

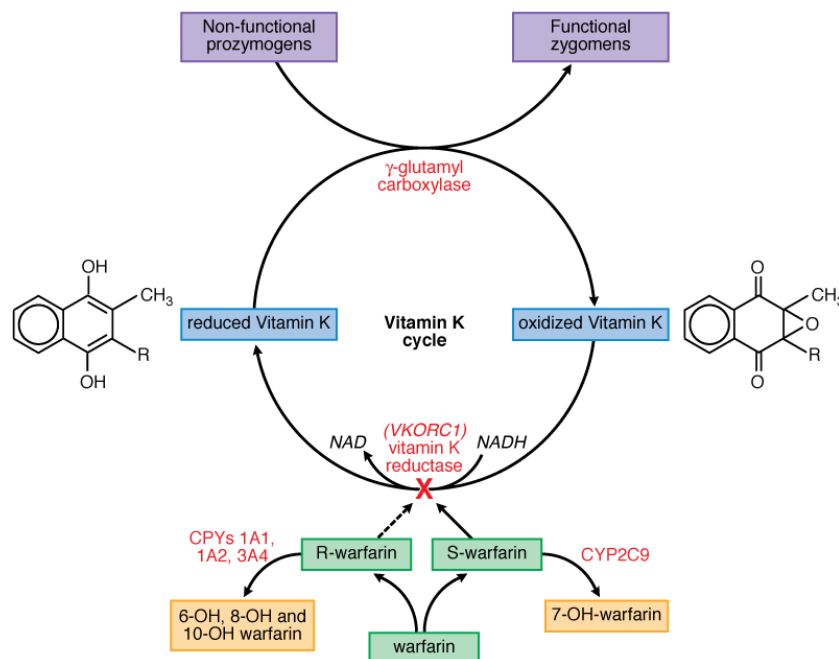
دکتر حبیب‌اله گل‌افشان عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

پایش آزمایشگاهی مقاومت دارویی به داروهای رایج ضد لخته‌گی در بیماران قلبی و عروقی

قسمت دوم

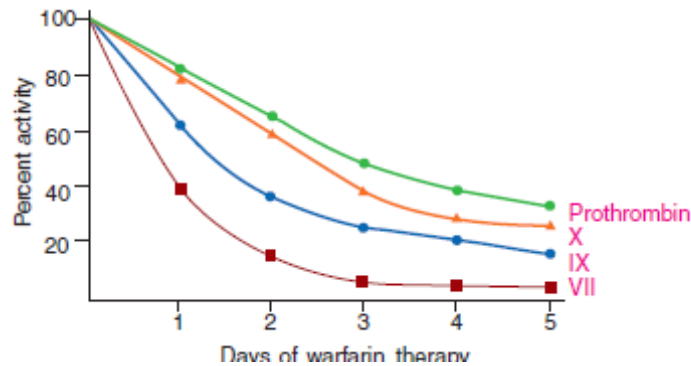
وارفارین:

وارفارین یک ضد انعقاد خوراکی و مخلوطی راسمیک از ایزومرهای S,R می‌باشد که در این راستا ایزومر S توانایی بیشتری برای ضد لخته‌گی دارد. وارفارین با ممانعت از عملکرد آنزیم احیاگر ویتامین K یا  $VKOR$  (Vitamin K epoxide reductase) خاصیت ضد انعقادی خود را ایفا می‌کند. گفتنی است که فاکتورهای انعقادی ۲، ۷، ۹، ۱۰ و پروتئین‌های  $Z, S, C$  که تنظیم‌گر سیستم انعقاد بوده و نقش مهمی در جلوگیری از گسترش انعقاد دارند برای کارآمد شدن نیاز به ویتامین K دارند. آنزیم کاربوکسیلاز کبدی در همراهی با ویتامین K به فرم احیا شده یک گروه کربوکسیل ( $\gamma$ -Carboxylation) را به واحدهای مخصوص گلوتامیک اسید در فاکتورهای وابسته به ویتامین K پیوند داده و از این رو واحدهای ویژه گلوتامیک اسید که خود دارای یک گروه کربوکسیل هستند دارای یک گروه کربوکسیل اضافی دیگر می‌گردند و در نتیجه هر واحد گلوتامیک اسید دارای دو شارژ منفی می‌شود (میدان GLA) و امکان پیوند فاکتورهای وابسته به ویتامین K با کمپلکس سطوح فسفولیپیدی با یون کلسیم ( $Ca^{++}/phospholipid$ ) را در پروسه انعقاد فراهم می‌سازد. این پروسه جهت انعقاد خون ضروری بوده و چنانچه اختلال در کربوکسیلاسیون فاکتورهای فوق رخ دهد سیستم انعقاد خون غیر کارآمد می‌گردد. ویتامین K در فرایند کربوکسیلاسیون به شکل اکسیده شده در می‌آید که دوباره توسط آنزیم  $VKOR$  احیا شده و چرخه ادامه می‌یابد. داروی وارفارین با ممانعت از آنزیم  $VKOR$  و احتباس ویتامین K در شکل اکسید شده از کربوکسیلاسیون فاکتورهای وابسته به ویتامین K جلوگیری کرده و فاکتورهای ۲، ۷، ۹ و ۱۰ را غیر کارآمد می‌کند.



فاکتورهای انعقادی ۲، ۷، ۹ و ۱۰ و پروتیین‌های تنظیم‌کننده انعقاد (پروتیین‌های **C,S,Z**) وابسته به ویتامین K می‌باشند. بدین مفهوم که برای کارآمد شدن نیازمند به افزایش یک گروه کربوکسیل به ۱۲ تا ۱۸ واحد اسید گلوتامیک در یک آرایش خطی در پایانه‌ی آمینی هستند. فرآیند کربوکسیلاسیون واحدهای اسید گلوتامیک تولید میدانی به نام GLA می‌باشد که در آن هر گلوتامیک اسید دارای دو شارژ منفی است و فاکتورها را قادر می‌سازد تا از طریق یون  $Ca^{2+}$  با سطوح فسفولیپیدی آنیونیک ارتباط برقرار کند. واکنش کربوکسیلاسیون توسط آنزیم کربوکسیلاز کبدی صورت می‌گیرد و ویتامین K بصورت احیا شده کوفاکتور آن می‌باشد. در این فرآیند ویتامین K به فرم اکسیدشده یا اپوکسی در می‌آید که توسط آنزیم ردوکتاز کبدی دوباره احیا و در چرخه قرار می‌گیرد. وارفارین با تداخل در احیای دوباره ویتامین K از کارآمد شدن فاکتورهای وابسته به ویتامین K جلوگیری کرده و فاکتورهای انعقادی خون را رقیق می‌کند.

اثرات ضد لختگی وارفارین با سنجش زمان پروترومبین (PT) است. آزمایش زمان پروترومبین مسیر خارجی انعقاد را ارزیابی می‌کند و با توجه به اینکه سه فاکتور از ۴ فاکتور وابسته به ویتامین K (۷، ۲ و ۱۰) در این مسیر قرار دارند از این رو آزمایشی مناسب جهت ارزیابی اثرات ضد لختگی وارفارین است. وارفارین به سرعت فاکتور ۷ را به علت کوتاه‌ترین نیم‌عمر بیولوژیک (۴ تا ۶ ساعت) ناکارآمد می‌کند و از آن پس فاکتور ۱۰ با نیم‌عمر ۲۴ تا ۴۸ ساعت و فاکتور ۲ با نیم‌عمر ۷۲-۴۸ ساعت را ناکارآمد می‌کند. از این رو اثرات کامل وارفارین برای رسیدن به سطح یکنواخت ضد انعقادی پس از ۴ تا ۶ روز از شروع درمان مشخص می‌شود. طولانی شدن اولیه زمان PT با شروع درمان ناشی از افت سریع فاکتور ۷ می‌باشد.



با شروع درمان وارفارین سطح فاکتور ۷ پس از ۶ ساعت به حدود ۵۰٪ افت می‌کند و آزمایش PT طولانی می‌شود. ولی اثرات کامل وارفارین پس از ۳ تا ۵ روز از شروع درمان که تمام فاکتورهای وابسته به ویتامین K کاهش یافتند ظاهر می‌گردد. اولین آزمایش PT حدود ۲۴ ساعت پس از درمان انجام می‌شود و از آن پس روزانه تکرار می‌شود تا زمانی که حداقل دو جواب پشت سرهم در طیف درمانی باشد و از آن پس هر ۴ تا ۱۲ هفته تا پایان درمان نیاز به چک کردن آزمایش است. برای یک حادثه ترومبوز درمان تا ۶ ماه و جلوگیری از سکته مغزی و فیبریلاسیون دهلیزی درمان به صورت نامحدود ادامه می‌یابد.

وارفارین اثرات ضدانعقادی خود را از طریق آنتاگونیست با ویتامین K ایجاد می‌کند و یک داروی مهم در جلوگیری از پدیده‌های ترومبوآمبولی در بیماران مستعد به لخته‌گی عروقی و نیز جلوگیری از پدیده‌های ترومبوآمبولی ناشی از فیبریلاسیون دهلیزی و دریچه مصنوعی در قلب می‌باشد. وارفارین در پیشگیری از آمبولی بعد از سکته قلبی و نیز کاهش عود سکته قلبی کاربرد دارد.



کاربرد های گسترده وارفارین

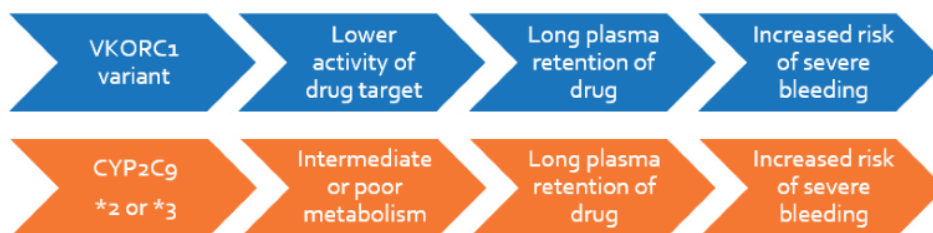
اثرات ضد انعقادی وارفارین وابسته به ژنتیک شخص بوده و فاکتورهایی مانند جنس، سن و وزن پیش‌بینی کننده ضعیف درمان هستند. ژن‌های کنترل کننده فعالیت و متابولیسم وارفارین بیش از ۵۰٪ نوسان اثر وارفارین را در بین بیماران عهده‌دار می‌باشند. وارفارین با هدف قرار دادن آنزیم VKORC1 اثرات ضدانعقادی خود را اعمال کرده و آنزیم CYP2C9 با متابولیسم وارفارین سطح دارویی را تنظیم می‌کند. ایزومر S وارفارین توسط آنزیم CYP2C9 و ایزومر R آن توسط آنزیم‌های CYP1A2 و CYP3A4 متابولیزه و از بدن پاکسازی می‌شوند. سه پلی‌مورفیسم تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) که دو تای آن در ژن CYP2C9 و یکی در ژن VKORC1 رخ می‌دهد دارای اثرات کلیدی در تعیین دوزاژ وارفارین می‌باشند. گونه نرمال و اصلی (Wild type) آنزیم CYP2C9 را با نشانه 1\* و پلی‌مورفیسم‌های دیگر با نشانه 2\* و 3\* علامت‌گذاری می‌شود. هر شخص می‌تواند دو آلل از پلی‌مورفیسم‌های مختلف (SNP) را مانند 1\*/1\* یا 3\*/1\* یا 3\*/3\* و غیره را به ارث ببرد. شیوع پلی‌مورفیسم‌ها در نژادها و جمعیت‌های مختلف یکسان نمی‌باشد.

CYP2C9			VKORC1 -1639G>A		
Alleles	N	Frequency (%)	Alleles	N	Frequency (%)
CYP2C9*1	208	93.7	VKORC1 G	206	92.8
CYP2C9*2	9	4.1	VKORC1 A	16	07.2
CYP2C9*3	5	2.2			
Genotype					
CYP2C9 1/1	98	88.3	VKORC1 GG	98	88.3
CYP2C9 ½	8	7.2	VKORC1 AG	10	9.0
CYP2C9 1/3	4	3.6	VKORC1 AA	3	2.7
CYP2C9 2/3	1	0.9			

### فراوانی پلی‌مورفیسم‌های CYP2C9 و VKORC1

پلی‌مورفیسم CYP2C9\*1 به وارفارین حساس بوده و به طور طبیعی آنرا متابولیزه می‌کند در حالی که سرعت متابولیسم وارفارین با گونه 2\* تا ۳۰٪ و در گونه 3\* تا ۹۰ درصد کاهش می‌یابد. از این‌رو در واریان‌های 2\* و 3\* با توجه به کاهش سرعت متابولیسم نیاز به دوزاژ کمتر و پیگیری بیشتری با آزمایش PT/INR می‌باشد.

- CYP2C9\*1-wild-type genotype
- CYP2C9\*2  
– metabolism rate ~50-70% of wild-type
- CYP2C9\*3  
– Metabolism rate ~5-10% of wild-type
- Patients with CYP2C9\*2 or CYP2C9\*3 variants require lower warfarin maintenance doses and have higher risk of bleeding during initiation of therapy



وراثت گونه های \*2 و \*3 موجب انباشتگی وارفارین در بدن و افزایش نا متناسب PT/INR و میل به خونریزی می‌گردد.

آنزیم VKORC1 دارای دو پلی مورفیسیم مهم A و G می‌باشد. آلل A یا هاپلوتیپ A مقدار کمتری از آنزیم VKOR را نسبت به الل G تولید می‌کند و از این رو دوزاژ وارفارین کمتری برای جلوگیری از عملکرد آن لازم است.

### Three polymorphic variants of VKORC1

- Non-A,Non-A : wild type – Requiring more warfarin dose
- Non-A/A : Heterozygous – Requiring 25% dose reduction
- A/A : Homozygous - Requiring 50% dose reduction

تنظیم دوزاژ وارفارین با توجه به پلی مورفیسیم‌های آنزیم احیاگر ویتامین K (VKORC1)

بیماران با هاپلوتیپ های CYP2C9\*2 و C9YP2C9\*3 به طور میانگین به ترتیب به کاهش ۱۹٪ و ۳۳٪ به ازای هر الل نسبت به الل \*1 دارند. وراثت هاپلوتیپ A از ژن VKORC1 به طور میانگین نیاز به کاهش ۲۸٪ در دوزاژ وارفارین به ازای هر الل نسبت به افرادی که الل A ندارند می‌باشد.

درمان استاندارد وارفارین در بیمار با الل های \*2 و \*3 و نیز الل A با پاسخ آزمایشگاهی PT/INR خارج از طیف درمانی (INR>4) بروز می‌کند. فنوتیپ‌های G/G و \*1/\*1 حساسیت کمتری به وارفارین داشته و برای دستیابی به INR مطلوب نیاز به افزایش دوزاژ وارفارین نسبت به حالت استاندارد دارند. به نظر می‌رسد تنظیم وارفارین بر اساس فارموژنتیک زمانی لازم است که بیمار به صورت طولانی مدت پاسخ غیرمنتظره و نامتناسب با آزمایش PT/INR بدهد. بیمارانی که با دو دوزاژ وارفارین، PT/INR بیشتر از ۱/۵ می‌گردد، ممکن است در گروه متوسط تا خفیف حساس به وارفارین باشند و به دوزاژ کمتری نسبت به استاندارد درمان نیاز داشته باشند.

داروهای گوناگون با تحریک آنزیم CYP2C9 و یا افزایش سرعت پاک‌سازی و یا کندکردن سرعت پاک‌سازی روی غلظت وارفارین اثر می‌گذارند برای مثال استفاده از چای سبز، آووکادو و سبزیجات با برگ‌های پهن یک منبع غنی از ویتامین K بوده و موجب کاهش اثر وارفارین می‌گردد و یا آنتی‌بیوتیک‌ها با کاهش دادن فلورهای روده که منبع تولید ویتامین K می‌باشند موجب تقویت

اثر وارفارین می‌گردند. به نظر می‌رسد که معرفی بعضی از داروها برای پزشک و مسئول فنی آزمایشگاه برای تفسیر نتیجه PT/INR ضروری می‌باشد.

INHIBITION OF WARFARIN EFFECT	
<b>Antiinfectives</b>	Griseofulvin Nafcillin Ribavirin Rifampin
<b>Cardiovascular drugs</b>	Cholestyramine
<b>Analgesics, antiinflammatories, and immunologics</b>	Mesalamine
<b>CNS drugs</b>	Barbiturates Carbamazepine
<b>GI drugs and foods</b>	High vitamin K-content foods/enteral feeds Avocado (large amounts)
<b>Herbal supplements</b>	
<b>Other drugs</b>	Mercaptopurine

مهم‌ترین داروهایی که اثر وارفارین را کاهش داده و موجب کاهش PT/INR می‌گردند

Highly Probable	
POTENTIATION OF WARFARIN EFFECT	
<b>Antiinfectives</b>	Ciprofloxacin Cotrimoxazole Erythromycin Fluconazole Isoniazid (600 mg daily) Metronidazole Miconazole oral gel Miconazole vaginal suppositories Voriconazole

مهم‌ترین داروهای ضد میکروبی و ضد قارچی که اثرات وارفارین را افزایش داده و موجب افزایش PT/INR حتی به دو تا سه برابر می‌گردند

<b>Cardiovascular drugs</b>	Amiodarone Clofibrate Diltiazem Fenofibrate Propafenone Sulfinpyrazone (biphasic with later inhibition)
<b>Analgesics, antiinflammatories, and immunologics</b>	Phenylbutazone Piroxicam

مهم‌ترین داروهای قلبی و ضدالتهابی که اثرات وارفرارین را افزایش داده و موجب افزایش PT/INR می‌شوند

<b>CNS drugs</b>	Alcohol (if concomitant liver disease) Citalopram Entacapone Sertraline
<b>GI drugs and foods</b>	Cimetidine Fish oil Mango Omeprazole
<b>Herbal supplements</b>	Boldo-fenugreek Quilinggao
<b>Other drugs</b>	Anabolic steroids Zileuton

مهم‌ترین داروهای عصبی و گوارشی که اثرات وارفرارین را افزایش داده و موجب افزایش PT/INR می‌شوند

Dietary Supplement	Effects on Coagulation		
Echinacea	None reported	St. John's wort	May cause irregular menstrual bleeding when taken with oral contraceptives
Ginseng	Possible antiplatelet activity May increase or decrease INR when taken with warfarin	Peppermint	None reported
Ginkgo biloba	Possible antiplatelet activity May increase risk of bleeding when taken with warfarin	Fish oils/omega-3 fatty acids	Possible antiplatelet activity May increase INR when taken with warfarin
Garlic	Possible antiplatelet activity May increase INR when taken with warfarin	Ginger	Possible antiplatelet activity May increase INR when taken with warfarin
Glucosamine	When taken alone, no reported effects on coagulation When combined with chondroitin, may increase INR when taken with warfarin	Soy	Possible antiplatelet activity May decrease INR when taken with warfarin

INR, International normalized ratio.



مهمترین داروهای گیاهی اثرگذار بر سیستم انعقادی که احتمال تداخل آنها در تست‌های آزمایشگاهی می‌باشد

معرف فاکتور بافتی که در آزمایش PT به کار می‌رود، بر اساس منبع دارای حساسیت متفاوتی در کمبود فاکتورهای مسیر وابسته به ویتامین K است. درجه حساسیت معرف فاکتور بافتی با

ISI (International Sensitivity index) یا نشانه حساسیت بین‌الملل مشخص می‌شود. معرف PT با ISI کمتر از 1.4 (بین 1-1.4) بسیار حساس و بین 1.4 تا 1.7 دارای حساسیت متوسط و بیشتر از 2 دارای حساسیت کم است. وقتی گفته می‌شود حساسیت معرف PT برای مثال ISI=1.2 است، بدین مفهوم است که آزمایش PT در کمبود فاکتورهای انعقادی به سرعت طولانی می‌شود، برای مثال اگر PT بیماری با ISI=2 برابر 17 ثانیه باشد با ISI=1 ممکن است حدود 25 تا 30 ثانیه گردد.

چنانچه گزارش آزمایش PT بر مبنای INR (نسبت همسو شده بین‌الملل) باشد وابستگی آزمایش PT به حساسیت معرف از بین می‌رود، برای محاسبه INR نسبت PT بیمار بر حسب ثانیه به میانگین PT پلاسمای نرمال به توان ISI می‌رسد. هنگامی که PT بیمار بر اساس INR گزارش شود مثل این است که نسبت PT بیمار به کنترل با معرف PT مرجع بین‌الملل انجام شده است.



Reagent A: ISI = 1.24, mean normal = 12.6 sec  
PT = 22 sec

$$INR = \left( \frac{22.0}{12.6} \right)^{1.24} = 2.0$$

Reagent B: ISI = 2.46, mean normal = 12.2 sec  
PT = 16.2 sec

$$INR = \left( \frac{16.2}{12.2} \right)^{2.46} = 2.0$$

**INTERNATIONAL NORMALISED RATIO (INR)**

$$INR = \left[ \frac{[PT_{pt}]}{[PT_{Ref}]} \right]^{ISI}$$

PT<sub>pt</sub> – prothrombin time of patient  
PT<sub>Ref</sub> – prothrombin time of normal pooled sample  
ISI – International Sensitivity Index

آزمایش PT بیمار با دو معرف PT که یکی دارای ISI=1.24 و دیگری دارای ISI=2.46 بوده است انجام شده است. همان طور که مشاهده می شود جواب PT/INR برای هر دو معرف یکسان بوده و وابستگی آن به حساسیت معرف از بین رفته است. توجه داشته باشید که معرف PT با ISI نزدیک به یک در کمبود فاکتورهای انعقادی طولانی تر از معرف PT با ISI بالاتر از 2 میگردد. (۱۶/۲ ثانیه در مقابل ۲۲ ثانیه)

سازمان بهداشت جهانی معرف PT شرکت سازنده را با معرف مرجع که از مغز انسان تهیه و دارای ISI یک است مقایسه کرده و ضریب ISI را به معرف شرکت سازنده می دهد. ضریب ISI ممکن است به صورت عمومی و یا با توجه به نوع تجهیزاتی که آزمایش با آن انجام می شود اختصاصی باشد.

**EFFECTS OF DIFFERENT THROMBOPLASTINS ON THE PROTINE AND INR**

Thromboplastin	ISI	Patient's PT	Mean Normal PT	PT Ratio	INR
A	1.02	29.7	12.1	2.45	2.5
B	1.35	23.8	12.1	1.97	2.5
C	1.57	22.5	12.5	1.80	2.5
D	2.08	18.0	11.6	1.55	2.5
E	2.08	19.4	12.5	1.55	2.5
F	2.40	16.2	11.0	1.47	2.5

در جدول فوق از یک نمونه پلاسمای بیمار که روی درمان با وارفارین بوده است با شش نوع معرف PT که دارای ISI های متفاوت از ۱/۰۲ تا ۲/۴ بوده است آزمایش PT انجام گرفته و جواب های آزمایش از ۲۹/۷ ثانیه تا ۱۶/۲ ثانیه متغیر بوده است و این تفاوت ناشی از تفاوت در حساسیت معرف PT است. بدین مفهوم که معرف PT با ISI نزدیک به یک در کمبود فاکتورهای انعقادی بسیار طولانی و با ISI بالا چندان طولانی نمی گردند ولی جواب INR برای معرف های PT با حساسیت های مختلف یکسان است.

پلی مرفیسمی از فاکتور هفت به نام فاکتور هفت Padua وجود دارد که تنها با فاکتور بافتی انسانی در پروسه انعقاد شرکت می کند و پاسخ PT نرمال با معرف بافتی انسانی می دهد در حالی که با استفاده از فاکتور بافتی تهیه شده از خرگوش جواب طولانی بدست می دهد. سفارش می شود که جهت آزمایش روتین PT برای بیمارانی که چک آپ می شوند و یا عمل جراحی دارند و وارفارین مصرف نمی کنند از معرف PT با حساسیت متوسط حدود ۱/۷ استفاده شود، در غیر این صورت استفاده از PT با ISI نزدیک به یک جواب PT را حتی در مواردی که کمبود فاکتورهای انعقادی جزئی بوده و ارزش بالینی ندارد طولانی کرده و اقدام به تزریق غیر ضروری پلاسما می گردد. گفتنی است که سطح فاکتورهای انعقادی حدود ۲۰٪ تا ۵۰٪ برای ثبات انعقادی کافی است.



با مصرف وارفارین سطح پروتیین های تنظیم گر انعقاد خون که جلوگیری از گسترش انعقاد می کنند کاهش می یابد که در این میان پروتیین C که نیمه عمر حدود ۶ ساعت دارد و وابسته به ویتامین K است دارای اهمیت ویژه است. با کاهش پروتیین های تنظیم گر در ۲ تا ۳ روز اول از شروع درمان با وارفارین بیمار در خطر ابتلا به ترومبوز قرار می گیرد و از این رو درمان با وارفارین گاهی برای ۵ روز اول با هپارین همراه می گردد. رعایت نکردن این روند درمانی به ویژه در بیماران با کمبود پروتیین C موجب نکروز پوستی ناشی از وارفارین (warfarin skin necrosis) گردیده که یک واکنش شدید ترومبوتیک پوست همراه با خارش شدید است که نیاز به برداشتن بافت های مرده (debridement) با جراحی است.

بیماران مبتلا به ترومبوز عروق عمقی (DVT) که برای مدت ۷ تا ۱۰ روز هپارین درمانی می شوند بایستی چند روز قبل از قطع هپارین داروی وارفارین نیز همزمان تجویز شود و با قرار گرفتن PT/INR در سطح درمانی، تجویز هپارین قطع گردیده و مصرف وارفارین ادامه می یابد. با توجه به اینکه هپارین می تواند آزمایش PT را طولانی کند سفارش می شود که در این گونه موارد از کیت های PT حاوی جاذب هپارین یا با آنزیم هپاریناز استفاده شود تا بتوان میزان PT را تنها با توجه به سطح دارویی وارفارین بدست آورد.