
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Eficiența anticoagulantelor de generație nouă în profilaxia evenimentelor trombotice asociate fibrilației atriale

Doctorand **Adela-Nicoleta Popa (căs. Roșian)**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	13
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	15
1. Fibrilația atrială și riscul tromboembolic	17
1.1. Trombogeneza	17
1.2. Stratificarea riscului de apariție a accidentului vascular cerebral	18
2. Tratamentul anticoagulant	20
2.1. Anticoagulantele de generație nouă	20
2.2. Indicațiile administrării anticoagulantelor de generație nouă la pacienții cu fibrilație atrială nonvalvulară	23
2.3. Alegerea tratamentului anticoagulant	24
3. Glicoproteina P și interacțiunile medicamentoase	26
4. Carboxilesteraza 1	28
5. Farmacogenetica	30
5.1. Importanța farmacogeneticii	30
5.2. Farmacogenetica anticoagulantelor de generație nouă	31
5.3. Utilitatea clinică a testelor genetice în tratamentul cu NOAC	33
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	35
1. Ipoteza de lucru/obiective	37
Obiective generale:	38
2. Metodologie generală	39
2.1. Lotul de studiu	39
2.2. Evaluarea clinică	40
2.3. Analizele de laborator	42
2.4. Analiza statistică	43
3. Studiu 1. Corelații genotip-fenotip: variabilitatea plasmatică a dabigatranului	45
3.1. Introducere	45
3.2. Ipoteza de lucru	46
3.3. Material și metodă	46
3.4. Rezultate	46
3.5. Discuții	51
3.6. Concluzii	54

4. Studiu 2. Influența factorilor clinici și genetici asupra variabilității interindividuale a concentrațiilor plasmatice ale apixabanului	57
4.1. Introducere	57
4.2. Ipoteza de lucru	58
4.3. Material și metodă	58
4.4. Rezultate	59
4.5. Discuții	62
4.6. Concluzii	65
5. Studiu 3. Eficiența anticoagulantelor non-vitaminice K și riscul hemoragic la pacienții cu fibrilație atrială – rolul polimorfismelor genetice	67
5.1. Introducere	67
5.2. Ipoteza de lucru	68
5.3. Material și metodă	68
5.4. Rezultate	69
5.4.1. Evoluția clinică	69
5.4.2. Analiza genotipurilor	74
5.4.3. Analiza haplotipurilor <i>ABCB₁</i>	77
5.5. Discuții	78
5.6. Concluzii	84
6. Discuții generale	85
6.1. Variațiile genetice ale <i>ABCB₁</i> și farmacocinetica NOAC	86
6.2. Variațiile genetice ale <i>CES₁</i> și farmacocinetica NOAC	87
6.3. Variabilitatea concentrațiilor plasmatice și factorii nongenetici care o influențează	89
6.4. Evoluția clinică	92
7. Concluzii generale	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE (273 de cote bibliografice)	101

Cuvinte cheie: anticoagulante orale non-vitaminice K, dabigatran, apixaban, carboxilesteraza 1, glicoproteina P, polimorfisme genetice uninucleotidice, polimorfismele *ABCB₁*, polimorfismele *CES₁*, concentrațiile plasmatice ale dabigatranului, concentrațiile plasmatice ale apixabanului, cromatografie de lichide de ultraperformanță cuplată cu spectrometrie de masă.

Introducere

Fibrilația atrială reprezintă o problemă importantă de sănătate publică. Prin complicațiile sale trombotice afectează calitatea vieții și supraviețuirea, implică costuri importante pentru sistemele sanitare. Anticoagulatele ocupă un loc central în tratamentul pacienților cu fibrilație atrială deoarece sunt singurele clase de medicamente care și-au dovedit eficiența în prevenirea complicațiilor trombotice.

Ultimul deceniu a cunoscut o schimbare majoră în terapia anticoagulantă orală, astfel că, în prezent, opțiunile terapeutice pentru profilaxia trombotică în fibrilația atrială nonvalvulară, includ două clase de medicamente care inhibă direct factorii coagulării, cunoscute sub denumirea de anticoagulante orale non-vitaminice K (NOAC). Deși sunt considerate în prezent eficiente și sigure, NOAC prezintă și o serie de neajunsuri legate de existența variabilității concentrației plasmatică, lipsa unor parametri pentru monitorizarea de rutină a efectelor anticoagulante (în special la pacienții cu risc crescut de hemoragie sau în cazul supradozajului), accesul dificil la agenții specifici de reversibilitate și de complianța pe termen lung a pacienților. Individualizarea dozelor de NOAC este un subiect extrem de dezbătut în ultimii ani. Se presupune că cel mai mult ar beneficia de aceasta pacienții cu multipli factori care interferă și determină un răspuns anticoagulant inadecvat.

Achizițiile din domeniul farmacogeneticii au conturat conceptul de testare genetică prognostică care are ca și scop asocierea tratamentului unui profil genetic individual pentru a crește la maxim eficiența acestuia și/sau a reduce semnificativ riscul apariției reacțiilor adverse. Numărul studiilor actuale de farmacogenetică dedicate NOAC este limitat. Rezultatele acestora sunt puține, heterogene și uneori discordante.

Contribuția personală

Teza cuprinde trei studii prospective observaționale care s-au desfășurat în paralel. Din contribuțiile personale au fost publicate trei articole: două în reviste cotate ISI (*Genes, Journal of Personalized Medicine*) și un articol BDI (*HVM Bioflux*).

S-a demonstrat că în cazul tuturor NOAC există o variabilitate interindividuală a răspunsului la tratament determinată de diverși factori dintre care un loc important ar putea să îl ocupe polimorfismele uninucleotidice (SNP - „*single nucleotide polymorphisms*”) ale genelor care codifică enzimele implicate în metabolizarea acestei clase de anticoagulante. Pornind de la această idee am ales tema actualei teze în dorința de a analiza factorii care influențează răspunsul individual la NOAC prin evaluarea caracteristicilor pacienților întâlniți în practica noastră clinică. Pacienții au fost recrutați dintr-un centru terțiar de urgențe cardiace a cărui activitate de rutină implică multiple proceduri invazive și intervenții chirurgicale cu risc hemarogic important. În absența testelor de monitorizare a nivelului anticoagulant este foarte importantă selectarea atentă, bazată pe cât mai multe caracteristici, a pacienților care pot beneficia de tratamentul cu NOAC.

Cele două NOAC prescrise cel mai frecvent la momentul începerii studiului au fost dabigatranul și apixabanul. Ambele administrate în doze fixe, de două ori pe zi, cu un timp de înjumătățire plasmatică similar, dar cu mecanism de acțiune și farmacocinetică diferite.

Metodologie generală:

Toți pacienții au fost evaluați inițial, cu ocazia unei vizite de includere în studiu, în perioada martie - decembrie 2017, din punct de vedere clinic, paraclinic și biologic și tuturor li s-au prelevat probe pentru determinarea genetica. Acestea au fost efectuate în laboratorul Departamentului de Genetică a UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca, utilizând kiturile comerciale disponibile. Genotiparea pentru determinarea statutului de purtător al SNP *ABCB1* s-a efectuat la toți pacienții și al SNP *CES1* doar la pacienții tratați cu dabigatran prin reacție de polimerizare în lanț cu detecție în timp real utilizând kituri comerciale achiziționate din fondurile Granturilor de Cercetare Doctorală ale UMF “Iuliu Hațieganu” PCD 2016 (Nr.7690/94/15.04.2016).

Pentru primele două studii am selectat două subloturi de pacienți care au fost evaluați în perioada aprilie-iunie 2017 și la care s-au determinat în plus concentrațiile plasmatice reziduale și de vârf ale dabigatranului și respectiv ale apixabanului. Determinarea cantitativă a concentrației plasmatice a dabigatranului și apixabanului a fost efectuată aplicând o metodă bazată pe cromatografie de lichide de ultraperformanță cuplată cu spectrometrie de masă (LC/MS/MS) în cadrul laboratorului Departamentului de Toxicologie, Facultatea de Farmacie, UMF „Iuliu Hațieganu” Cluj-Napoca. Standardele interne ([¹³C,²H⁷]-apixaban, [¹³C⁶]-dabigatran) au fost deasemenea achiziționate din Granturile de Cercetare Doctorală ale UMF “Iuliu Hațieganu” PCD 2016 (Nr.7690/94/15.04.2016).

De asemenea, întregul lot a fost urmărit ulterior, periodic, pe toată durata desfășurării studiilor, pentru aprecierea aderenței la tratament și identificarea apariției posibilelor complicații.

Studiu 1. Corelații genotip-fenotip: variabilitatea plasmatică a dabigatranului

Ipoteza:

Obiectivul studiului nostru a fost analizarea polimorfismelor genetice care codifică enzimele implicate în metabolizarea dabigatranului (*ABCB1* și *CES1*), relația lor genotip-fenotip și posibila asociere între profilul interindividual și evoluția pacienților cu FANV tratați cu dabigatran în condițiile practicii clinice curente.

Material și metodă:

Studiul monocentric, prospectiv, observațional, analitic a fost realizat din martie 2017 până în iunie 2019 în cadrul Institutului Inimii de Urgență „Niculae Stancioiu” Cluj-Napoca. Am inclus pacienți caucazieni cu FANV tratați cu dabigatran 150 mg de două ori pe zi. Pacienții au fost evaluați inițial într-o vizită de includere în studiu în perioada martie - iunie 2017. În cadrul acesteia, două probe de sânge de la nivelul venei antecubitale au fost obținute la 12 și respectiv 2 ore de la ultima doză de dabigatran (la orele 8:00 și 10:30). De asemenea, s-au prelevat probe pentru

determinările genetice și a celorlalți parametri biologici. Pacienții au fost urmăriți până în luna iunie 2019.

Rezultate

Au fost incluși în analiza finală 37 de pacienți cu mediana vârstei de 70,0 ani (interval: 62–77).

Dintre inhibitorii glicoproteinei P (gp-P) doar amiodarona a fost prescrisă asociat tratamentului cu dabigatran la 10,8% dintre pacienții incluși în studiu. Niciunul dintre pacienți nu a fost tratat cu verapamil sau chinidină. Inhibitorii pompei de protoni sau suplimentele alimentare au fost administrate sporadic cu mai mult de patru săptămâni înainte de prelevarea probelor sanguine.

Durata medie de urmărire, din momentul includerii în studiu, a fost de $17,74 \pm 3,01$ luni (limite: 12-24), însă pacienții au urmat tratament anterior, până la momentul recoltării concentrației plasmatice, cu dabigatran în aceeași doză timp de $16,82 \pm 14,06$ luni (1-60 luni). În toată această perioadă nu s-au produs evenimente trombotice, hemoragice majore sau non-majore relevante clinic. Doar episoade hemoragice minore au apărut la 13,5% dintre pacienți.

Au predominat genotipurile heterozigote ale polimorfismelor genice *ABCB1*. Pentru SNP rs1045642, 11 pacienți (29,7%) au prezentat genotipul CC, în timp ce 22 (59,5%) genotip CT și patru pacienți (10,8%) genotipul TT. În mod similar, 12 pacienți (32,4%) au prezentat genotipul GG pentru SNP rs 4148738, 22 (59,5%) genotip GA și trei pacienți (8,1%) au purtat genotipul AA. În ceea ce privește polimorfismele *CES1*, majoritatea pacienților au fost homozigoti pentru allelea nonvariantă din toate subgrupurile: 51,4% au prezentat genotipul TT pentru SNP rs8192935, în timp ce 17 pacienți (45,9%) au fost purtători ai genotipului TC și doar un pacient al genotipului CC (2,7%); în mod similar 56,8% dintre pacienți au prezentat genotipul GG pentru rs4580160, 14 pacienți au prezentat genotipul GA și doar doi pacienți au fost purtători ai genotipului AA (5,4%); pentru rs2244613 a predominat genotipul AA homozigot (66,6%), dar niciunul dintre pacienți nu a prezentat genotipul CC. Pentru toate celelalte polimorfisme, distribuția genotipurilor a fost în acord cu echilibrul Hardy-Weinberg.

Nu s-au găsit diferențe semnificative statistic ale concentrațiilor plasmatice reziduale sau de vârf ale dabigatranului între grupurile genotipice pentru niciun polimorfism studiat. S-a observat o tendință descendentă a nivelurilor plasmatice ale dabigatranului la purtătorii allelei variante *CES1* rs8192935 și rs4580160, dar fără semnificație statistică. Purtătorii *CES1* rs4580160 homozigoti ai allelei variante A au prezentat concentrații plasmatice cu 30% mai mici decât homozigoții pentru allelea G, la limita semnificației statistice în cazul concentrațiilor plasmatice de vârf (89 ng/dl vs. 130 ng/dl; testul χ^2 : $p = 0,06$).

Nivelurile plasmatice maxime au fost mai scăzute la purtătorii allelelor variante *ABCB1* pentru ambele SNP, fără semnificație statistică, iar nivelurile reziduale au fost similare între subgrupurile genotipice. Atât concentrația plasmatică reziduală (80 (59; 98,3)ng/mL) cât și cea de vârf (130 (111,7; 180)ng/mL), determinate prin LC/MS/MS,

au prezentat o variabilitate importantă. Au avut niveluri mai crescute la femei (82,6 (50,3; 110) ng/dl vs. 75,1(59,2; 89,2) ng/dl concentrații reziduale, test Mann-Whitney U: $p=0,5$ și 150,0 (120;209,8) ng/dl vs. 122,1(110;139,6)ng/dl concentrații de vârf, test Mann-Whitney U: $p=0,1$) și la pacienții tratați cu amiodarona (88,1(74,2;114,8)ng/dl vs. 80,0 (57,8;95,2)ng/dl concentrații reziduale, test Mann-Whitney U: $p=0,2$ și 163,4 (115,3;224,6)ng/dl vs. 130,0(111,5;160,8)ng/dl concentrații de vârf, test Mann-Whitney U: $p=0,4$), dar fără semnificație statistică.

Pacienții cu insuficiență cardiacă au prezentat valori mai scăzute ale concentrațiilor plasmatice (54,8 (43,6;79,3)ng/dl vs. 82,6 (60,9;100,4)ng/dl concentrații reziduale, test Mann-Whitney U: $p=0,1$ și 113,8 (69,1;208,5)ng/dl vs. 130 (113,3;180)ng/dl concentrații de vârf, test Mann-Whitney U: $p=0,4$).

Clearance-ul creatininei s-a corelat invers cu nivelurile reziduale și de vârf ale dabigatranului (corelație Spearman: $r = -0,215$; $p = 0,2$ și respectiv, $r = -0,127$; $p = 0,4$). O corelație inversă moderată s-a observat între concentrațiile plasmatice reziduale ale dabigatranului și IMC (corelație Spearman: $r = -0,353$; $p < 0,05$) și respectiv suprafața corporală ($r = -0,345$; $p < 0,05$). De asemenea, s-a constatat o corelație slabă între nivelurile plasmatice reziduale și valorile APTT la 12 ore de la administrarea capsulei($r = 0,308$; $p = 0,07$).

Concluzii

Genele care codifică proteinele implicate în metabolizarea dabigatranului pot explica în parte variabilitatea concentrațiilor plasmatice ale acestuia. Polimorfismele *CES1* nu s-au asociat semnificativ cu nivelurile plasmatice ale dabigatranului, dar a existat o tendință de scădere a valorilor plasmatice reziduale și de vârf la purtătorii allelelor variante atât ale SNP rs8192935 cât și ale rs4580160. Toți pacienții au prezentat variații considerabile ale concentrațiilor reziduale și de vârf. Nivelurile plasmatice ale dabigatranului sunt influențate de parametri demografici.

Studiu 2. Influența factorilor clinici și genetici asupra variabilității interindividuale a concentrațiilor plasmatice ale apixabanului

Ipoteza:

Scopul acestui studiu a fost de a evalua factorii care influențează nivelul plasmatic al apixabanului, măsurat în stare de echilibru, într-un grup de pacienți cu FANV din practica clinică, tratat conform recomandărilor ghidurilor în vigoare. Un alt obiectiv important a fost monitorizarea periodică a efectelor adverse ale administrării apixabanului pentru a stabili dacă există o anumită relație cu relevanță clinică.

Material și metodă:

Pentru acest studiu observațional, prospectiv, realizat între martie 2017 - iunie 2019, au fost selectați pacienți caucazieni, de ambele sexe, cu FANV documentată, care urmau tratament cu apixaban 5 mg de două ori pe zi, din Institutul Inimii de Urgență „Niculae Stancioiu” Cluj-Napoca. În perioada martie-iunie 2017, toți pacienții au participat la o vizită de includere în cadrul căreia au furnizat probe de sânge prin puncție venoasă directă dintr-o venă antecubitală pentru determinarea concentrației

plasmatic reziduale la 12 ore de la administrarea dozei de apixaban de seara și pentru determinarea concentrației plasmatice vârf la 2 ore de la administrarea tabletei de dimineața. În același timp s-au prelevat și probe pentru efectuarea analizei genetice și determinarea celorlalți parametri biologici. Pacienții au fost urmăriți până în luna iunie 2019.

Rezultate:

Lotul final de studiu a inclus un număr de 53 de pacienți cu mediana vârstei a fost de 70,0 de ani (limite: 65–77). Nu au apărut evenimente tromboembolice sau hemoragii majore pe parcursul perioadei de urmărire ($25,15 \pm 0,6$ luni), însă 11,3% dintre pacienți au prezentat sângerări minore. La momentul prelevării probelor, pacienții urmau tratament cu apixaban de $14,67 \pm 8,51$ luni (1–36 luni).

Mediana concentrațiilor plasmatice ale apixabanului a fost de 132,3 (90,4; 184,2) ng/dL pentru cele reziduale și de 287,3 (198,6; 396,8) ng/dL pentru cele de vârf. Ambele concentrații plasmatice au avut variații considerabile (mai mari de 10 ori); 66,03% dintre pacienți au avut valori mai mari de 100 ng/dL; 24,52% între 50–100 ng/dL și 9,43% mai mici de 50 ng/mL. Nu s-au observat diferențe statistice semnificative ale concentrațiilor plasmatice ale apixabanului între pacienții care urmau sau nu tratament asociat cu amiodaronă (18,9%), beta-blocante (5,7%), propafenonă (5,7%), digoxin (22,6%), statine (52,8%), antiagregante plachetare (18,9%) sau antiinflamatoare nonsteroidiene (3,8%).

Nivelurile plasmatice au fost mai crescute la pacienții de sex feminin decât la cei de sex masculin, cu semnificație statistică borderline pentru concentrațiile plasmatice de vârf: 311,2 ng/dL (240,4; 445,1) vs. 252,2 (148,7; 333,1) ng/dL; test Mann–Whitney U: $p = 0,05$). Pacienții cu insuficiență cardiacă au prezentat valori mai scăzute ale concentrațiilor plasmatice, semnificativ statistic în cazul concentrațiilor de vârf: 149,4 (133,5; 278,6) ng/dL vs. 304,5 (230,4; 438,8) ng/dL; test Mann–Whitney U: $p < 0,01$). Niciunul dintre pacienții lotului studiat nu a avut insuficiență renală severă. Mediana ratei filtrării glomerulare, calculată cu formula Cockcroft–Gault a fost de 77,5 mL/min/1,72m². Clearance-ul creatininei s-a corelat invers cu nivelul plasmatic al apixabanului, cu semnificație statistică în cazul concentrațiilor reziduale (Spearman correlation: $r = -0,365$; $p = 0,007$).

Cele două polimorfisme *ABCB1* au fost în dezechilibru de linkaj ($D' = 0,83$; $r_2 = 0,75$). Un model predictiv a fost construit pentru a determina variabile legate independent de nivelurile plasmatice ale apixabanului. Modelul nostru a avut în vedere vârsta, sexul, indicele de masă corporală, tipul FA, clearance-ul creatininei, prezența insuficienței cardiace și SNP rs1045642 și rs4148738. Pentru nivelurile plasmatice reziduale, am obținut o valoare a R^2 de 0,407. Doar prezența insuficienței cardiace și clearance-ul creatininei au fost asociate independent cu nivelurile plasmatice ale apixabanului. Pentru nivelurile plasmatice de vârf, am obținut o valoare R^2 de 0,357. Doar prezența insuficienței cardiace a fost asociată independent cu nivelurile plasmatice ale apixabanului.

Concluzii

Concentrațiile plasmatice ale apixabanului au avut variații foarte mari, iar concentrațiile măsurate la femei au avut valori mai mari decât cele măsurate la bărbați. Insuficiența cardiacă s-a asociat cu scăderea concentrației plasmatice de vârf a apixabanului. Prezența insuficienței cardiace și clearance-ul creatininei au fost asociate independent cu nivelurile plasmatice ale apixabanului. Nu s-a obținut o relație semnificativă statistic între polimorfismele genei *ABCB1* și nivelurile plasmatice ale apixabanului, dar purtătorii homozigoti ai allelei variante *ABCB1* rs4148738 au avut niveluri plasmatice de vârf mai mari decât cei homozigoti pentru genotipul GG. Variabilitatea concentrațiilor plasmatice nu a influențat eficiența apixabanului.

Studiu 3. Eficiența anticoagulantelor non-vitamin K și riscul hemoragic la pacienții cu fibrilație atrială: rolul polimorfismelor genetice

Ipoteza:

Pornind de la ipoteza că prezența polimorfismelor genetice poate să influențeze efectele tratamentului cu NOAC asupra evoluției clinice a pacienților cu FANV, ne-am propus să evaluăm posibila asociere a SNPs *ABCB1* și *CES1* cu evenimentele ischemice sau hemoragice la pacienți din practica clinică tratați cu dabigatran și apixaban.

Al doilea obiectiv al studiului a constat în analiza comparativă a celor două grupuri de pacienți, tratați cu dabigatran și cu apixaban din punct de vedere al eficienței și siguranței tratamentului cu NOAC și a factorilor care le influențează.

Material și metodă:

Studiul monocentric, prospectiv, observațional, analitic a fost realizat din martie 2017 până în decembrie 2019 în cadrul Institutului Inimii de Urgență „Niculae Stancioiu” Cluj-Napoca. Am inclus pacienți caucazieni cu FANV tratați cu dabigatran și apixaban, în ambele doze. Pacienții au fost evaluați inițial într-o vizită de includere în studiu în perioada martie - decembrie 2017. În cadrul acestuia s-au prelevat probe pentru determinările genetice și a celorlalți parametri biologici. Pacienții au fost urmăriți până în luna decembrie 2019.

Rezultate

Pe tot parcursul studiului au fost urmăriți în total un număr de 218 pacienți. Aceștia au fost incluși în analiza finală distribuiți în două loturi: lotul pacienților tratați cu dabigatran (n=104) și lotul pacienților tratați cu apixaban (n=114).

Evoluția clinică

Caracteristicile demografice, clinice și ecocardiografice au fost analizate pe loturi și subploturi (constituite în funcție de doza administrată). Analizate pe loturi vârsta medie, distribuția pe sexe, indicele de masă corporală, tipul FA, scorurile CHA_2DS_2-VASc și HAS-BLED, precum și valorile parametrilor ecocardiografici au fost similare. Pacienții tratați cu apixaban au prezentat valori mai reduse ale clearance-ului creatininei decât pacienții tratați cu dabigatran ($77,58 \pm 25,98$ ml/min/1,72m² vs. $81,57 \pm 28,53$ ml/min/1,72m²). Spre deosebire de pacienții tratați cu apixaban, majoritatea celor tratați cu dabigatran (61,54%) au urmat anterior tratament cu AVK.

Ponderea pacienților care urmau tratament asociat cu inhibitori ai gp-P și antiagregante plachetare a fost similară între cele două grupuri. Pacienții din ambele loturi tratați cu dozele reduse de anticoagulante au avut media vârstei, a IMC, a clearance-ului creatininei și a diametrului anteroposterior al atriului stâng semnificativ mai reduse decât cei care au urmat tratament cu dozele maxime.

Mediana timpului de urmărire la ambele loturi a fost de 30 luni (26;31). Un număr de 24 (23,07%) dintre pacienții tratați cu dabigatran și 15 (13,15%) dintre pacienții tratați cu apixaban au fost incluși în studiu imediat după inițierea tratamentului cu NOAC de către cardiologul curant. Restul pacienților urmau tratament cu dabigatran de 14.67 ± 12.76 luni (1 – 60 luni) și respectiv cu apixaban de 13.96 ± 9.14 luni (1 – 36 luni) la momentul includerii în studiu.

Pe parcursul perioadei de urmărire singurele evenimente embolice survenite au fost reprezentate de două episoade de AVC ischemic în grupul pacienților tratați cu doza redusă de dabigatran. Cei doi pacienți aveau antecedente de AVC și respectiv atac ischemic tranzitor (AIT) și boală arterială carotidiană, erau în ritm sinusal la momentul internării și nu au întrerupt administrarea anticoagulantului, motiv pentru care tratamentul cu dabigatran nu a fost considerat inefficient și a fost continuat (în asociere cu antiagregant plachetar și inhibitor al pompei de protoni).

Complicațiile hemoragice au apărut la 16 pacienți per ansamblul lotului (7.34%). Majoritatea au fost hemoragii non-majore clinic relevante (HNMCR) și au determinat întreruperea temporară a tratamentului cu NOAC (48-72 ore). La pacienții tratați cu dabigatran (8 pacienți, 7,69%) complicațiile hemoragice au fost reprezentate de: cinci episoade de rectoragii; două de hematochezie și un episod de hematemeză, survenit în urma asocierii la schema terapeutică de AINS. Ulterior pacientei i s-a indicat apixaban în doza redusă. În lotul pacienților tratați cu apixaban de la momentul inițierii terapiei și pe toată durata de urmărire nu s-au înregistrat evenimente tromboembolice. La 8 dintre pacienți (7,02%) au survenit HNMRC reprezentate de: trei episoade de rectoragii; doi pacienți au urmat tratament concomitent cu antiagregante plachetare și AINS. Pentru toți pacienții tratamentul cu NOAC a fost reluat, cu aceleași doze, după efectuarea consultului gastroenterologic, la recomandarea medicului cardiolog curant. De asemenea, s-au înregistrat și câteva hemoragii minore: 2 episoade de gingivoragii și patru episoade de epistaxis la pacienții tratați cu dabigatran și trei episoade de epistaxis și patru de gingivoragii la cei tratați cu apixaban. La doi pacienți episoadele hemoragice minore au coincis cu HNMRC. În ambele loturi, pacienții care au prezentat hemoragii au fost predominant femei (raport B:F = 1:1,66) și au fost mai vârstnici ($72,81 \pm 7,49$ ani vs. $70,78 \pm 9,14$ ani). Niciunul dintre acești pacienți nu a urmat tratament cu inhibitori ai Gp-P, nu a avut afecțiuni ale tractului gastro-intestinal sau alte episoade hemoragice în antecedente. Dintre factorii tradiționali de risc pentru apariția hemoragiilor, doar vârsta peste 70 de ani și antecedentele de AVC sau AIT au prezentat o tendință spre semnificația statistic ($p < 0,10$).

Distribuția polimorfismelor pe ansamblul lotului și în ambele subloturi a respectat condițiile echilibrului Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Dintre pacienții tratați cu dabigatran majoritatea (52,8%) au prezentat genotipul homozigot TT pentru *CES1* rs8192935 (T>C), genotipul homozigot GG (55,76%) pentru *CES1* rs4580160(G>A) și genotipul homozigot AA (57,69%) pentru *CES1* rs2244613 (A>C). În acest lot niciun pacient dintre cei care au prezentat hemoragii nu s-a încadrat în genotipul homozigot pentru allelele variante ale niciunui polimorfism *CES1*. Cazurile au fost distribuite în proporții egale sau foarte asemănătoare între genotipurile heterozigot și homozigot pentru allelele majore. Pentru ambele polimorfisme *ABCB1* au predominat pacienții heterozigoți atât per ansamblul lotului studiat, cât și în cadrul subloturilor. Dintre pacienții tratați dabigatran care au prezentat hemoragii 75% au fost purtători ai genotipului variant al *ABCB1* rs4148738(GA+AA) și 75% au fost purtători ai genotipului variant al rs1045642(CT+TT). În cazul pacienților tratați cu apixaban care au prezentat hemoragii 75% au fost purtători ai genotipului variant al *ABCB1* rs4148738(GA+AA, ambii purtători homozigoți ai AA au prezentat rectoragie) și 62,5% au fost purtători ai genotipului variant al *ABCB1* rs1045642(CT+TT). Asocierea complicațiilor hemoragice cu SNPs *ABCB1* și *CES1* a fost analizată prin testarea a patru modele genetice prin regresie liniară. Acestea au inclus: modelul codominant, dominant, recesiv și supradominant. Nu s-a atins semnificație statistică pentru niciunul dintre modelele testate nici în întregul lot, nici pe subloturi. Totuși, am observat că genotipul variant al *ABCB1* rs1045642 C>T s-a asociat cu scăderea riscului de hemoragie (OR ajustat >1), timp în care *ABCB1* rs4148738 G>A s-a asociat cu un risc mai crescut de hemoragie (OR ajustat >1); asocierile nu au atins semnificație statistică ($p > 0,05$). Analiza haplotipurilor *ABCB1* pe întregul lot a relevat 4 haplotipuri atât la pacienții care au prezentat hemoragii, cât și la cei fără complicații. Considerând ca referință haplotipul comun CG (OR=1), rezultatele modelului linear generalizat bazat pe haplotip (regresie logistică) nu a determinat asocieri semnificative între haplotipurile *ABCB1* și hemoragiile apărute la pacienții tratați cu dabigatran sau apixaban ($p > 0,05$). La pacienții care au prezentat hemoragii au predominat haplotipurile TA și CA, ceea ce presupune o posibilă asociere pozitivă cu probabilitatea de apariție a complicațiilor hemoragice (OR=1,04 și respective OR=1,91). De asemenea, în lotul nostru, am observat o tendință spre semnificația statistică pentru asocierea dintre haplotipul TG și hemoragii ($p = 0,092$). Frecvența acestui haplotip a fost mai mare la pacienții fără hemoragii, decât la cei care au prezentat episoade hemoragice, ceea ce sugerează un potențial rol protector al acestui haplotip pentru complicațiile hemoragice în rândul pacienților tratați cu NOAC.

Concluzii

Utilizate riguros, respectând recomandările în vigoare, dabigatranul și apixabanul sunt sigure și eficiente la pacienții cu FANV. Riscul hemoragic, în special de apariție a HGI, este prezent indiferent de tipul și doza de NOAC administrate. Nu am găsit o asociere semnificativă între genotipurile variante ale *CES1* (rs8192935;

rs4580160; rs2244613) și respectiv, ale $ABCB_1$ (rs1045642; rs 4148738) și riscul de apariție a hemoragiilor non-majore la pacienții tratați cu dabigatran sau apixaban. În lotul studiat am obținut o tendință de asociere a haplotipului TA al $ABCB_1$ rs1045642 (C>T) - rs4148738 (G>A) cu riscul de sângerare, ceea ce ar putea implica un rol protector al acestui haplotip față de apariția hemoragiilor.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Acesta este primul studiu farmacogenetic din România adresat pacienților cu fibrilație atrială tratați în mod curent cu anticoagulante orale non-vitaminice K conform recomandărilor actuale. Tema de cercetare este de mare actualitate deoarece NOAC, esențiale în tratamentul FANV, sunt utilizate tot mai frecvent pentru profilaxia evenimentelor trombotice și criteriile necesare în personalizarea tratamentului nu sunt încă pe deplin stabilite pentru această nouă clasă de anticoagulante. Unul dintre aspectele originale ale tezei este faptul că am analizat pentru prima dată polimorfisme CES_1 și $ABCB_1$ într-un grup populațional din România cu scopul de a contura rolul variațiilor genetice în variabilitatea importantă a nivelurilor plasmatice ale dabigatranului și apixabanului. Optimizarea terapiei anticoagulante contribuie la ameliorarea eficienței și siguranței și menține un echilibru avantajos între costurile și beneficiile terapiei. Un alt aspect original al tezei, neabordat până acum în România, a fost determinarea directă a concentrațiilor plasmatice ale dabigatranului prin metoda bazată pe cromatografie de lichide de ultraperformanță cuplată cu spectrometrie de masă, standardul de aur bioanalitic pentru anticoagulantele orale non-vitaminice K. Au fost identificați factorii care influențează variabilitatea concentrațiilor plasmatice ale dabigatranului și apixabanului la pacienții cu FANV, în rândul cărora s-a conturat o categorie specială reprezentată de cei cu insuficiență cardiacă. Un aspect inovativ al tezei este reprezentat de faptul că am studiat în paralel două anticoagulante de generație nouă, cu caracteristici diferite, dar și cu similitudini, printr-o evaluare globală, completă: fundal genetic - fenotip - evoluție clinică, ceea ce ne-a permis obținerea unor rezultate care să contribuie la progresul cunoașterii în domeniul terapiei cu această clasă de anticoagulante.

PhD THESIS SUMMARY

New generation anticoagulants efficacy in thromboembolic events prophylaxis associated with atrial fibrillation

Doctorand **Adela-Nicoleta Popa (căs. Roșian)**

Conducător de doctorat **Prof. dr. Anca Dana Buzoianu**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

THESIS CONTENTS

INTRODUCTION	13
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	15
1. Atrial fibrillation and thromboembolic risk	17
1.1. The thrombogenesis	17
1.2. The stroke risk's stratification	18
2. The anticoagulant treatment	20
2.1. The new generation anticoagulants	20
2.2. New generation anticoagulants indications in patients with nonvalvular atrial fibrillation	23
2.3. The anticoagulant treatment selection	24
3. P-glycoprotein and drug interactions	26
4. Carboxylesterase 1	28
5. Pharmacogenetics	30
5.1. The pharmacogenetics importance	30
5.2. New generation anticoagulants pharmacogenetics	31
5.3. The genetic testing usefulness of NOAC treatment in clinical practice	33
PERSONAL CONTRIBUTION	35
1. Purpose and objectives	37
General objectives:	38
2. General methodology	39
2.1. The study group	39
2.2. Clinical evaluation	40
2.3. Laboratory tests	42
2.4. Statistical analysis	43
3. Study 1. Genotype-phenotype correlations: plasma variability of dabigatran	45
3.1. Introduction	45
3.2. Purpose and objectives	46
3.3. Material and method	46
3.4. Results	46
3.5. Discussions	51
3.6. Conclusions	54

4. Study 2. Clinical and genetic factors influence on apixaban's plasma concentrations interindividual variability	57
4.1. Introduction	57
4.2. Purpose and objectives	58
4.3. Material and method	58
4.4. Results	59
4.5. Discussions	62
4.6. Conclusions	65
5. Study 3. Non-vitamin K anticoagulants efficacy and bleeding risk in patients with atrial fibrillation - the genetic polymorphisms role	67
5.1. Introduction	67
5.2. Purpose and objectives	68
5.3. Material and method	68
5.4. Results	69
5.4.1. Patients clinical evolution	69
5.4.2. Genotype Analysis	74
5.4.3. <i>ABCB₁</i> Haplotype Analysis	77
5.5. Discussions	78
5.6. Conclusions	84
6. General discussions	85
6.1. <i>ABCB₁</i> variations and NOAC's pharmacokinetics	86
6.2. <i>CES₁</i> variations and NOAC's pharmacokinetics	87
6.3. The plasma concentrations variability and the non-genetic factors that influence it	89
6.4. Clinical evolution	92
7. General conclusions	97
8. Thesis originality and innovative contributions	99
REFERENCES (273 bibliographic quotations)	101

Keywords: non-vitamin K oral anticoagulant, dabigatran, apixaban, carboxylesterase 1, P glycoproteine, single nucleotide polymorphisms, *ABCB₁* polymorphisms, *CES₁* polymorphisms, dabigatran plasma concentrations, plasma concentrations of apixaban, liquid chromatography-tandem mass-spectrometry.

Introduction

Atrial fibrillation is a major public health problem. Through its thromboembolic complications it affects the quality of life and survival and involves significant costs for health systems. Anticoagulants takes a central place in atrial fibrillation patients treatment because they are the only classes of drugs that have been proved effective in preventing thromboembolic complications.

The last decade has seen a major shift in oral anticoagulant therapy, so currently therapeutic options for thromboembolic prophylaxis in nonvalvular atrial fibrillation (NVAF) include two classes of drugs that directly inhibit coagulation factors, known as non-vitamin K oral anticoagulants (NOAC). Although currently considered effective and safe, NOAC also has a number of drawbacks related to the high variability of plasma concentrations, lack of parameters for routine anticoagulant effects monitoring (especially in high risk of bleeding or overdose patients), difficult access for specific reversal agents and long-term patient compliance. Individualization of NOAC doses has been a intense debated topic in recent years. It is assumed that patients with multiple factors that interfere and cause an inadequate anticoagulant response would benefit most.

Pharmacogenetics acquisitions have outlined the concept of prognostic genetic testing which aims to associating the treatment of an individual genetic profile associating the treatment of an individual genetic profile the treatment of an individual genetic profile to maximize its effectiveness and/or significantly reduce the risk of adverse reactions. The number of current NOAC pharmacogenetic studies is limited. Their results are scarced, heterogeneous and sometimes discordant.

Personal contribution

The thesis includes three prospective observational performed in parallel. Three articles were published from the personal contributions part: two in ISI quoted journals (*Genes, Journal of Personalized Medicine*) and one BDI article (HVM Bioflux).

It has been shown that in all NOAC there is an interindividual variability of the response to treatment caused by various factors, of which an important place could be taken by the single-nucleotide polymorphisms (SNP) of the genes encoding the enzymes involved in the metabolism of this class of anticoagulants. Starting from this idea, we have chosed the current thesis topic aiming to analyze the factors that influence the individual response to NOAC by evaluating the characteristics of patients encountered in real clinical practice. Patients were recruited from a tertiary cardiac emergency center whose routine activity involves multiple invasive procedures and surgery which involves significant bleeding risk. In the absence of anticoagulant level monitoring tests, it is very important to carefully select, based on as many characteristics as possible, the patients who can benefit from NOAC treatment.

The two most frequently prescribed NOAC at the study beginning were dabigatran and apixaban. Both administered in fixed doses, twice daily, with a similar plasma half-life, but with different mechanism of action and pharmacokinetics.

General methodology:

All patients were initially clinical, paraclinical and biological evaluated, during an inclusion visit, between March and December 2017, and all were sampled for genetic determinations. These were performed in the Genetics Departments laboratory of the "Iuliu Hațieganu" UMF Cluj-Napoca, using available commercial kits. Genotyping for *ABCB₁* SNP carrier status was performed in all patients and *CES₁* SNP only in dabigatran treated patients, by real-time polymerase chain reaction using commercial kits purchased from the "Iuliu Hațieganu" UMF Doctoral Research Grants PCD 2016 (Nr.7690/94/15.04.2016) funds.

For the first two studies, we selected two subgroups of patients that were evaluated between April and June 2017 and in which the dabigatran and apixaban residual and peak plasma concentrations were determined. Quantitative determinations of plasma concentrations were performed using liquid chromatography-tandem mass-spectrometry(LC-MS/MS) in the Department of Toxicology's laboratory, Faculty of Pharmacy, of the „Iuliu Hațieganu” UMF Cluj-Napoca. Internal standards ([¹³C,²H⁷]-apixaban, [¹³C⁶]-dabigatran) were also purchased from the "Iuliu Hațieganu" UMF Doctoral Research Grants PCD 2016 (Nr.7690/94/15.04.2016).

Also, the whole group was subsequently followed, periodically, throughout the studies, to assess treatment adherence and to identify possible complications.

Study 1. Genotype-phenotype correlations: plasma variability of dabigatran

Purpose and objectives:

The aim of our study was to analyze the genetic polymorphisms encoding the enzymes involved in dabigatran metabolism (*ABCB₁* and *CES₁*), their genotype-phenotype relationship and the possible association between the interindividual profile and the dabigatran treated patients evolution in current clinical practice.

Material and method:

The monocentric, prospective, observational, analytical study was conducted from March 2017 to June 2019 at the "Niculae Stancioiu" Emergency Heart Institute Cluj-Napoca. We included Caucasian NVAf patients treated with dabigatran 150 mg twice daily. Patients were initially evaluated in a study visit between March and June 2017. Two blood samples from the antecubital vein were obtained 12 and 2 hours after the last dose of dabigatran (at 8:00 and 10:30). Samples were also obtained for genetic determinations. Patients were followed until June 2019.

Results: In the final analysis 37 patients with a median age of 70.0 years (range: 62–77) were included.

Of the glycoprotein P (gp-P) inhibitors, only amiodarone was prescribed in 10.8% of patients included in the study. None of the patients were treated with verapamil or quinidine. Proton pump inhibitors or dietary supplements were sporadically administered, more than four weeks prior to blood sampling. The mean follow-up time was 17.74 ± 3.01 months (limits: 12- 24). Patients underwent

treatment for 16.82 ± 14.06 months (1-60 months) until the blood sampling. All through this period no thromboembolic, major or clinically relevant non-major hemorrhagic events occurred. Only minor bleedings appeared in 13.5% of patients.

The heterozygous genotypes of the ABCB1 gene polymorphisms predominated. For SNP rs1045642 11 patients (29.7%) presented CC genotype, whereas 22 (59.5%) the CT genotype and four patients (10.8%) the TT genotype. Similarly, 12 patients (32.4%) presented the GG genotype for SNP rs 4148738, 22 (59.5%) the GA genotype, and three patients (8.1%) carried the AA genotype. Regarding *CES*₁ polymorphisms, most of the patients were homozygous for the major allele in all subgroups: 51.4% presented TT genotype for the SNP rs8192935, while 17 patients (45.9%) carried TC genotype and only one patient presented the CC genotype (2.7%); 56.8% had the GG genotype of rs4580160, 14 patients presented GA genotype and only two patients carried the AA type (5.4%); finally, for rs2244613 homozygous AA predominated (66.6%), but none of the patients carried the CC genotype. For all other polymorphisms, the genotypes distribution was in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. No statistically significant differences were found in the trough or peak dabigatran plasma concentrations between the genotypic groups, for any studied polymorphism. A downward trend of the dabigatran plasma levels at *CES*₁ rs8192935 and rs4580160 variant allele carriers was observed but without statistical significance. Carriers of variant allele A of *CES*₁ rs4580160 homozygotes showed plasma concentrations 30% lower than homozygotes for the G allele, at the statistical significance limit for peak plasma concentrations (89 ng/dl vs. 130 ng/dl; test χ^2 : $p = 0.06$). The peak plasma levels were lower in the ABCB1 variant allele carriers for both SNP, with no significance and the trough levels were similar between genotypic subgroups.

Both trough (mean 80 (59; 98.3)ng/mL) and peak plasma concentration (mean 130 (111.7; 180)ng/mL), determined by LC-MS/MS, presented important variability. They were higher in women (82.6 (50.3; 110)ng/dl vs. 75.1 (59.2; 89.2)ng/dl residual concentrations, Mann - Whitney U test: $p = 0.5$ and 150.0 (120; 209.8)ng/dl vs. 122.1 (110; 139.6)ng/dl peak concentrations, Mann - Whitney U test: $p = 0.1$) and in patients treated with amiodarone (88.1 (74.2; 114.8)ng/dl vs. 80.0 (57.8; 95.2)ng/dl residual concentrations, Mann - Whitney U test: $p = 0.2$ and 163.4 (115.3; 224.6)ng/dl vs. 130.0 (111.5; 160.8) ng/dl peak concentrations, Mann - Whitney U test: $p = 0.4$), but without statistical significance.

Patients with heart failure had lower values of plasma concentrations (54.8 (43.6; 79.3)ng/dl vs. 82.6 (60.9; 100.4)ng/dl residual concentrations, Mann test - Whitney U: $p = 0.1$ and 113.8 (69.1; 208.5) ng/dl vs. 130 (113.3; 180)ng/dl peak concentrations, Mann - Whitney U test: $p = 0.4$).

Creatinine clearance was inversely correlated with dabigatran trough and peak plasma levels (Spearman correlation: $r = -0.215$; $p = 0.2$ and $r = -0.127$; $p = 0.4$ respectively). An inverse moderate correlation between dabigatran residual plasma

concentrations and the BMI (Spearman correlation: $r = -0.353$; $p < 0.05$), and BSA ($r = -0.345$; $p < 0.05$) was noticed. A weak correlation was also observed between trough levels and APTT values at 12 hours ($r = 0.308$; $p = 0.07$).

Conclusions

The genes that encode proteins related to dabigatran's metabolism may explain part of the dabigatran's plasma concentrations variability. *CES1* polymorphisms were not significantly associated with dabigatran plasma levels, but there was a tendency to decrease residual and peak plasma values in variant allele carriers of both rs8192935 and rs4580160 SNPs. All patients showed considerable variations in residual and peak concentrations. The plasma levels of dabigatran are influenced by demographical parameters.

Study 2. Clinical and genetic factors influence on apixaban's plasma concentrations interindividual variability

Purpose and objectives:

The aim of this study was to assess the factors that influence apixaban's plasma levels, measured at steady state, in a real-life group of patients with NVAF, treated according to guidelines recommendations. Another important goal was the periodic monitoring of adverse effects of apixaban administration in order to establish if a certain relationship has clinical relevance.

Material and method:

For this observational, prospective study, conducted between March 2017 and June 2019, Caucasian patients, of both sexes, with documented NVAF treated with apixaban 5 mg twice daily from the "Niculae Stancioiu" Emergency Heart Institute Cluj-Napoca were selected. Between March and June 2017, all patients attended one visit at our clinic and provided blood samples by direct vein puncture from an antecubital vein, for trough plasma concentration at 12 h from the evening apixaban dose intake and for peak plasma concentration at 2 h from the morning dose intake. At the same time, samples were taken for genetic analysis. Patients were followed until June 2019.

Results: The final study group included 53 patients with a median age of 70.0 years (range: 65–77). No thromboembolic or major hemorrhagic events occurred during the follow-up period (25.15 ± 0.6 months), but 11.3% of patients presented minor bleedings. At the time of sampling, patients underwent treatment for 14.67 ± 8.51 months (1–36 months).

The median apixaban concentration, determined by LC-MS/MS, was 132.3 (90.4; 184.2)ng/dL for trough and 287.3 (198.6; 396.8)ng/dL for peak levels. The plasma concentrations varied considerably (more than 10-fold for both); 66.03% of patients had plasma concentrations higher than 100 ng/dL; 24.52% between 50–100 ng/dL, and 9.43% less than 50 ng/mL. No significant differences in apixaban concentrations were found between patients with/without treatment with amiodarone (18.9%), beta-blockers (5.7%), propafenone (5.7%), digoxine (22.6%), statins (52.8%), antiplatelet drugs (18.9%) or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (3.8%).

Plasma levels were higher in women than in men, regarding peak plasma concentration with borderline statistical significance (311.2 (240.4; 445.1)ng/dL vs. 252.2 (148.7; 333.1)ng/dL; Mann-Whitney U test: $p = 0.05$). Patients with heart failure had lower values of plasma concentrations, significantly for the peak levels (149.4 (133.5; 278.6)ng/dL vs. 304.5 (230.4; 438.8)ng/dL; Mann-Whitney U test: $p < 0.01$). None of the patients had severe renal impairment. The median glomerular filtration rate calculated according to the Cockcroft-Gault formula was 77.5 mL/min/1.72m². The creatinine clearance was inversely correlated with the apixaban plasma level, with statistical significance for trough concentrations (Spearman correlation: $r = -0.365$; $p = 0.007$). The genotype distribution and allele frequencies of *ABCB1* were in agreement with the Hardy-Weinberg equilibrium. The two *ABCB1* SNP were in linkage disequilibrium ($D' = 0.83$ and $r^2 = 0.75$). No statistically significant differences between the genotypic groups for any studied polymorphism, or for their haplotype combinations, were found in the trough or peak apixaban plasma concentrations. Also, statistical significance was not reached in tests for genetic models (additive, dominant or recessive). Homozygous carriers of the *ABCB1* rs1045642 variant allele T showed peak plasma concentrations 24% higher than those that were CC homozygous, and *ABCB1* rs4148738 homozygous carriers of the variant allele A showed peak plasma concentrations 11% higher than those homozygous for the G allele.

A predictive model was constructed in order to find out which variables were independently linked to the apixaban plasma levels. Our model considered the age, gender, body mass index, type of AF, creatinine clearance, presence of heart failure, and rs1045642 and rs4148738 SNP. For trough plasma levels, we obtained an R² value of 0.407. Only the presence of heart failure and creatinine clearance were independently associated with the apixaban trough plasma levels. For peak plasma levels, we obtained an R² value of 0.357. Only the presence of heart failure was independently associated with the apixaban trough plasma levels.

Conclusions

Apixaban's plasma concentrations varied widely and those measured in women were higher than those measured in men. Heart failure has been associated with decreased apixaban's peak plasma concentrations. The presence of heart failure and creatinine clearance were independently associated with apixaban's plasma levels. No statistically significant relationship was obtained between *ABCB1* gene polymorphisms and apixaban plasma levels, but homozygous carriers of the variant *ABCB1* allele rs4148738 had higher peak plasma levels than those homozygous for the GG genotype. Plasma concentrations variability did not affect the apixaban's efficacy.

Study 3. Non-vitamin K anticoagulants efficacy and bleeding risk in patients with atrial fibrillation - the genetic polymorphisms role

Purpose and objectives:

Assuming that the presence of genetic polymorphisms may influence the effects of NOACs treatment on the clinical outcome of NVAf patients, we aimed to evaluate the

possible association of the *ABCB1* and *CES1* gene SNPs with bleeding in patients from the real-world clinical practice treated with dabigatran and apixaban.

The second study objective was the comparative analysis of the two groups of patients treated with dabigatran or apixaban.

Material and method:

The monocentric, prospective, observational, analytical study was conducted from March 2017 to December 2019 at the "Niculae Stancioiu" Emergency Heart Institute Cluj-Napoca. We included Caucasian NVAf patients treated with dabigatran and apixaban in both doses. Patients were initially evaluated in an inclusion visit between March and December 2017. Samples were taken for genetic determinations. Patients were followed until December 2019.

Results: A total of 218 patients were followed throughout the study. These were included in the final analysis divided into two groups: the dabigatran treated patients group (n = 104) and the apixaban treated patients group (n = 114).

Demographic, clinical and echocardiographic characteristics were analyzed in groups and subgroups (constituted according to the administered dose). Analyzed by groups, mean age, sex distribution, body mass index, AF type, CHA₂DS₂-VASc and HAS-BLED scores, as well as echocardiographic parameter values were similar. Patients treated with apixaban had lower creatinine clearance values than patients treated with dabigatran (77.58 ± 25.98 ml/min/1.72m² vs. 81.57 ± 28.53 ml/min/1.72m²). Unlike patients treated with apixaban, the majority of those treated with dabigatran (61.54%) previously had AVK treatment. The proportion of patients receiving treatment with gp-P inhibitors and antiplatelet agents was similar between the two groups. Patients in both groups treated with low doses of anticoagulants had significantly lower mean age, BMI, creatinine clearance, and left anteroposterior diameter of the left atrium than those treated with the maximum doses.

The median follow-up time in both groups was 30 months (26; 31). A total of 24 (23.07%) of dabigatran-treated patients and 15 (13.15%) of apixaban-treated patients were included in the study immediately after initiation of NOAC treatment by the treating cardiologist. The rest of the patients were treated with dabigatran 14.67 ± 12.76 months (1 - 60 months) and apixaban 13.96 ± 9.14 months (1 - 36 months), respectively, at the time of study inclusion.

During the follow-up period, only two episodes of ischemic stroke in the low-dose dabigatran group occurred. The two patients had a history of stroke and transient ischemic attack (TIA) and carotid artery disease, were in sinus rhythm at the time of admission and did not discontinue the anticoagulant, which is why dabigatran treatment was not considered ineffective and was continued (in combination with platelet antiplatelet and proton pump inhibitor).

Bleeding complications occurred in 16 NOACs-treated patients (7.34%). Most of them were CRNMB and required temporary cessation of treatment (48-72 h). In patients treated with dabigatran they were represented by five episodes of

rectorrhagia; two of hematochezia and one episode of hematemesis. The last case occurred after the association of NSAIDs and the patient was subsequently prescribed a low dose of apixaban. In the apixaban-treated group during the follow-up we identified three episodes of rectorrhagia; two patients received concomitant antiplatelet and NSAIDs therapy. In all patients, the treatment with NOACs was resumed, with the same doses, on the attending physician recommendation, after seeing a gastroenterologist. Also, several minor bleeding episodes were recorded: two gingival bleedings and four episodes of epistaxis in patients treated with dabigatran and three episodes of epistaxis and four gingival bleeding in those treated with apixaban. In two patients these minor episodes were concomitant with CRNMB. In both groups, patients with bleeding were predominantly female (ratio B: F = 1: 1.66) and were older (72.81 ± 7.49 years vs. 70.78 ± 9.14 years). None of these patients received treatment with gp-P inhibitors, no history of gastrointestinal disorders, or other history of bleeding. Among the traditional risk factors for bleeding, only age over 70 years and a history of stroke or TIA showed a trend towards statistical significance ($p < 0.10$).

The polymorphisms' distribution on the entire group of patients treated with NOACs and in both subgroups, respected the Hardy-Weinberg equilibrium's conditions ($p > 0.05$). The majority of the patients treated with dabigatran (52.8%) had the TT homozygous genotype for *CES₁* rs8192935 (T>C), the GG homozygous genotype (55.76%) for *CES₁* rs4580160 (G>A) and the AA homozygous genotype (57.69%) for *CES₁* rs2244613 (A>C). In this group, none of the patients who presented bleedings had the homozygous genotype for the variant allele of any *CES₁* polymorphism. The cases were distributed in equal or very similar proportions between the heterozygous and homozygous genotypes for the major allele.

For both *ABCB₁* polymorphisms, heterozygous patients predominated both in the whole studied group and within the subgroups. Among the dabigatran-treated patients that had experienced bleedings, 75% were carriers of rs4148738 variant genotype (GA+AA) and 75% were carriers of rs1045642 variant genotype (CT+TT). In patients treated with apixaban who had bleedings, 75% were carriers of the rs4148738 variant genotype (GA+AA, both AA carriers presented rectorrhagia) and 62.5% were carriers of the rs1045642 variant genotype (CT+TT).

The association of bleedings with *ABCB₁* and *CES₁* SNP was analyzed by logistic tested models based on four genetic models (codominant, dominant, recessive, and overdominant). These revealed no significant association between the two *ABCB₁* SNPs and the risk of bleeding. Although we noticed that the variant genotype of *ABCB₁* rs1045642 C>T was associated with decreased odds of bleedings (adjusted OR >1) while *ABCB₁* rs4148738 G>A was associated with increased odds of bleedings (adjusted OR > 1), the associations were of no statistical significance ($p > 0.05$).

The *ABCB₁* haplotype analysis in the entire group of patients with and without bleedings revealed that the haplotype set was covered by four haplotypes. Taking the

common CG haplotype as reference (OR = 1), the results of the haplotype-based generalized linear model (logistic regression) found no significant association of haplotypes with bleedings in NOACs-treated patients ($p > 0.05$). TA and CA haplotypes had the highest frequency in NOACs-treated patients with bleedings, involving a possible positive association with the susceptibility of bleeding complications (OR = 1.04 and OR = 1.91, respectively). Also, in our sample, there was a trend toward statistical significance for the association between TG haplotype and bleedings ($p = 0.092$). The haplotype frequency was higher in patients without bleedings than in those with bleedings, implying a possible protective role of this haplotype against bleeding in NOACs-treated patients.

Conclusions:

Rigorously used, in accordance with current recommendations, dabigatran and apixaban are safe and effective in patients with FANV. The risk of bleeding, especially the occurrence of HGI, is present regardless of the type and dose of NOAC administered. We did not find a significant association between the variant genotypes of *CES₁* (rs8192935; rs4580160; rs2244613) and *ABCB₁* (rs1045642; rs 4148738), respectively, and the risk of non-major bleeding in patients treated with dabigatran or apixaban. In the studied group we obtained a tendency to associate the TA haplotype of *ABCB₁* rs1045642 (C>T) - rs4148738 (G>A) with the risk of bleeding, which could imply a protective role of this haplotype against the occurrence of hemorrhages.

Thesis originality and innovative contributions

This is the first romanian pharmacogenetic study addressed to atrial fibrillation patients treated with non-vitamin K oral anticoagulants according to current recommendations. Since NOAC, essential in the NVAF patients treatment, are increasingly used for the thromboembolic events prophylaxis and because the mandatory criteria in treatment personalization are not yet fully established for this new class of anticoagulants, the present thesis presnets an up-to-date topic. One of the thesis original aspects is represented by the *CES₁* and *ABCB₁* polymorphisms analysis for the first time in a population group from Romania, in order to outline the role of genetic variations in the important variability of dabigatran and apixaban plasma levels. Another original aspect of the thesis, not addressed so far in Romania, was the direct determination of dabigatran plasma concentrations by the liquid chromatography-tandem mass-spectrometry method, the bioanalytical gold standard for NOAC. The factors influencing the dabigatran and apixaban plasma concentrations variability in NVAF patients, among which those with heart failure represent a special category were identified. An innovative aspect of the thesis is represented by the fact that we studied in parallel two new generation anticoagulants, with different characteristics, but also with similarities, through a global, complete evaluation: genetic background - phenotype - clinical evolution, which allowed us to obtain results that contribute to the knowledge progress in the NOAC therapy field.