.mitr.zaklopka
17382	ž	2,2	24	1927	84	58	152	NE	VT (gol D)
17383	m	2	21	1937	74	98	175	NE	AF paroks.
17386	ž	2,8	19,5	1972	39	80	160	NE	PE
17394	ž	2,2	22,5	1928	83	72	162	NE	AF kron.
17407	ž	2,2	7,5	1924	87	60	159	NE	AF paroks.
17417	ž	2,3	39	1951	60	70	168	NE	PE
17419	m	2,2	46,5	1956	55	90	171	NE	AF kron., Plastika zaklopke
17427	ž	2,5	30	1939	72	109	170	NE	AF kron.
17429	ž	2,2	19,5	1934	77	80	168	NE	AF paroks.
17433	m	2,5	33	1933	78	85	175	NE	AF paroks.
17718	ž	2,2	19,5	1934	77	80	168	NE	AF paroks.
24812	m	2,7	48	1942	69	79	175	NE	AF paroks.

24844	ž	2,2	58,5	1933	78	65	165	DA	AF kron
24877	m	2,1	30	1924	87	85	170	NE	AF paroks.
24884	ž	2,2	58,5	1938	73	75	168	NE	AF kron.
24897	m	2,3	34,5	1945	66	80	170	NE	AF kron.
25040	m	2,3	31,5	1938	73	82	166	DA	AF paroks.
25100	ž	2,6	33	1943	68	66	152	NE	VT popl.D
25110	ž	2,3	18	1951	60	54	157	NE	AF kron. AF paroks.
25118	m	2,5	27	1944	67	74	174	NE	AF kron.
25137	ž	2,3	15	1930	81	48	154	NE	AF kron.
25390	ž	2,6	15	1935	76	85	165	NE	AF kron.
25392	m	2,4	16,5	1928	83	70	165	NE	AF kron.
25542	ž	2,6	12	1935	76	68	158	NE	AF kron.
25547	ž	2,3	12	1923	88	68	158	NE	AF kron.
25573	ž	2,4	39	1926	85	57	155	NE	AF kron.
25588	m	2,5	39	1949	62	85	180	NE	AF paroks.
25594	ž	2,7	27	1938	73	95	178	NE	VT gol.D
25604	ž	2,5	16,5	1930	81	70	165	DA	AF kron.
25623	ž	2,2	22,5	1930	81	78	164	NE	AF kron.
25644	ž	2,3	16,5	1923	88	70	163	NE	AF kron.
25892	m	2,2	45	1949	62	86	175	NE	AF paroks.
25955	ž	2,5	25,5	1933	78	69	160	NE	AF kron.
26031	ž	2	21	1926	85	80	156	NE	AF kron.
26032	ž	2,5	24	1929	82	72	163	NE	AFparoks., Um.aort.zakl.
26053	m	2,3	19,5	1928	83	75	170	NE	AF kron.
26055	m	2	31,5	1931	80	75	172	NE	AF perzistentna
26210	m	2,8	49,5	1960	51	92	185	NE	AF kron.
26218	m	2,3	37,5	1943	68	92	178	NE	AF paroks.
26219	m	2,3	39	1942	69	124	188	NE	AF paroks.
26249	ž	2,6	31,5	1937	74	60	165	NE	AF kron.
26251	ž	2,4	16,5	1930	81	80	165	NE	AF kron.
26256	ž	2,5	28,5	1936	75	62	157	NE	AF kron.
26258	ž	2,6	34,5	1929	82	70	157	NE	AF paroks.
26274	m	2,1	31,5	1938	73	94	180	NE	AF kron.
26305	m	2,5	18	1936	75	87	172	NE	AF kron.
26307	m	2,6	30	1949	62	83	173	NE	PE
26308	ž	2,7	22,5	1929	82	79	158	NE	AF paroks.
26309	ž	2,2	15	1939	72	58	166	NE	PAOB-by pass
26310	ž	2,2	22,5	1932	79	78	159	NE	AF paroks.
26311	ž	2,3	33	1925	86	70	165	NE	AF paroks.
26312	ž	2,7	30	1928	83	63	166	NE	Um.biol.zakl.
26316	m	2,6	42	1955	56	80	176	NE	Um.mitr.zakl.
26319	ž	2,4	37,5	1930	81	90	175	NE	AF kron.
26324	ž	2,3	18	1940	71	90	156	NE	AF kron.
26443	ž	2,1	13,5	1947	64	85	165	NE	AF kron.
26483	ž	2,8	12	1930	81	67	162	NE	AF kron.
26499	ž	2,2	12	1936	75	65	165	NE	VTE rec.(2x)
26516	ž	2,3	25,5	1931	80	100	170	NE	AF paroks.
26519	m	2,4	18	1949	62	101	184	NE	Um. aort. zakl.
26530	m	2,5	36	1938	73	110	180	NE	AF neopred.
26536	m	2,1	28,5	1935	76	96	172	NE	AF kron.
26541	m	2,5	51	1932	79	130	165	NE	AF kron.

26548	m	2,3	12	1930	81	66	160	NE	AF kron.
26549	ž	2,6	19,5	1928	83	71	164	NE	AF paroks.
26637	m	2,1	25,5	1928	83	72	165	NE	AF kron.
26671	m	2,2	22,5	1943	68	65	165	NE	AF paroks.
26706	m	2,4	18	1944	67	80	167	NE	AF kron.
26713	ž	2,3	24	1941	70	72	168	NE	AF paroks.
26734	ž	2,4	16,5	1926	85	70	162	NE	AF kron.
26737	ž	2	21	1938	73	72	165	NE	AF kron.
26740	ž	2,5	33	1932	79	67	162	NE	AF kron.
26993	ž	2,3	28,5	1935	76	75	170	NE	VT popl.D
27043	m	2,5	36	1929	82	80	175	NE	AF neoprend.
27105	m	2,6	22,5	1933	78	60	160	NE	AF kron.
27149	ž	2,6	10,5	1925	86	64	164	NE	AF neopred.
27171	m	2,9	42	1935	76	78	171	NE	PE
27239	ž	2,2	45	1917	94	59	165	NE	AF persistentna
27304	m	3	24	1928	83	90	165	NE	AF kron.
27308	ž	2,2	36	1924	87	80	168	NE	VT fem-popl.L
27343	ž	2,3	24	1926	85	80	170	NE	AF paroks.
27344	ž	2,2	7,5	1934	77	57	160	NE	AF kron.
27346	m	2,2	36	1955	56	90	178	NE	PE
27350	m	2,4	48	1939	72	76	170	NE	AF neopred.
27352	ž	2,9	39	1959	52	70	168	NE	Atrij septum defekt
27357	ž	2	28,5	1933	78	80	155	NE	AF kron.
27382	ž	2	34,5	1932	79	75	169	NE	AF kron.
27517	ž	2,6	16,5	1936	75	69	163	NE	AF paroks.
27587	ž	2,4	19,5	1924	87	72	164	NE	AF paroks
27589	ž	2,5	49,5	1926	85	50	150	NE	AF kron.
27591	m	3	27	1928	83	83	174	NE	AF paroks.
27596	ž	2,3	34,5	1949	62	85	150	NE	AF kron.
27597	ž	2,1	13,5	1923	88	76	167	NE	AF kron.
27616	ž	3,2	12	1946	65	83	165	NE	Um. mitr. zakl.
27622	ž	3	31,5	1968	43	62	156	NE	Um.mitr.zakl.
27630	m	2,6	51	1968	43	79	188	NE	Um.aort.zakl.
27631	ž	3	27	1951	60	68	165	NE	Antifosfolipidni sy
27725	m	2,7	13,5	1942	69	62	170	NE	PAOB-by-pass
27760	m	2,2	57	1972	39	80	176	NE	VTpopl.L, VTgol.L
27786	ž	2	21	1928	83	72	164	NE	AF neopred.
27792	m	2,6	42	1954	57	75	172	NE	Um.aort.zakl.
27817	ž	2,2	18	1926	85	70	165	NE	AF paroks.
27821	ž	2	16,5	1929	82	78	166	NE	AF kron.
27829	m	2,7	22,5	1944	67	65	165	NE	AF kron.
27830	ž	2,4	25,5	1958	53	75	169	NE	VT fem-popl-L
27832	m	2,5	28,5	1924	87	80	175	NE	AF kron.
27846	ž	2,3	19,5	1931	80	74	166	NE	AF kron.
27849	m	2,4	33	1946	65	100	178	NE	AF kron.
27854	ž	2,5	39	1925	86	68	164	NE	AF kron.
27855	m	2,5	22,5	1927	84	113	168	NE	PE
27868	m	2,6	34,5	1941	70	73	172	NE	AF paroks.

PRILOGA 5

Število meritev INR v letu 2011	PACIENT	CYP4F2	VKORC1	CYP2C9
7	27830	1	2	11
7	27855	1	2	11
8	5840	1	2	11
9	4790	1	2	11
9	25892	1	2	11
9	26316	1	2	11
9	26516	1	2	11
10	26549	1	2	11
10	27596	1	2	11
11	5559	1	2	11
11	24812	1	2	11
11	25118	1	2	11
11	25623	1	2	11
11	26671	1	2	11
11	27760	1	2	11
12	5799	1	2	11
12	17433	1	2	11
12	27343	1	2	11
13	4675	1	2	11
13	17383	1	2	11
13	26219	1	2	11
13	26251	1	2	11
13	26319	1	2	11
14	24844	1	2	11
14	26210	1	2	11
14	27352	1	2	11
15	4781	1	2	11
15	4786	1	2	11
15	5065	1	2	11
15	27517	1	2	11
16	5038	1	2	11
16	5898	1	2	11
16	6898	1	2	11
16	27304	1	2	11
16	27849	1	2	11
17	4922	1	2	11
19	5036	1	2	11
20	4600	1	2	11
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*1-VKORC1GA</i>				

Število meritev INR v letu 2011	PACIENT	CYP4F2	VKORC1	CYP2C9
6	27239	1	1	11
8	24877	1	1	11
8	26307	1	1	11
9	25955	1	1	11
9	26993	1	1	11
10	25573	1	1	11
10	27350	1	1	11
10	27817	1	1	11
11	4590	1	1	11
11	5471	1	1	11
11	7084	1	1	11
12	4762	1	1	11
12	26706	1	1	11
13	17267	1	1	11
14	26740	1	1	11
15	7071	1	1	11
15	7215	1	1	11
16	6373	1	1	11
17	24884	1	1	11
20	26256	1	1	11
11	5104	.	1	11
13	6366	.	1	11
15	6804	.	1	11
20	6117	.	1	11
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*1-VKORC1GG</i>				
6	5863	2	1	11
6	27854	2	1	11
8	27171	2	1	11
9	17357	2	1	11
9	26055	2	1	11
11	27308	2	1	11
12	7192	2	1	11
12	17718	2	1	11
12	26258	2	1	11
14	26218	2	1	11
15	5035	2	1	11
18	5064	2	1	11
19	5557	2	1	11
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*1-VKORC1GG</i>				
7	5892	3	1	11
9	4724	3	1	11
15	27382	3	1	11
<i>CYP4F2*3*3-CYP2C9*1*1-VKORC1GG</i>				

Število meritev INR v letu 2011	PACIENT	CYP4F2	VKORC1	CYP2C9
7	27792	2	2	11
8	25588	2	2	11
9	26274	2	2	11
9	26308	2	2	11
9	26536	2	2	11
10	6166	2	2	11
10	6334	2	2	11
10	27043	2	2	11
11	6089	2	2	11
11	26530	2	2	11
11	27346	2	2	11
11	27786	2	2	11
12	5491	2	2	11
13	4697	2	2	11
13	26713	2	2	11
14	5893	2	2	11
14	25040	2	2	11
14	27357	2	2	11
15	4739	2	2	11
15	26541	2	2	11
16	17340	2	2	11
16	24897	2	2	11
18	7046	2	2	11
19	4571	2	2	11
26	4676	2	2	11
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*1-VKORCIGA</i>				
13	17382	3	2	11
<i>CYP4F2*3*3-CYP2C9*1*1-VKORCIGA</i>				
3	5469	.	2	11
11	5090	.	2	11
3	5727	1	3	11
8	26309	1	3	11
9	4932	1	3	11
9	6128	1	3	11
10	5548	1	3	11
10	6057	1	3	11
10	17427	1	3	11
11	5798	1	3	11
11	7235	1	3	11
11	26499	1	3	11
11	26519	1	3	11
11	27149	1	3	11
14	27622	1	3	11
15	17394	1	3	11
16	6833	1	3	11
17	25110	1	3	11
19	5097	1	3	11
19	7055	1	3	11
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*1-VKORCIAA</i>				

Števílo merítev INR v letu 2011	PACIENT	CYP4F2	VKORC1	CYP2C9
9	27587	2	3	11
10	6092	2	3	11
10	25594	2	3	11
10	26324	2	3	11
10	27589	2	3	11
11	27616	2	3	11
13	6377	2	3	11
15	5850	2	3	11
16	26483	2	3	11
18	17341	2	3	11
21	4670	2	3	11
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*1-VKORCIAA</i>				
9	25100	1	1	12
10	17419	1	1	12
10	26637	1	1	12
11	5077	1	1	12
14	5021	1	1	12
17	4933	1	1	12
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*2-VKORCIGG</i>				
10	6314	2	1	12
11	27105	2	1	12
12	6810	2	1	12
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*2-VKORCIGG</i>				
9	26053	1	2	12
11	5843	1	2	12
11	26032	1	2	12
13	27631	1	2	12
14	17417	1	2	12
15	5821	1	2	12
15	27591	1	2	12
19	6345	1	2	12
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*2-VKORCIGA</i>				
9	26249	2	2	12
10	27630	2	2	12
11	27832	2	2	12
13	5075	2	2	12
15	5507	2	2	12
15	26443	2	2	12
17	17381	2	2	12
20	27344	2	2	12
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*2-VKORCIGA</i>				
11	6123	3	2	12
<i>CYP4F2*3*3-CYP2C9*1*2-VKORCIGA</i>				
11	6115	1	3	12
12	26031	1	3	12
17	26548	1	3	12
20	27868	1	3	12
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*2-VKORCIAA</i>				

Število meritev INR v letu 2011	PACIENT	CYP4F2	VKORC1	CYP2C9
9	25137	2	3	12
17	6088	2	3	12
20	17407	2	3	12
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*2-VKORCIAA</i>				
9	26312	1	1	13
11	5902	1	1	13
11	26310	1	1	13
14	5901	1	1	13
14	27846	1	1	13
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*3-VKORCIGG</i>				
13	5118	2	1	13
13	5874	2	1	13
15	27829	2	1	13
<i>CYP4F2*1*2-CYP2C9*1*3-VKORCIGG</i>				
11	25604	1	2	13
13	6163	1	2	13
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*3-VKORCIGA</i>				
12	25644	2	2	13
15	27725	2	2	13
17	4978	2	2	13
17	26311	2	2	13
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*1*3-VKORCIGA</i>				
12	17429	3	2	13
<i>CYP4F2*3*3-CYP2C9*1*3-VKORCIGA</i>				
7	26305	1	3	13
11	6813	1	3	13
11	17386	1	3	13
12	4971	1	3	13
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*1*3-VKORCIAA</i>				
12	26737	2	1	22
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*2*2-VKORCIGG</i>				
18	26734	1	2	22
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*2*2-VKORCIGA</i>				
10	27597	2	3	22
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*2*2-VKORCIAA</i>				
9	6079	1	1	23
10	25547	1	1	23
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*2*3-VKORCIGG</i>				
10	27821	2	1	23
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*2*3-VKORCIGG</i>				
8	25392	1	2	23
15	25542	1	2	23
<i>CYP4F2*1*1-CYP2C9*2*3-VKORCIGA</i>				
15	25390	2	2	23
17	5809	2	2	33
10	5059	2	3	33
<i>CYP4F2*1*3-CYP2C9*3*3-AA</i>				