

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Весна С. Субота

**ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКТИ
АНТИКОАГУЛАНТА ВАРФАРИНА
КОД ПАЦОВА**

докторска дисертација

Београд, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Vesna S. Subota

**IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF
ANTICOAGULANT WARFARIN IN RATS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

МЕНТОРИ

Др Јанко Пејовић

доцент, Универзитет одбране у Београду – Медицински факултет ВМА

Др Милена Катарановски

редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

ЧЛАНОВИ КОМИСИЈЕ

Др Јанко Пејовић

доцент, Универзитет одбране у Београду – Медицински факултет ВМА

Др Милена Катарановски

редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Др Драган Катарановски

редовни професор, Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Др Саша Василијић

ванредни професор, Универзитет одбране у Београду – Медицински факултет ВМА

Др Александра Попов Александров

научни сарадник, Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања
„Синиша Станковић“

Ова дисертација је урађена у Институту за Биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитета у Београду и Институту за медицинску биохемију Војномедицинске академије, под руководством проф. др Милене Катарановски и доц. др Јанка Пејовића.

Велику захвалност дугујем свом ментору проф. др Милени Катарановски која ми је преносила своје научно знање и искуство. Захвална сам јој на несебичној помоћи у свакој фази израде овог рада, неизмерној подршци, подстицају и оптимизму којим ме је надахњивала. Задужила ме је својим топлим односом и несебичним саветима.

Захваљујем се свом начелнику и ментору доц. др Јанку Пејовићу на дугогодишњем поверењу и подршци у мојој стручној каријери, као и на позитивном ставу током израде ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем др Ивани Мирков и др Александри Попов Александров на свесрдној и драгоценуј помоћи у експерименталној и теоријској обради резултата дисертације, на колегијалности и пружању помоћи у виду конкретних и корисних савета.

Захваљујем се др Лидији Золотаревски на предусретљивости при изради хистопатолошких узорака ткива и др Сандри Белиј-Rammerstorfer на помоћи у експерименталном делу рада.

Проф. др Драгану Катарановском изражавам огромну захвалност што ми је указао поверење приставши да учествује у оцењивњу ове дисертације и на корисним смерницама које су допринеле побољшању квалитета и успешном завршетку.

Проф. др Сашу Василијићу дугујем захвалност на пажљивом исчитавању и конкретним сугестијама и коментарима у завршној фази израде дисертације.

Драгим колегама из ИМБ-а се захваљујем јер су ми веровали у тренуцима самоневерице.

Мојој деци и мом супругу који су моја инспирација, охрабрење и подстицај дугујем захвалност на стрпљивости и подршци.

Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова

САЖЕТАК

Варфарин (4-хидроксикумарин) је антагонист витамина К. Овај кумарински дериват се користи као антикоагулантни родентицид и као терапеутско средство у профилакси тромбоемболијских болести. Антикоагулантни ефекат варфарина се заснива на инхибицији корака, који зависе од витамина К, у синтези бројних фактора коагулације у јетри. Захваљујући инхибицији циклуса витамина К, варфарин утиче и на друге протеине неопходне за биолошке процесе ван хемостазе (раст и калцификацију костију, раст глаткомишићних ћелија васкулатуре и мезангијских ћелија и друге), доводећи до штетних последица. Варфарин инхибира и процесе који нису у вези са витамином К, укључујући раст тумора. Малобројни подаци указују да овај агенс може да делује и на поједине аспекте имунске функције. Механизми деловања варфарина на имунски систем су, међутим, најмање познати.

Ова дисертација је имала за циљ да испита имуномодулаторни потенцијал варфарина након његове епикутане и оралне примене код пацова. Акутни епикутани третман (три дана за редом у дози од 10 μg и 100 μg натријум варфарина) одговара професионалној или акциденталној изложености, а субкутни орални третман (30 дана у дози од 0.35 mg/L и 3.5 mg/L натријум варфарина у пијаћој води) одговара терапијској примени. Проинфламаторни и имуномодулаторни потенцијал варфарина је испитан анализом хуморалних параметара (концентрација акутно фазних протеина и проинфламаторног цитокина, интерлеукина 6 (IL-6) у плазми, као и активности основних ензима антиоксидативне одбране супероксид дисмутазе и каталазе у еритроцитима), као и ћелијских параметара [квантитативне и квалитативне промене леукоцита периферне крви, посебно полиморфонуклеарних леукоцита (PMN)] као показатеља запаљења на системском нивоу. Механизми дејства на полиморфонуклеарне ћелије периферне крви испитани су у погледу њихове оксидативне активности, продукције проинфламаторних цитокина, фактора некрозе тумора (TNF) и IL-6, способности адхезије, миграције и екстравазације у циљна ткива, коришћењем модела субкутано имплантираних стерилних поливинилских сунђера.

Резултати су показали да варфарин доспева у организам и када се наноси на кожу и након оралне примене, судећи по продужењу протромбинског времена. Епикутана апликација не доводи до промена концентрације протеина акутне фазе и

IL-6, али је запажен пораст активности каталазе при вишој дози варфарина. У овом режиму примене варфарина запажене су квантитативне промене леукоцита периферне крви (повећање броја неутрофилних и еозинофилних леукоцита уз истовремено смањења броја лимфоцита). Евидентне су и промене карактеристика еритроцита. Варфарин није испољио директно цитотоксично дејство на полиморфонуклеарне леукоците, али је довео до промена њихове активности укључујући: (1) повећање броја ћелија које исказују CD11b (при обе дозе) без ефекта на адхезију, (2) диференцијални ефекат на оксидативну активност полиморфонуклеара [повећање мијелопероксидазе и повећану способност редукције тетразолијумове соли након стимулације липополисахаридом (LPS) (при вишој дози), али смањење нестимулисане продукције азот-оксида (при обе дозе) и непромењену продукцију након стимулације LPS-ом] и (3) смањење нестимулисане и LPS-ом стимулисане продукције и експресије проинфламаторних цитокина TNF и IL-6 (као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу). Орална примена варфарина је довела до успостављања системске запаљењске реакције коју су карактерисале повећање протеина акутне фазе и IL-6 (при обе дозе), као и промене активности супероксид дисмутазе и каталазе. Виша доза варфарина је довела до повећања броја неутрофилних леукоцита, али до смањења броја лимфоцита. Варфарин није био директно токсичан за полиморфонуклеарне леукоците, али је утицао на квалитативне промене ових ћелија. Оне су обухватиле смањење броја ћелија које исказују CD11b (при обе дозе), повећање свих аспеката оксидативних активности ових ћелија, али са диференцијалним ефектом на њихов цитокински одговор (снижење TNF при вишој дози варфарина, као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу, без утицаја на IL-6). И поред повећања броја полиморфонуклеарних леукоцита који су мигрирали у сунђер, запажен је слаб ефекат на активност ових ћелија, што је указало на значај системског окружења у остваривању утицаја на ћелијску активност.

Резултати ове студије су показали имуномодулаторни капацитет варфарина чиме се проширује листа биолошких активности варфарина које нису везане за хемостазу, а што указује на потребу за разматрањем штетних ефеката варфарина и додатних испитивања ефеката овог агенса. Ово може да буде важно за критичко сагледавање ризика од професионалне изложености, а посебно клиничке примене варфарина (као лека), ако се има у виду да се овај агенс, и поред појаве нових оралних

антикоагуланата са директним инхибиторним дејством на факторе коагулације Па и Ха, и даље сврстава у оне који се најчешће преписују као антикоагулантна терапија.

Кључне речи: Лабораторијски пацови, епикутана апликација варфарина, орални субкутни режим примене варфарина, субкутани стерилни поливинилски сунђери, полиморфонуклеарни леукоцит (PMN), инфламација.

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Биохемија

УДК број: 577.1:616.151.5-085.273-092.9 (043.3)

Immunomodulatory Effects of Anticoagulant Warfarin in Rats

ABSTRACT

Warfarin (4-hydroxycoumarin) is a vitamin K antagonist. This coumarin derivative is used as an anticoagulant rodenticide and as a therapeutic agent for the prophylaxis of thromboembolic disorders. The anticoagulant effect of warfarin is based on the inhibition of the steps which are dependent on Vitamin K in the synthesis of a number of coagulation factors in the liver. Owing to the inhibition of the vitamin K cycle, warfarin also affects the other proteins which are necessary for the biological processes apart from hemostasis (growth and calcification of bones, vascular smooth muscle cells, mesangial cells and others), leading to harmful effects. Warfarin also inhibits the processes which are not related to vitamin K, including the growth of tumors. Few data suggest that this agent may act on certain aspects of immune function. Mechanisms of action of warfarin on the immune system are, however, the least known.

This study was aimed to investigate the immunomodulatory potential of warfarin after its epicutaneous and oral administration in rats. The acute epicutaneous treatment (within three consecutive days in doses of 10 µg and 100 µg sodium warfarin) corresponds to professional or accidental exposure, and the subacute oral treatment (30 days in doses of 0.35 mg/L and 3.5 mg/L sodium warfarin in drinking water) corresponds to the therapeutic use. The proinflammatory and immunomodulatory potential of warfarin has been tested by analyzing the humoral parameters (concentration of acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines, interleukin 6 (IL-6) in the plasma, as well as the activities of basic enzymes of antioxidant defence, superoxide dismutase and catalase in erythrocytes) as well as the cell parameters [quantitative and qualitative changes in peripheral blood leukocytes, especially polymorphonuclear leukocytes (PMN)] as an indicator of inflammation at the system level. Mechanisms of effects to the peripheral blood polymorphonuclear cells were tested with regard to their oxidative activity, production of pro-inflammatory cytokines, tumor necrosis factor (TNF) and IL-6, ability of adhesion, migration and extravasation in the target tissues, using models of subcutaneously implanted sterile polyvinyl sponges.

The results showed that warfarin comes into the organism both when it is applied on the skin and after oral administration, judging by the extension of prothrombin time. Epicutaneous application does not lead to changes in the concentration of acute phase proteins and interleukin 6, but it has been noticed a significant increase of catalase activity

at the higher dose of warfarin. In this mode of application of warfarin quantitative changes were observed in peripheral blood leukocytes (increase in the number of neutrophil and eosinophil leukocytes with a simultaneous decrease in the number of lymphocytes). There are obvious changes in the characteristics of red blood cells. Warfarin did not exhibit a direct cytotoxic effect on polymorphonuclear leukocytes, but it led to changes in their activities, including: (1) increasing the number of cells that express CD11b (at both doses) but with no effect on adhesion, 2) a differential effect on the oxidative activity of polymorphonuclears [increase in myeloperoxidase and an enhanced ability to reduce a tetrazolium salt after stimulation with lipopolysaccharide (LPS) (at a higher dose), but decrease in non-stimulated production of nitric oxide (at both doses) and an unchanged production upon stimulation with LPS] and (3) reduction of the spontaneous and LPS-stimulated production and the expression of pro-inflammatory cytokines TNF and IL-6 (as a result of inhibition at the transcriptional level). Oral administration of warfarin led to the systemic inflammatory reaction which was characterized by the increase in acute phase proteins and IL-6 (at both doses), and change in activities of superoxide dismutase and catalase. A higher dose of warfarin led to the increase in the number of neutrophil leukocytes, but to the decrease in the number of lymphocytes. Warfarin was not directly toxic to the polymorphonuclear leukocytes, but it influenced the qualitative changes in these cells. These included a reduced number of cells that express CD11b (at both doses), increase of all aspects of the oxidative activity of these cells, but with differential effects on their cytokine response (reduced TNF at the higher dose of warfarin, as a result of inhibition at the transcriptional level, without affecting the IL-6). Despite the increased number of polymorphonuclear leukocytes which migrated to the sponge, it was noticed a poor effect on the activity of these cells, which indicated the importance of the system environment in influencing the cell activity.

Results of this study have shown the immunomodulatory capacity of warfarin thus extending the list of biological activities of warfarin that are not related to hemostasis, which indicates the need to consider the harmful effects of warfarin and to do further research on the effects of this agent. This may be important for the critical evaluation of the risk of occupational exposure, and specifically a clinical use of warfarin as a medicine, if we have in mind that this agent, despite the emergence of new oral anticoagulants with a direct inhibitory effect on coagulation factors IIa and Xa, is still classified among those most often prescribed as an anticoagulant therapy.

Keywords: Laboratory rats, epicutaneous application of warfarin, oral subchronic administration regimen of warfarin, subcutaneous sterile polyvinyl sponges, polymorphonuclear leukocyte (PMN), inflammation.

Scientific field: Biology

Subfield: Biochemistry

UDC number: 577.1:616.151.5-085.273-092.9 (043.3)

СКРАЋЕНИЦЕ

ABCB1	ATP-binding cassette sub-family B member 1	
ATP	Adenosine Triphosphate	аденозин трифосфат
BSP	Bromocresol purple	бром крезол пурпур
CAT	Catalase	каталаза
cDNK	complementary DNA	комплементарна дезоксирибонуклеинска киселина
CRP	C-reactive protein	С-реактивни протеин
CTAB	hexadecyl-trimethyl-ammonium bromide	
CYP	Cytochrome P450 superfamily	цитохром P450 суперфамилија
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2 enzyme	цитохром P450 1A2 ензим
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19 enzyme	цитохром P450 2C19 ензим
CYP2C9	Cytochrome P450 2C9 enzyme	цитохром P450 2C9 ензим
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4 enzyme	цитохром P450 3A4 ензим
CYP4F2	Cytochrome P450 4F2 enzyme	цитохром P450 4F2 ензим
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate	диоксиуридин трифосфат
DNCB	Dinitrochlorbenzene	динитро хлорбензен
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Елиза имуноензимски тест
FCS	Fetal Calf Serum	фетални телећи серум
FII	Coagulation factor II - Prothrombin	коагулациони фактор II - протромбин
FIIa	Activated Coagulation factor II - Thrombin	активирани коагулациони фактор II - тромбин
FITC	Fluorescein isothiocyanate	флуоресцеин изотиоцијанат
FIX	Coagulation factor IX	коагулациони фактор IX
FVII	Coagulation factor VII	коагулациони фактор VII
FVIIa	Activated Coagulation factor VII	активирани коагулациони фактор VII
FVIII	Coagulation factor VIII	коагулациони фактор VIII
FX	Coagulation factor X	коагулациони фактор X

FXa	Activated Coagulation factor X	активирани коагулациони фактор X
FXI	Coagulation factor XI	коагулациони фактор XI
Gas6	Growth Arrest-Specific 6	
GGCX	Gamma-glutamyl carboxylase	гама глутамил карбоксилаза
Gla	Gamma-carboxyglutamic acid	гама карбокси-глутаминска киселина
Glu	Glutamic acid	глутаминска киселина
GPx	Glutathione peroxidase	глутатионске пероксидаза
GRP	Gla-rich protein	
GST	Glutathione S-transferase	глутатион с-трансфераза
H&E	Hematoxylin and Eosin	хематоксилин и еозин
HIS48	Monoclonal Granulocytes antibody	
HIV	Human Immunodeficiency Virus	вирус хумане имунодефицијенције
HPE	High Protein Edemas	едеми са високим садржајем протеина
IL-6	Interleukin 6	интерлеукин 6
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	индуцибилна форма азот синтазе
INR	International normalized ratio	међународни нормирани однос
iRNK	Messenger RNA	информациона рибонуклеинска киселина
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Међународна унија за чисту и примењену хемију
K1	Phylloquinone, Vitamin K1	филокинон, витамин K1
K2	Menaquinone, Vitamin K2	менакинон, витамин K2
KH2	Hydroquinone, Vitamin KH2	хидрокинон, витамин KH2
LPS	Lipopolysaccharide	липополисахариди
MHC	Major histocompatibility complex	главни комплекс гена ткивне подударности
MCH	Mean Corpuscular Hemoglobin	просечна количина хемоглобина у еритроциту
MCHC	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration	просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита
MCV	Mean Corpuscular Volume	просечна запремина еритроцита
MGP	Matrix gla protein	матрикс гла протеин

MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus	Молони мишји вирус леукемије
MPO	Myeloperoxidase	мијелопероксидаза
MPV	Mean Platelet Volume	просечна запремина тромбоцита
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue	тиазолил плава
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	никотинамид аденин динуклеотид
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide - reduced form	никотинамид аденин динуклеотид - редуковани облик
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase	никотинамид аденин динуклеотид - фосфатна оксидаза
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	нитро плави тетразолијум
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1	NAD(P)H : хинон оксидоредуктаза
ORM1	Orosomucoid 1	орозомукоид 1
ORM2	Orosomucoid 2	орозомукоид 2
OSHA	Occupational Safety and Health Administration	Управа за безбедност и здравље на раду, САД
PBS	Phosphate-Buffered Saline	фосфатни пуфер
PCR	Polymerase chain reaction	ланчана реакција полимеразе
PIVKA	Protein induced by vitamin K absence/antagonist	
PMA	Phorbol myristate acetate	тетрадеканоилфорбол ацетат
PMN	Polymorphonuclear	полиморфонуклеарни
PT	Prothrombin time	протромбинско време
RNS	Reactive nitrogen species	реактивне врсте азота
ROS	Reactive oxygen species	реактивне врсте кисеоника
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	Меморијални институт Розвел Парк
RT-PCR	Real Time Polymerase chain reaction	ланчана реакција полимеразе у реалном времену
SDS	Sodium dodecyl sulfat	натријум додецил сулфат
SNP	Single nucleotide polymorphisms	једнонуклеотидни полиморфизам
SOD	Superoxide dismutase	супероксид дизмутаза
TF	Tissue factor	ткивни фактор

Thr	Threonine - amino acid residues	треонин - аминокиселински остатак
TMG	Transmembrane Gla proteins	трансмембрански Gla протеини
TNF	Tumor necrosis factor α	фактор некрозе тумора α
VKOR	Vitamin K epoxide reductase	витамин К епоксид редуктаза
VKORC1	Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1	витамин К епоксид редуктаза субјединица 1
WHO	World Health Organization	Светска здравствена организација

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. Варфарин - историјат и осврт на коришћење.....	2
1.1.1. Варфарин као отров (родентицид).....	4
1.1.2. Варфарин као лек / терапијско средство.....	5
1.2. Структурна својства кумарина и његових деривата.....	6
1.2.1. Структурна својства варфарина.....	9
1.2.2. Фармакокинетика и фармакодинамика варфарина.....	10
1.2.2.1. Апсорпција варфарина.....	11
1.2.2.2. Транспорт варфарина.....	11
1.2.2.3. Елиминација варфарина.....	12
1.3. Механизам деловања варфарина: инхибиција синтезе фактора коагулације ...	12
1.3.1. Хемостаза и коагулација крви.....	12
1.3.2. Витамин К-зависни протеини коагулације.....	14
1.3.3. Механизам деловања: Антитромботски ефекат варфарина.....	15
1.3.4. Циклус витамина К.....	16
1.3.5. VKORC1 и варфарин.....	19
1.3.6. Резистенција или отпорност на варфарин.....	21
1.3.6.1. Урођена резистенција на варфарин.....	22
1.3.6.2. Стечена резистенција.....	22
1.4. Ефекти варфарина на друге протеине зависне од витамина К.....	23
1.4.1. Витамин К-зависни протеини кости.....	24
1.4.2. Витамин К-зависни протеини и васкуларна калцификација.....	25
1.4.3. Витамин К-зависни протеини и функције мозга.....	26
1.4.4. Ефекат варфарина као HIV-1 инхибитор.....	26
1.4.5. Остали витамин К-зависни протеини.....	27
1.5. Непожељни ефекти варфарина.....	27
1.5.1. Крварења изазвана неусклађеном оралном терапијом варфарином.....	28
1.5.2. Некроза коже и други ефекти на кожу изазвани оралном терапијом варфарином.....	29
1.5.3. Тератогени ефекти варфарина.....	30
1.5.4. Остеопороза изазвана варфарином.....	30
1.5.5. Ефекат варфарина на бубрежне болести.....	31

1.6. Ефекти варфарина на биолошке процесе који не зависе од витамина К	31
1.6.1. Антиоксидативна активност варфарина	31
1.6.2. Ефекти варфарина на едеме	32
1.6.3. Варфарин и канцери.....	32
1.7. Имуномодулаторни ефекти варфарина	33
2. ЦИЉЕВИ	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	38
3.1. Хемикалије и антитела	39
3.2. Експерименталне животиње	40
3.2.1. Акутни третман, епикутана примена варфарина	40
3.2.2. Субакутни третман, орална примена варфарина	41
3.2.3. Субкутана имплантација стерилних поливинилских сунђера који садрже варфарин.....	41
3.3. Биохемијски параметри.....	42
3.3.1. Одређивање протромбинског времена.....	42
3.3.2. Одређивање концентрације фибриногена.....	42
3.3.3. Одређивање концентрације хаптоглобина.....	43
3.3.4. Одређивање концентрације С-реактивног протеина	43
3.3.5. Одређивање концентрације албумина.....	43
3.4. Испитивање елемената комплетне крвне слике.....	44
3.5. Испитивање параметара у урину.....	44
3.6. Одређивање активности полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви ..	44
3.6.1. Изолација полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви	44
3.6.2. Одређивање метаболичке вијабилности ћелија МТТ тестом	45
3.6.3. Одређивање нивоа нитрита Грисовом методом.....	45
3.6.4. Одређивање унутарћелијске активности мијелопероксидазе.....	45
3.6.5. Одређивање степена активације ћелија помоћу NBT теста.....	46
3.6.6. Одређивање способности ћелија да адхерирају за нећелијски матрикс	46
3.6.7. Анализа експресије CD11b помоћу проточне цитометрије	47
3.6.8. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену.....	47
3.7. Изолација еритроцита и одређивање параметара оксидативног стреса	48
3.7.1. Одређивање концентрације хемоглобина.....	48
3.7.2. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе.....	48
3.7.3. Одређивање активности каталазе	49
3.8. Имуноензимски тест на чврстој фази	49

3.9. Хистолошка анализа ткива	50
3.10. Статистичка анализа.....	50
4. РЕЗУЛТАТИ	51
4.1. Имуномодулаторни ефекти варфарина у режиму акутне епикутане примене .	52
4.1.1. Релевантност одабране дозе	52
4.1.2. Ефекат епикутано примењеног варфарина на протромбинско време	52
4.1.3. Хистолошка анализа коже након акутне примене варфарина.....	53
4.1.4. Ефекат епикутано примењеног варфарина на хематолошке параметре.....	54
4.1.5. Ефекат епикутано примењеног варфарина на протеине акутне фазе и IL-6 у плазми.....	57
4.1.6. Ефекат епикутано примењеног варфарина на активност еритроцитних ензима SOD и САТ.....	57
4.1.7. Ефекат епикутано примењеног варфарина на вијабилност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви.....	58
4.1.8. Адхезија полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви изолованих из крви пацова изложених епикутаном режиму примене варфарина.....	59
4.1.9. Ефекат епикутано примењеног варфарина на експресију CD11b молекула на укупним и полиморфонуклеарним леукоцитима периферне крви.....	60
4.1.10. Ефекат епикутано примењеног варфарина на оксидативну активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви (NBT редукција, унутарћелијска активност MPO и продукција азот оксида)	61
4.1.11. Ефекат епикутано примењеног варфарина на продукцију и експресију цитокина TNF и IL-6 од стране полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви.....	63
4.2. Орални режим примене варфарина.....	65
4.2.1. Релевантност одабране дозе	65
4.2.2. Антикоагулантни ефекат орално примењеног варфарина.....	65
4.2.3. Хистолошка анализа ефеката орално примењеног варфарина.....	66
4.2.4. Ефекат орално примењеног варфарина на хематолошке параметре	69
4.2.5. Ефекат орално примењеног варфарина на протеине акутне фазе.....	72
4.2.6. Ефекат орално примењеног варфарина на активност еритроцитних SOD и САТ ензима.....	72
4.2.7. Ефекат орално примењеног варфарина на вијабилност леукоцита периферне крви.....	73
4.2.8. Ефекат орално примењеног варфарина на адхезију полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви за пластику	74
4.2.9. Ефекат орално примењеног варфарина на експресију CD11b ⁺ леукоцита периферне крви.....	75

4.2.10. Ефекат орално примењеног варфарина на оксидативну активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви (NBT редукција, унутарћелијска активност MPO и продукција азот оксида)	75
4.2.11. Ефекат орално примењеног варфарина на продукцију и експресију цитокина TNF и IL-6 полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви	78
4.3. Испитивање директног ефекта варфарина на полиморфонуклеарне ћелије периферне крви	80
4.3.1. Ефекат варфарина примењеног субкутаном апликацијом сунђера на хематолошке параметре периферне крви	81
4.3.2. Ефекат варфарина на леукоците изоловане из течности издвојене из субкутано апликованог сунђера.....	83
4.3.3. Ефекат варфарина примењеног субкутаном апликацијом сунђера на активност леукоцита	83
5. ДИСКУСИЈА.....	86
6. ЗАКЉУЧЦИ	100
7. ЛИТЕРАТУРА	103

1. УВОД

Сумња у могућност да се фармаколошки потентна једињења могу издвојити из биљака, која је данас присутна у већем делу научне заједнице, недвосмислено се може развејати спознајом историје открића и развоја варфарина, данас најшире коришћеног антикоагуланса 4-хидроксикумарина.

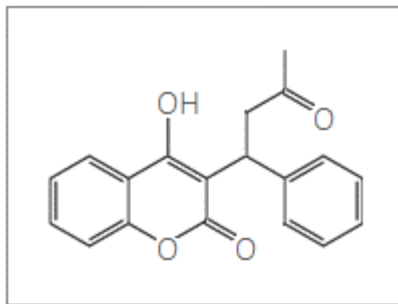
1.1. Варфарин - историјат и осврт на коришћење

Варфарин је до данас пацијентима најшире преписиван антикоагулант у свету (Last, 2002; Lamb, 2009) и поред појаве нових антикоагулантних лекова, какви су директни инхибитори тромбина (инхибитори FIIa) и индиректни и директни инхибитори фактора Ха (Jacobson, 2012). Непожељни ефекти нове групе антикоагулантних лекова, као и недовољно клиничко искуство и недостатак података о ефекатима терапије новим антикоагулантима, који се иначе прикупљају на основу великих и дугогодишњих клиничких студија, а који тек предстоје за нову групу лекова, разлог су да се на варфарин, као антикоагулант, може рачунати још дуго. Према подацима Светске здравствене организације (енгл. World Health Organization, WHO), 1 % укупне популације и око 8 % популације старије од 80 година је на неком од видова терапије варфарином (Pirmohamed, 2006).

Појава варфарина, прво као отрова, а касније као лека са великим терапеутским потенцијалом, може да се веже за рад Карла Линка (Karl Paul Gerhard Link) и његовог тима (Meyer, 1959). Поменута група је крајем тридесетих и почетком четрдесетих година XX века открила ово једињење, радећи у лабораторији Висконсин алумни истраживачке фондације (Wisconsin Alumni Research Foundation). Ова лабораторија је финансирала почетне студије о кумарину (Stahmann M.A., Huebner C.F., Link K.P., 1941). Раду професора Линка, пионира базичних истраживања у области токсикологије, претходила су запажања Скофилда и Родерика (F.W. Schofield, L.M. Roderick) који су указивали на реверзибилну хеморагијску болест код стоке која је конзумирала труло сено биљака *Melilotus alba* и *Melilotus officinalis*. Лоше складиштење детелине у периоду влажних лета доводило је до развоја плесни *Penicillium nigricans*, *Penicillium Jensi* и *Aspergillus spp.*, које су метаболичком активношћу преводили у биљкама присутни кумарин, мирисну органску хемијску компоненту која „обесхрабрује“ потенцијалне предаторе, у дикумарол. Код стоке која је храњена овим сеном примећена хеморагија је често имала фаталан исход. Већ у то време, 1931. године, Родерик је установио да је продужено или потпуно одсуство

коагулације последица „протромбинског“ дефицита и да је јачина хеморагије директно зависна од редукције у „протромбинском садржају или активности“ (Roderick, 1929). Изолација непознатог агенса, који је узроковао хеморагијску болест код крава, започета је 1933. године у лабораторији К.П. Линка. Дикумарол, кога је сам Линк назвао „Јанусом у фамилији кумарина“ због ефекта на систем коагулације и фибринолизе, по структури је сличан витамину К. Када се конзумира, изазива инхибицију продукције витамина К који је неопходан за активацију многих протеина, посебно протеина коагулационог система и то преваходно протромбина. У нормалним физиолошким условима, оштећено ткиво ослобађа тромбопластин који преводи протромбин у тромбин, који затим солубилни фибриноген преводи у нерастворљиви фибрин, узрокујући формирање угрушка који затвара ткивно оштећење. Дикумарол спречава овај процес и одвијање нормалне хемостазе организма. Односи између коагулације крви, витамина К и дикумарола остали су до данас значајни за клиничко разумевање процеса коагулације и дејства антикоагулационих лекова.

Током четрдесетих година заједно са групом својих студената Линк је изоловао дикумарол (3,3'-метилен-бис-[4-хидроксикумарин]), а годину дана касније одредио је хемијску структуру и синтетисао активни дикумарол. Више од сто структурних једињења дикумарола је синтетизовано у циљу изналажења компоненте са највећим антикоагулантним потенцијалом. Сва једињења су пописана по бројевима и сортирана по групама на основу њихове хемијске структуре. Процењујући антикоагулантну активност компоненти под бројевима од 40 до 60 Икава (М. Икава) је 1944. године дефинисао кумарине под бројем 42 и 63 као потентније, чак и од дикумарола. Испитујући њихова дејства на пацовима и псима установио је да продукују много униформнији антикоагулантни одговор (Икава, 1944). Компонента 42, која је по хемијској структури (3-[α -ацетонилбензил]-4-хидроксикумарин) (Слика 1), добила је име на основу почетних слова **Wisconsin Alumni Research Foundation** и наставка **arin** од кумарин (coumarin) и данас је позната под именом варфарин (warfarin).



Слика 1. Структура варфарина (3-(α -ацетонилбензил)-4-хидроксикумарин).

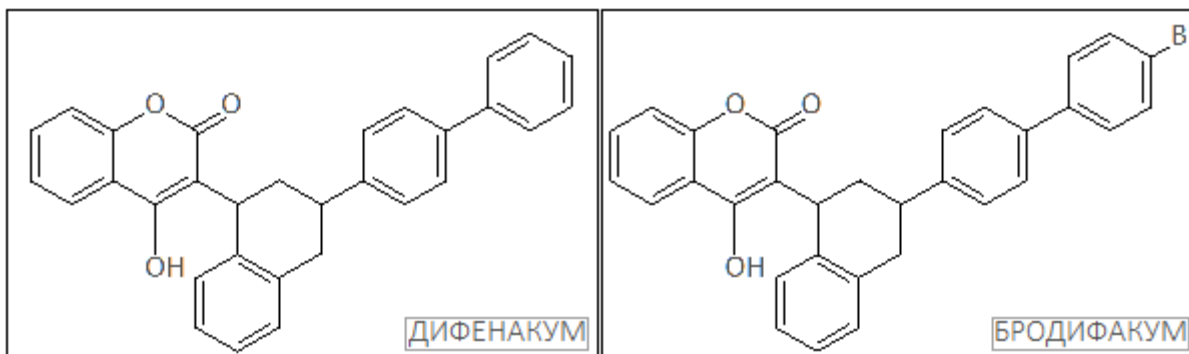
1.1.1. Варфарин као отров (родентицид)

Након проучавања ефеката дикумарола, као и утицаја витамина К који је у већим количинама заступљен у житарицама, Линк је закључио да дикумарол нема довољно снажно дејство за употребу као родентицид. Стога се 1948. године одлучио за промоцију компоненте 42 (варфарин) као родентицида који је унео револуцију у сузбијању бројности глодара. Вишеструке дозе варфарина су замениле високо токсичне акутне отрове, као што су цијанид и стрихнин. Варфарин је био много потентнији и ефикаснији, јер је као антикоагулант доводио до угинућа животиња услед масивних унутрашњих крварења и повећавања фрагилности зидова крвних судова. Стога је веома брзо постао лидер у области родентицида. Користи се за сузбијање бројности популација глодара у резиденцијалним, индустријским и пољопривредним подручјима (Слика 2). Варфарин се меша са храном која служи као мамац, а континуираним вишедневним уносом мамаца долази до његове акумулације. Акумулирана доза од 50 mg/kg - 500 mg/kg или уношење 1 mg/kg/дневно у току 6 дана имају летални исход. Варфарин се може користити и као талк, који се акумулира на крзну животиња и уноси у организам приликом тимарења, или се преко коже (трансдермално) уноси у организам, при чему испољава бројне нежељене ефекте. Генерално се варфарин сматра сигурним за употребу и по подацима из литературе милиони тона користе се широм света више од 50 година, још увек са веома малим ризиком за људе и животиње које нису глодари. Међутим, забележени су случајеви токсичности за људе, а примећено је и да се таложи у јетри птица и других животиња уколико се хране отрованим глодарима, што може довести до штетних последица.



Слика 2. Комерцијални производ за сузбијање глодара.

Са појавом резистенције на варфарин уведени су родентициди дифенакум и бродифакум као нови 4-хидроксикумарински антикоагуланти (Hadler и Shadbolt, 1975). Оба родентицида имају исти 4-хидроксикумарински сложени прстен као и варфарин, али са хемијски додатим новим тетрахидронафтилским ланцем који обезбеђује јачу везу са липофилним варфаринским рецептором (Слика 3). Они су много јачи антикоагуланти од варфарина и показали су се као ефективни родентициди код животиња резистентних на варфарин (Breckenridge и други, 1985).



Слика 3. Хемијска структура 4-хидроксикумаринских антикоагуланаса.

1.1.2. Варфарин као лек / терапијско средство

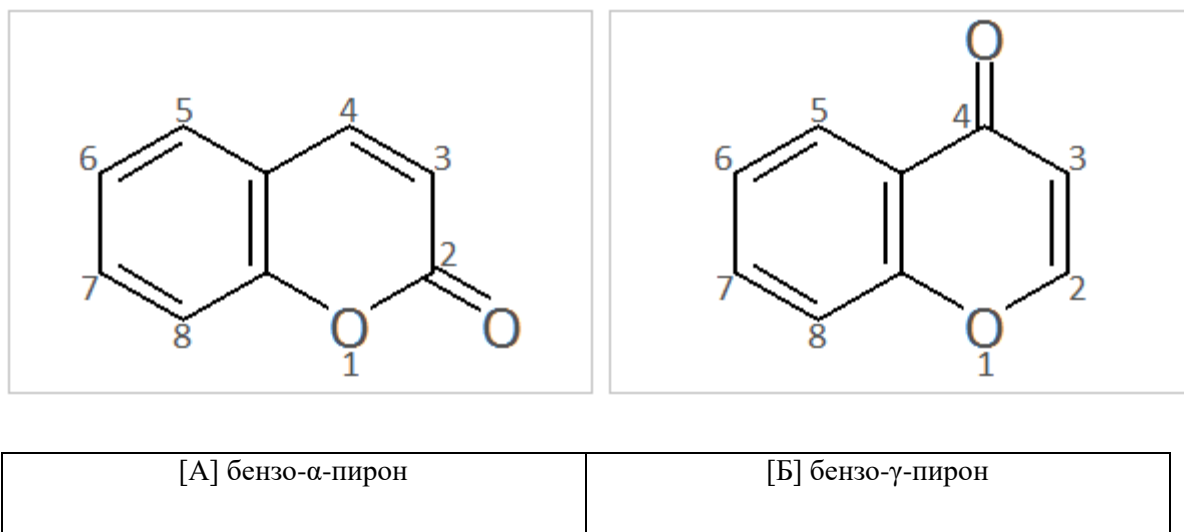
Након широке употребе као родентицида, варфарин је успешно доживео транзицију у клинички користан антикоагулант 1950. године због добре растворљивости у води и добре биолошке расположивости након оралног дозирања. Много потентнији од дикумарола, уз задржавање особина реверзibilног

антикоагулантног ефекта са примањем високих доза витамина К, варфарин је заиста деценијама након свог открића задржао позицију доминантног антикоагуланта. Након увођења компоненте 42 као родентицида, Линк је исказао бојазан да ће клиничари нерадо пацијентима преписивати отров као лек. Међутим, варфарин је достигао велику популарност као лек након примене у лечењу инфаркта миокарда председника САД Двајта Ајзенхауера 1955. године. Овоме је претходила прича о неуспелом покушају самоубиства америчког војника, испијањем велике дозе лека, која га није усмртила, већ довела до нежељених крварења. Крварење је, хитном реакцијом лекара, заустављено уз помоћ витамина К (Sharigo, 1953). Успех у третману инфаркта миокарда је охрабрио клиничку заједницу, која је након ових догађаја варфарин сврстала у редован фармацеутик. Међутим, с обзиром на то да се почетна истраживања нису вршила у сарадњи са клиничарима, да варфарин има узак терапеутски опсег (почетну одложену фазу од 12 до 24 сата пре него што се манифестује његов антикоагулантни ефекат), као и да је потребно неколико дана да се испољи његов кумулативни ефекат, Линк је већ тада изразио сумњу у адекватну клиничку употребу, јер се доза варфарина не прилагођава сваком пацијенту, зависно од статуса витамина К, као и других фактора, укључујући ту и функцију јетре и бубрега. Линкова брига се показала као потпуно оправдана, а варфарин је стекао репутацију опасног лека због епизода неконтролисаних крварења. Било је потребно да прође деценија да се рутински уведе пажљиво одређивање протромбинског времена и да се витамин К одреди као антидот. Дикумароли, а пре свега варфарин и његове генеричке копије, развијане углавном у европским лабораторијама, били су антикоагуланти избора до 1950-тих, када је постигнут бољи квалитет варфарина. Варфарин је до данас најкоришћенији антикоагулант, као антагонист витамина К, који је кључни учесник у коагулационој каскади. Међутим, још једна историјска епизода сврстала га је у ред супстанце којом је извршено велико убиство. Године 1953. од последица можданог удара, а како је касније аутопсијом утврђено, и јаке гастроинтестиналне и реналне хеморагије изазване током десетодневног тровања варфарином, умро је совјетски лидер Стаљин (Fria, 2011).

1.2. Структурна својства кумарина и његових деривата

Варфарин је дериват кумарина, супстанци које своје име дугују карипском термину „сумагу“ за биљку *Dipreryx odoratus* из фамилије грашка, из које су први пут

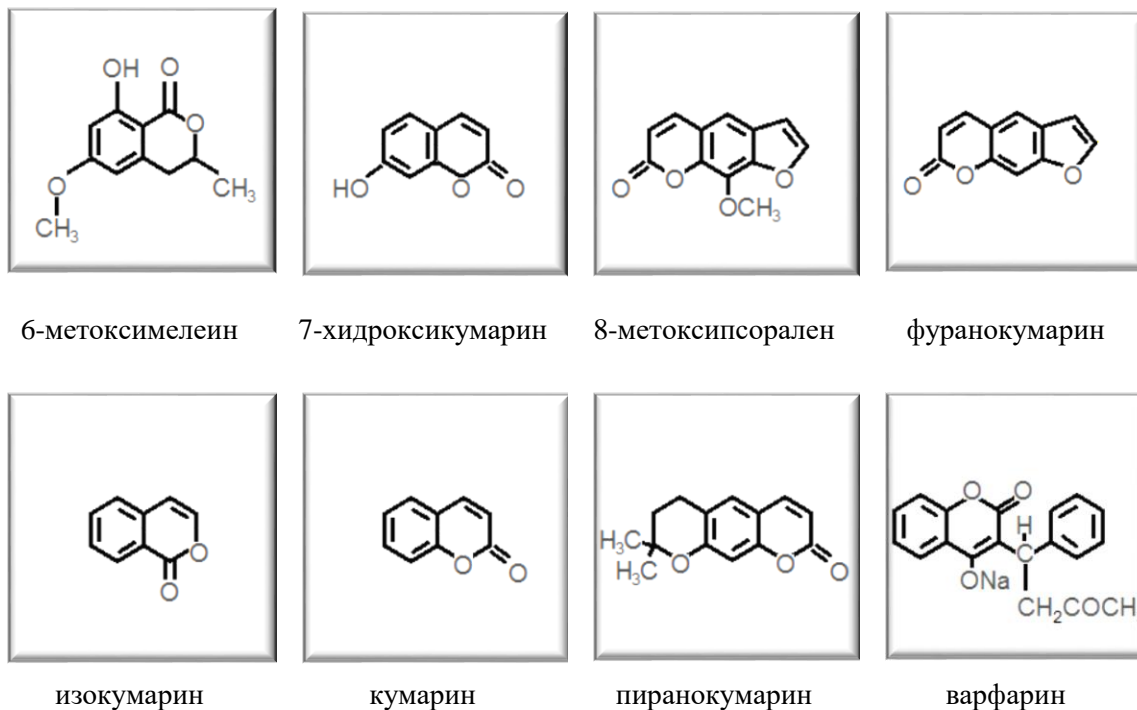
изоловани 1820. године (Jain и Himanshu, 2012). Кумарини припадају великој класи фенолних супстанци и класификовани су као бензопиронска једињења, која настају кондензацијом молекула α -пирона са бензеновим прстеном (Agarwal, 2000; Ојала, 2001). Бензопирони се деле у бензо- α -пироне којима припадају кумарини и бензо- γ -пироне, чији су главни чланови флавоноиди (Слика 4).



Слика 4. Хемијска структура субкласа бензопирона са базичном кумаринском структуром (бензо- α -пирон) [А] и флавоноид (бензо- γ -пирон) [Б].

Хемијске особине молекула кумарина условљене су присуством лактонске структуре, двогубе везе α -пирона и ароматичног прстена. Пријатног су мириса са карактеристичном аромом сена и ваниле због чега се користе и у козметичкој индустрији. Присутан у већој концентрацији, кумарин даје горак укус, што се сматра еволуционим механизмом за одбрану биљака од предатора.

Супституцијом и конјугацијом на различитим местима прототипске компоненте кумаринског молекула (познатог као 1,2-бензопирон или α -хидроксицинамички кисели 8-лактон), настају бројне природне супстанце (Слика 5), тако да је до данас идентификовано око 1600 једињења који су углавном секундарни метаболити не само зелених биљака, већ и бактерија и гљива (Murray, 1989).



Слика 5. Структура кумарина насталих супституцијом и конјугацијом прототипског кумаринског једињења.

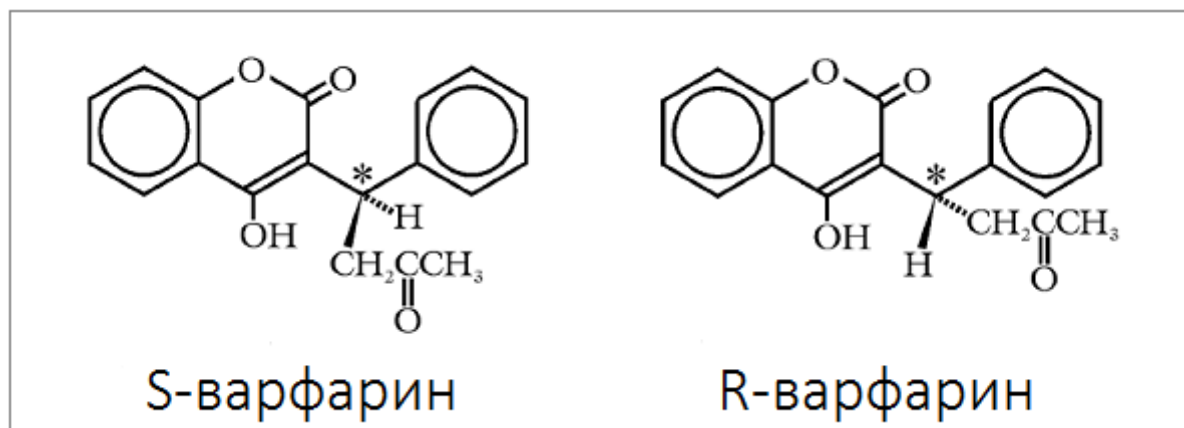
Постоје четири основна подтипа кумарина: прости кумарини, фуранокумарини, пиранокумарини и кумарини супституисани у пирановом прстену, најчешће на 3-С или 4-С позицији, што укључује 4-хидроксикумарин (Ласу и О'Kennedy, 2004). 4-хидроксикумарин се по хемијским особинама разликује како од самог несупституисаног кумарина тако и од осталих хидроксикумарина. Управо овом типу кумарина припада синтетско једињење варфарин.

Кумарини се првенствено биосинтетишу у биљкама. Међутим, 4-хидроксикумарин се синтетише једино у садејству са гљивама у процесу који започиње након руптуре ћелије биљке. Приликом труљења слатке дателине *Melilotus albus* у садејству са гљивама рода *Penicilium* или *Aspergillus*, након узастопних хемијских реакција и измена метаболичког пута транс-циметне киселине, која је природни супстрат за добијање кумаринског молекула, настаје 4-хидроксикумарин. До данас је описан велики број метода за синтезу кумаринског молекула које се већином заснивају на кондензацији супституисаног фенола и деривата дикарбонских киселина, а прву синтезу 4-хидроксикумаринског молекула извршио је Аншутц (R. Anschütz) 1903. године.

Природни и синтетички деривати кумарина предмет су бројних фармаколошких испитивања и до сада су на основу њих изучени и дефинисани многобројни видови њихове активности. Захваљујући својству њихове структурне једноставности означени су као најзначајнији међу бензо- α -пиронима. Готово да не постоји фармаколошко деловање које није констатовано код кумаринских деривата, због чега се за њих може рећи да су елитна класа секундарних биомолекула. Иако не постоји егзактна корелација зависности биолошке активности од структуре кумаринских деривата, јер се за поједине деривате може везати више од једне биолошке активности, описују се као антиартериосклеротички, антиинфламаторни, антиканцерогени, антикоагулантни, антимикуробни и антиоксидативни агенси. Поједини структурни аспекти су ипак предуслов биолошке активности, тако да су минимални структурни захтеви, хидроксилна група на положају С-4 и неполярни хидрофобни остатак на положају С-3, предуслов антикоагулантне активности (Petipas и други, 2001).

1.2.1. Структурна својства варфарина

Молекул који се састоји од 19 угљеникових, 16 водоникових и 4 кисеоникова атома ($C_{19}H_{16}O_4$) формиран у 3 прстенасте структуре (Слика 6), познат је под генеричким именом варфарин, у IUPAC номенклатури као (RS)-4-хидрокси-3-(3-оксо-1-фенилбутил)-2Н-хромен-2-он, а под заштићеним именима Coumadin, Jantoven и Marevan. Варфарин има малу молекулску масу од 308.328 g/mol, што је типично за лекове који се преписују за оралну терапију. То је безбојна, безмирисна чврста супстанца (пудер). Добро је растворљива у води (17 mg/L на 20 °C), средње растворљива у ацетону и диоксану и слабо растворљива у етанолу, метанолу, изопропанолу и практично нерастворљива у бензену и циклохексану. Слабо је кисела са рКа 5.0. У терапијске сврхе углавном се даје у форми натријумове соли, у којој је хидроксилна група замењена натријумом.



Слика 6. Варфарин (R)- и (S)-енантиомер (звездица представља хирални центар сваког молекула).

Фармаколошки важна карактеристика молекула варфарина је хиралност од грчке речи χεῖρ, у преводу рука, формално се дефинише као геометријско својство у коме се објекат и његов лик у огледалу не могу преклопити у равни (Lin и други, 2011). Ово својство је карактеристично за бројне биолошке системе, од базичних градивних супстанци аминокиселина и масних киселина, па до сложених структура организма. Варфарин се јавља у енантиомерним облицима (грчки εναντίος, супротан) који имају исте физичке карактеристике, али се разликују у погледу смера ротације поларизоване светлости и интеракције са различитим оптичким изомерима других компоненти. Енантиомерни облици имају и различита фармакокинетичка (апсорпција, дистрибуција, метаболизам, екскреција) и фармакодинамичка (интеракција са рецепторима и догађаји проистекли из интеракција) својства. Комерцијални препарат варфарина представља рацемат који се састоји од једнаке количине S(-) и R(+) стереоизомера, од којих је S много активнији. С обзиром на велику сложеност његове фармакологије могло би се рећи да су то два лека примењена заједно.

1.2.2. Фармакокинетика и фармакодинамика варфарина

Биолошки одговор на варфарин представља резултат интеракције између саме супстанце и функционалних ћелијских рецептора или ензимских система. Јачина одговора на варфарин је зависна од његове концентрације на месту деловања, примењене дозе, апсорпције и дистрибуције до места деловања, као и стопе његове елиминације из организма. Сви ови процеси су динамички и условљени бројним

факторима. Молекулска база фармакокинетики варфарина интензивно је проучавана у циљу разјашњења сложених механизма његовог дејства (Daly и King, 2003).

1.2.2.1. Апсорпција варфарина

Варфарин се брзо апсорбује из гастроинтестиналног тракта са готово 100 % - ном биорасполоивошћу (Palareti и Legnani, 1996), уз постојање знатних интериндивидуалних варијација. Осим тога, студије са варфарином су указале на снижену апсорпцију лека услед присуства хране у гастроинтестиналном тракту и деловања других примењених лекова. Варфарин се добро апсорбује и перкутано, а код поновљених излагања може довести и до токсичних реакција (Kataranovski и други, 2008). Пораст концентрације варфарина у плазми постиже се најчешће у оквиру 4 сата од отпочињања терапије, са максимумом у деведесетом минути. Антитромбогени ефекат варфарина независан је од његове концентрације у плазми која није одлучујућа детерминанта у дозирању овог агенса. У циркулишућој крви варфарин је везан за албумин и α 1- кисели гликопротеин. α 1- кисели гликопротеин кодован је са ORM1 (орозомукоид 1 или α 1-кисели гликопротеин 1 ген) и ORM2 (орозомукоид 2 или α 1-кисели гликопротеин 2 ген) геном (Otagiri и други, 1987; Nakagawa и други, 2003). Докази, базирани на тестовима инхибиције, указују да транспорт варфарина кроз мембране ћелија, на пример ћелија јетре, може бити посредован P-гликопротеином (мултirezистентан протеин 1) који је кодован ABCB1 (ATP-binding cassette transporter B1) геном. Полиморфизам ABCB1 везан је за промене у iRNK, експресију протеина и за фармакокинетички профил варфарина (Ishikawa и други, 2004), што додатно указује на комплексност и сложеност деловања варфарина.

1.2.2.2. Транспорт варфарина

Као што је претходно наведено, комерцијално расположив варфарин је рацемска мешавина S(-) и R(+) стереоизомера. У плазми, оба стереоизомера се високим афинитетом (99 %) вежу за албумин, а само 1 % циркулише слободно (Ferrer и други, 1998; Vertucci и други, 1999). Серумски албумин човека поседује четири везујућа места за варфарин са различитим афинитетом везивања (O'Reilly и Kowitz, 1967; Porter, 2010). Стереоскопском идентификацијом установљено је да се варфарин веже за албумин као јонизована форма отвореног таутомерног ланца. Обе таутомерне форме варфарина S и R вежу се за исто место. Невезана фракција варфарина везује се

за рецепторе у хепатичним ћелијама где врши свој антикоагулантни ефекат. На основу овога, очекивало би се да лекови који повећавају концентрацију невезаног варфарина, истискујући га из албумина, могу потенцирати антикоагулантни ефекат варфарина. Међутим, ово није доказано ниједном студијом јер се вероватно сваком потенцијалу за повећање фармаколошког ефекта супротставља његов бржи клиренс. Јетра игра централну улогу у модулацији антикоагулантног ефекта витамин К антагониста, тј. она је место фармаколошког дејства варфарина, место синтезе коагулационих витамин К-зависних фактора и место метаболичког клиренса варфарина и коагулационих протеина. Као резултат ових многобројних сложених процеса јетра има способност како за појачавање тако и за смањивање антикоагулантног ефекта варфарина.

1.2.2.3. Елиминација варфарина

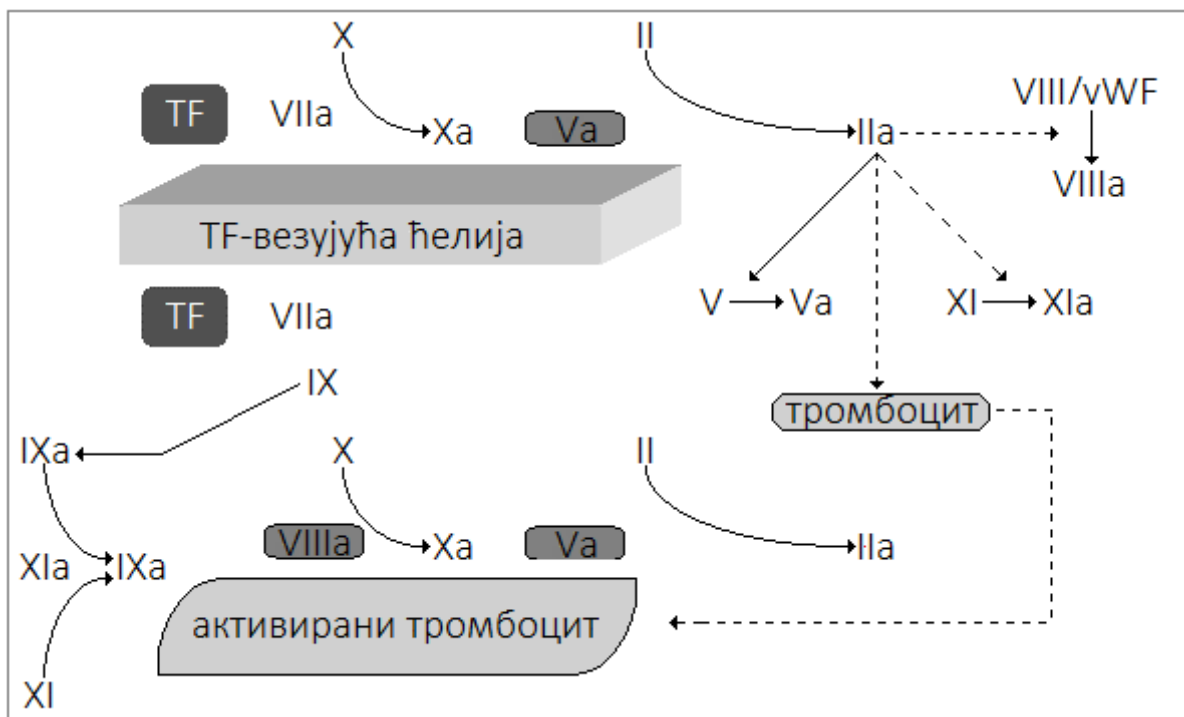
Полуживот варфарина у плазми генерално је независан од дозе, а ефективно време његове елиминације износи око 40 часова, са израженим интериндивидуалним карактеристикама (у опсегу 20 h – 60 h) (Palaretti и Legnani, 1996). Иако је дистрибуција оба енантиомера слична, време потребно за уклањање R-варфарина износи 50 % од потребног времена за S-варфарин, што изражено временом полуживота износи за R-варфарин (37 h – 89 h), а за S-варфарин (21 h – 43 h). Рацемат варфарина се стереоселективно метаболише дејством хепатичног цитохром P-450 (CYP) микрозомалног ензима. CYP2C9 је основни ензим у метаболизму варфарина, али алтернативни метаболички путеви, генетски полиморфизми CYP2C9 гена су удружени са значајном редукијом метаболизма, што је и основа интериндивидуалних разлика у осетљивости на варфарин. Правилно разумевање интеракција између генетичких фактора и других варијабли које утичу на ефекат варфарина, омогућавају побољшања у вођењу терапије, а посебно за почетно дозирање као најважнији моменат у успостављању њене ефикасности.

1.3. Механизам деловања варфарина: инхибиција синтезе фактора коагулације

1.3.1. Хемостаза и коагулација крви

Хемостаза или престанак крварења је физиолошки процес који се одвија у лумену крвног суда (интраваскуларно) ограниченог ендотелијумом. Она је процес

сталног одржавања равнотеже између механизма који доводе до згрушавања крви (коагулација) и механизма који то згрушавање спречавају (фибринолиза). Такође, хемостаза представља природни прекид крварења из повреде или оштећеног крвног суда, као и спречавање изласка крви кроз незлеђен крвни суд. Хемостазу чине васкуларна, тромбоцитна и фаза коагулације крви. Процес коагулације, некада представљен каскадним моделом који је деловао у засебном унутрашњем и спољашњем путу, данас је представљен активним процесом који се састоји из две фазе: иницијација и пропација (Слика 7), у којима тромбин заузима централно место (Colman и други, 2001). Завршни продукт процеса коагулације је превођење растворљивог фибриногена у нерастворни фибрин (McPherson и Pincus, 2007) и формирање фибриноског угрушка као завршног резултата комплексне серије протеолитичких реакција. Ове реакције отпочињу нарушавањем континуитета зида крвног суда, чиме се остварује контакт крви са ткивним фактором (TF) (Carson и Vrozna, 1993) који је конститутивно експримиран на мембрани фибробласта и макрофага, уз његово истовремено експримирање на површини ендотелних ћелија, под утицајем ендотоксина, интерлеукина-1 (IL-1) или фактора некрозе тумора (TNF). На процес хемостазе утичу бројни фактори који укључују: тромбоците, гранулоците и моноците, као и коагулационе, фибринолитичке и антикоагулантне протеинске системе. Сваки од ових система учествује у регулацији осталих (O'Shaughnessy и други, 2005). На значај хемостазе и њених елемената указује присуство хомологих протеина у примитивним организмима још од пре 450 милиона година (Davidson и други, 2003).



Слика 7. Иницијација и пропација хемостазе.

1.3.2. Витамин К-зависни протеини коагулације

Варфарин, као сви кумарински деривати, свој антикоагулантни ефекат остварује инхибицијом синтезе у јетри четири витамин К-зависна протеина процеса коагулације: протромбина (FII), FVII, FIX, и FX, који садрже 10 – 12 Gla аминокиселинских остатака (Versteeg и други, 2013). Сви антагонисти витамина К имају исти механизам дејства, али се разликују по фармакокинетичким карактеристикама. Варфарин свој антикоагулантни ефекат остварује интерференцијом са циклично интерконверзијом витамина К и витамин К епоксида (Wallin и Martin, 1985). Витамин К је кофактор за посттранслациону карбоксилацију глутаматских аминокиселинских остатака у γ -карбоксиглутамат (Gla), на N-терминалном региону витамин К-зависних протеина FII, FVII, FIX и FX, као и протеина С и протеина S (Ansell и други, 2004). Процесом γ -карбоксилације омогућена је неопходна конформациона промена коагулационих протеина у присуству калцијумових јона, како би се изградио комплекс витамин К-зависних протеина и њихових кофактора са фосфолипидном површином и на тај начин омогућила њихова биолошка активација (Nelsestuen, 1975; Borowski и други, 1986). Карбоксилација витамин К-зависних фактора коагулације катализована је

карбоксилазом која захтева редуковану форму витамина К (витамин КН₂), молекулски кисеоник и угљен диоксид. Током те реакције витамин КН₂ се оксидује до витамин К епоксида, који се рециклира у витамин К дејством ензима витамин К епоксид редуктазе; повратно, витамин К се редукује до витамина КН₂ дејством ензима витамин К редуктазе. Варфарин делује као витамин К антагонист инхибицијом витамин К епоксид редуктазе и могућом инхибицијом витамин К редуктазе (Whitlon и други, 1978; Choopara и други, 1988). Сам процес води до унутарћелијске потрошње витамина КН₂ и на тај начин ограничава γ -карбоксилацију глутаминских аминокиселинских остатака витамин К-зависних протеина коагулације (Oldenburg и други, 2008; Tie и други, 2011). Последица деловања варфарина је нагомилавање некарбоксилваних, неактивних прекурсора фактора коагулације (PIVKA - Protein Induced by Vitamin K Antagonism or Absence) до тачке када процес коагулације више није могућ.

Истовремено ограничавајући карбоксилацију протеина С и протеина S варфарин нарушава функционисање ових природних антикоагуланата (Harrison и други, 1997, Abdel-Aziz и други, 2015). Ефекат варфарина на витамин К-зависне протеине фактора коагулације представља базу терапеутске антикоагулације и објашњава продужење протромбинског времена (енгл. Prothrombin Time, PT) као теста који се користи у праћењу ефеката терапије (Furie, 2000).

1.3.3. Механизам деловања: Антитромботски ефекат варфарина

Антикоагулантни ефекат варфарина који изражава способност продужења времена коагулације битно се разликује од његовог антитромботског ефекта који изражава способност редукције коагулације крви. Током дуготрајне, хроничне, употребе варфарина ова два ефекта готово могу да се поклопе. Међутим, у току иницијалне фазе терапије варфарином они су строго раздвојени. Након отпочињања оралне терапије, дешава се брза и готово комплетна апсорпција варфарина, али изостаје пораст у протромбинском времену, који је очекујући услед његовог антикоагулантног ефекта. Ова диспропорција, и наизглед изостао ефекат, последица је времена потребног да декарбоксилисани фактори замене ефективне факторе коагулације. С обзиром на то да варфарин не утиче на катаболизам коагулационих фактора крви, снижење функционалних фактора, пре почетка деловања варфарина, последица је њихове потрошње која зависи од индивидуалних стопа разградње сваког

од њих. Након отпочињања деловања дозираог варфарина прва се смањује концентрација функционалног коагулационог фактора VII (FVII) због кратког времена полуживота (4 h – 7 h). Иако је пад концентрације FVII брз и може довести до приметног продужења протромбинског времена, ипак није довољан да изазове анти тромботски ефекат без редуције концентрације остала три коагулациона фактора чија времена полуживота износе за фактор FIX 20 h – 24 h, за FX 48 h – 72 h и за FII 60 h (Marder и Shulman, 1964). Описано кашњење у постизању адекватне антикоагулације, упркос продуженом времену коагулације, има велику, посебно клиничку важност, јер је током тог периода повећан ризик од тромбоемболичких компликација. Варфарин инхибицијом карбоксилације природног антикоагуланта протеина C доводи до снижења његове концентрације и до развоја протромботског стања које може изазвати тромбозу. Управо је овакав развој догађаја узрок синдрома познатог као „некроза коже изазвана варфарином“ (Comp, 1993; ADRAC, 2005).

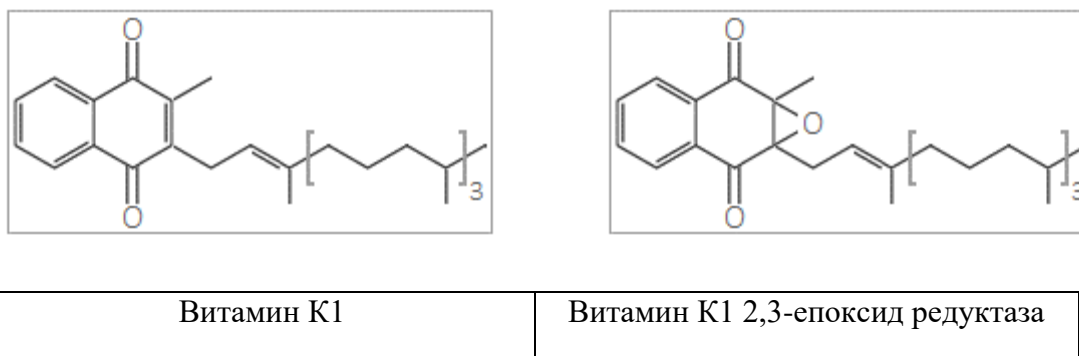
1.3.4. Циклус витамина К

Пошто варфарин своју кључну улогу, пре свега као антикоагулант, испољава на нивоу интерференције у циклусу витамина К, који је неопходан за синтезу витамин К-зависних коагулационих фактора у јетри (Табела 1), разумевање биолошке функције и механизма деловања витамина К кључни су за разумевање дејства и ефеката варфарина.

Табела 1. Коагулациони фактори.

Важећа номенклатура	Име	Улога	Полуживот (h)
Фактор I	Фибриноген	Прекурсор фибрина	90
Фактор II	Протромбин	Серинск протеаза у протромбиназа комплексу	65
Фактор III	Ткивни фактор	Кофактор	
Фактор IV	Калцијум	Иницијација коагулације	
Фактор V	Проакцелерин	Кофактор у протромбиназа комплексу	15
Фактор VII	Проконвертин	Иницијација коагулације	5
Фактор VIII	Антихемофилијски фактор	Кофактор у теназа комплексу	12
Фактор IX	Christmas-ов фактор	Серинска протеаза у теназа комплексу	24
Фактор X	Stuart-Power-ов фактор	Серинска протеаза у протромбиназа комплексу	40
Фактор XI	Ранији плазма тромбопластин	Убрзавање коагулације	45
Фактор XII	Hageman-ов фактор	Контактни фактор	50
Фактор XIII	Фибрин стабилизујући фактор	Унакрсно везивање фибрина	200
Прекаликреин	Fletcher-ов фактор	Контактни фактор	35
Високо молекулски кининоген	Fitzgerald-ов фактор	Контактни фактор	150

Историја витамина К датира још од 1929. године када је Дам (H. Dam) радећи на разјашњењу метаболизма стерола открио да експерименталне животиње на дијети без масти развијају јаку анемију и субкутану хеморагију. Компоненту растворљиву у мастима са антихеморагијским дејством, коју је изоловао из јетре, Дам је назвао витамин К, по првом слову немачке речи „*Koagulation*“. Витамин К припада фамилији једињења која деле заједничко 2-метил 1,3-нафтокинонско језгро субституисано у позицији 3 са различитим полиизопреноидима (Слика 8).



Слика 8. Структурна формула витамина К1 и витамин К1 2,3-епоксид редуктазе.

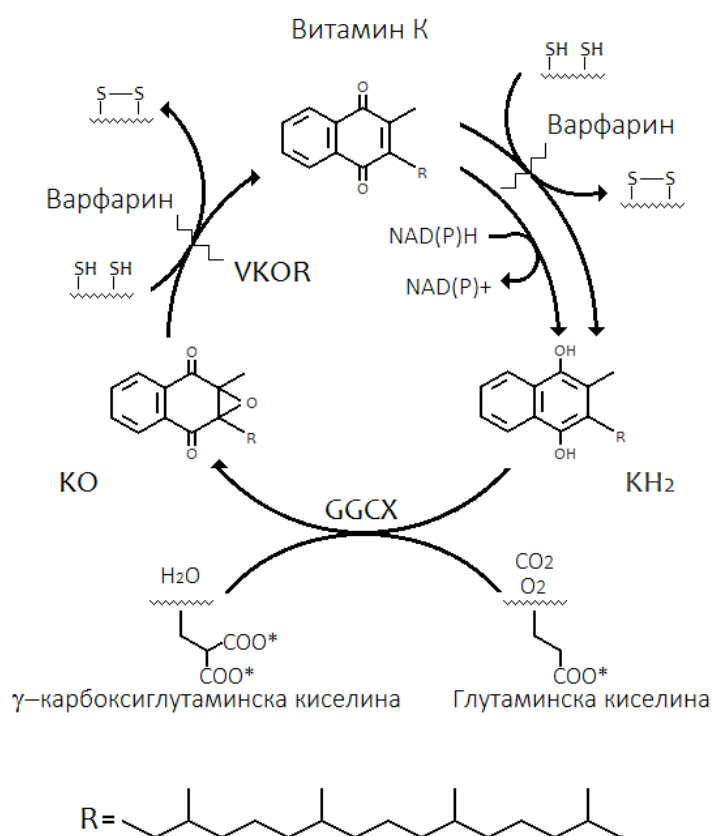
Јавља се у две природне форме: филокинон познат као К1, који синтетишу биљке и менакинон К2, који синтетишу бактерије и који чине фамилију ових

једињења. Филокинони из биљака су главни извори витамина К у исхрани. Иако је витамин растворљив у мастима, у телу се налази у малим залихама које се веома брзо празне у нарушеном дијетарном уносу. Основни ензими идентификовани као део циклуса витамина К су γ -глутамил карбоксилаза (GGCX) и витамин К епоксид редуктаза (VKOR) (Oldenburg и други, 2008). Витамин К се у ткиву редукује до витамин К хидрокинона, који служи као кофактор за γ -глутамил карбоксилазу (GGCX), микрозомални ензим лоциран у лумену ендоплазматичног ретикулума, који катализује посттранслациону карбоксилацију специфичних остатака глутаминске киселине (Glu) до γ -карбоксиглутаминске киселине (Gla) на N терминалном региону свих витамин К-зависних протеина (Presnell и Stafford, 2002). γ -глутамил карбоксилација је основни механизам који доводи до стварања биолошки активних витамин К-зависних протеина, укључених у коагулацију крви, метаболизам костију, сигналну трансдукцију и ћелијску пролиферацију. Сви новосинтетисани витамин К-зависни протеини су биолошки неактивни, и пре секретовања у крвни ток морају да се активирају дејством GGСX (Berkner, 2008). Рециклирање витамин К епоксида (оксидована форма) у хидрокинон (редукована форма) одвија се кроз два редукциона корака. Први, који је осетљив на витамин К антагонисте (Whitlon и други, 1978; Fasco и други, 1982) и редукује витамин К епоксид у витамин К (природна форма витамина К1 у храни). Ову редукцију катализује ензим витамин К оксидоредуктаза (VKOR), док други корак, који је релативно неосетљив на витамин К антагонисте, користи NAD(P)H као кофактор за редукцију витамина К1 до витамина КН2.

Шерман (P.A. Sherman) је први претпоставио да се редукција КО у витамин К спроводи под дејством сулфхидрил зависне епоксид редуктазе, ензима VKOR који је осетљив на инхибицију варфарином (Sherman и Sander, 1981). Неке студије на животињама показале су да, и поред високог афинитета епоксидазе ка витамину К, постоји велика количина овог слободног витамина у јетри, која је довољна да доведе до протромбинске синтезе без потребе за рециклирањем епоксида. Као објашњење за овај процес наведене су могућности да сав витамин К није у истом пулу и да дифузија витамина кроз микрозомалну мембрану представља релативно успорен процес. Сва ова запажања и даље потврђују сложеност система и интеракција између витамина К и варфарина.

1.3.5. VKORC1 и варфарин

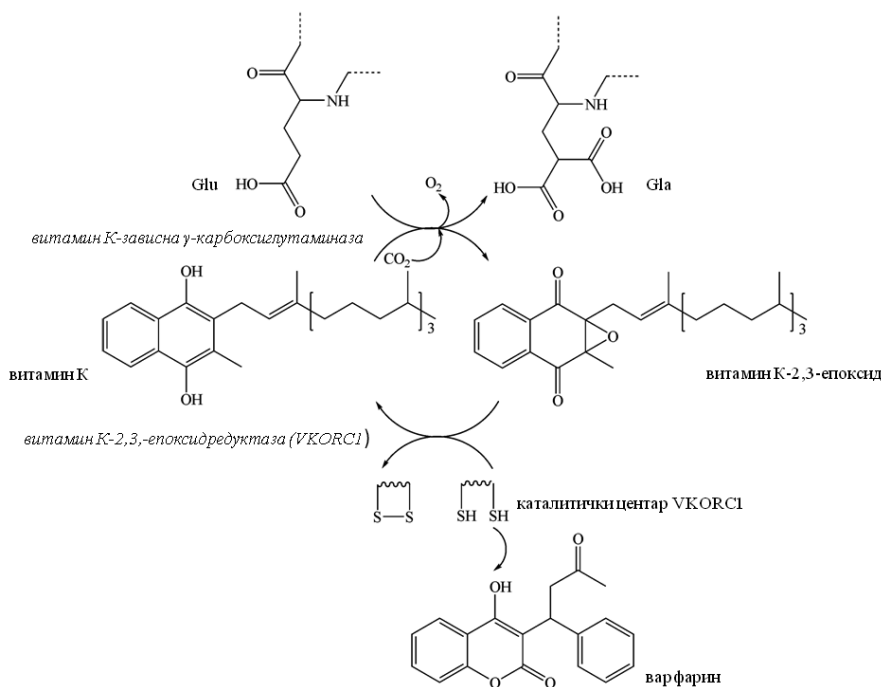
Способност рециклаже витамина К из витамин К 2,3-епоксида предуслов је нормалног одвијања процеса коагулације. Ген за хуману витамин К-зависну епоксид редуктазу - субјединица 1 (VKORC1), мапиран на краћем краку хромозома 16, састоји се из 3 егзона и 2 интрона и кодује мали интегрални мембрански протеин од 163 аминокиселинска остатка који садржи три мембранска α -хеликса (D'Andrea, 2005). Ген је идентификован 2004. године од стране Роста (S. Rost) и сарадника на основу испитивања чланова породица пацијената који су показивали отпорност на варфарин (Rost и други, 2004). За варфарин циљно место деловања је VKORC1 (Слика 9).



Слика 9. Циклус витамина К.

Многе од варијабилности у дозирању варфарина зависе од хаплотипова VKORC1*1,*2,*3 и *4. Бројна истраживања су потврдила да су чести полиморфизми појединачних нуклеотида (engl. Single Nucleotide polymorphism, SNP) у гену за VKORC1 удружени са осетљивошћу на варфарин. Код припадника Кавказоидне расе процењена је учесталост VKORC1*2 са 42 %, VKORC1*3 са 38 % и VKORC1*4 са 20 % и она се значајно разликује од учесталости код Монголоидне и Негроидне расе.

Према подацима из фармакогенетичких студија неопходно је пратити удруженост CYP2C9 и VKORC1 (Adcock и други, 2004; Miao и други, 2007; Jiang и други, 2016) због значајних клиничких последица до којих може да доведе специфична фармакокинетика и фармакодинамика варфарина и других оралних антикоагуланата. Механизам деловања варфарина је актуелно питање и у данашње време и то најмање из два разлога. Први је још увек непознат начин на који варфарин остварује интеракцију са VKORC1 ензимом, јер због трансмембранске природе VKORC1 не постоји снимљена кристалографска структура варфарин - VKORC1 комплекса. Други је још недовољно познат начин на који варфарин врши инхибицију редукције епоксидне форме витамина К и како долази до формирања дисулфидне везе. Ипак, по мишљењу које је данас уважено, варфарин механизам свог деловања остварује компетитивном инхибицијом хинонске структуре витамина К (Слика 10).



Слика 10. Антикоагулантна активност варфарина на нивоу витамин К епоксид редуктазе.

Фаско (M.J. Fasco) је са сарадницима предложио механизам по ком негативно наелектрисани атом сумпора из активног центра витамин К 2,3-епоксид редуктазе утиче на хинонску структуру витамин 2,3-епоксида, при чему се гради ковалентна веза између еоксида и ензима. Након тога другом реакцијом, такође негативног атома сумпора из каталитичког центра, долази до грађења дисулфидне везе уз истовремену редукцију витамина К (Kostova, 2005).

Иако означен као антагонист витамина К, варфарин не антаганише биолошку активност већ рециклажу витамина К (као што је напред детаљније описано), исцрпљујући на тај начин активност витамина. Адекватним дозирањем витамина К постиже се реверзни ефекат варфарина на синтезу витамин К-зависних фактора коагулације у јетри. Код тровања токсичном количином варфарина и сличних лекова, уобичајени третман је давање великих доза витамина К.

1.3.6. Резистенција или отпорност на варфарин

Резистенција на антикоагуланте представља проблем како у хуманој медицини, тако и у сузбијању штетних глодара. С обзиром да варфарин представља базични лек у лечењу тромбоза и њихових компликација, појава резистентности на овај антикоагулант доводи до озбиљних проблема у лечењу (Bodin и други, 2006; Kovač и други, 2009) Резистенција на варфарин као родентицид откривена је 10 до 15 година након његовог увођења. Први резистентни пацови су нађени у Шкотској 1958. године (MacNicol, 1986; Wallin и други, 2001). Резистенција на антикоагулант се дефинише као неспособност ових супстанци да утичу на продужење протромбинског времена до адекватне вредности, када се антикоагуланти примењују у нормалној препорученој или блиској дози (Lefrere и други, 1987). Први резултати који су указали да је резистенција на антикоагуланте генски условљена добијени су седамдесетих година XX века. Сазнања о генској основи механизма резистентности на антикоагуланте, а пре свега на антикоагулантне родентициде, направила су велики помак у разумевању механизма деловања варфарина. Прве смернице за идентификацију гена у синтези VKOR проистекле су из радова Кона и Пелца (Kohn и Pelz, 2000), а затим је Ли са сарадницима (Li и други, 2004) успео да идентификује први протеин VKOR код људи, који је назвао витамин К редуктазни комплекс субјединца 1 (VKORC1). Отпорност на варфарин је ретка појава код људи и повезује се са неколико *missence* (погрешно кодно значење) мутација у гену *vkorc1*. Ген за VKORC1 главна је мета за спонтане мутације које доводе до отпорности на варфарин (Rost и други, 2009). *Missence* мутације, које су одговорне за отпорност на варфарин, смештене су у очуваној луминалној петљи регије VKORC1 (Scott и други, 2008). Механизме којим мутације у гену изазивају неосетљивост на варфарин и остале оралне антикоагуланте тек треба проучити. Занимљиво је да је ген током еволуције добро очуван и да је мутација Y139C *vkorc1* гена нађена код артропода, бактерија,

археа и биљака што је указало на значај ензима VKORC1 у физиолошким путевима који нису везани за коагулацију (Goodstadt и Ponting, 2004). Отпорност на варфарин евидентирана је и код ензима CYP и то CYP4F2, који је оксидаза витамина К. Истраживачи који се баве изучавањем утицаја полиморфизама *vkorc1* на терапију антикоагулантима су установили заједнички полиморфизам *vkorc1* гена са полиморфизмом гена CYP2C9, који диктира синтезу ензима за метаболизам варфарина (Vožina, 2010).

1.3.6.1. Урођена резистенција на варфарин

Урођена резистенција је узрокована присуством комплекса са повећаним афинитетом за витамин К и редукованим за варфарин. Ова форма резистенције први пут је откривена пре готово 30 година, код човека, и одликује се немогућношћу остваривања жељеног степена антикоагулације, чак и при двадесет пута већој концентрацији антикоагуланта (O'Reilly и други, 1964). Урођена резистенција је аутозомално доминантна карактеристика. Две потенцијалне форме урођене резистенције су познате код човека. Једна, коју одликује фармакокинетички механизам у ком је појачан клиренс S-варфарина и до 5 пута и друга која је зависна од фармакодинамичких механизма дејства варфарина. И поред великог напретка у идентификацији генетских механизма који објашњавају варијабилност у одговору на варфарин, остаје неогворено на нека питања која би омогућила његову адекватну примену (Linder, 2001).

1.3.6.2. Стечена резистенција

Стечена резистенција код људи је документована у неколико случајева при интравенској примени липида, због чега је пацијентима препоручена употреба хепарина како би се избегли наведени проблеми (Lutomski и други, 1987; Mac Laren и други, 1997). Тачан механизам овог деловања још није јасан. Чу (K. Chu) је 1996. године описао природно испољавање мутације у пропептидној секвенци FIX која директно делује на γ -глутамил карбоксилазу. Пацијенту са протромбинским временом у жељеном опсегу, који је примљен у болницу са јаким крварењем, измерена је активност фактора IX < 1 % и враћена у нормалу (80 % – 120 %) после прекида варфаринске терапије. Мутација претпоставља замену аланинских (Ala) резидуа, треонинским (Thr), на позицији 10 у пропептидном региону фактора IX.

Резистентност на антикоагуланте код пацова резултира смањењем ефикасности антикоагуланта, што за последицу има узимање веће количине хране помешане са антикоагулантом и на тај начин садржај родентицида у резистентним јединкама може бити и до 5 пута већи у односу на осетљиве јединке, услед чега оне представљају опасност за средину са екотоксиколошког становишта (Greaves, 1994).

1.4. Ефекти варфарина на друге протеине зависне од витамина К

Осим значаја за синтезу биолошки активних форми протеина коагулације, витамин К је неопходан и за синтезу других протеина названих, оперативно, витамин К-зависни протеини. Ово је проширило је листу значаја физиолошке улоге витамина К и указало на могући шири утицај његових антагониста. Протеини који су укључени у метаболизам калцијума, костију и мозга, витамин К-зависни протеини и њихова функција сумарно су представљени у Табели 2. Три главна Gla протеина укључена у метаболизам костију су: остеокалцин, матрикс Gla протеини (MGP), и протеин S (Ferland, 1998; Price и други, 1983).

Табела 2. Витамин К-зависни протеини и њихова функција.

Име протеина	Физиолошка функција
Коагулација крви	
Протромбин	Прокоагуланс
Фактор VII	Прокоагуланс
Фактор IX	Прокоагуланс
Фактор X	Прокоагуланс
Протеин C	Антикоагуланс
Протеин Z	Антикоагуланс
Протеин S	Антикоагуланс
Коштани протеини	
Остеокалцин	Негативни регулатор формирања кости
Матрикс Gla протеини	Инхибитор калцификације
Протеин S	Неразјашњена
Протеини ћелијске регулације	
Gas6	Ћелијска диференцијација, пролиферација, адхезија, хемотакса, фагоцитоза, антиапоптоза
Остали витамин К-зависни протеини	
TMG	Неразјашњена
GRP	Неразјашњена
Периостин	Ћелијска миграција и ангиогенеза
Транстиретин	Лиганд за тиреоидне хормоне и ретинол везујући протеин

1.4.1. Витамин К-зависни протеини кости

Остеокалцин се синтетише у остеобластима и донотобластима и делује као негативни регулатор формирања кости. Садржи три Gla аминокиселинска остатка који повећавају афинитет његовог везивања за хидроксиапатит у кости. У експерименту на пацовима који су били на режиму варфарина уочена је повећана минерализација костију као резултат дефицита остеокалцина (Ducu и други, 1996). Протеин S, осим улоге у коагулацији крви као кофактор протеина C, има значајну

улогу и у костној хомеостази, а забележени су и случајеви остеопеније код особа са урођеним дефицитом протеина S (Pan и други, 1990).

1.4.2. Витамин К-зависни протеини и васкуларна калцификација

До скоро се сматрало да је васкуларна калцификација пасиван процес, зависан од физиолошких концентрација серумског фосфата и калцијума. Ипак, он је активно регулисан и биолошки веома комплексан. Витамин К-зависни протеини дају посебну димензију разумевању ових механизма (Danziger, 2008). Протеини попут MGP (Matrix Gla protein) и Gas6 (Growth arrest-specific gene 6) представљају два витамин К-зависна протеина који имају низ улога у васкуларној биологији. MGP има примарну функцију као инхибитор васкуларне калцификације, док Gas6 утиче на процес апоптозе и покретљивост ћелија глатке мускулатуре. Заступљени су у ткивима као што су: плућа, срце, бубрези, слезина и хрскавица. Свакако најзначајнија улога ових протеина је у механизму локалне васкуларне регулације којом зид крвног суда сам себе штити од непожељних утицаја и учествује у процесима сопствене репарације. Оштећење овог локалног механизма је почетни корак у каскади непожељних догађаја који на крају доводе до васкуларне калцификације. Као и витамин К-зависни протеини коагулације који се синтетишу и постижу функционалну биоактивност карбоксилацијом која се одвија у јетри, MGP и Gas6 биолошку активност постижу карбоксилацијом која се одвија у лумену крвног суда. Ова периферна карбоксилација се, као и хепатична карбоксилација, инхибира дејством антикоагуланата варфарина. Будући да постоје разлике између хепатичне и карбоксилације у периферној крви (Wallin и други, 1999; Berkner и Runge, 2004; Murshed и други, 2004) дејство варфарина на ове процесе се разликује. Ниске дозе варфарина инхибирају периферну карбоксилацију, без утицаја на карбоксилацију у јетри, што указује на већу осетљивост ових протеина на варфарин од фактора коагулације који се синтетишу у јетри (Naga и други, 2005). Код особа које су на терапији варфарином и тако изложени већем ризику, суплементација витамином К пружа заштиту од повећане калцификације крвних судова. За боље разумевање ових процеса неопходна су испитивања експресије и активације витамин К-зависних протеина код људи, што захтева дуготрајне клиничке студије. Стога су извршена бројна *in vitro* истраживања на животињским моделима (Price и други, 1998; Howe и Webster, 2000) којима је потврђен ефекат варфарина на васкуларну калцификацију. Комплексност процеса γ-

карбоксилације, који се огледа у мултипним ензимским реакцијама и бројним полиморфизмима гена одговорних за продукцију и метаболизам протеина у овом процесу, указује на присуство бројних фенотипа витамин К-зависних протеина и објашњава варијабилност у индивидуалној осетљивости на варфарин (Price и други, 1998). Важан аспект утицаја варфарина на процес васкуларне калцификације код људи и животиња остварује се и испољавањем полиморфизама у гену за VKORC, CYP2C9 и калуменин (Tantisattamo и други, 2014; Han и O'Neill, 2016). Мутација MGP гена код људи доводи до абнормалности ткива хрскавице и повећане калцификације артерија (Hug и други, 2005). Прерана калцификација ларингеалних структура код деце на дуготрајној терапији описана је у неколико радова (Rifkin и Pritzker 1984; Taubі и Capitanio, 1990).

1.4.3. Витамин К-зависни протеини и функције мозга

Gas6 и протеин S су два витамин К-зависна протеина који нису директно укључени у процесе когниције, премда њихово сигнално дејство у неуронима и глијалним ћелијама уз антитромботску функцију (протеин S) указују на учешће тих протеина у когнитивним процесима (Ferland и други 2012). Gas6 је откривен 1993. године, садржи 11 или 12 Gla аминокиселинских остатака и показује 43 % - 44 % хомологију са протеином S (Manfioletti и други, 1993). Gas6 је експримиран у бројним ткивима и укључен је у ћелијске процесе као што су: ћелијска диференцијација, пролиферација, активација, фагоцитоза и заштита од апоптозе (Bellido-Martin и de Frutos, 2008).

1.4.4. Ефекат варфарина као HIV-1 инхибитор

Лекови са анти-HIV дејством и имуномодулаторне супстанце из групе кумарина какви су и варфарин, циметидин, левамисол и грамицидин, могу да се користе као коктел комбинација у терапији (Bourinbaiar и Jirathitika, 2003). Нарочито обећавајући резултати указују на варфарин као потентни HIV инхибитор *in vitro*. Варфарин у микроларним концентрацијама инхибира HIV ретровиралну протеазу у компетитивној реакцији (Tummino и други, 1994). Гликопротеин 120 хуманог имунодефицијентног вируса-1 (HIV-1 env gp 120) је по структури сличан коагулационом FX (Tishkoff и Hunt, 2000), а FX зимоген може да учествује у активацији вируса. Захваљујући инхибиторном деловању варфарина на циклус

витамина К, од кога је зависна синтеза FX, варфарин може деловати као компетитивни инхибитор HIV-1 протеазе (Tishkoff и Hunt, 2000; Anderson и други, 2012).

1.4.5. Остали витамин К-зависни протеини

Трансмембрански Gla протеини (transmembrane Gla proteins TMG) своју функцију остварују у процесу ћелијске трансдукције (Kulman и други, 2001).

Протеин богат Gla (Gla rich protein, GRP) регулише калцијум у екстраћелијском простору.

Периостин је протеин удружен са екстра-ћелијским матриксом и учествује у ћелијској миграцији и ангиогенези (Coutu и други, 2008).

Транстиретин је идентификован захваљујући његовој везаности за тиреоидне хормоне и ретинол-везујући протеин (Ruggeberg и други, 2008).

Наведени протеини у свом саставу садрже Glu аминокиселинске остатаке што их сврстава у групу протеина на које варфарин може имати утицај у процесима карбоксилације.

1.5. Непожељни ефекти варфарина

Брзо након увођења варфарина у клиничку праксу четрдесетих година XX века, он је почео широко да се користи за примарну и секундарну превенцију тромбоемболијских болести. Међутим, извештаји о непожељним ефектима варфаринске терапије су довели до класификовања овог лека од стране Светске здравствене организације као токсичне хемикалије, заједно са другим агенсима из прве генерације хидроксикумарина, кумахлором и куматетралилом (WHO, 1995). У документу „Варфарин – здравствени и безбедносни водич број 96“ (енгл. Warfarin - Health and Safety guide No.96) Светска здравствена организација је уврстила варфарин у токсичне супстанце које спадају у групу Ib (високо ризична) једињења, при чему је указано да постоји ризик по здравље уколико се у организам унесе инхалацијом, контактом преко коже, или орално. Данас је варфарин трећи на листи лекова који доводе до непожељних дејстава (Pirmohamed и други, 2004). Из наведених разлога у

истом документу је издата препорука о неопходности истраживања могућих биолошких последица изложености овом антикоагуланту.

1.5.1. Крварења изазвана неусклађеном оралном терапијом варфарином

Антикоагулациони ефекат којим варфарин превенира тромбозу инхибицијом способности крви да коагулише, веома је близак ефекту који узрокује крварење, услед уског терапијског опсега. Због тога није изненађујуће да се као непожељни ефекти варфарина јављају блажа крварења [из носа (Denholm и други, 1993; Srinivasan и други, 1997), појава модрица (Scott и други, 2006)] али и снажна, па чак и фатална крварења [гастроинтестинална (Goldfarb, 1965; Bettler и други, 1983; Seo и други, 2009; Basir и Chong, 2010; Baser и други, 2013; Chang и други, 2015), интракранијална (Woo и други, 2014), генитоуринарна (White и други, 1996), перикардијална (Braitheh и Plana, 2009), пулмонарна (Kaaya и други, 2015) или хепатична]. Сам интензитет крварења је у узајамном односу са интензитетом антикоагулантне терапије (Turpie и други, 1988) и природом основне болести (Landefeld и Goldman, 1989). Најчешћа су гастроинтестинална крварења код којих комбинована терапија варфарина и аспирина доводи до нарушавања функције тромбоцита и изазивања гастроинтестиналне ерозије (Altıkaya и други, 2011; Veldt и други, 2011; Abraham и други, 2013; Samaħa и други, 2013; Bekheit и други, 2014; Chen и други, 2014; Keskin и други, 2014). Код окултних гастроинтестиналних или реналних лезија јака крварења се могу јавити и код усклађених доза варфарина. Крварења често не морају бити видљива, али се могу препознати симптоми у виду парализе, бола у грудима, абдомену, мишићима или у виду кратког даха или необјашњивих отока (Arnason и други, 2006). Ризик од крварења повећава се са годинама, па су код особа старијих од 65 година она чешћа (Petersen и други, 1989). Крварење се као нежељени ефекат терапије према подацима из литературе (Hirsh и други, 1998) јавља у 1.6 %, 3.3 %, 5.3 % и 10 % код пацијената који су 1, 3, 12 и 24 месеци на терапији. Из наведених разлога је јасно колико велики значај има лабораторијско праћење утицаја терапије, јер повећање изнад горњег терапијског опсега повећава ризик од крварења, што су показале бројне студије у којима је услед директне везе са интензитетом варфаринске терапије долазило до смањења крварења након смањења терапије. Међутим, смањење испод терапијског опсега је такође ризично јер повећава ризик од тромбоза (Jones и други, 2005).

1.5.2. Некроза коже и други ефекти на кожу изазвани оралном терапијом варфарином

Некроза коже је, уз хеморагијске компликације, најчешће описиван штетни ефекат варфарина. Изазвана варфарином, јавља се код особа са урођеним или стеченим дефицитом протеина C, или његовог кофактора протеина S, као природних антикоагуланата, и може бити фатална (Stewart и други, 1999; Chan и други, 2000; Scarff и други, 2002; Parsi и други, 2003; ADRAC, 2005). Међутим, некротична реакција може да се јави и без дефицита наведених протеина. Приликом увођења варфарина, услед бржег снижења концентрације протеина C у плазми, у односу на концентрацију FII, FIX и FX, и у условима настале хиперкоагулабилности, услед дисбаланса коагуланата и антикоагуланата, изостанак инхибиција FV и FVIII од стране протеина C, за последицу може да има субкутани инфаркт који се јавља од 3 до 10 дана након отпочињања терапије. Верхаген (H. Verhagen) је 1954. године први описао повезаност варфарина са кожном некрозом, а Ад-Ел и сарадници (Ad-El и други, 2000) су установили да готово 0.1 % пацијената на варфарину пати од наведеног синдрома. Некроза укључује и мека ткива и мишиће са чешћим испољавањем код жена, при чему се обично јавља на местима са више масног ткива (абдомен, дојке, задњица, бутине) (Lennox и други, 2001). Бројни нежељени ефекти терапије варфарином у кожи као што су: пруритични еритем, livedo reticularis, макулопапулоза и хеморагична некроза, указују на кожу као циљни орган за деловање варфарина (Sheps и Gifford, 1959; Eby, 1993; Coates и други, 1998). Екстремно необична, нехеморагична, кожна компликација удружена са варфаринском терапијом, позната под именом синдром љубичастих прстију, последица је повећаног ослобађања фрагмената атероматозног плака. Карактеришу га болне, љубичасте лезије на прстима обе шаке. Синдром се обично развија 3-8 недеља након отпочињања варфаринске терапије (David и други, 2003). У неким случајевима синдром напредује до гангрене или некрозе са потребом ампутације захваћеног ткива. С обзиром на то да је компликација реверзibilног карактера, прекидом терапије успоставља се нормализација наведене компликације.

Поред тога што варфарин у организам доспева оралним путем, као део терапије, у организам може доспети и перкутаном излагањем. Овај начин је веома чест код необучених лица која су изложена његовом дејству услед нестручног руковања и код професионалних лица која раде у припреми и паковању концентрата,

његовој обради за примену или чишћења производне апаратуре. У експерименталним студијама у којима је коришћена епикутана примена варфарина код лабораторијских пацова указано је на чињеницу да је кожа циљно ткиво за токсичне ефекте овог агенса будући да изазива ткивно оштећење након једнократног или вишекратног излагања коже овом агенсу (Kataranovski и други, 2008, Popov Aleksandrov и други, 2015; Zolotarevski и други, 2016).

1.5.3. Тератогени ефекти варфарина

Варфарин је генерално контраиндикуван током трудноће, премда се код спречавања високог ризика од венских тромбоза може применити у другом триместру трудноће. У физиолошкој трудноћи у циркулацији мајке долази до повећања концентрације фибриногена и активности коагулационих фактора VII, VIII, IX, X, као и адхезивности тромбоцита, док је истовремено лимитиран капацитет за синтезу фактора фетуса (Brooks и други, 2002; Vitale и други, 2002). Уколико се као терапија за ризичну трудноћу, која се развија као последица повећаног коагулационог капацитета, уведе варфарин, може доћи до одбацивања плода или ембриопатије изазване варфарином (WHO, 1995). Пошто варфарин интерферира са витамин К-зависном протеинском синтезом у костима (Price, 1988; Nauschka и други, 1989), тај ефекат је значајан за објашњење промена у густини костне масе код новорођенчади чије су мајке третиране варфарином. Варфарин лако пролази плаценталну баријеру и доводи често до спонтаног абортуса, мртворођености, неонаталне смрти и различитих конгениталних анормалија као што су: носна хипоплазија, сужење носног моста, сколиоза, калцификација кичме, бедрене кости, пете, абнормалност удова, брахидактилија и друге (WHO, 1995). Хиперметаболичка стања у трудноћи, каква су грозница или хипертиреозидизам, додатно повећавају дејство варфарина (Hall и други, 1980).

1.5.4. Остеопороза изазвана варфарином

Варфарин може изазвати редукцију минералне густине костију, што може довести до остеопорозе. У студији спроведеној 1999. године на женама које су због тромбозе дубоких вена биле на терапији варфарином, потврђен је повећан ризик вертебралне и фрактуре ребарних костију (Carabello и други, 1999). Ретроспективном студијом „Medicare” из 2006. године потврђен је ризик од остеопорозе код 60 %

пацијената који су били на терапији варфарином. Механизам овог непожељног дејства остварује се као последица инхибиције витамин К-зависних протеина укључених у коштани метаболизам (Iwamoto, 2014; Adams и Pepping, 2005).

1.5.5. Ефекат варфарина на бубрежне болести

Варфарин се још од седамдесетих година прошлог века користи у третману бубрежних обољења, а на основу низа проспективних студија уочена су побољшања, услед његовог деловања, на ток и прогнозу болести, као резултат превенције фибринског нагомилавања око гломерула (Bergstein, 1950; Singhal и Brimble, 2006; Brodsky и други 2009). Друга истраживања су показала да варфарин у комбинацији са вазодилаторима постиже добар терапијски ефекат у успоравању прогресије IgA нефритиса (Woo и други, 1987; Woo и други, 1991; Lee и други, 2010). У основи повољног терапијског учинка варфарина може да буде ефекат на Gas6, аутокрини фактор раста мезангијских ћелија (Yanagita и други, 1999). Инхибиција пролиферације ендотелних ћелија човека, дејством комбинације варфарина и дипиридамола, која је показана *in vitro* (Liem и други, 2001), такође се сматра могућим механизмом који доприноси модулацији ангиогенезе као фактора IgA нефритиса.

1.6. Ефекти варфарина на биолошке процесе који не зависе од витамина К

1.6.1. Антиоксидативна активност варфарина

Ћелија се од неконтролисаног развоја реактивних врста кисеоника брани помоћу ензима супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT), глутатионске S-трансферазе (GST), глутатионске редуктазе (GR), глутатионске пероксидазе (GPX) као и неензимским механизмима одбране који укључују биомолекуле витамин-Е, β-каротен и аскорбинску киселину (Hoult и други, 1996). Једињења попут хидроксикумарина, којима припада и варфарин остварују антиоксидативну функцију директно прекидајући иницијацију и пропацију радикалских ланчаних реакција (Singh и други, 2010). С обзиром на то да варфарин припада групи природних ароматичних једињења, делује и као хелатор метала и неутрализатор слободних радикала, што га сврстава у групу антиоксиданаса и инхибитора липидне пероксидације на нивоу ћелијских мембрана (Vervoort и други, 1997).

Има међутим података и о прооксидантној активности варфарина. Варфарин који доспева у кожу лабораторијских пацова доводи до липидне пероксидације, судећи по повећању продукције малон диалдехида у овом ткиву (Kataranovski и други, 2005). Прооксидантни потенцијал варфарина је у основи нефротоксичности изазване оралним конзумирањем варфарина код пацова (Ware и други, 2013; 2015a).

1.6.2. Ефекти варфарина на едеме

Лимфни систем је одговоран за дренажу интерстицијалне ткивне течности, међутим код едема са високим садржајем протеина (енгл. High Protein Edemas, HPE), акумулација протеина у ткивима услед трауме или инфламације доводи до повећане пропустљивости капилара и појаве воде у ткивима (Parslew и други, 2000). О позитивном утицају варфарина на едеме, код пацијената са хроничном антихистамин резистентном уртикаријом, први је у својој студији указао Рајан (Ryan, 1997). Он је механизам деловања варфарина објаснио активацијом коагулационо-фибринолитичког система под дејством едема, и указао је на дејство плазминогена који може да доведе до уклањања „фибринског филма“ са зида крвног суда, активацијом комплемента и повећаном продукцијом деградационих продуката фибрина. Иако механизам није до краја расветљен, утицај варфарина на каскадну активацију кининског и система комплемента преко његовог дејства на протеазе каскаде и C1 инхибитора естеразе може такође да објасни механизам којим варфарин доприноси позитивном утицају на едеме (Morgan и Khan, 2008). Варфарин се посебно у комбинацији са вазоактивним лековима показао као едемо-протективан, деловањем на смањење пропустљивости ендотела зида крвног суда и редукцијом ефеката медијатора инфламације. Смањење адхезије леукоцита на ендотел, и испољавање њиховог антитромботичног ефекта указује на механизам дејства који је одговоран за успешност фармаколошког третмана наведене комбинације лекова (Vanscheidt и други, 2002).

1.6.3. Варфарин и канцери

Метастазе су процеси у којима се, након уласка у крвоток, туморске ћелије сплетом капилара допремају на удаљена места где се тумор даље развија. Канцер и његов третман утичу на Вирховљево (R. Virchow) тријадну узрокујући тромбоемболијске компликације у циркулацији и оштећујући ендотелијалне ћелије

(Zielinski и Hejna, 2000; Vona и други, 2000). Компоненте коагулационог система доприносе развоју метастаза заустављањем и задржавањем туморских ћелија у капиларима и олакшавањем њихове адхеренције на зид крвног суда (Constantini и Zacharski, 1992). Испитивањима дејства антикоагулационих лекова као потенцијалних терапеутских агенаса за третман солидних тумора, експерименталним студијама је установљена много ефективнија инхибиција метастатске каскаде од утицаја ових лекова на сам примарни тумор. Клиничким студијама је потврђена добробит за пацијенте који су били на третману антикоагулантним лековима, која се огледа у продуженом преживљавању и регресији примарног тумора код пацијената. Варфарин даје посебно обећавајуће резултате када је у питању ситноћелијски карцином плућа (Aisner и други, 1992; Mousa, 2002). У оригиналним радовима који су испитивали утицаје кумарина на третман меланома, варфарин се издвојио инхибиторним дејством на ширење тумора услед стимулаторног дејства на гранулоците, лимфоците и макрофаге (Thornes, 1994; Velasco-Velazquez, 2003).

Антипролиферативни ефекти варфарина на неке туморске ћелије и повећање активности ћелија природних убица (Natural Killer, NK ћелија) (Bobek и Kovarik, 2004; Bobek и други, 2005; Nakchbandi и други, 2006) су у основи примене варфарина као адјувантне антитуморске терапије. Ране експерименталне студије на лабораторијским мишевима су, међутим, показале хепатотоксични и хепатоканцерогени потенцијал варфарина (Cohen, 1979; Lake и други, 1994). Испитивања у експерименталном систему поправке ДНК хепатоцита пацова су показала да кумарин нема генотоксични потенцијал, што је навело на претпоставку да су други механизми одговорни за појаву тумора код експерименталних глодара (Edwards и други, 2000).

1.7. Имуномодулаторни ефекти варфарина

Рана испитивања су показала инхибицију развоја отока у тестовима касне преосетљивости код пацијената на варфаринској терапији (Edwards и Rickles, 1978). Супротно овим налазима, моноклеарне ћелије изоловане из периферне крви пацијената на терапији овим агенсом су имале повећани капацитет да одговоре на стимулацију повећану лектином фитохемаглутинином (РНА) (Berkarda и други, 1983). Испитивање ефеката варфарина коришћењем модела лабораторијских глодара су указала на имуностимулаторни потенцијал (Berkarda и други, 1978), али и на супресију имунских одговора (Eichbaum и други, 1979; Perez и други, 1994; Kurohara

и други, 2008). Има података о одсуству ефекта варфарина на ћелије имунског система, као што је показано за тромбоците (Takahashi и други, 1991).

Поједине клиничке компликације запажене код пацијената на варфаринској терапији као што су плеуралне ефузије (Jo и други, 2011) и плеурисије (Kuwahara и други, 1995), еозонофилија као и леукоцитокластични васкулитис и алергијски интерстицијални нефритис (Karoor и Bekari-Saab, 2008) указују на проинфламаторни капацитет варфарина.

Испитивања локалне, епикутане отворене апликације варфарина на кожу лабораторијских пацова (Zolotarevski и други, 2016) су показала стимулацију имуно/инфламаторне активност коже и епидермних ћелија (Kataranovski и други, 2005; Kataranovski и други, 2007; Popov Aleksandrov и други, 2015). Она се манифестује као инфилтрација Т ћелија, акумулација маст ћелија и њихова дегранулација, као и стимулација ендотелних ћелија и фибробласта и продукција проинфламаторних цитокина (IL-1 и TNF), указујући тако на комплексни ефекат на компоненте имунског система коже. Снижење одговора на контактни алерген динитрохлоробензен (Dinitrochlorbenzene, DNCB) дренирајућих лимфних чворова, указује, пак, на имunosупресивни ефекат варфарина (Kataranovski и други, 2003).

Осим деловања на имунске реакције овог ткива, орално излагање лабораторијских сојева пацова варфарину је довело до инфламације у цреву и стимулације активности придружених лимфних чворова (Mirkov и други, 2016).

2. ЦИЉЕВИ

Варфарин (4-хидроксикумарин) и његови аналози су најчешће коришћени лекови у терапији пацијената са ризичним кардиоваскуларним поремећајима, као и у профилактичкој медицини за превенцију венских и артеријских тромбоза (Holbrook и други, 2005). Међутим, употреба варфарина може довести до компликација као што су крварења (у случају примене сувише високих доза - предозирање) или тромбоза (субдозирање). Услед ових компликација предложени су и развијени системи континуиране терапије, као алтернатива оралној варфаринској терапији, у виду трансдермалних система за примену варфарина (Gale, 2008; Khalil и други, 2012). Осим употребе у медицини, варфарин се као антикоагулантни родентицид широко користи у сузбијању штетних глодара у урбаним/субурбаним и руралним срединама употребом комерцијалних („ready-to-use“), лако доступних препарата. Због његове високе способности апсорпције, не само путем оралне примене, већ и путем инхалације, контакта са кожом или слузницом очију, излагање варфарину представља потенцијални ризик за све који су у додиру са њим. Овај агенс је још 1995. године класификован од стране Светске здравствене организације као отров I-б (енгл. highly hazardous) категорије, када је и препоручено испитивање његових штетних ефеката (WHO, 1995). Дермално излагање варфарину доводи до имуно/инфламаторне активности на кожи и епидермису изазивајући промене имунских реакција у овом ткиву (Kataranovski и други, 2003; Kataranovski и други, 2005; Popov-Aleksandrov и други, 2011; 2013), што представља потенцијални ризик за професионално изложене раднике у производњи родентицида који имају варфарин као активну супстанцу (мешање, пуњење, пражњење контејнера, одржавање и чишћење система). Осим локалних ефеката, професионална изложеност антикоагулантним родентицидима може довести до системских нежељених дејстава (коагулопатије, понекада удружене са фаталним исходом) (Pariп и други, 2007, Spahr и други, 2007). Са друге стране, клиничке компликације настале током терапије варфарином (Sagar и други, 2006, Goudarziроur и други, 2015) често су удружене са присуством ћелијских и хуморалних компоненти имунског система, што указује на проинфламаторни потенцијал овог агенса. Међутим, и поред података о штетним ефектима варфарина који укључују компоненте имунског система, скоро да нема података о имуномодулаторном потенцијалу овог агенса.

У светлу горе наведеног, циљ ове дисертације је испитивање имуномодулаторног потенцијала варфарина код пацова изложених његовом

деловању у два режима примене: (1) акутна епикутана, која одговара ситуацији професионалне изложености и (2) субакутна орална, која одговара терапијској примени.

Имуномодулаторни ефекат биће испитан анализом параметара системске запаљењске реакције укључујући хуморалне (протеини акутне фазе, активност ензима антиоксидативне одбране, хематолошке вредности периферне крви, ниво проинфламаторних цитокина) и ћелијске показатеље (промене броја леукоцита периферне крви и посебно промене активности полиморфонуклеарних леукоцита, као главних ћелија запаљења). За потребе разумевања директног ефекта варфарина на гранулоците, као циљ постављено је и испитивање миграције и активације ових полиморфонуклеарних ћелија коришћењем *in vivo* модела субкутане апликације стерилних поливинилских сунђера који садрже варфарин.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Хемикалије и антитела

Натријум варфарин (енгл. Warfarin sodium, WF) фирме Serva (Serva Fein Biochemical, Heidelberg, Немачка) растваран је у апирогеном физиолошком раствору.

Тетразолијумова со 3-(4,5 диметилтиазолил-2)-2,5-дифенил тетразолијум бромид (МТТ) (ICN Biomedicals Inc, Aurora, САД) растварана је у апирогеном физиолошком раствору у концентрацији 5 mg/mL и додавана у културу у финалној концентрацији 500 µg/mL.

Нитроплаво тетразолијум (енгл. Nitroblue tetrazolium, NBT), форбол-12-миристанат 13-ацетат (енгл. Phorbol-12-myristate 13-acetate, РМА), липополисахарид (енгл. LPS, *Echerichia coli* серотип 055:B5) растварани су у медијуму за ћелијску културу у стерилним условима, N-(1-нафтил) етилендиамин дихидрохлорид, сулфаниламид (p-аминобензенсулфонамид), хексадецил триметил амонијум бромид (СТАВ), о-дианизидин дихидрохлорид, мијелопероксидаза (МРО) и декстран Т-500, као 6 % раствор припреман у апирогеном раствору и аутоклавиран на 110 °С, су набављени од фирме Sigma (Sigma Aldrich., St. Louis, MO, САД).

Коришћени су натријум нитрит фирме Fluka Chemika (Buchs, Швајцарска), и водоник пероксид фирме Zorka Farma (Zorka, Шабац, Србија).

Лизирајући пуфер (eBioscience Inc., San Diego, CA, САД) је коришћен за лизу еритроцита.

Супстрат за одређивање садржаја мијелопероксидазе припреман је додавањем о-дианизидин дихидрохлорида (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, САД) у концентрацији 0.167 mg/mL и 0.0005 % H₂O₂ у 50 mM калијум-фосфатни пуфер (pH 6,0).

Грисов (Griess J.P.) реагенс прављен је од једнаких запремина 0.1 % раствора нафтилетилендиамин-дихидрохлорида (Sigma-Aldrich Inc, St Louis, MO, САД) (у води) и 1% раствора сулфаниламида (у 5 % H₃PO₄).

RPMI-1640 течна подлога за гајење леукоцита (РАА Laboratories, Аустрија) допуњавана је са 2 mM глутамином, 20 µg/mL гентамицином (Galenika a.d., Земун, Србија), 5 % (v/v) инактивисаним феталним телећим серумом (енгл. Fetal Calf Serum, FCS), (РАА Laboratories, Аустрија) и 5 µg/mL антифугалним агенсом вориконазолом (Pfizer PGM, Француска) и као таква коришћена је за културу ћелија.

Сви раствори за културу ћелија су припремани у стерилним условима или су стерилно филтрирани (Minisart поре величине 0.20 μm , Sartorius Stedim biotech, Göttingen, Немачка) пре употребе. Матични раствори чувани су на $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до употребе.

Комерцијални тестови за мерење биохемијских и хематолошких параметара (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Немачка) употребљавани су на Сименс дијагностичким системима (Siemens Healthcare Diagnostic).

Мишја антитела за пацовски CD11b/CD11c фирме Серотек (Serotec Ltd, Bicester, Велика Британија) и флуоресцеин изотиоцијанатом (енгл. Fluorescein isothiocyanate, FITC) обележена козја F(ab') анти-мишја антитела IgG и мишја антитела за маркер гранулоцита код пацова (HIS-48) од фирме иБајосајенс (eBioscience Inc., San Diego, CA, САД) су коришћена у експерименту.

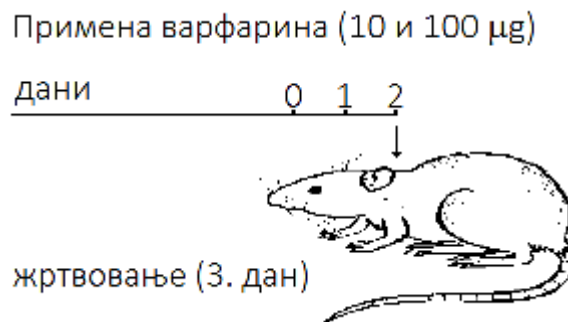
3.2. Експерименталне животиње

Све процедуре спровођене над животињама сагласне су са директивом 2010/63/ЕУ, која се односи на употребу животиња у експерименталне и друге научне сврхе. За експеримент је добијена сагласност Етичког комитета Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ (решење број 01-07-14). У испитивањима су коришћени мужјаци Dark Agouti соја пацова старости 10 до 12 недеља, телесне тежине $200\text{ g} \pm 40\text{ g}$. Јединке су одгајане у одгајалишту животиња Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ под стандардним условима (температура $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, интервали светлост и мрак по 12 h, комерцијална храна и пијаћа вода *ad libitum*). Након третмана животиње су држане у засебним кавезима. Сва функционална мерења спроведена су један дан (24 h) након акутног третмана или 30-ог дана субакутног третмана, при чему су животиње анестезиране интра перитонеално са 40 mg/kg телесне тежине натријум тиопенталом (Rotexmedica, Tritau, Немачка).

3.2.1. Акутни третман, епикутана примена варфарина

За испитивање акутног/локалног режима примене варфарина формиране су три групе, које су се састојале од четири до шест јединки. Варфарин је наносен на дорзалну површину тела у близини врата да би се онемогућило лизање третираног

подручја. Кожа је пажљиво шишана да не би дошло до њеног повређивања, а на овако припремљену површину коже од 10 cm^2 - 12 cm^2 наношено је $100\text{ }\mu\text{L}$ варфарина раствореног у физиолошком раствору у току 3 узастопна дана (Слика 11). Варфарин је растваран у концентрацији $100\text{ }\mu\text{g/mL}$ (на тај начин животиње су примале дозу од $10\text{ }\mu\text{g}$ варфарина дневно) и у концентрацији $1000\text{ }\mu\text{g/mL}$ (животиње су примале $100\text{ }\mu\text{g}$ варфарина дневно). Животиње у контролној групи третиране су само физиолошким раствором.



Слика 11. Режим епикутане примене варфарина.

3.2.2. Субкутни третман, орална примена варфарина

За испитивање ефекта варфарина у терапијском режиму примене, четири до шест јединки одређено је за сваку групу. Једна група животиња је појена водом у којој је варфарин растворен у концентрацији од $0,35\text{ mg/L}$, а друга водом са концентрацијом варфарина од $3,5\text{ mg/L}$. Контролне животиње су добијале чисту пијаћу воду. Појење је вршено 30 узастопних дана. Варфарин је замењиван свеже припремљеним раствором два пута недељно.

3.2.3. Субкутана имплантација стерилних поливинилских сунђера који садрже варфарин

Ради добијања увида у могући директни ефекат варфарина на гранулоците, инфламаторни гранулоцити су добијени применом матрикс модела сунђера тако што су групи од четири до шест животиња субкутано апликовани стерилни поливинилски сунђери (Middleton и Campbell, 1989) који садрже варфарин у дозама од $10\text{ }\mu\text{g}$ и $100\text{ }\mu\text{g}$. Сунђери су уклоњени 24 часа након апликације, а течност садржана у сунђерима је пажљиво исцеђена у силиконисане епрувете. Телије које су мигрирале у сунђер су изоловане центрифугирањем (1400 rpm у трајању од 8 минута), два пута су испране

медијумом за културу ћелија (RPMI-1640) са 5 % телећим феталним серумом и ресуспендоване у истом медијуму. Чистоћа ћелија износила је >95 % гранулоцита. Модел субкутане апликације сунђера служи за процену активације и миграције леукоцита *in vivo*, јер одговара фази екстравазације неутрофила.

3.3. Биохемијски параметри

Крв за тестирање је узимана из абдоминалне артерије. За одређивање протромбинског времена коришћена је цитратна плазма изолована центрифугирањем цитратне крви (у један запремински део раствора натријум цитрата масене концентрације 0,11 mol/L су додавана четири запреминска дела крви) 20 минута на 1500 × g. Серум је изолован центрифугирањем пуне крви 20 минута на 1500 × g.

3.3.1. Одређивање протромбинског времена

Протромбинско време по Квику (Quick) мерено је комерцијалним тромбопластинским реагенсом Thromborel S (Siemens Healthcare Diagnostic Products GmbH, Marburg, Немачка) на аутоматизованом коагулационом анализатору (Siemens Healthcare Diagnostic BCS-XP). Принцип методе заснива се на инкубацији плазме са оптималном количином тромбопластина и калцијума на 37 °C и мерењу времена потребног да се формира фибрински угрушак. Резултати су изражени у секундама.

3.3.2. Одређивање концентрације фибриногена

Концентрација фибриногена у плазми одређивана је применом модификоване Клаусове (Clauss) методе употребом комерцијалног реагенса Multifibren U (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Немачка) на аутоматизованом коагулационом анализатору. Квантитативно одређивање фибриногена у плазми заснива се на додавању вишка тромбина у плазму, превођењу фибриноген у фибрин и мерењу апсорбанце на 540 nm. Концентрација фибриногена израчунавана је са стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација комерцијалног калибратора и провером криве преко комерцијално расположивих контролних плазми. Резултати су приказани као релативна промена у односу на вредности добијене код контролних животиња (варфарин 0 µg), које су сматране као 100 %.

3.3.3. Одређивање концентрације хаптоглобина

Концентрација хаптоглобина је мерена у серуму комерцијалним N-антисерумом за хаптоглобин на имунохемијском систему Siemens BN II нефелометру (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Немачка). Метода се заснова на реакцији са антителима и формирању имуно комплекса који у методи нефелометрије расипају светлост снопа који пролази кроз узорак. Степен расипања светлости пропорционалан је количини протеина у узорку. Концентрација хаптоглобина је одређивана поређењем са стандардом познате концентрације. Унакрсна реакција са протеинима крви пацова је проверавана употребом серума јединки код којих је инфламаторна реакција изазвана терпентином (познати инфламаторни модел акутно фазне реакције код пацова). Резултати су приказани као релативна промена у односу на вредности добијене код контролних јединки (варфарин 0 μg), које су сматране као 100 %.

3.3.4. Одређивање концентрације С-реактивног протеина

С-реактивни протеин (енгл. C reactive protein, CRP) у серуму је мерен квантитативним комерцијалним тестом фирме Siemens на аналитичком систему Siemens Healthcare Diagnostic Dimension (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Newark, САД). Тест се базира на повећању турбидитета узорка услед формирања агрегата између синтетичких партикула обложених антителима за CRP и протеина присутног у узорку. Турбидитет узорка се мери на 340 nm, и директно је пропорционалан концентрацији протеина. Резултати су приказани као релативна промена у односу на вредности добијене код контролних јединки (варфарин 0 μg), које су сматране као 100 %.

3.3.5. Одређивање концентрације албумина

Концентрација албумина у серуму одређивана је на основу мерења количине комплекса формираног између албумина из узорка и бром крезол љубичастог (енгл. Bromocresol purple BCP) (Loudenback и други, 1968) при рН 4.9 употребом комерцијалног теста фирме Siemens на аналитичком систему Siemens Healthcare Diagnostic Dimension. Апсорбанца је мерена на 540/600/700 nm. Резултати су приказани као релативна промена у односу на вредности добијене код контролних јединки (варфарин 0 μg), које су сматране као 100 %.

3.4. Испитивање елемената комплетне крвне слике

Елементи комплетне крвне слике одређивани су на аутоматском ADVIA 120 проточном цитометру (Siemens Healthcare Diagnostics Inc, Newark, САД). Одређивани су: укупан број леукоцита и диференцијални састав (релативни и апсолутни број неутрофила, лимфоцита, моноцита, еозинофила и базофила). Од параметара црвене лозе одређивани су укупан број еритроцита, хематокрит, хемоглобин и морфолошки параметри: просечна запремина еритроцита (енгл. Mean Corpuscular Volume, MCV), просечна количина хемоглобина у еритроциту (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH), просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MCHC), као и параметри анизоцитозе и хипохромије еритроцита. Из тромбоцитне лозе поред укупног броја одређиван је и морфолошки параметар просечне запремине тромбоцита (енгл. Mean Platelet Volume, MPV).

3.5. Испитивање параметара у урину

Присуство крви/хемоглобина у урину одређивано је семиквантитативном методом, употребом Combur10 Test M (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Немачка).

3.6. Одређивање активности полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви

3.6.1. Изолација полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви

Гранулоцити периферне крви изоловани су из хепаринизиране крви након седиментације на 6 % декстрану и центрифугирањем добијене плазме на Opti Prep градијенту густине (Nycomed AS, Норвешка). Талог ћелија је лизиран изотоничним NH₄Cl и испиран у медијуму за културу ћелија. Гранулоцити су ресуспендовани у медијуму за гајење ћелија за даље функционалне студије. Укупан број гранулоцита одређиван је бројањем ћелија у суспензији разблаженој у Трипан плавом помоћу Neubauer хемоцитометра. Чистоћа гранулоцита проверавана је морфолошким бојењем цитоспин препарата суспензије ћелија May-Grunwald-Giemsa методом и износила је више од 95 %.

За одређивање концентрације цитокина и азот-оксида продукованих од стране гранулоцита, ћелије ($0,5 \times 10^6$ ћелија) су гајене 48 сати у само у медијуму (нестимулисана продукција) или уз додатак 100 ng/mL LPS-а. Супернатант (кондиционирани медијум) је сакупљан центрифугирањем плоча 10 минута на $1770 \times g$ и чуван на -20°C до употребе.

3.6.2. Одређивање метаболичке вијабилности ћелија МТТ тестом

Метаболичка вијабилност гранулоцита одређивана је помоћу колориметријског теста који се заснива на метаболичкој редукцији тетразолијумове соли МТТ, од стране ћелијске митохондријалне дехидрогеназе, до крајњег обојеног продукта формазана (Oez и други, 1990). Ћелије ($0,25 \times 10^6$ ћелија) су сејане у бунарчиће плоче за микрокултуру са 96 места. $500 \text{ }\mu\text{g/mL}$ МТТ је додавано одмах (0 h) или један дан након инкубације ћелија (24 h), а инкубација је затим настављена још три сата. Настали формазан екстрахован је преко ноћи помоћу закисељеног раствора натријум додецил сулфата (енгл. Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (10 % SDS/0,01 N HCl). Апсорбанца је мерена на ELISA читачу (GRD, Roma, Италија) на таласној дужини 540 nm са корекцијом на 650 nm. Резултати су приказани као средња вредност апсорбанце за трипликат култура.

3.6.3. Одређивање нивоа нитрита Грисовом методом

За одређивање нивоа нитрита (NO_2^-), као мере ослобађања азот-оксида у различитим биолошким течностима, коришћена је Грисова реакција (Griess, 1879; Hibbs и други, 1988). Тест је рађен мешањем $50 \text{ }\mu\text{L}$ аликвота кондиционираног медијума са $50 \text{ }\mu\text{L}$ Грисовог реагенса (мешавина 0.1 % N-(1-нафтил етилендиамин), NAD) у води и 1 % сулфониламид (SA) у 5 % фосфорној киселини у односу 1:1) и инкубацијом узорака 10 минута на собној температури. Апсорбанца је мерена помоћу ELISA читача на таласној дужини 570 nm, а корекција је вршена на 650 nm. Концентрација нитрита одређивана је са стандардне криве конструисане помоћу познатих концентрација натријум нитрита. Резултати су приказани као $\mu\text{M NO}$.

3.6.4. Одређивање унутарћелијске активности мијелопероксидазе

Активност мијелопероксидазе (MPO, EC 1.11.2.2) у гранулоцитима одређивана је на основу оксидације супстрата о-дианизидин дихлорида у присуству H_2O_2

(Vozeman и други, 1990). Тест је извођен додавањем 33 μL лизата гранулоцита (добитијеног поновљеним замрзавањем и отапањем) у 966 μL раствора супстрата (0.167 mg/mL о-дианизидин дихлорида и 0.0005 % H_2O_2 у 50 mM калијум фосфатном пуферу, рН 6.0). Апсорбанца је читавана на свака три минута у току десет минута на таласној дужини од 450 nm (на ELISA читачу). Активност мијелопероксидазе у гранулоцитима је прерачунавана помоћу стандардне криве конструисане са стандардом мијелопероксидазе (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, MO, САД), а резултат је изражен као јединице MPO на 10^6 ћелија.

3.6.5. Одређивање степена активације ћелија помоћу NBT теста

Степен активације ћелија одређиван је помоћу квантитативног цитохемијског теста за респираторни прасак заснованог на редукцији тетразолијумове соли NBT (енгл. Nitroblue tetrazolium) до формазана (Choi и други, 2006). Суспензија гранулоцита (5×10^5 ћелија у 50 μL) је сејана у плоче за микрокултуру са 96 места само у медијуму (нестимулисана NBT редукција) или уз додатак 100 ng/mL PMA (PMA стимулисана активација ћелија). У бунариће је додавано 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ културе NBT и инкубирано 30 минута. Формазан продукован од стране гранулоцита екстрахован је преко ноћи (10 % SDS-0.01 N HCl) и мерен на ELISA читачу на таласној дужини 540 nm (корекција је вршена на 650 nm). Резултати су приказани као средња вредност апсорбанце за четворопликат културе.

3.6.6. Одређивање способности ћелија да адхерирају за нећелијски матрикс

Способност гранулоцита да адхерирају за нећелијски матрикс је одређивана употребом модификованог теста првобитно описаног од стране Оза (Oez, 1990), базираног на капацитету ћелија да адхерира за пластику. Укратко, 100 μL суспензије ћелија (5×10^5 ћелија/бунарчић) је постављено у плоче са 96 места (Спектар, Чачак, Србија) и инкубирано 60 минута у медијуму самом (спонтана адхезија) или у присуству 100 ng/mL PMA. Након инкубације, неадхериране ћелије су испиране, а адхерентне ћелије су фиксирани метанолом и бојене 0.1 % раствором метилен плавог. Боја је растварана са 0,1 N HCl, а апсорбанца растворене боје мерена на 650 nm (корекција је урађена на 540 nm). Резултати су приказани као средња вредност апсорбанце за трипликат култура.

3.6.7. Анализа експресије CD11b помоћу проточне цитометрије

Експресија адхезионог молекула CD11b и ћелијског површинског маркера HIS48 анализирана је на леукоцитима периферне крви који су добијени након лизе еритроцита у лизирајућем пуферу и инкубације са OX-42 мишјим анти-пацовским CD11b антителима (mAbOX-42) и анти-пацовским HIS48, на леду. Након тридесетоминутне инкубације са примарним антителима, ћелије су обележене са FITC коњугованим F(ab')₂ козјим анти-мишјим IgG у трајању од 30 минута. Након тога ћелије су испиране два пута у PBS/0.1% натријум азиду, а затим фиксиране додавањем 400 μ L 1% параформалдехида и тестиране на интензитет флуоресценце на проточном цитофлуориметру CyFLOW SPACE (Partec, Munich, Немачка). Анализирано је најмање 10000 догађаја по узорку. Ћелије у хистограму са позицијом карактеристичном за гранулоците су анализирани, а резултати су изражени као средњи проценат заступљености позитивних ћелија у популацији узорка.

3.6.8. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену

За одређивање нивоа експресије гена за цитокине коришћена је реакција ланчаног умножавања у реалном времену (енгл. Real Time-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR). RT-PCR (Higuchi и други, 1993), као метода, служи за детекцију продуката PCR амплификације у току експоненцијалне фазе, у којој се количина DNK дупло увећава у току сваког циклуса. Укупна RNK изолована је из PMN леукоцита помоћу mi-Total Isolation Kit (Metabion, Martinsried, Немачка). Изолована RNK је реверзно транскрибована (1 μ g RNK) употребом насумичних хексамера као олигонуклеотида (прајмера) и ензима реверзне транскриптазе пореклом из Moloney леукемија вируса (Moloney Murine Leukemia Virus, MMLV) према упутствима произвођача (Fermentas, Vilnius, Литванија). Припремљена cDNK је амплификована помоћу Power SYBR Green PCR Master Mix-a (Applied Biosystems, Foster City, CA, САД), према упутствима произвођача у укупној запремини од 20 μ L, ABI PRISM 7000 Sequence Detection System-ом (Applied Biosystems, Foster City, CA, САД). Реакција се састојала из следећих циклуса: Активације dUTP (10 минута на 50 °C), иницијалне денатурације cDNK (10 минута на 95 °C), након чега је следило 40 циклуса амплификације cDNK. Сваки од 40 циклуса се састојао из денатурације (15 s на 95 °C), и везивања прајмера за ланац cDNK (анилинг) и синтезе новог ланца cDNK (екстензија/елонгација) (1 минут на 60 °C). Одређиван је ниво експресије за TNF и IL-6. Парови прајмера

коришћених у реакцији приказани су у Табели 3. Акумулација PCR продуката одређивана је у реалном времену, а резултат је анализиран помоћу 7500 System Software (AB) и израчунаван као $2^{-(\Delta Ct)}$, где је ΔCt разлика између броја циклуса на ком се појављује флуоресцентни сигнал за испитивани ген и броја циклуса за ендогени контролни (β -actin) ген, према ком се нормализује експресија испитиваног гена. Резултати за iRNK су приказани као релативна промена у односу на вредности добијене код контролних јединки (варфарин 0 μ g), које су сматране као 100 %.

Табела 3. Секвенце коришћених олигонуклеотида (прајмера).

β aktin	
5'-CCC TGG CTC CTA GCA CCA T-3'	5'-GAG CCA CCA ATC CAC ACA GA-3'
TNF	
5'-TCG AGT GAC AAG CCC GTA GC-3'	5'-CTC AGC CAC TCC AGC TGC TC-3'
IL-6	
5'-GCC CTT CAG GAA CAG CTA TGA-3'	5'-TGT CAA CAA CAT CAG TCC CAA-3'

3.7. Изолација еритроцита и одређивање параметара оксидативног стреса

За одређивање активности ензима антиоксидативне одбране у мембрани еритроцита коришћени су еритроцити добијени центрифугирањем хепаринизираних крви (1 mL) 20 мин на 400 g. Након издвајања плазме, крвни елементи у талогу су испирани хладним физиолошким раствором и хемолизирани ултрачистом водом (3 mL).

3.7.1. Одређивање концентрације хемоглобина

Концентрација хемоглобина је одређивана спектрофотометријски, мерењем апсорбанце смеше хемолизираних крви (20 μ L) и Драпкиновог реагенса (5 mL) на 545 nm. Концентрација хемоглобина је прерачунавана по формули: $[Hb] = A_{545} \times 36,77$ и изражавана у g/100 mL крви.

3.7.2. Одређивање активности укупне супероксид дизмутазе

Активност укупне супероксид дизмутазе (SOD, EC 1.15.1.1) одређивана је на бази спонтане аутооксидације адреналина у адренохром у присуству супероксид

анјонског радикала и мерења промене апсорбанце на 480 nm (Misra и Fridovich, 1972). Укратко, у хемолизирану крв (500 μL) је додавана дејонизована вода (3 mL), апсолутни етанол (100 μL) и хлороформ (600 μL). Након инкубације од 10 минута на 4 °C, узорци су центрифугирани 10 минута на 1000 \times g. У супернатант је додаван бикарбонатни пуфер (pH 10.1) и адреналин, а промена апсорбанце је мерена сваких 30 секунди (у укупном трајању од 180 секунди) на спектрофотометру Shimadzu UV-1800 (Kyoto, Јапан). Активност супероксид дисмутазе је прерачунавана на основу формуле: $[\text{SOD}] = 2 \times (\Delta\text{K} - \Delta\text{A}) \times \text{R} \times 100 / (\text{Hb} \times \text{V} \times \Delta\text{K})$, при чему је R - разблажење узорка, ΔK - промена апсорбанце бланка (адреналина), ΔA - промена апсорбанце узорка, Hb – концентрација хемоглобина у узорку (изражена у g/100 mL) и V – запремина узорка у којој је мерење вршено (изражена у mL), Јединица активности је дефинисана као количина ензима неопходна да смањи концентрацију адреналина за 50 % аутооксидацијом на pH 10.2. Резултати су изражени као U/g хемоглобина.

3.7.3. Одређивање активности каталазе

Активност каталазе (CAT, EC 1.11.1.6) одређивана је спектрофотометријски на основу стопе разградње водоник пероксида (H_2O_2) (Beutler, 1982). Хемолизирана крв (100 μL) је инкубирана 10 минута на 37 °C у смеши дејонизоване воде (9,9 mL) и 95 % етанола (100 μL). Након инкубације, узорцима је додаван TRIS-EDTA пуфер (pH 8) и H_2O_2 , а промена апсорбанце је мерена на 30 секунди (у укупном трајању од 180 секунди) на 240 nm. Активност каталазе је прерачунавана на основу формуле: $[\text{CAT}] = 100 \times \text{R} \times \Delta\text{A} / (\text{Hb} \times \text{V} \times 0.071)$, при чему је R - разблажење узорка, ΔA - промена апсорбанце, Hb – концентрација хемоглобина у узорку (изражена у g/100 mL) и V – запремина узорка у којој је мерење вршено (изражена у mL). Јединица активности се дефинише као количина ензима која разлаже за минут 1 mM H_2O_2 при pH 7.0 на температури од 25 °C.

3.8. Имуноензимски тест на чврстој фази

Концентрација цитокина у плазми и кондиционираном медијуму културе ћелија одређивана је коришћењем комерцијално доступних ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) сетова за фактор некрозе тумора (енгл. Tumor necrosis factor, TNF; Bioscience Inc. San Diego, CA, САД) и интерлеукин 6 (IL-6; R&D systems, Minneapolis, САД), према упутству произвођача. Концентрација цитокина

прерачунавана је са стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација рекомбинантних цитокина.

3.9. Хистолошка анализа ткива

Исечци ткива коже, јетре, плућа, црева и слезине су фиксирани у 4 % формалину (pH 6.9), спровођени кроз серију алкохола растуће концентрације и ксилол, након чега су калупљени у парафину. Припремани су пресеци ткива дебљине 5 μm и бојени су хематоксилином и еозином (H&E). Хистолошки препарати су анализирани помоћу дигиталног светлосног микроскопа (Coolscope, Nikon Co. Јапан).

3.10. Статистичка анализа

Добијени резултати су изражени као средња вредност и стандардна девијација. За статистичку обраду коришћен је непараметарски Mann-Whitney U-тест (ћелијски број, цитокинска продукција, функционални гранулоцитни тестови и еритроцитна SOD и CAT) и t-тест (експресија гена за цитокине) у програму STATISTIKA v7.0.61.0 (StatSoft Inc., Tulsa, САД). Статистички значајним сматране су р вредности мање од 0,05 ($p < 0,05$).

4. РЕЗУЛТАТИ

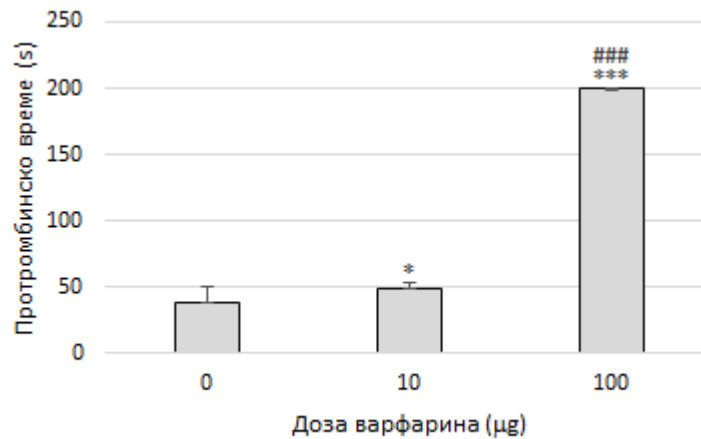
4.1. Имуномодулаторни ефекти варфарина у режиму акутне епикутане примене

4.1.1. Релевантност одабране дозе

У досадашњој литератури нема довољно информација о употреби нелеталне дозе варфарина, а на основу расположивих података (прикупљених за утврђивање ризика за хуману популацију) установљено је да акутна дермална LD₅₀ за пацове износи 1400 mg/kg (Owens и други, 2000). Дермална примена 188 mg/kg дневно у току пет дана код бабуна узроковала је обилно крварење и довела до угинућа јединки. У раду смо се определили за много ниже дозе, које су у радовима (Kataranovski и други, 2003; Kataranovski и други, 2008) указале на способност изазивања системског ефекта и системске модулације, без изазивања већих штетних ефеката који би довели до смртог исхода по јединке. Натријум варфарин је за епикутану примену растворен у непирогеном физиолошком раствору у концентрацији од 100 µg/mL и 1000 µg/mL и апликован у волумену од 0.1 mL на дорзалну страну врата пацова, очишћену од длаке. Наношењем на ову регију избегава се могућност уношења варфарина орално, лизањем подручја на који је нанесена доза. На тај начин животињама је епикутано апликован варфарин у дози од 10 µg и 100 µg, што износи, као средња доза коју су примиле животиње, 0.05 ((0.048-0.053) mg/kg) или 0.5 ((0.48-0.53) mg/kg) mg варфарина по килограму телесне тежине. Контролна група је третирана само са физиолошким раствором.

4.1.2. Ефекат епикутано примењеног варфарина на протромбинско време

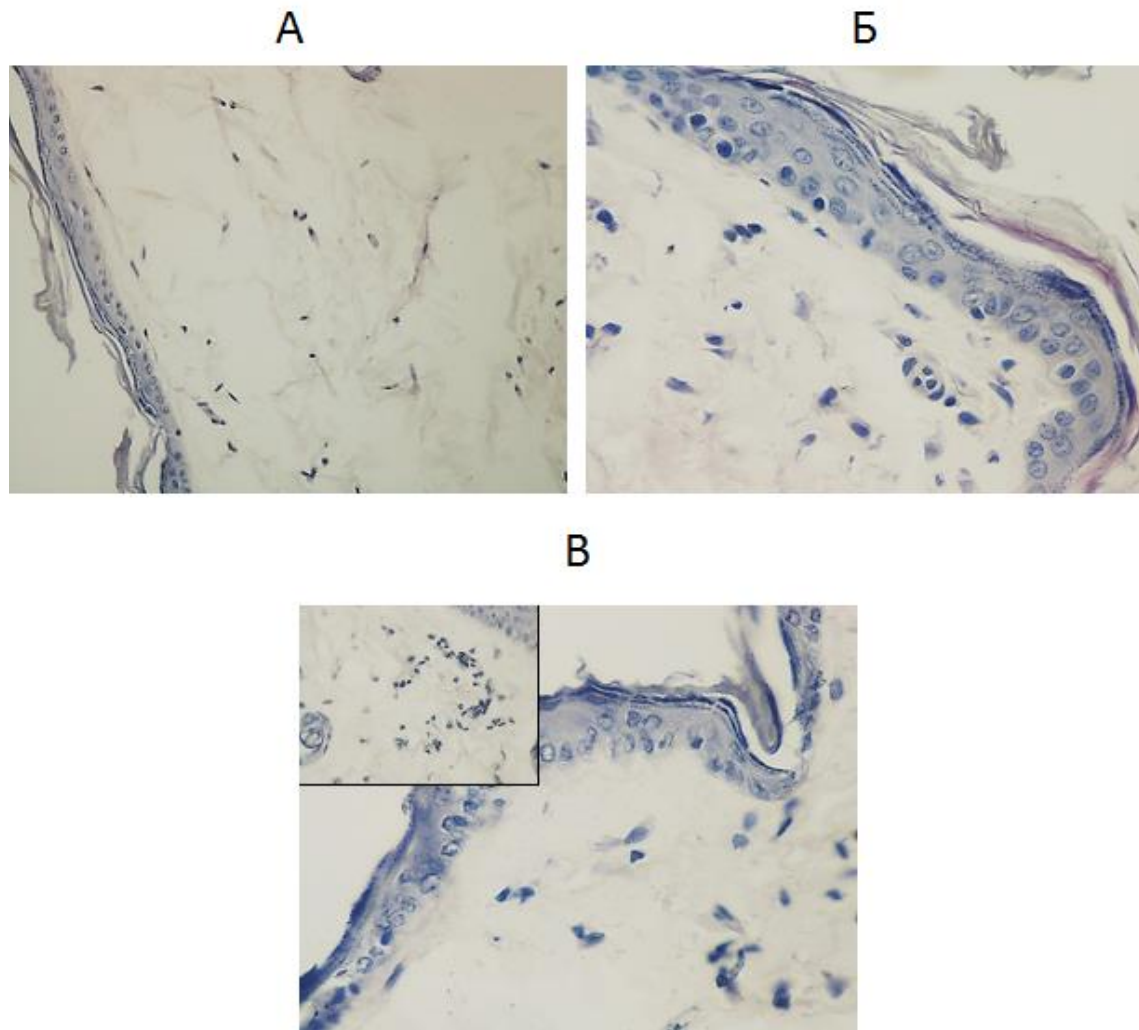
Након апликације ниже дозе варфарина (10 µg) запажа се благо, али статистички значајно, повећање протромбинског времена, док је након примене више дозе (100 µg) ефекат вишеструко израженији у поређењу са контролном групом (0 µg) (Слика 12). Уочена је и статистички значајна међу-дозна разлика у односу на нижу дозу.



Слика 12. Протромбинско време у епикутаном режиму варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), ### $p < 0.001$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 μg).

4.1.3. Хистолошка анализа коже након акутне примене варфарина

У циљу добијања увида у ефекте варфарина на ткиво коже извршена је хистолошка анализа (Слика 13). У нижој дози варфарина (10 μg) видљиве су адаптивне промене кожане баријере које се манифестују задебљањем кератинског слоја и епидерма, повећањем целуларности дермалних мезенхимних ћелија и акумулацијом мањег броја мононуклеара, што указује на активност шантног пута акумулације варфарина. У вишој дози, уз фокално повећану целуларност дерма уочавају се ретки дилатирани фоликули са мањом акумулацијом мононуклеара.



Слика 13. Хистологија коже у епикутаном режиму примене варфарина. (А) Варфарин (0 μg). Дискретна десквамација кератинског слоја са наглашеним грануларним слојем. Танак епидерм и хипоцелуларни дерм, у ком се не виде крвни судови. **(Б)** Варфарин (10 μg). Хиперортокератоза и хипергранулоза, задебљан епидерм. Мањи број мононуклеара периваскуларно и у базалном слоју епидерма. **(В)** Варфарин (100 μg). Одсуство кератинског слоја, присутан грануларни слој са епидермом у 2-3 реда кератиноцита без повећане целуларности у дерму. Група активираних васкуларних простора суперфицијалног плексуса са мањим бројем мононуклеара око њих (уметнуто). (хематоксилин и еозин, увећање $\times 40$)

4.1.4. Ефекат епикутано примењеног варфарина на хематолошке параметре

Испитивање ефеката епикутане примене варфарина на хематолошке параметре је показало да примењене дозе (10 μg и 100 μg) не утичу на укупни број леукоцита у односу на контролну групу животиња (0 μg). Примена више дозе (100 μg) резултује значајним повећањем релативног броја неутрофилне субпопулације леукоцита и

релативног и апсолутног броја еозинофила, уз истовремени значајан пад лимфоцита, како у релативном тако и у апсолутном броју. При примени ниже дозе варфарина (10 μg) приметно је снижење само апсолутног броја лимфоцитне субпопулације леукоцита (Табела 4). Нису запажене промене у броју моноцита и базофила ни у једној од примењених доза варфарина. Пад вредности хематокрита евидентан је у обе дозе варфарина. Промене у броју еритроцита код пацова нису забележене ни у једној од примењених доза варфарина, али је приметно значајно снижење средњег волумена еритроцита (MCV) након излагања вишој дози овог агенса. Примена више дозе доводи до снижења укупног хемоглобина, као и до промена индекса везаних за узајамни однос хемоглобина, броја и волумена еритроцита, тако да је забележено значајно снижење МСН и повећање МНС. Снижење броја тромбоцита (нумеричко у нижој дози варфарина, $p=0.46$) и значајно у вишој дози, уз повећање просечне запремине тромбоцита, евидентирано је у обе групе епикутано третираних животиња.

У свежем урину пацова који су били на епикутаном третману варфарином је евидентирано присуство еритроцита, али без статистичке значајности, с обзиром на велике варијације у вредностима (13.3 ± 32.7 еритроцита/ μL у нижој дози, 25.0 ± 37.0 еритроцита/ μL у вишој дози, у односу на 0.0 ± 0.0 у контролној групи). Тенденција повећања ($p=0.053$ у поређењу са вредностима код контрола) уочена је само код више дозе (100 μg).

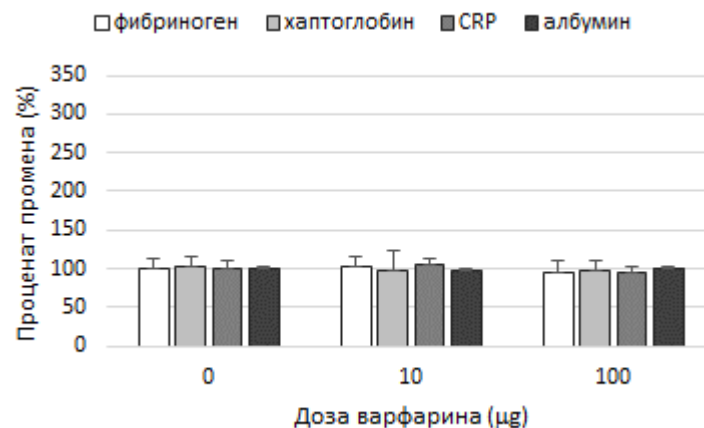
Табела 4. Хематолошки параметри периферне крви код пацова на епикутаној варфаринској терапији

		Доза варфарина (μg)		
		0	10	100
Леукоцити	($\times 10^9/\text{L}$)	9.3 \pm 2.5	7.8 \pm 0.8	8.0 \pm 1.2
Неутрофили	(%)	45.2 \pm 5.3	49.0 \pm 1.7	52.7 \pm 5.2*
	($\times 10^9/\text{L}$)	4.2 \pm 1.2	3.8 \pm 0.5	4.5 \pm 0.6
Лимфоцити	(%)	52.8 \pm 5.5	49.1 \pm 1.5	44.9 \pm 5.2*
	($\times 10^9/\text{L}$)	4.9 \pm 1.3	3.8 \pm 0.4*	3.6 \pm 0.6*
Моноцити	(%)	1.0 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.1 \pm 0.03	0.07 \pm 0.03	0.08 \pm 0.02
Еозинофили	(%)	0.5 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2	0.8 \pm 0.2*
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01*
Базофили	(%)	0.5 \pm 0.2	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.05 \pm 0.03	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
Еритроцити	($\times 10^{12}/\text{L}$)	8.0 \pm 0.4	7.7 \pm 0.3	8.1 \pm 0.1
Хематокрит	(L/L)	0.45 \pm 0.01	0.43 \pm 0.01**	0.43 \pm 0.01**
Хемоглобин	(g/L)	137.0 \pm 3.5	130.4 \pm 4.9*	132.0 \pm 3.0*
MCV	(fL)	56.3 \pm 1.8	56.3 \pm 3.5	53.4 \pm 0.9**
MCH	(pg)	17.0 \pm 0.5	16.9 \pm 0.6	16.4 \pm 0.1**
MCHC	(g/L)	302.3 \pm 6.1	301.4 \pm 9.0	308.6 \pm 3.2*
Тромбоцити	($\times 10^9/\text{L}$)	783.2 \pm 32.3	768.5 \pm 45.2	747.0 \pm 38.2*
MPV	(fL)	8.2 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1*	8.5 \pm 0.1**#

Скраћенице: **MCV** (енгл. Mean Corpuscular Volume) просечна запремина еритроцита; **MCH** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin) просечна количина хемоглобина у еритроциту; **MCHC** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита; **MPV** (енгл. Mean Platelet Volume) просечне запремине тромбоцита. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), # $p < 0.05$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 μg).

4.1.5. Ефекат епикутано примењеног варфарина на протеине акутне фазе и IL-6 у плазми

Узимајући у обзир изражени ефекат варфарина на PMN леукоците, основне ћелијске компоненте инфламације, испитани су ефекти на хуморалне показатеље запаљења, укључујући солубилне протеине акутне фазе (фибриноген, хаптоглобин, С-реактивни протеин (CRP) и албумин, као негативни акутнофазни реактант) и IL-6. Епикутано излагање варфарину није довело до промена у нивоу испитиваних протеина акутне фазе ни у једној од испитиваних група (Слика 14). Концентрација IL-6 била је испод нивоа детекције у обе испитиване групе третираних пацова.



Слика 14. Промене концентрација фибриногена, хаптоглобина, CRP и албумина у крви након епикутане апликације варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.1.6. Ефекат епикутано примењеног варфарина на активност еритроцитних ензима SOD и CAT

У циљу добијања даљих података о системским проинфламаторним ефектима епикутано апликованог варфарина, испитан је његов про-оксидантни потенцијал мерењем промена основних ензима антиоксидативне одбране, супероксид дизмутазе (SOD) и каталазе (CAT) у еритроцитима третираних пацова (Табела 5). Показано је да нема промена у активности SOD, мада се бележи нумеричко повећање ($p=0.07$) при вишој дози варфарина. Статистички значајно повећање активности CAT забележено је у обе примењене дозе варфарина, у односу на контроле.

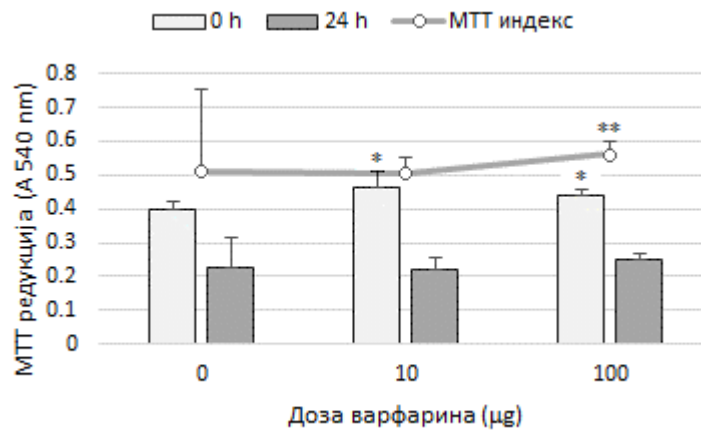
Табела 5. Активност супероксид димутаза и каталазе у еритроцитима пацова на епикутаном режиму примене варфарина

	Доза варфарина (μg)		
	0	10	100
Супероксид димутаза (SOD) (U/g Hb $\times 10^3$)	15.3 \pm 3.3	17.1 \pm 3.7	18.9 \pm 4.8
Каталаза (CAT) (mmol H ₂ O ₂ /min/g Hb)	119.6 \pm 30.5	156.0 \pm 35.2*	162.0 \pm 43.8*

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg).

4.1.7. Ефекат епикутано примењеног варфарина на вијабилност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви

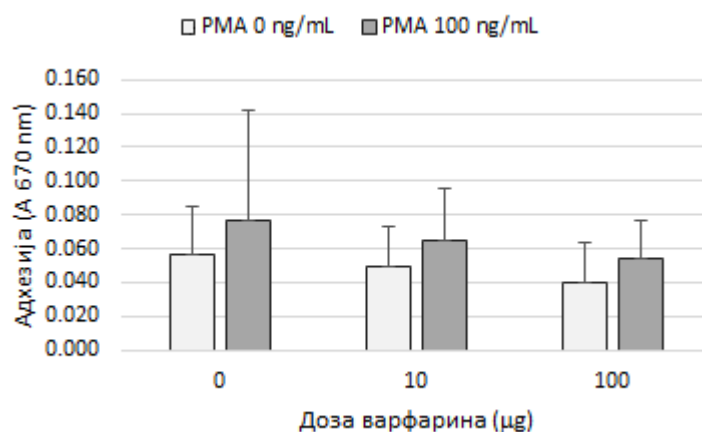
У циљу процене цитотоксичности епикутано примењеног варфарина испитан је вијабилитет PMN леукоцита изолованих из периферне крви. Коришћењем трипан плавог показан је сличан проценат вијабилних ћелија у суспензији PMN ћелија пацова третираних са обе дозе (96.0 % \pm 4.5 % за нижу и 96.4 % \pm 4.2 % за вишу дозу) у односу на контролну групу животиња (96.4 % \pm 2.4 %). Мерењем базичног аспекта метаболичке вијабилности помоћу МТТ редукционог капацитета свеже изолованих PMN ћелија и ћелија гајених у култури 24 h (Слика 15), показано је статистички значајно повећање метаболичке вијабилности свеже изолованих PMN ћелија код обе примењене дозе у односу на контролну групу животиња. У 24 h култури PMN ћелија нису евидентирани промене у нивоу редукције МТТ ни у једној групи третираних животиња. Степен преживљавања ћелија представљен МТТ индексом [који представља однос редукције МТТ у култури ћелија гајених 24 сата (24 h) и свеже изолованих ћелија (0 h)], је значајно повећан у групи на вишој дози варфарина (100 μg).



Слика 15. МТТ редукција као мера метаболичке вијабилности PMN ћелија периферне крви након епикутане апликације варфарина. МТТ редукција је изражена апсорбанцом на 540 nm. МТТ индекс је прерачунао као однос апсорбанце раствореног формазана формираног у култури ћелија и свеже изолованим ћелијама. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

4.1.8. Адхезија полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви изолованих из крви пацова изложених епикутаном режиму примене варфарина.

Ефекат епикутане апликације варфарина на PMN леукоците испитан је даље анализом промена у њиховом капацитету адхезије за пластику (Слика 16). Нису евидентирани статистички значајне промене ни у једној од група, како у нестимулисаномј активацији PMN леукоцита, тако и након активације изазване стимулатором гранулоцитне функције PMA (phorbol-12-myristate 13-acetate).



Слика 16. Нестимулисана и PMA-стимулисана адхезија PMN ћелија периферне крви. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.1.9. Ефекат епикутано примењеног варфарина на експресију CD11b молекула на укупним и полиморфонуклеарним леукоцитима периферне крви

Будући да адхезија полиморфонуклеарних ћелија за различите матриксе зависи од CD11b молекула, извршена је анализа експресије ових молекула проточном цитометријом. Код пацова који су третирани варфарином (Табела 6) уочено је статистички значајно повећање релативног броја CD11b⁺ ћелија у укупној популацији и у PMN ћелијској субпопулацији код обе примењене дозе.

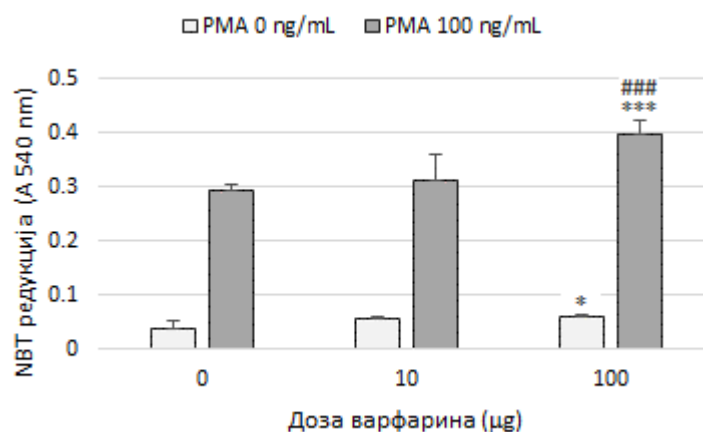
Табела 6. Заступљеност CD11b⁺ леукоцита периферне крви у епикутаном третману варфарином

CD11b ⁺ ћелије		Доза варфарина (µg)		
		0	10	100
Укупне ћелије	(%)	8.6 \pm 2.7	14.1 \pm 4.5*	15.4 \pm 5.5*
	(x 10 ⁶)	263.2 \pm 46.7	317.0 \pm 69.5	324.6 \pm 65.0
Полиморфонуклеарне ћелије	(%)	29.4 \pm 5.7	41.5 \pm 11.8*	43.8 \pm 11.1*
	(x 10 ⁶)	319.7 \pm 50.0	341.0 \pm 66.0	343.6 \pm 66.5

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: *p<0.05 у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

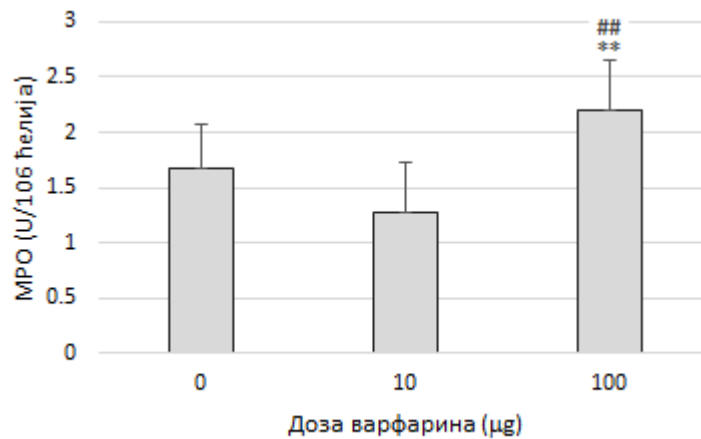
4.1.10. Ефекат епикутано примењеног варфарина на оксидативну активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви (NBT редукција, унутарћелијска активност МРО и продукција азот оксида)

У групи пацова на епикутаном третману варфарином, испитана је способност PMN леукоцита да редукују са NBT (цитохемијска мера потрошње кисеоника и показатељ припреме за респираторни прасак) спонтано и након стимулације са PMA (Слика 17). Уочен је пораст нестимулисане активације код обе примењене дозе варфарина са нумеричким порастом ($p=0.08$) за варфаринску дозу од 10 μg и статистичком значајношћу у дозној групи од 100 μg , у односу на контролну групу. Ниво активације PMN леукоцита и њихов одговор на егзогену стимулацију са PMA евидентиран је значајно вишим одговором за дозу од 100 μg у односу на контролну групу.



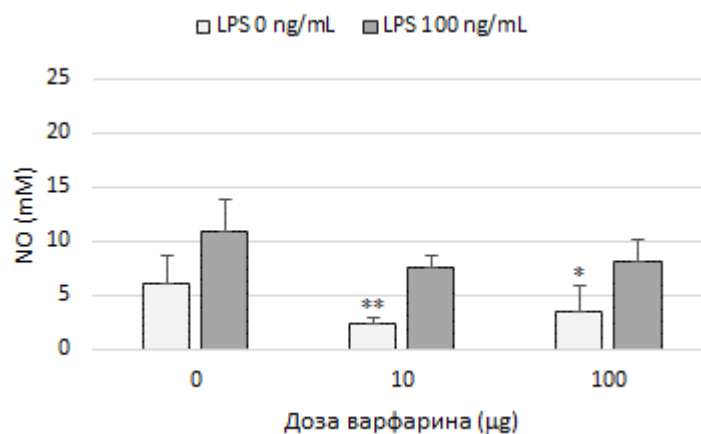
Слика 17. Оксидативна активност PMN ћелија периферне крви: NBT редукциона активност у епикутаном режиму примене варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), ### $p < 0.001$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 μg).

Испитивање активности ензима мијелопероксидазе (МРО) (карактеристични функционални маркер неутрофилних леукоцита) (Слика 18) је показало да нема промена у групи јединки третираних нижом дозом варфарина, док је код третмана вишом дозом (100 μg) присутно повећање ензимске активности у односу на контролну групу.



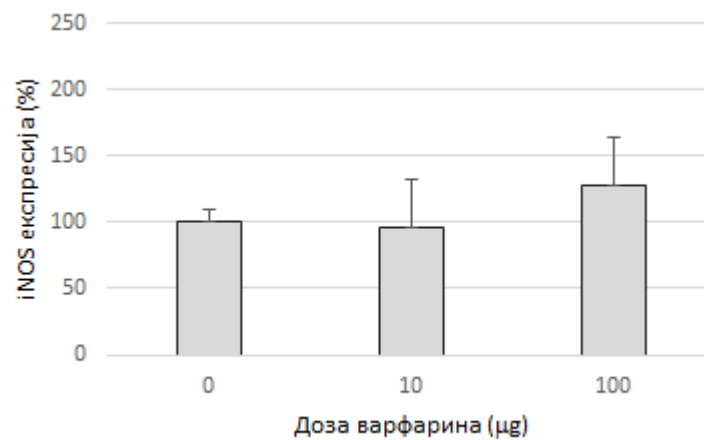
Слика 18. Унутарћелијска активност мијелопероксидазе (MPO) полиморфонуклеарних ћелија периферне крви. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$, у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg), ## $p < 0.01$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 µg).

Испитивање продукције азот монооксида (NO) је показало значајно смањење нестимулисана продукције NO код животиња третираних нижом и вишом дозом варфарина у односу на контролну групу, док није било статистички значајних промена у LPS-ом стимулисаној продукцији ни у једној групи са епикутано примењеним дозама варфарина (Слика 19).



Слика 19. Нестимулисана и LPS стимулисана NO продукција. Ниво нитрита (µM) мерен у кондиционираном медијуму периферних PMN леукоцита у епикутаном режиму примене варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

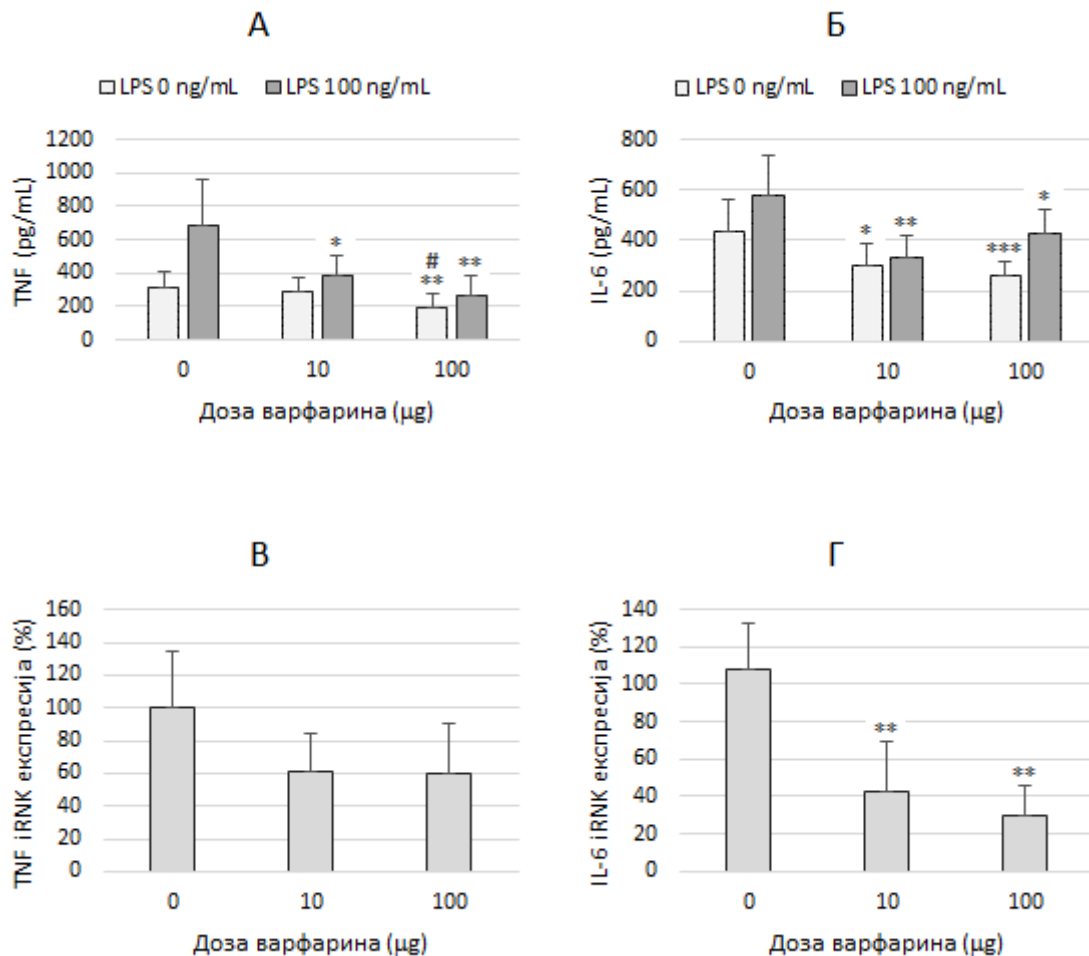
Испитивањем нивоа iRNK за индуцибилну азот оксид синтазу (iNOS) нису уочене статистички значајне промене у односу на контролну групу (Слика 20).



Слика 20. Релативна експресија iNOS гена анализирана RT-PCR. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација.

4.1.11. Ефекат епикутано примењеног варфарина на продукцију и експресију цитокина TNF и IL-6 од стране полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви

У циљу даље процене ефекта епикутане примене варфарина на PMN ћелије, испитана је продукција и експресија солубилних медијатора инфламације: фактора некрозе тумора (TNF) и цитокина IL-6 (Слика 21). У односу на контролну групу јединки уочено је статистички значајно снижење TNF продукције код нестимулисаних ћелија у групи животиња изложеној вишој дози варфарина. Након стимулације LPS-ом запажено је снижење продукције цитокина у обе експерименталне групе у односу на контролну групу (Слика 21А).



Слика 21. Цитокински одговор полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви на епикутану апликацију варфарина. (А) Нестимулисана и LPS-стимулисана продукција TNF. (Б) Нестимулисана и LPS-стимулисана продукција IL-6. (В) експресија iRNA за TNF. (Г) експресија iRNA за IL-6. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација у односу на контролну групу животиња. iRNA експресија је представљена као проценат промене нивоа iRNA у ћелијама животиња третираних варфарином у односу на ниво iRNA у ћелијама контролних животиња (које су представљене као 100%). Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), # $p < 0.05$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 μg).**

Обе дозе варфарина имају значајан ефекат како на нестимулисану тако и на продукцију IL-6 стимулисану LPS -ом (Слика 21 Б).

Поред смањења концентрације протеинских продуката, евидентно је значајно снижење информационе РНК (iRNA) за оба цитокина (Слика 21 В и Г).

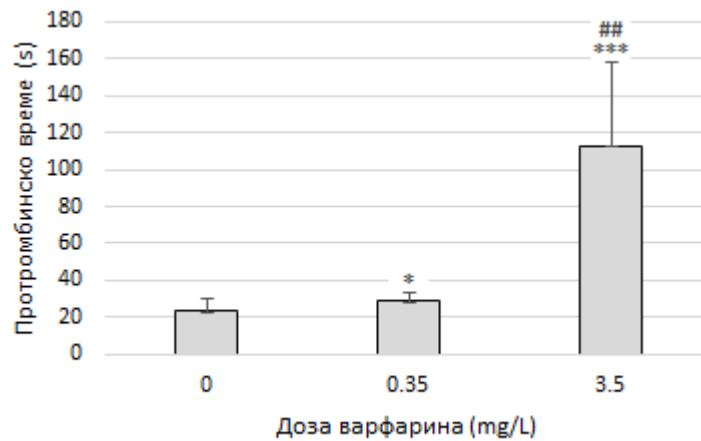
4.2. Орални режим примене варфарина

4.2.1. Релевантност одабране дозе

Група животиња на оралном третману примала је у нижој дози 0.35 mg/L, а у вишој дози 3.5 mg/L натријум варфарина у пијаћој води током периода од 30 дана (субакутна примена). Средња запремина конзумиране воде износила је 22 mL/дан по животињи, а средња маса пацова била је 234 g. На тај начин пацови су добили 0.031 ± 0.005 mg/kg (0.022-0.043 mg/kg) или 0.295 ± 0.052 mg/kg (0.231-0.433 mg/kg) варфарина дневно, при нижој или вишој дози редом, што су установљене дозе које доводе до модулације леукоцитне активности (Kataranovski и други, 2003; 2008). На основу формуле за прерачунавање еквивалентне дозе за употребу код људи (енгл. Human Equivalent Dose, HED) (Reagan-Shaw и други, 2008), HED се у mg/kg прерачунава множењем дозе коју су примили пацови (mg/kg) са количником животињског K_m (вредност 6 за пацове) и хуманог K_m (37). На тај начин износ дневне дозе коју су примили пацови је 0.005 mg/kg за нижу дозу и 0.046 mg/kg за вишу дозу, што одговара конзумацији код људи од 0.30 mg/60 kg за нижу, односно 2.7 mg/60 kg за вишу дозу (60 kg је узето као просечна маса човека). С обзиром да је доза од 2 mg - 5 mg (која је у нивоу више дозе примењене код пацова) најчешће преписивана за хуману употребу (Hirsh и други, 1998), а да се дозе мање од 1.5 mg (која је у нивоу ниже дозе примењене код пацова) користе као стартне дозе код отпочињања терапије (Aithal и други, 1999; Vern и други, 2015), произилази да су дозе примењене у раду сагласне са дозама за употребу код људи, што даје основу за разматрања могућих штетних дејстава насталих услед употребе овог агенса као лека.

4.2.2. Антикоагулантни ефекат орално примењеног варфарина

Примена оралног уноса високе дозе варфарина је довела до појаве спољашњих (кожа) и унутрашњих (гастроинтестиналних) крварења и угинућа код 9.5 % животиња. Конзумација обе дозе варфарина праћена је статистички значајним повећањем протромбинског времена у секундама у односу на контролну групу (Слика 22).

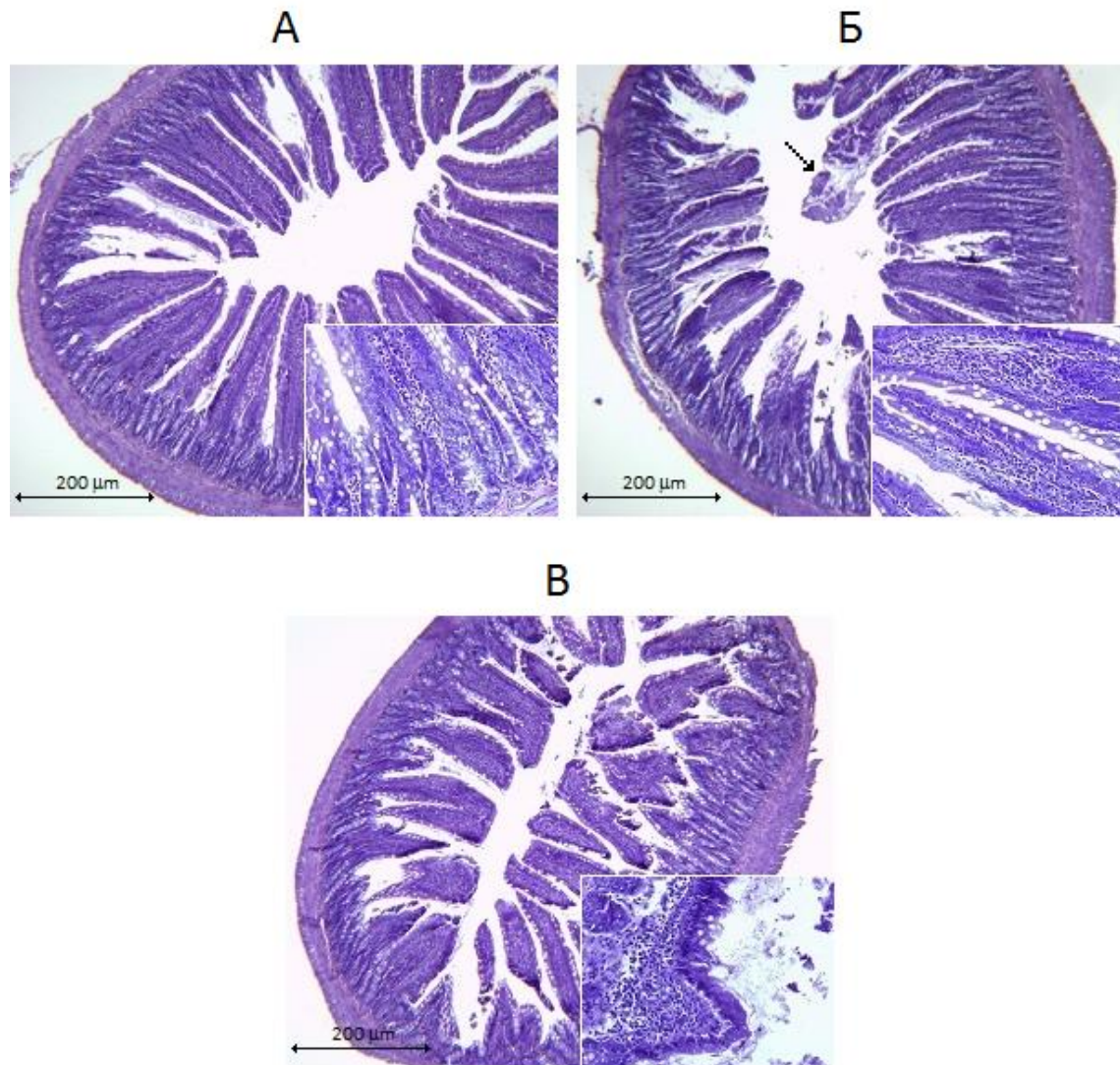


Слика 22. Протромбинско време након оралног режима субакутне примене варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L), ## $p < 0.01$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 0.35 mg/L).

4.2.3. Хистолошка анализа ефеката орално примењеног варфарина

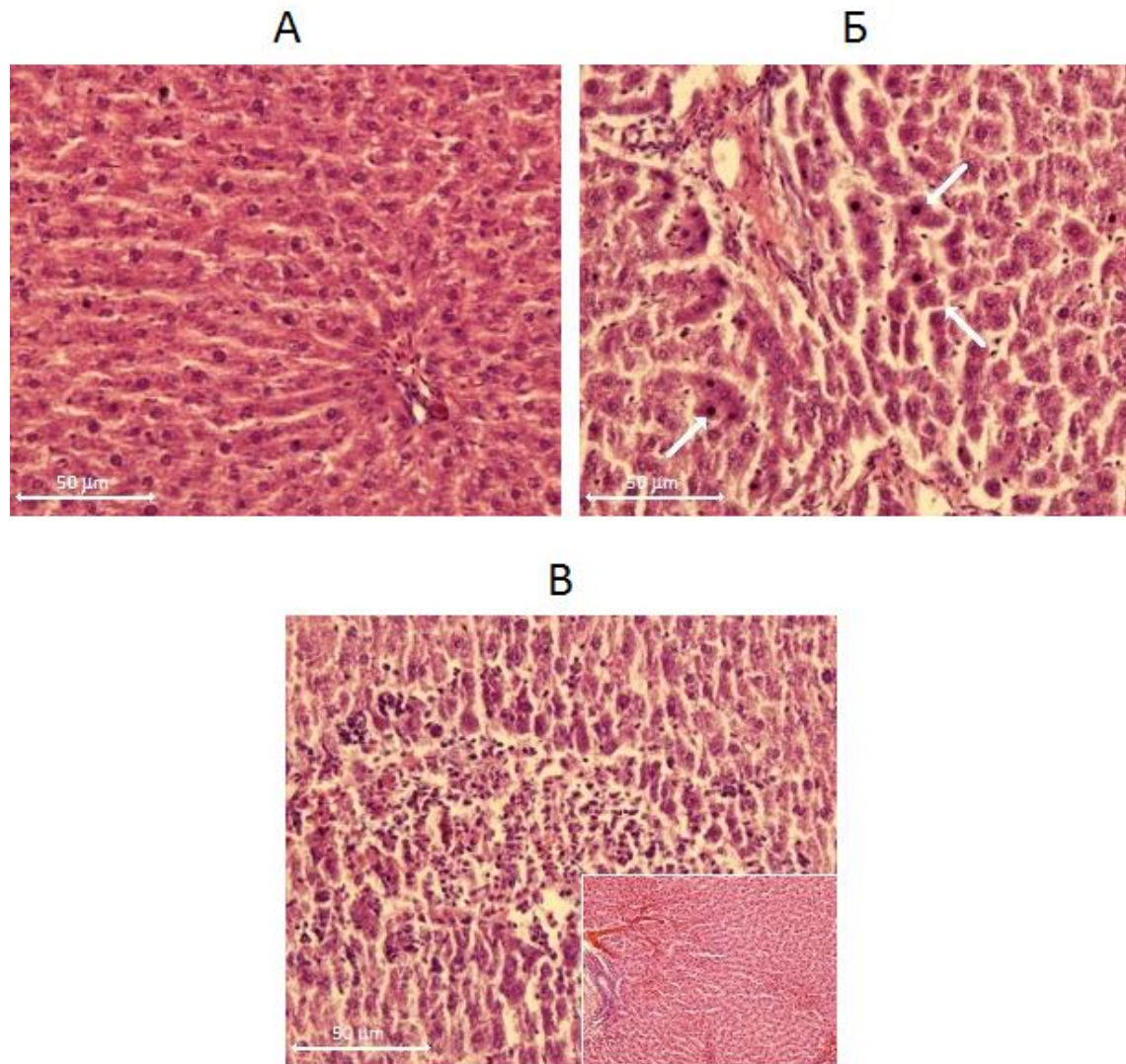
Локални и системски ефекти оралне примене варфарина на ткива и органе третираних пацова процењивани су на основу хистолошке анализе узорака црева, јетре, плућа и слезине.

Хистолошки преглед црева открива да су, насупрот дугачким и танким вилусима у групи контролних животиња, у групи пацова на дози од 0.35 mg/L варфарина уочени краћи и дебљи вилуси и њихова фузија праћена знацима некрозе на врховима. Израженија некроза вилуса уочљива је у узорцима црева код животиња које су биле на дози од 3.5 mg/L. Инфилтрација инфламаторних ћелија у паренхиму код обе варфаринске дозе је уочена, али је много интензивнија у групи на дози од 3.5 mg/L (Слика 23).



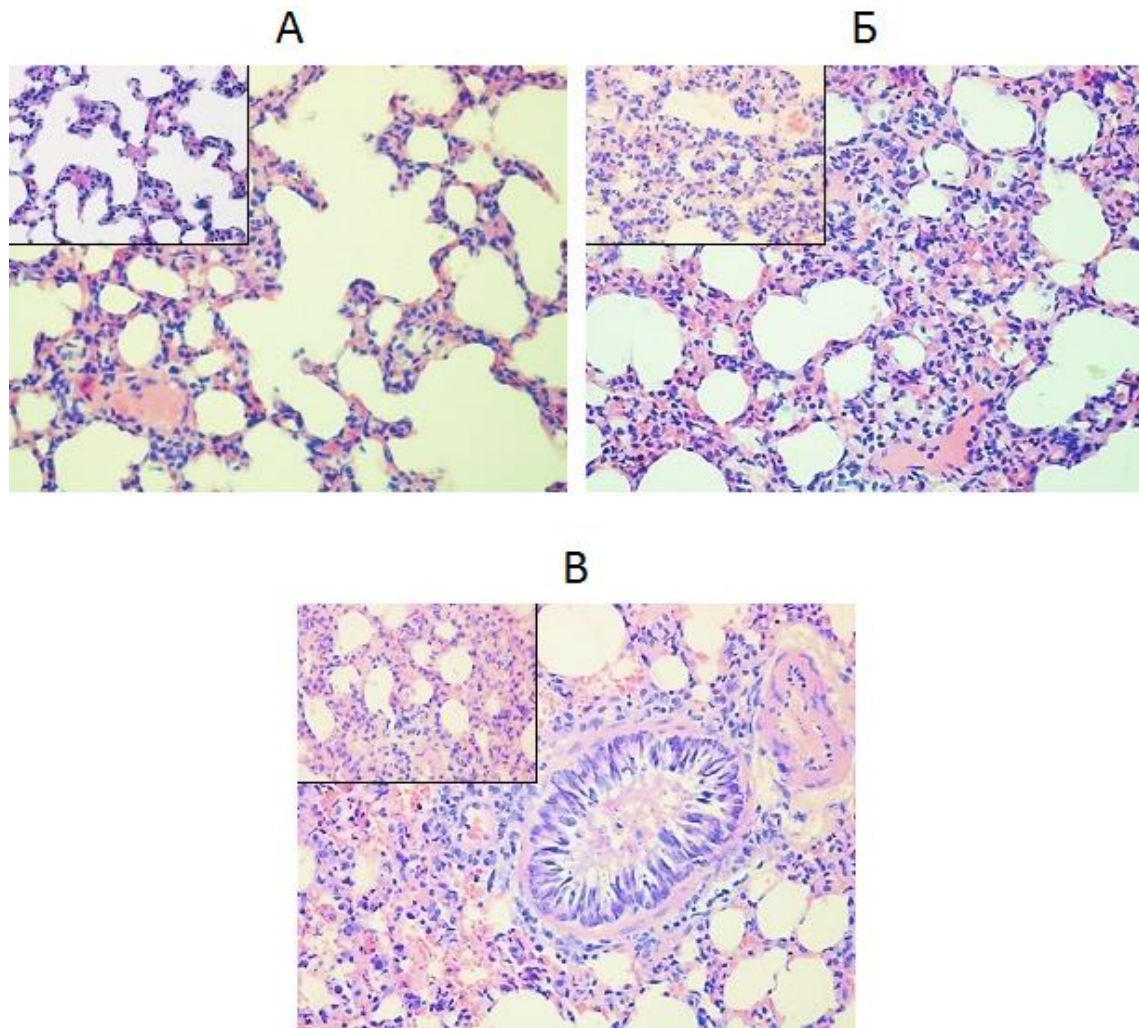
Слика 23. Хистологија црева у оралном режиму примене варфарина. (А) Варфарин (0 mg/L). Танки и дугачки вили са ретким ћелијама у епителу (уметнуто). (Б) Варфарин (0.35 mg/L). Краћи и дебљи вили од којих су неки спојени и ољуштени (стрелица). (В) Варфарин (3.5 mg/L). Краћи и дебљи вили од којих су многи спојени. (хематоксилин и еозин, увећање $\times 40$) Интензивнија инфилтрација инфламаторних ћелија и епителијална некроза (уметнуто). (хематоксилин и еозин, увећање $\times 200$)

Хистолошки преглед јетре указује на некрозу хепатоцита код пацова на дози од 0.35 mg/L варфарина, док је код пацова на вишој дози варфарина (3.5 mg/L) видљива хеморагија у паренхиму јетре, заједно са ацидофилном некрозом хепатоцита (Слика 24).



Слика 24. Хистологија јетре у оралном режиму примене варфарина. **(А)** Варфарин (0 mg/L). Нормалан паренхим јетре. **(Б)** Варфарин (0.35 mg/L). Некроза хепатоцита (стрелице). **(В)** Варфарин (3.5 mg/L). (хематоксилин и еозин, увећање $\times 200$) Некроза ћелија у паренхиму јетре са израженим крварењем (уметнуто). (хематоксилин и еозин, увећање $\times 100$)

Хистолошком анализом плућа (Слика 25) установљено је присуство ретких неутрофила уз доминацију момонуклеарних ћелија у интерстицијуму. Уочљиви су и микрофокуси крварења.



Слика 25. Хистологија плућа у оралном режиму примене варфарина. (А) Варфарин (0 mg/L). Плућа без особености. (Б) Варфарин (0.35 mg/L). Мањи фокуси крварења периваскуларно и у алвеолама. (В) Варфарин (3.5 mg/L). Микрофокуси интерстицијалног крварења. (хематоксилин и еозин, увећање $\times 20$) (уметнуто, хематоксилин и еозин, увећање $\times 40$)

Хистолошком анализом слезине нису установљене промене у ткиву било које примењене дозе варфарина у односу на нетретиране контролне јединке (није приказано).

4.2.4. Ефекат орално примењеног варфарина на хематолошке параметре

У односу на контролну групу животиња (0 mg/L), ниједна од орално примењених доза варфарина (0.35 mg/L и 3.5 mg/L) не утиче на укупни број леукоцита. Повећање процентуалне заступљености неутрофилних леукоцита и

њиховог апсолутног броја, као и снижење релативног броја лимфоцита, уочено је при вишој дози варфарина. У осталим субпопулацијама леукоцита није било промена ни у једној од примењених доза. Благо, али значајно, снижење волумена еритроцита (MCV) праћено је значајним повећањем MCHC код обе дозе у односу на контролну групу, уз израженије снижење на нижој дози (Табела 7). Није забележена значајна промена у погледу броја тромбоцита, али је уочено дозно зависно снижење њиховог просечног волумена.

Табела 7: Хематолошки параметри периферне крви код пацова на оралној варфаринској терапији

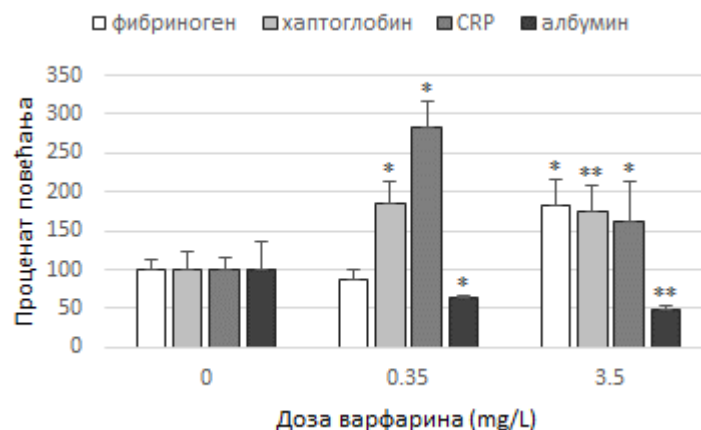
		Доза варфарина (mg/L)		
		0	0.35	3.5
Леукоцити	(x10 ⁹ /L)	8.0 ± 2.3	8.3 ± 3.3	9.1 ± 3.0
Неутрофили	(%)	52.0 ± 7.5	58.1 ± 8.4	64.4 ± 11.0*
	(x10 ⁹ /L)	4.2 ± 0.7	4.8 ± 2.2	5.8 ± 2.1*
Лимфоцити	(%)	45.7 ± 7.2	39.6 ± 8.4	34.1 ± 11.0*
	(x10 ⁹ /L)	3.6 ± 1.7	3.3 ± 1.5	3.2 ± 1.4
Моноцити	(%)	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.2	0.9 ± 0.2
	(x10 ⁹ /L)	0.11 ± 0.07	0.12 ± 0.07	0.08 ± 0.03
Еозинофили	(%)	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2
	(x10 ⁹ /L)	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.03
Базофили	(%)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
	(x10 ⁹ /L)	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01
Еритроцити	(x10 ¹² /L)	9.3 ± 0.4	9.4 ± 0.3	9.8 ± 1.1
Хематокрит	(L/L)	0.44 ± 0.01	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.06
Хемоглобин	(g/L)	148.8 ± 4.5	148.8 ± 4.4	156.5 ± 19.3
MCV	(fL)	47.3 ± 1.4	46.0 ± 0.8*	45.6 ± 0.8*
MCH	(pg)	16.1 ± 0.3	15.9 ± 0.2	15.9 ± 0.3
MCHC	(g/L)	337.8 ± 5.1	345.4 ± 2.3**	350.0 ± 1.4**##
Тромбоцити	(x10 ⁹ /L)	714.3 ± 27.4	744.0 ± 40.9	714.0 ± 62.8
MPV	(fL)	7.7 ± 0.1	7.4 ± 0.1**	7.0 ± 0.1**##

Скраћенице: **MCV** (енгл. Mean Corpuscular Volume) просечна запремина еритроцита; **MCH** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin) просечна количина хемоглобина у еритроциту; **MCHC** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита; **MPV** (енгл. Mean Platelet Volume) просечна запремина тромбоцита. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * p<0.05 у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L), ** p<0.01 у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L), ## p<0.01 у односу на прву подгрупу (доза варфарина 0.35 mg/L).

Евидентирано је присуство еритроцита у свежем урину пацова који су били на вишој дози оралног варфарина (3.5 mg/L) са статистичком значајношћу од p<0.001 (128.6±92.1) у односу на контролну групу (0.9±2.9).

4.2.5. Ефекат орално примењеног варфарина на протеине акутне фазе

Тридесетодневна орална конзумација варфарина довела је до повећања протеина акутне фазе у плазми третираних пацова и то статистички значајног повећања фибриногена при вишој дози варфарина, као и повећања хаптоглобина и CRP-а у случају примене било које од доза варфарина (Слика 26). Што се тиче албумина, као негативног реактанта акутне фазе, забележено је његово снижење при третману животиња са обе дозе у односу на контролну групу. У односу на контролну групу (31.0 ± 9.13 pg/mL), приметан је пораст продукције IL-6 у плазми третираних пацова, са статистичком значајношћу $p < 0.01$, за вредности при обе дозе, нижој (37.67 ± 19.84 pg/mL) и вишој (44.17 ± 13.62 pg/mL). Статистичком анализом уочена је висока и значајна корелација између солубилног IL-6 у плазми и протеина акутне фазе и то ($r = 0.70$, $p < 0.05$, $y = 0.13 + 0.003 \cdot x$, за IL-6 и хаптоглобин и $r = 0.83$, $p < 0.001$, $y = 0.065 + 0.0037 \cdot x$ за IL-6 и фибриноген).



Слика 26. Промене концентрација фибриногена, хаптоглобина, CRP и албумина у крви након оралне примене варфарина. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

4.2.6. Ефекат орално примењеног варфарина на активност еритроцитних SOD и CAT ензима

Системски ефекти субакутног оралног уноса варфарина испитани су и мерењем промена ензима антиоксидативне одбране, SOD и CAT у еритроцитима

третираних пацова (Табела 8). Видљиво је да у групи животиња третираних са 0.35 mg/L варфарина није забележена промена у активности SOD, али је уочен нумерички пад активности овог ензима ($p=0.08$), док је снижење активности у групи животиња третираних са 3.5 mg/L статистички значајно. Снижење активности SOD није резултат инхибиторног ефекта варфарина на ензим, будући да нема разлика у нивоу активности SOD у присуству 3,5 $\mu\text{g/mL}$ варфарина ($8,2 \pm 0.92.5 \text{ U/g Hb}$) у поређењу са $6,50 \pm 0,13 \text{ U/g Hb}$ измерених без додатог варфарина. Статистички значајна повећана активност CAT забележена је само у групи која је конзумирала вишу дозу варфарина.

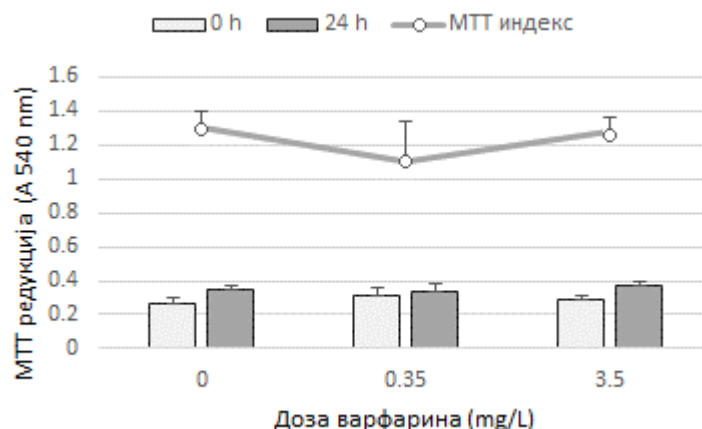
Табела 8: Активност супероксид димутаза и каталаза у еритроцитима пацова на оралном режиму примене варфарина

	Доза варфарина (mg/L)		
	0	0.35	3.5
Супероксид димутаза (SOD) (U/g Hb $\times 10^3$)	6.1 \pm 0.3	4.0 \pm 0.7	3.7 \pm 0.3**
Каталаза (CAT) (mmol H ₂ O ₂ /min/g Hb)	55.7 \pm 6.0	57.9 \pm 5.2	63.7 \pm 3.4*

Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p<0.05$, ** $p<0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

4.2.7. Ефекат орално примењеног варфарина на вијабилност леукоцита периферне крви

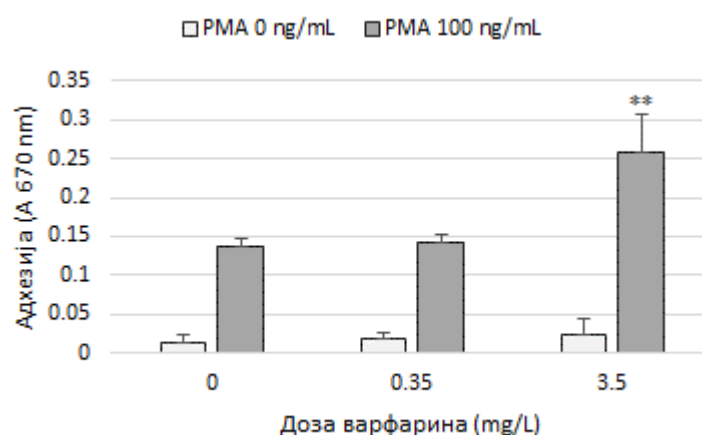
У односу на контролну групу свеже изолованих PMN ћелија, орална примена варфарина није довела до значајних промена у капацитету редукције МТТ код животиња третираних дозом варфарина од 0.35 mg/L, као ни код животиња третираних дозом варфарина од 3.5 mg/L (Слика 27). Сличан ефекат на МТТ редукцију је уочен након 24 h у култури. МТТ индекс је непромењен код обе дозе у односу на контролну групу јединки.



Слика 27. МТТ редукција као мера метаболичке активности полиморфонуклеарних ћелија периферне крви након оралног третмана варфарином. МТТ редукција је представљена апсорбанцом на 570 nm. □ свеже ћелије, ■ ћелије 24 h у органском медијуму, ● МТТ индекс. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

4.2.8. Ефекат орално примењеног варфарина на адхезију полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви за пластику

Испитивање спонтане адхезије није показало значајне промене међу групама (Слика 28). Након стимулације са PMA запажа се повећање адхезије гранулоцита пореклом из животиња које су конзумирале вишу дозу варфарина.



Слика 28. Нестимулисана и PMA-стимулисана адхезија PMN ћелија периферне крви у оралном режиму примене варфарина. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg).

4.2.9. Ефекат орално примењеног варфарина на експресију CD11b⁺ леукоцита периферне крви

Анализа укупног броја леукоцита проточном цитометријом, након лизе еритроцита, указала је на снижење апсолутног броја ћелија са експримираним CD11b ланцем β -2 интегринског молекула код обе варфаринске дозе у односу на контроле (Табела 9). Снижење апсолутне заступљености овог молекула демонстрирана је и у субпопулацији PMN ћелија након примене обе дозе варфарина.

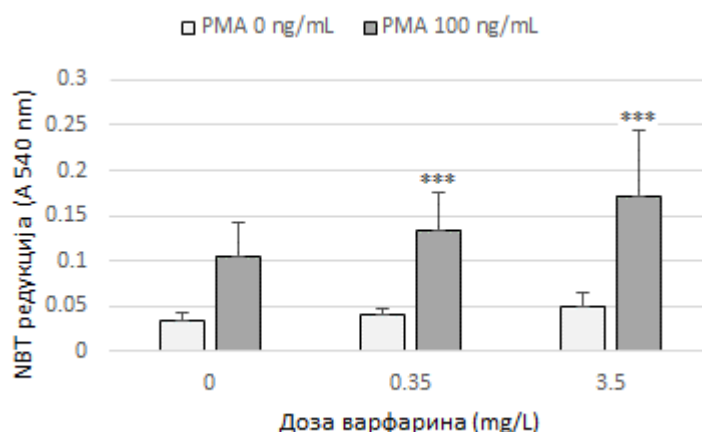
Табела 9. Заступљеност CD11b⁺ леукоцита периферне крви у оралном третману варфарином

CD11b ⁺ ћелије		Доза варфарина (mg/L)		
		0 (n=10)	0.35 (n=9)	3.5 (n=10)
Укупне ћелије	(%)	25.3 ± 3.0	22.8 ± 2.4	21.2 ± 6.1
	(x 10 ⁶)	272.9 ± 17.8	229.5 ± 9.7**	237.7 ± 31.2*
Полиморфонуклеарне ћелије	(%)	40.5 ± 4.7	40.7 ± 2.1	34.8 ± 6.1
	(x 10 ⁶)	321.4 ± 26.7	271.2 ± 5.1**	272.4 ± 24.3**

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * p<0.05, ** p<0.01 у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

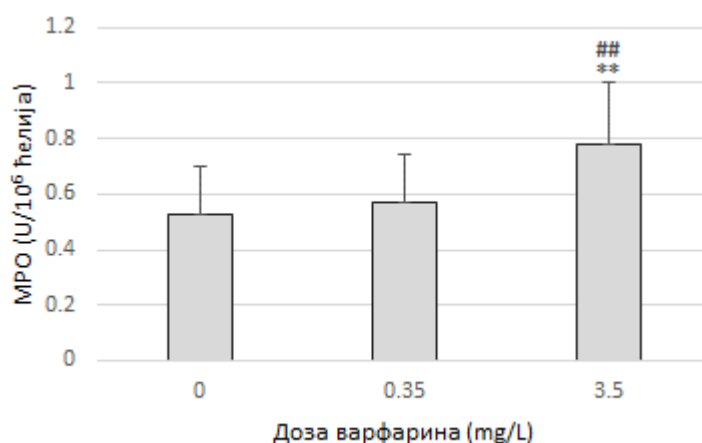
4.2.10. Ефекат орално примењеног варфарина на оксидативну активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви (NBT редукција, унутарћелијска активност MPO и продукција азот оксида)

У групи животиња које су биле на оралном режиму субакутне примене агенса није уочена промена у капацитету нестимулисане NBT редукције ни код једне дозе (0.35 mg/L и 3.5 mg/L варфарина) у односу на контролну групу. Егзогена PMA стимулација резултовала је значајно повећаном редукцијом у обе дозне групе у односу на контролну групу (Слика 29).



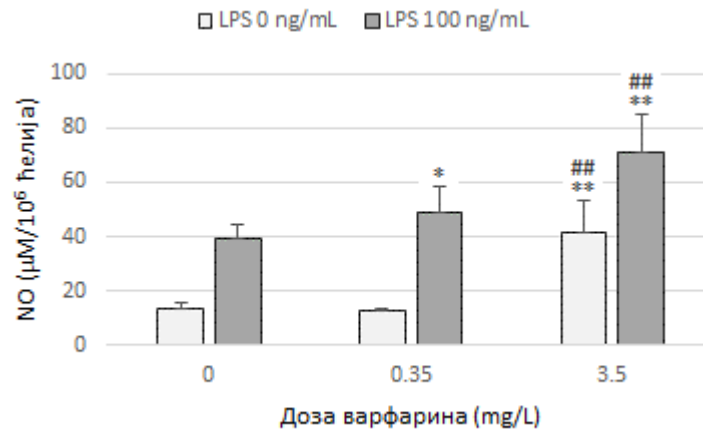
Слика 29. Оксидативна активност полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви, редукција NBT у оралном третману. □ нестимулисана NBT редукција, ■ NBT редукција PMN ћелија стимулирана помоћу PMA. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: *** $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

Орална конзумација 3.5 mg варфарина резултовала је повећањем активности унутарћелијске мијелопероксидазе, док код ниже дозе није евидентирана промена у односу на контролну групу пацова који нису третираны варфарином (Слика 30). Евидентирана је и значајна међудозна разлика.



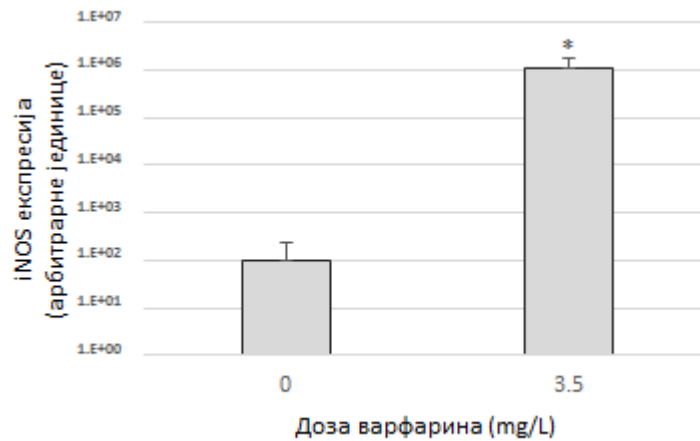
Слика 30. Унутарћелијска активност мијелопероксидазе у оралном третману. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L). ## $p < 0.01$ у односу на нижу дозу варфарина (0.35 mg/L).

Пораст нестимулисане продукције NO забележен је у режиму оралне примене само у дози од 3.5 mg/L, док је стимулисана продукција NO дозно зависно повећана након примене варфарина, у односу на контролну групу (Слика 31).



Слика 31. Нестимулисана и LPS стимулисана NO продукција и експресија мерена нивоом нитрита (μM) у кондиционираном медијуму периферних гранулоцита крви код оралног третмана. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L), ## $p < 0.01$ у односу на нижу дозу варфарина.

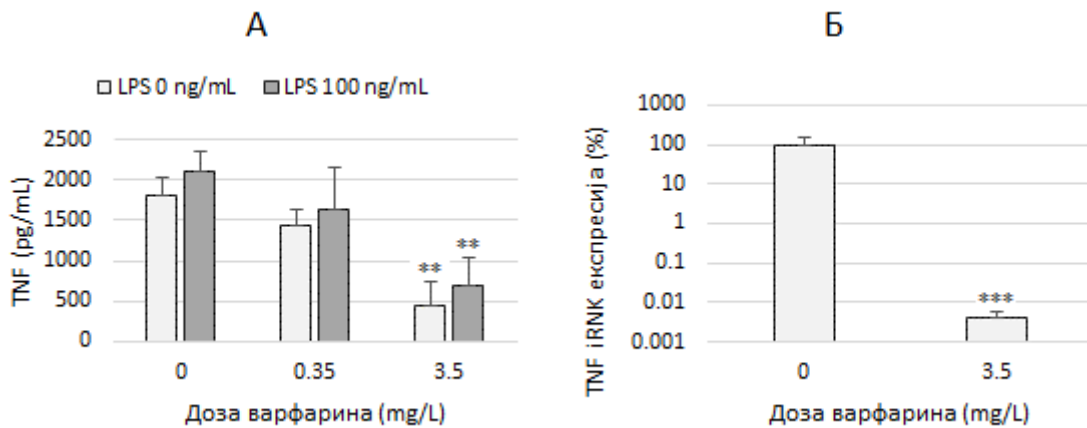
Значајно повећање нивоа iRNK за индуцибилну азот оксид синтазу (iNOS) уочено је за групу на вишој дози (3.5 mg/L) варфарина у односу на контролну групу (Слика 32).



Слика 32. Релативна експресија iNOS гена. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

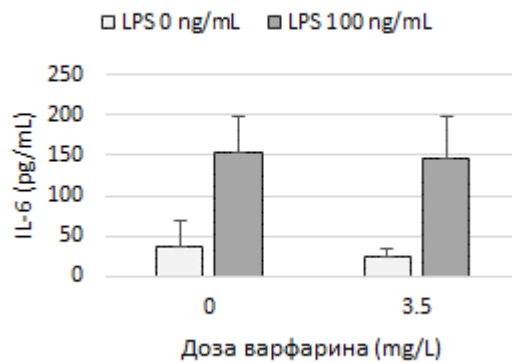
4.2.11. Ефекат орално примењеног варфарина на продукцију и експресију цитокина TNF и IL-6 полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви

Снижење нивоа нестимулисана и LPS-ом стимулисане продукције TNF детектовано је са нумеричком значајношћу ($p=0.09$) код пацова на нижој и статистичком значајношћу у вишој дози у односу на контролну групу нетретираних животиња (Слика 33А). Мерење експресије iRNK за TNF показало је статистички значајно снижење iRNK испитиване групе (3.5 mg/L) у односу на контролну групу (0 mg/L) (Слика 33Б).



Слика 33. Цитокински одговор полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви на оралну примену варфарина. (А) Нестимулисана и LPS-стимулисана продукција TNF у кондиционираном медијуму PMN леукоцита изолованих из периферне крви контролних пацова (0 mg/L) и пацова који су конзумирали (0.35 mg/L и 3.5 mg/L) варфарина. **(Б)** TNF iRNK експресија. iRNK експресија је представљена као проценат iRNK у ћелијама животиња третираних варфарином у односу на iRNK у ћелијама контролних животиња (које су представљене као 100%). Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација у односу на контролну групу животиња. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 mg/L).

У светлу резултата добијених за TNF, испитан је ефекат више дозе варфарина на други цитокин, IL-6 (Слика 34), при чему је констатовано да нема промена ни у нестимулисаној ни у стимулисаној продукцији IL-6 цитокина код пацова који су били на терапији са 3.5 mg/L у односу на контролну групу животиња. С обзиром да продукција IL-6 цитокина није била промењена, није вршено испитивање на нивоу експресије гена.

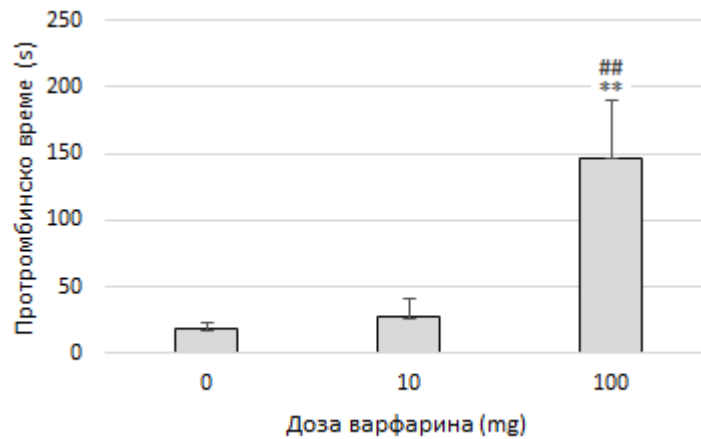


Слика 34. Цитокински одговор полиморфонуклеарних леукоцита периферне крви на оралну примену варфарина. Нестимулисана и LPS-стимулисана продукција IL-6. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација у односу на контролну групу животиња.

4.3. Испитивање директног ефекта варфарина на полиморфонуклеарне ћелије периферне крви

У циљу испитивања директног потенцијала варфарина да изазове системску запаљенску реакцију и тако делује на леукоците периферне крви, посебно PMN ћелије, пацовима је субкутано апликован стерилни поливинилски сунђер који садржи овај антикоагуланс и испитане су промене леукоцита који су мигрирали у овај матрикс, укључујући квантитативне (укупни леукоцити и субпопулације) и квалитативне параметре (метаболички вијабилитет и нестимулисана и стимулисана активација PMN ћелија).

На Слици 35 приказани су резултати протромбинског времена код пацова са субкутано постављеним сунђером. Евидентно је значајно продужење протромбинског времена само код више дозе у односу на контролну групу животиња којима су постављени сунђери са физиолошким раствором.



Слика 35. Протромбинско време у режиму субкутано апликованих стерилних варфаринских сунђера. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), ## $p < 0.01$ у односу на нижу дозу (доза варфарина 10 μg).

4.3.1. Ефекат варфарина примењеног субкутаном апликацијом сунђера на хематолошке параметре периферне крви

Подаци из табеле 10 показују да ниједна од субкутано примењених доза варфарина апликацијом поливинилских сунђера (10 μg и 100 μg) не утиче на укупни број леукоцита периферне крви, као ни на апсолутни број и релативни однос неутрофилних гранулоцита у односу на контролну групу животиња (0 μg). Нумерички пораст неутрофила ($p=0.07$) евидентиран је у вишој дози, у којој је присутно и значајно смањење лимфоцитне популације у апсолутном и релативном броју. Ни у једној од примењених доза варфарина нису примећене промене у броју моноцита, еозинофила и базофила. Пад вредности хематокрита евидентиран је при вишој дози, без забележене промене у броју еритроцита код јединки обе дозне групе, с тим да је приметно значајно снижење волумена еритроцита (MCV) у вишој дози варфарина. Примена ове дозе доводи до снижења укупног хемоглобина, као и до промена индекса везаних за узајамни однос хемоглобина, броја и волумена еритроцита, тако да је МСНС значајно повећан у групи на вишој дози. У групи на вишој дози, по питању хематокрита, хемоглобина, MCV и MCH, постоји дозно-зависно снижење у односу на групу животиња са субкутаном дозом од 10 μg . Снижење броја тромбоцита установљено је само при нижој дози варфарина, у којој је истовремено забележено и

повећање у волумену тромбоцита. Између дозних група забележена је значајна међу дозна разлика како броја тако и морфолошке величине тромбоцита.

Табела 10. Хематолошки параметри периферне крви код пацова са субкутано апликованим сунђером

		Доза варфарина (μg)		
		0	10	100
Леукоцити	($\times 10^9/\text{L}$)	12.9 \pm 3.8	12.3 \pm 3.9	12.4 \pm 3.4
Неутрофили	(%)	65.1 \pm 2.3	64.2 \pm 4.3	68.8 \pm 2.4
	($\times 10^9/\text{L}$)	8.39 \pm 2.16	8.35 \pm 3.06	8.53 \pm 2.42
Лимфоцити	(%)	32.7 \pm 1.7	33.2 \pm 4.5	28.8 \pm 2.1*
	($\times 10^9/\text{L}$)	4.17 \pm 1.5	4.17 \pm 0.85	3.53 \pm 0.87*
Моноцити	(%)	1.9 \pm 0.5	2.2 \pm 0.4	2.0 \pm 0.4
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.28 \pm 0.13	0.28 \pm 0.13	0.25 \pm 0.11
Еозинофили	(%)	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.1	0.3 \pm 0.2
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.03 \pm 0.006	0.03 \pm 0.005	0.04 \pm 0.014
Базофили	(%)	0.2 \pm 0.07	0.2 \pm 0.01	0.2 \pm 0.01
	($\times 10^9/\text{L}$)	0.02 \pm 0.005	0.02 \pm 0.005	0.02 \pm 0.014
Еритроцити	($\times 10^{12}/\text{L}$)	9.8 \pm 0.3	9.2 \pm 0.5	9.2 \pm 0.4
Хематокрит	(L/L)	0.45 \pm 0.02	0.43 \pm 0.01	0.41 \pm 0.02 [#]
Хемоглобин	(g/L)	151.0 \pm 2.1	148.0 \pm 1.2*	142.0 \pm 6.1 [#]
MCV	(fL)	45.5 \pm 0.8	44.8 \pm 0.4	43.8 \pm 0.1 [#]
MCH	(pg)	15.4 \pm 0.3	15.6 \pm 0.2	15.5 \pm 0.1 [#]
MCHC	(g/L)	339.0 \pm 12.0	349.0 \pm 8.2	352.0 \pm 0.6*
Тромбоцити	($\times 10^9/\text{L}$)	713.0 \pm 19.1	530.0 \pm 108.2*	730.0 \pm 45.0 [#]
MPV	(fL)	6.9 \pm 0.14	7.1 \pm 0.06*	6.8 \pm 0.25 [#]

Скраћенице: **MCV** (енгл. Mean Corpuscular Volume) просечна запремина еритроцита; **MCH** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin) просечна количина хемоглобина у еритроциту; **MCHC** (енгл. Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration) просечна концентрација хемоглобина на литар еритроцита; **MPV** (енгл. Mean Platelet Volume) просечна запремина тромбоцита. Резултати су приказани као средња вредност \pm стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * $p < 0.05$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 μg), # $p < 0.05$ у односу на прву подгрупу (доза варфарина 10 μg).

4.3.2. Ефекат варфарина на леукоците изоловане из течности издвојене из субкутано апликованог сунђера

Из Табеле 11 евидентно је да се у непромењеном приносу ћелија под дејством ниже (10 µg) и више дозе варфарина (100 µg) бележи повећање заступљености HIS 48+ ћелија у вишој дози у односу на контролну дозу (0 µg) .

Табела 11. Укупни принос и заступљеност HIS 48+ ћелија у субкутаном поливинилском импланту са варфарином

	Доза варфарина (µg)		
	0	10	100
Број ћелија x 10 ⁶	16.5 ± 3.9	11.7 ± 6.4	16.4 ± 10.0
HIS 48+ ћелије (%)	77.7 ± 1.8	77.6 ± 1.3	80.5 ± 2.9*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: * p<0.05 у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

Из података приказаних у Табели 12, евидентно је да нема промена у заступљености леукоцита са CD11b експримираним молекулима издвојених из поливинилског импланта ни код једне апликоване дозе у односу на контролну дозу.

Табела 12 : Заступљеност CD11b⁺ леукоцита у субкутаном поливинилском импланту са варфарином

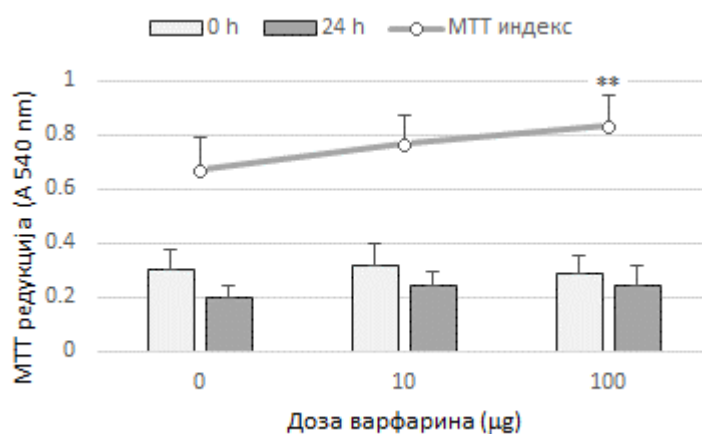
		Доза варфарина (µg)		
		0	10	100
CD11b ⁺ ћелије	(%)	87.4 ± 3.2	89.9 ± 5.8	87.1 ± 8.6
	(x 10 ⁶)	94.1 ± 23.7	122.4 ± 60.2	116.6 ± 52.1*

Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

4.3.3. Ефекат варфарина примењеног субкутаном апликацијом сунђера на активност леукоцита

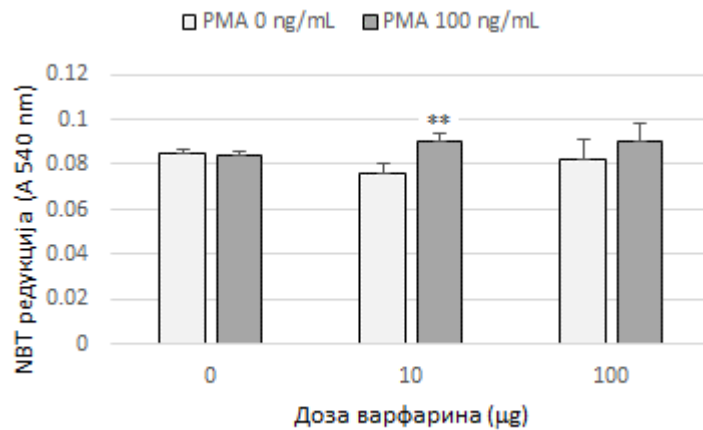
На Слици 36 приказани су резултати активности PMN леукоцита изражени квантитативним променама у капацитету МТТ редукције као мере метаболичке вијабилности ћелија. Види се да нема промена ни у свеже изолованим гранулоцитима, ни у ћелијама након 24 h инкубације. МТТ индекс (представљен односом редукције

МТТ у култури ћелија гајених 24 h и свеже изолованих ћелија), значајно је повећан у групи јединки које су биле изложене вишој дози варфарина.



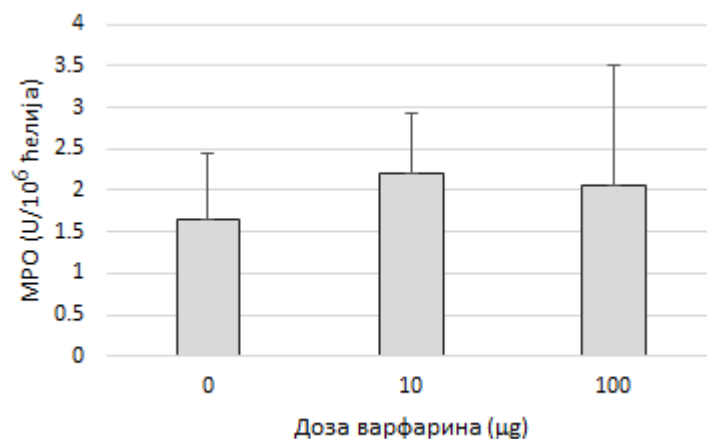
Слика 36. МТТ редукција као мера метаболичке активности PMN ћелија у режиму субкутано апликованих стерилних варфаринских сунђера. МТТ редукција је представљена стубићима као апсорбанца на 570 nm. □ свеже ћелије, ■ ћелије 24 h у органском медијуму, ● МТТ индекс. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

На Сликама 37 и 38 приказани су резултати ефеката апликације поливинилског сунђера са варфарином на базичне активности PMN ћелија, као што је активација/припрема за оксидативни прасак (Montboisse и други, 1991). Резултати указују да је дошло до статистички значајног повећања вредности редукције NBT код ћелија које су стимулисане са 100 ng/mL PMA, у односу на контролну групу. У вишој дозној групи животиња забележена је нумеричка промена редукционе активности PMN ћелија ($p=0.12$), чија је активација стимулисана са PMA.



Слика 37. Оксидативна активност полиморфонуклеарних леукоцита. Редукција NBT у режиму субкутано апликованих стерилних варфаринских сунђера. □ NBT редукција код нестимулисаних PMN ћелија, ■ NBT редукција код PMN ћелија стимулираних помоћу PMA. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација. Статистички значајне разлике: ** $p < 0.01$ у односу на контролну групу (доза варфарина 0 µg).

Непромењена активност MPO у леукоцитима изолованим из течности издвојене из субкутано апликованог сунђера забележена је код обе примењене дозе варфарина.



Слика 38. Унутарћелијска активност мијелопероксидазе у субкутаном третману са поливинилским варафаринским сунђерима. Резултати су приказани као средња вредност ± стандардна девијација.

5. ДИСКУСИЈА

У овом раду је испитан имуномодулаторни потенцијал варфарина коришћењем пацовског модела. Лабораторијски сојеви пацова широко се користе у имунотоксиколошким и токсиколошким истраживањима (Descotes, 2004) будући: 1. да су њихова физиологија и генетика добро познате, 2. да је имунски систем пацова добро проучен и 3. да постоји сличност имунског система пацова и човека, што омогућава екстраполацију резултата истраживања са ове врсте на човека. Осим тога, величина јединки ове врсте (у поређењу са мишевима) омогућава да се добију у довољном броју ћелије из ткива као што је крв. У раду су извршена испитивања ефеката епикутане апликације (као корелата професионалне изложености овом агенсу) као и оралног уноса (као корелата његове терапијске примене).

Варфарин (4-хидроксикумарин) се користи готово пола века као родентицид, али и као терапеутско средство у профилакси и третирању тромбоемболијских компликација. Овај терапеутски ефекат варфарина произилази из његовог дејства на метаболизам витамина К, преко интерференције са цикличном интерконверзијом витамина К и његовог 2,3 епоксида (витамин К епоксида). Сваке године милиони пацијената широм света третирају се овом класом активних супстанци и стога је ефекат деловања варфарина и до данас предмет научних истраживања. Међутим, осим њиховог антикоагулантног утицаја дејством на метаболизам витамина К, варфарин поседује и алтернативне молекулске механизме о којима се недовољно зна. Ајхбаум (Eichbaum F.W.) је још 1979. године утврдио да варфарин, осим његове специфичне антикоагулантне активности, исказује и велики број других фармакодинамичких својстава која се не примењују у клиничкој пракси и чија се дејства ретко испитују (Eichbaum и други, 1979). Осим бројних ефеката који укључују коронарну дилатацију, снижење тромбоцитне лепљивости, антиспазматски ефекат и др. значајан је антиинфламаторни ефекат који се испољава чак и након оралне или парентералне примене варфарина код пацова са већ развијеном инфламацијом. Механизми деловања варфарина на имунски систем најмање су познати, а ретки литературни подаци указују на различите ефекте варфарина (супресивне и стимулаторне) на ћелије и ткива имунског система.

У оквиру Интернационалног програма за хемијску сигурност, Светска здравствена организација је 1995. године категорисала варфарин као токсичну хемијску супстанцу и издала препоруке за испитивање биолошких последица изложености организма овом агенсу (WHO, 1995). И поред тога, мало је студија које

се баве штетним ефектима и последицама, посебно експозиције коже овом агенсу, у односу на многобројне радове који се баве испитивањем дерматотоксичности осталих пестицида (инсектицида, хербицида, фунгицида) о чему постоје бројни радови (Sullivan и други, 2000; Spiewak и други, 2001).

Варфарин се веома брзо апсорбује и орално и епикутано (Beckley-Kartey и други, 1997; Yourick и Bronaugh 1997; Hirsh и други, 2001; Jacques и други, 2010). Контакт са кожом остварује се случајним (ненамерним) излагањем коже родентицидима професионално (у току током њихове производње, примене на терену или одржавања коришћене опреме), као и у случају нестручне примене (у непрофесионалним условима) у домаћинствима урбаних/субурбаних и руралних подручја. Осим тога, трансдермални варфарински систем актуелан је и као терапеутско средство (Khalil и други, 2012). Из ових разлога веома је важно разумевање његовог утицаја како локално на кожу, тако и системски на цео организам приликом епикутаног излагања овом агенсу.

Кожа као комплексна баријера обезбеђује ефикасну комуникацију организма са спољашњом средином и одржава његову токсиколошку, биохемијску и имунолошку хемостазу. Топикална изложеност коже различитим супстанцама из спољашње средине (ксенобиотици) узрокује штетне ефекте који иреверзибилно или реверзибилно делују иритирајуће или индукују реверзибилну инфламаторну реакцију урођеног имунитета. Дермално апсорбовани родентициди могу узроковати тешку системску токсичност чак и са смртним исходом, какав је био инцидент тровања око седам стотина вијетнамске деце, од чега две стотине са смртним исходом, путем талка који је садржао варфарин у недозвољеним количинама (Martin-Boyer и други, 1983). У клиничким приказима случајева тровања варфарином приликом непрофесионалне и неадекватне употребе овог агенса као родентицида описују се његове системске последице, коагулопатије, са честим фаталним исходом (Svendson и други, 2002; Spiller и други, 2003). Ефекат изложености коже овом агенсу зависи од концентрације дозе и дужине експозиције (Abell и други, 1994), као и од саме фармаколошке мете, тј. места са високим капацитетом за његово везивање, што су најчешће рецепторски и транспортни протеини, ензими.

Повећање протромбинског времена код пацова који су били на режиму епикутане, оралне или субкутане примене варфарина указује на апсорпцију варфарина и његово присуство у системској циркулацији. Мерење протромбинског

времена се као лабораторијски тест користи и у дијагностици болести крварења или тромбоза (Tuazon и Scapoli, 2014) и служи за контролисање ефикасности антикоагулантног дејства варфарина на коагулациону каскаду. Основа фармаколошког дејства варфарина лежи у постизању равнотеже између превенције формирања угрушка али и крварења које може настати прекомерном инхибицијом формирања протромбина. Протромбинско време, као базични тест за процену активности спољашњег пута коагулације мери активност фибриногена, протромбина (FII) и фактора V, VII и X (FV, FVII и FX).

Одсуство промена концентрација хаптоглобина, једног од главних акутно фазних протеина пацова (Dobryszucka, 1997; Gruys и други, 2005; Nielsen и други, 2006) указује на слаб проинфламаторни ефекат епикутано апликованог варфарина. Одсуство мерљивих промена IL-6, главног цитокинског стимулатора акутно фазног одговора код пацова (Geiger и други, 1988; Heinrich и други, 1990), такође указује на одсуство ефекта варфарина, који доспева у циркулацију преко коже, на акутно фазни одговор. Краткотрајно излагање (три дана) може да буде узрок непостојања ефекта на хаптоглобин, будући да је дужа примена (30 дана, орално) довела до повећања овог протеина (Слика 26). Са друге стране, одсуство ефекта на хаптоглобин може да буде последица токсичности варфарина, на шта указује смањење концентрација CRP. Повећање активности каталазе ипак указује на то да епикутана апликација варфарина испољава системски проинфламаторни ефекат. Повећање активности каталазе је резултат потребе активације заштитног механизма против реактивних кисеоничних врста у плазми пацова, на шта указују резултати других аутора о позитивном ефекту антагониста реактивних врста кисеоника на штетне ефекте варфарина као што су оштећење бубрега (Ware и други, 2013) или повећање крвног притиска пацова (Ware и други, 2015a).

Промене броја и активности PMN леукоцита говори у прилог системских проинфламаторних ефеката варфарина који доспева у организам преко коже. Повећање броја неутрофилних леукоцита вероватна је последица њихове редистрибуције и демаргинације, с обзиром на присуство пула у самој циркулацији, али и размене са ткивним пуловима који се налазе у више органа као што су плућа, слезина, јетра и костна срж. Размена са овим пуловима омогућава брзо повећање броја неутрофила у периферији (Summers и други, 2010). Иако благе, ове промене у циркулишућим леукоцитима део су нормалног физиолошког одговора организма на

различите стимулусе, при чему су неутрофили примарна компонента акутне форме одговора (Vain и други, 2012). Снижење апсолутног и релативног броја лимфоцита је највероватније последица њиховог изласка из циркулације у периферна ткива, првенствено у третирану кожу, судећи по инфилтрацији CD 3⁺ ћелија (Т лимфоцита) у кожу на коју је нанесен варфарин (Kataranovski и други, 2007; Zolotarevski и други, 2015). Истовремена акумулација маст ћелија у дубоком дермису (Zolotarevski и други, 2015) и око васкулатуре дермиса рефлектује капацитет варфарина да делује и на ове ћелије, што даље указује на проинфламаторне ефекте епикутаног варфарина.

Повећање апсолутног и релативног броја еозинофила у крви пацова третираних вишом дозом варфарина у сагласности је са подацима који указују на еозинофилију изазвану варфарином код пацијената на оралној антикоагулантној терапији (Kuwahara и други, 1995; Teragaki и други, 2012; Goudarzirou и други, 2015), указујући на негативан (алергијски) ефекат овог антикоагулантног агенса. Алергијска реакција код пацијената на терапији варфарином представља велики проблем у вођењу и управљању терапијом, јер се код изражених алергијских реакција, као једина алтернатива, намеће прекид терапије варфарином и увођење другог кумаринског деривата, или неког од нових лекова, какви су директни инхибитори фактора (FIIa или FXa). Иако се алергијска реакција на варфарин као лек приписује неактивним састојцима каква је, на пример, боја за таблете (Bogart и други, 2010), подаци из ове дисертације указују да сам варфарин као активна супстанца може бити доприносио фактор за развој алергијске реакције. Снижење вредности хематокрита код пацова третираних варфарином је највероватније последица снижења MCV. Како није забележена промена у броју еритроцита, која би могла утицати на снижење хематокрита, наведена промена највероватније осликава стање утицаја варфарина на реологију крви. Амин (Amin T.M.) је са сарадницима установио снижење вискозитета крви и флексибилности еритроцита код коња који су били на терапији варфарином (Amin и други, 1986). Еритроцити се под дејством овог агенса скупљају и постају смежурани, што може да утиче на снижење нивоа хематокрита крви пацова (Rosenblum, 1968). У вези са овим примећена је и повећана конзумација воде од стране пацова који су конзумирали вишу дозу варфарина ($27,0 \pm 5,8$ у поређењу са $20,8 \pm 2,0$ код контрола, $p < 0.01$), која је била удружена са непромењеним волуменом урина код животиња на обе варфаринске дозе, што указује на присутну ретенцију воде. Истовремено, евидентирано је присуство еритроцита у урину животиња третираних

варфарином, што је указало на присуство хематурије, која заједно са горе наведеним подацима може да објасни комплексан утицај више фактора на реологију и објасни промене хематокрита, али и параметара еритроцита какав је МСНС. Добијени подаци сагласни су са хематуријом код пацова третираних кумаринским родентицидом бродифакумом (Ware и други, 2015). Повећана вредност МСНС у вишој дози варфарина, и поред снижења концентрације хемоглобина, у вези је са уоченом променом флексибилности еритроцита (Amin и други, 1986). Снижење броја тромбоцита, присутно у обе дозе, али статистички значајно само у вишој дози, указује на токсично дејство варфарина на ове елементе крви, уз истовремено повећање волумена тромбоцита (MPV) као резултат настојања организма да сачува тромбоцитну масу неопходну за активност примарне хемостазе. Наведени подаци заједно указују на збир сложених утицаја самих ћелија крви, које заједно са солубилним протеинима акутне фазе доводе до промена у крвном току и до провокације леукоцита који преко низа реакција леукоцитне адхезионе каскаде, почев од „rolling“-а преко адхезије и трансмиграције могу отпочети процесе неутрофилне активације, лимфоцитне рецикулације и моноцитне миграције.

Варфарин не испољава директну цитотоксичност на PMN леукоците, о чему може да се суди на основу тестова за процену ћелијске вијабилности. С обзиром на чињеницу да је МТТ тест базиран на активности ћелијских митохондрија (Denizot и Lang, 1986), која зависи од расположивих извора NADPH за ћелије (Berridge и други, 1996), повећање МТТ редуционог капацитета свеже изолованих PMN ћелија третираних животиња, код обе дозе варфарина, указује на повећану биохемијску активност ћелија. Она се заснива не само на активности митохондријалне сукцинат дехидрогеназе (Slater и други, 1963), већ и на активности азот оксид синтазе (Pozzolini и други, 2003) и неколико унутарћелијских редукујућих агенаса (Stocker и други, 2012).

Повећање апсолутног и релативног броја експримираних молекула CD11b (алфа ланац $\beta 2$ интегринског рецептора) PMN ћелија, у обе епикутане дозе, указује на стимулаторни ефекат трансдермалног варфарина на PMN ћелије, имајући у виду значај ових молекула за функционалну активацију леукоцита, посебно неутрофила (Abram и Lowel, 2009). Повећање експресије ових молекула такође може да буде одговорно за инфилтрацију неутрофилних леукоцита у ткива, будући да су ови

молекули кључни за леукоцитну екстравазацију (Sorokin и други, 2010; Ley и други, 2007).

Повећана активност интрацелуларне MPO, као и повећан NBT редукциони капацитет PMN ћелија указује на проинфламаторни ефект трансдермалног излагања PMN леукоцита овом антикоагулационом агенсу. Повећање ових оксидативних активности PMN леукоцита се може довести у везу са оксидативним стресом на системском нивоу (о чему говори повећање активности каталазе еритроцита), будући да реактивне врсте кисеоника стимулишу активацију ових ћелија (Allen и Tresini, 2000; Swain и други, 2002; Finkel, 2003).

Повећање експресије CD11b молекула такође може да буде одговорно за повећање оксидативне активности гранулоцита, јер су ови молекули укључени у функционалну активацију тих леукоцита (Abram и Lowell, 2009). Међутим, процес активације гранулоцита је сложен (Condliffe и други, 1998; Greenberg, 1999), тако да је могуће претпоставити учешће више различитих медијатора.

Значајно снижење нестимулисанае продукције азот оксида указује на супресивни ефекат варфарина на овај аспект оксидативне активности PMN ћелија. Ефекат је највероватније последица деловања на послетранскрипционом нивоу, будући да нема промена у нивоу iRNK за iNOS. У прилог овоме индиректно говори и одсуство инхибиције продукције NO након стимулације са LPS-ом, познатим стимулатором iNOS-а. За сада се не може говорити о механизмима који могу да буду одговорни за смањење нивоа NO након транскрипције, будући да велики број медијатора утиче на продукцију NO (Bogdan и други, 2009).

Снижена продукција проинфламаторних цитокина TNF и IL-6, од стране PMN леукоцита периферне крви пацова изложених варфарину, показује супресију још једне од активности ових ћелија и указује на ове цитокине као циљне мете за варфарин. Инхибиција активности гена за TNF и IL-6 одговорна је за снижену нестимулисану продукцију ових цитокина и утиче на стимулисану продукцију ових цитокина. Супресија наведених цитокина одражава покушај домаћина да ограничи проинфламаторну активност ћелија и поврати хомеостатски баланс. Инхибиција продукције TNF се може довести у везу са повећањем каталазе, ензима који штити ћелије од токсичног ефекта водоник пероксида, будући да је H₂O₂ одговоран за негативан ефекат на продукцију цитокина PMN леукоцита код мишева (Strassheim и

други, 2004; Zmijewski и други, 2007). Истраживања ефекта варфарина на ћелије макрофагне линије су показала да овај агенс инхибира трансдукцију сигнала насталих након везивања TNF за рецептор (Kater и други, 2002), а наши резултати показују да варфарин може и да инхибира продукцију овог цитокина. Снижење продукције IL-6 код PMN ћелија, у обе примењене варфаринске дозе, сагласно је са литературним подацима који су показали смањење продукције IL-6 спленоцита код мишева којима је варфарин примењиван орално (Kurohara и други, 2008) и у студијама *in vitro* са ћелијским линијама макрофага (Kater и други, 2002). Присутна редукција IL-6 се међутим разликује од података који указују на недостатак ефекта оралног варфарина на овај цитокин (Pоров и други, 2013). Непознат је узрок описаних разлика, али оне се могу приписати начину варфаринског третмана, као и дужини трајања изложености агенсу. Као подршка наведеном, код оралног (30 дана) режима примене уочено је повећање нивоа реактанта акутне фазе и продукције NO, за разлику од одсуства ових ефеката након локалне, епикутане примене варфарина. Студије штетних ефеката варфарина, посебно оних везаних за професионалну изложеност варфарину као родентициду и антикоагулансу, као и непрофесионална употреба лако примењивих и доступних комерцијалних препарата за кућну употребу, описују присутна крварења и пратеће негативне манифестације као што су хематурија, склоност ка модрицама и друге видове коагулационих поремећаја. Од већине пријављених случајева, који су забележени у литератури, у малом броју евидентирани су подаци изведних биохемијских тестова, с тим да су најчешће одређивани број тромбоцита и концентрација фибриногена (Park и други, 1986), који су у већини случајева били у референтним границама. Ипак, у раду Парка (Park В.К.) и сарадника наглашена је дужина коагулационих поремећаја која се мерила месецима, што је директни показатељ озбиљности комплексних поремећаја који произилазе из нарушене хемостазне хомеостазе и могућих комплексних имуномодулаторних ефеката. Продужени антикоагулантни ефекат варфарина, посебно ако акцидент није адекватно забележен пре пријаве лекару, може довести до стварања услова за испољавање штетних дејстава варфарина, а посебно дејства на активност леукоцита и друге механизме који супресивним или активационим дејством могу довести до озбиљних компликација. Стога студије које проучавају ове ефекте могу бити од велике помоћи у сагледавању опасности за здравље (других у односу на крварење) кумаринских родентицида. Имајући на уму обимну употребу антикоагулантних родентицида, недоследност и неспровођење заштитних мера при употреби и неспровођење хигијене

руку пре и после употребе и апликације родентицида (Svendson и други, 2002) и некомпетентну употребу у кућним условима (Fristed и Sterner, 1965; Abell и други, 1994; Spiller и други, 2003) кумарински родентициди се морају третирати као скривена опасност за особе које рукују овим агенсом. Осим тога, подаци о дејству епикутане примене варфарина могу бити од користи за дизајнирање алтернативне терапије оралној варфаринској терапији у виду трансдермалних система за примену варфарина, предложених као вид континуиране терапије (Gale, 2008) или нових технолошких решења која укључују супстанце или смеше које појачавају пермеацију варфарина (Khalil и други, 2012).

Повећање протромбинског времена, детектовано након завршетка конзумације обе дозе варфарина, показује антикоагулантни ефекат и говори о апсорпцији овог агенса. На основу формуле за прерачунавање еквивалентне дозе за употребу код људи (енгл. Human Equivalent Dose, HED), установљено је да је доза, коју су пацови конзумирали у току тридесет дана, износила 0.06 mg/kg, што је одговарајућа вредност за дозу од 3.6 mg/60kg, а која се у литератури наводи као средња доза за хуману употребу (Hirsh и други, 1998; Jaffer и Bragg, 2003). С обзиром да је доза од 2 mg до 5 mg најчешће преписивана за хуману употребу, дозе примењене у раду сагласне су са дозама за хуману употребу. Нижа испитивана доза код пацова била је 10 пута мања. Уочена унутрашња као и спољашња крварења су узрок угинућа код мање од 10 % животиња и указују на поремећену коагулацију која узрокује штетне патолошке ефекте (Lund, 1988).

Хистолошком анализом узорака јетре, црева и плућа показано је да варфарин делује на ова ткива. Хистолошка анализа црева потврђује токсичност варфарина на ткиво интестинума, што је регистровано и код пацијената на антикоагулантној терапији (Ou Yang и други, 2014). Леукоцитна инфилтрација говори о локалном запаљенском процесу. Присуство леукоцита у овом ткиву осликава потребу организма да управља повредом и поврати, иначе добро контролисану, интестиналну хомеостазу. У хистолошким препаратима јетре присуство хепатичних озледа ткива код обе примењене дозе потврђује директно токсични потенцијал варфарина. Овај ефекат примећен је и код пацијената на терапији варфарином (Slagboom и Loeliger, 1980; Nöhler и други, 1994; Lee, 2003). Плућа су интраваскуларни резервоар леукоцита, посебно неутрофила, који се константно измењује са циркулишућим ћелијама (Kuebler, 2005). Обе дозе варфарина доводе до микрофокуса

интерстицијалног крварења, што заједно са ретким налазима код пацијената (Erdogan и други, 2004; Uysal и други, 2014) указују на плућа као циљно ткиво варфарина. Хистолошком анализом слезине нису евидентиране промене на нивоу ћелија и ткива.

Повећање концентрација хаптоглобина и CRP у плазми пацова који су пили воду са варфарином, као и фибриногена (при вишој дози овог агенса), показује запаљењску реакцију на системском нивоу (Baumann и други, 1990). Статистички значајно повећање протеина акутне фазе фибриногена, хаптоглобина и CRP (као и следствено снижење албумина као негативног реактанта акутне фазе), одражава системски инфламаторни миље пацова на оралном режиму варфарином. Премда су CRP, хаптоглобин и фибриноген позитивни реактанти акутне фазе, који се најчешће користе за процену инфламације код човека, код пацова је хаптоглобин најосетљивији реактант акутне фазе, са највећом магнитудом промена и јасним корелацијама са другим маркерима инфламације, нарочито са фибриногеном и албумином (Giffen и други, 2003). Слабо повећање хаптоглобина (мање од два пута), у односу на повећање од готово седам пута у моделима акутне инфламације, посредно указује на низак степен инфламације у оралном режиму варфарина код пацова, што је у сагласности са литературним наводом (Giffen и други, 2003) који указује на низак ниво CRP код пацијената који примају варфаринску терапију (MacCallum и други, 2004). Снижење нивоа албумина је у сагласности са подацима који показују да је повећање протеина акутне фазе (хаптоглобина и фибриногена) у системској инфламацији нижег степена, удружено са снижењем нивоа албумина (Maillot и други, 2008). Висока и значајна корелација између IL-6 и протеина акутне фазе ($r=0.70$, $p<0.05$, $y=0.13+0.003 \cdot x$, за IL-6 и хаптоглобин, $r=0.83$, $p<0.001$, $y=0.065+0.0037 \cdot x$, за IL-6 и фибриноген) указује на учешће тог цитокина у њиховој продукцији, као што је евидентирано у акутној (Giffen и други, 2003) и хроничној инфламација код пацова (Maillot и други, 2008).

Повећање циркулишућег IL-6 цитокина након LPS стимулације присутно је и код пацијената на варфаринској терапији високим дозама, при чему је детектовано и повећање појединих протеина акутне фазе (Saminathan и други, 2010).

Промена активности еритроцитних ензима антиоксидативне одбране, SOD и CAT, такође говоре у прилог постојања системског запаљења код пацова који су пили варфарин (Halliwell и други, 1988; 2000). Ове промене проистичу из потребе за активацијом заштитног механизма, неопходног за уклањање реактивних врста

кисеоника из плазме и потребе за заштитом хемоглобина од пероксидације (Halliwell и други, 2000). С обзиром на то да варфарин не утиче директно на активност SOD, уочено снижење активности ензима резултат је његове потрошње у превођењу O_2 - до H_2O_2 , уз истовремено повећање активности САТ која даље трансформише H_2O_2 у O_2 и H_2O . Промене у активности оба еритроцитна ензима чистача резултат су потребе за активацијом заштитних механизма и неопходности уклањања ROS продуката из плазме, услед потребе за заштитом ткива и лимитирањем његове даљње озледе (Toth и други, 1984; Oishi и други, 1999). И саме промене могу бити извор инфламације, те смањење SOD утиче на повећање осетљивости еритроцита на оксидативни стрес (Bartoli и други, 1992). Истовремено и еритроцитна повреда оксидантима и антиоксидантна потрошња, могу бити узроци инфламације (Lang и други, 2006).

Промене у броју неутрофила и лимфоцита периферне крви вероватно су последица редистрибуције леукоцита због потреба за њиховом миграцијом у ткива, где ће испољити своје ефекторске активности. У том смислу су индикативни подаци о смањењу броја ћелија који исказују CD11b. Имајући у виду кратак полуживот неутрофила, повећање њиховог броја може бити резултат потребе за њиховим сталним присуством, услед потрошње у репарационим процесима повређеног ткива. Осим тога, повећан број неутрофилних леукоцита говори, индиректно, у прилог чињеници да варфарин нема цитотоксичан ефекат на ову субпопулацију периферних ћелија крви. Излазак лимфоцита изван крвног тока до места ткивне озледе може бити разлог за снижење њиховог броја, с обзиром на то да варфарин нема цитотоксичан ефекат.

Поред квантитативних промена, варфарин узрокује и бројне квалитативне промене леукоцита периферне крви. Статистички значајно виша адхезија и редукција NBT од стране PMN леукоцита пацова који су били на вишој варфаринској дози, као одговор на активацију са потентним PMN активатором PMA, говоре о „priming“ ефекту, тј. ефекту на припрему PMN леукоцита да одговоре на егзогену стимулацију (Hallett и Lloyds, 1995) .

Значајно повећана активност унутарћелијске MPO у групи на вишој дози, заједно са фагоцитном оксидазом, је главни извор оксидантне активности фагоцита (Finkel, 2003). Припрема периферних PMN леукоцита за респираторни прасак, уз повећање унутарћелијске MPO, може бити последица повећања IL-6 на шта указује висока и значајна корелација ($r=0.85$, $p<0.001$. $y=-0.0003+0.0035 \cdot x$, за IL-6 и NBT и

$r=0.83$, $p<0.001$, $y=0.18+0.01 \cdot x$, за IL-6 и MPO) за вишу дозу варфарина. Ови резултати су од значаја и за пацијенте на терапији варфарином, будући да постоје студије које указују на повећање IL-6 код ових пацијената, које доводи до подстицања активације неутрофила изолованих из периферне крви човека и ослобађање супероксида (Biffi и други, 1994), као и до секреције примарних азурофилних гранула које садрже MPO (Borish и други, 1989). Подстицање активације PMN је компликован процес који зависи од различитих стимулуса и агониста ћелијских рецептора (Condliffe и други, 1998) и бројних ефеката инфламаторно-релевантних стимулуса у циркулацији, у светлу чега треба посматрати и сложеност ефеката орално примењене терапије. Припрема PMN за респираторни прасак и повећана адхезија за пластику, посебно у вишој дози могу се приписати и еритроцитима изложеним оксидативном стресу будући да су реактивне врсте кисеоника познати стимулатори PMN (Swain и други, 2002). Висока и значајна корелација између еритроцитне каталазе и подстицања активације PMN, мерено NBT редукцијом ($r=0.88$, $p<0.001$, $y=-0.0009+ 0.000004 \cdot x$) у вишој дози, говори у прилог овим разматрањима.

Промене у продукцији и експресији NO такође указују на проинфламаторни ефекат орално примењеног варфарина на PMN ћелије периферне крви. Повећање iRNK за iNOS је одговорно за повећање нестимулисана продукције NO при вишој дози варфарина, док нижа доза доводи до повећања способности PMN ћелија да одговоре на егзогену стимулацију. Различити медијатори могу да индукују ћелијску експресију азот оксида (Bogdan и други, 2009). Повећана продукција и експресија NO може се приписати и повећању MPO, с обзиром на то да капацитет MPO може да повећа каталитичку активност iNOS-а на месту инфламације (Galijasevic и други, 2003; Brovkovich и други, 2008). У прилог овоме говори и висока позитивна корелација између продукције MPO и NO ($r=0.93$, $p<0.001$, $y=1.46+ 0.037 \cdot x$) код више дозе варфарина.

За разлику од проинфламаторних ефеката на нивоу оксидативних активности PMN леукоцита и адхезије, примена варфарина је испољила различите ефекте на цитокински одговор PMN леукоцита. Снижење TNF продукције PMN, код пацова који су конзумирали варфарин, резултат је инхибиције на транскрипционом нивоу, на шта указује снижени ниво TNF iRNK. Одсуство ефекта оралног варфаринског режима примене, како на нестимулисану тако и на продукцију IL-6 стимулисану LPS-ом није за сада јасан, Инхибиција овог цитокина у режиму акутне примене, за разлику од

одсуства ефекта након конзумирања у трајању од 30 дана, указује на разлике у динамици ефекта. У том смислу индикативни су подаци о пролазном снижењу концентрације IL-6 у плазми пацијената на терапији варфарином (MacLean и други, 2003).

На основу промена оксидативних активности евидентно је да су PMN ћелије у стању припреме за активност, или постају активирани унутар стимулације варфарином за вршење различитих ефекторних функција (ослобађање ензима, продукција реактивних кисеоникових и азотових врста), које су неопходне за одбрану домаћина против штетних спољашњих стимулуса (Baggiolini и други, 1995). Са друге стране, ове активности PMN леукоцита могу да резултују ендотелијалном ћелијском повредом, док модулација адхезивног и миграторног потенцијала неутрофила може допринети формирању микротромба, што може да доведе до ткивне повреде. Присутна инфламација код пацова који су конзумирали варфарин вероватно представља заштитни механизам за вулнерабилна ткива обухваћена дејством варфарина. С друге стране повећана активација неутрофила представља истовремено и ризик од штетних интралуминалних ефеката ових ћелија (Babior, 2000). Диференцијални ефекат на цитокине вероватно одражава тежњу организма за постизањем баланса проинфламаторних и антиинфламаторних ефеката, будући да је TNF моћан стимулатор активности PMN (Klebanoff и други, 1986; Fox и Kubes, 2000, Norman и други, 2005).

Већи број PMN леукоцита (HIS 48+ ћелија) у сунђерима који садрже варфарин указује на позитиван ефекат овог агенса на ћелијску миграцију. Он може бити последица директног деловања варфарина, али и показатељ веће подложности PMN леукоцита (под деловањем варфарина који је доспео у циркулацију) да мигрирају у околна ткива. Слабо изражене промене активности PMN леукоцита који су мигрирали у сунђер који садржи варфарин, могу да буду последица кратког времена трајања изложености или недовољне концентрације агенса, али и недостатка системског окружења (периферна крв са уобличеним елементима и медијатори из плазме) чији чиниоци могу да модулирају активности PMN леукоцита.

Резултати ове дисертације су показали да системско деловање варфарина може произвести различите ефекте (повећање адхезије, дегранулације, продукције реактивних врста кисеоника и секреције цитокина) на PMN леукоците у *in vivo* условима, што показује имуномодулаторни капацитет варфарина. Проширење листе

биолошких активности варфарина, које нису везане за хемостазу, указује на потребу за пажљивим разматрањем штетних ефеката варфарина и додатним испитивањима ефеката овог агенса. Ово може да буде важно за критичко сагледавање клиничке примене варфарина као лека, ако се има у виду да се овај агенс, и поред појаве нових оралних антикоагуланата са директним инхибиторним дејством на факторе коагулације IIa и Xa, и даље сврстава у оне који се најчешће преписују као антикоагулантна терапија.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Добијени резултати у овој дисертацији омогућавају следеће закључке:

Натријум варфарин примењен епикутано, орално или субкутано доспева у организам, судећи по продужењу протромбинског времена као основног механизма деловања овог антикоагуланса.

У режиму епикутане примене варфарина уочено је да:

1. Нема промена концентрације протеина акутне фазе и IL-6, али се запажа пораст активности каталазе при вишој дози варфарина.
2. Епикутана примена више дозе варфарина доводи до повећања броја неутрофилних и еозинофилних леукоцита, али до смањења броја лимфоцита. Евидентне су и промене карактеристика еритроцита.
3. Варфарин нема директно цитотоксично дејство на полиморфонуклеарне леукоците, али доводи до промене њихове активности укључујући:
 - а) повећање броја ћелија које исказују CD11b (при обе дозе), али без ефекта на адхезију;
 - б) диференцијални ефекат на оксидативну активност полиморфонуклеара [повећање MPO и повећану способност редукције NBT након стимулације липополисахаридом (при вишој дози), али смањење нестимулисана продукције азот-оксида (при обе дозе) и непромењену продукцију након стимулације LPS-ом];
 - в) смањење нестимулисана и LPS-ом стимулисане продукције и експресије проинфламаторних цитокина TNF и IL-6 (као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу).

У режиму оралне примене уочено је да:

1. Обе дозе варфарина доводе до системске запаљењске реакције коју карактерише повећање протеина акутне фазе и IL-6 (при обе дозе), као и промене активности основних ензима антиоксидативне одбране, супероксид дисмутазе и каталазе.

2. Виша доза варфарина доводи до повећања броја неутрофилних леукоцита, али до смањења броја лимфоцита. Евидентне су и промене карактеристика еритроцита.

3. Варфарин нема директно цитотоксично дејство на полиморфонуклеарне леукоците, али доводи до промене њихове активности које обухватају:

а) смањење броја ћелија које исказују CD11b (при обе дозе), али без ефекта на спонтану адхезију;

б) повећање оксидативне активности (MPO при вишој дози и повећање способности редукције NBT и продукције NO након стимулације LPS-ом);

в) диференцијални ефекат на цитокински одговор полиморфонуклеарних леукоцита (снижење TNF при вишој дози варфарина, као резултат инхибиције на транскрипционом нивоу (TNF mRNA), али без утицаја на IL-6).

У режиму субкутане апликације стерилних поливинилских сунђера уочено је:

1. Повећање броја неутрофилних леукоцита у сунђерима који садрже варфарин.

2. Да су слабо изражене промене активности полиморфонуклеарних леукоцита, што указује или на краткоћу трајања изложености и/или значај системског окружења.

Узето у целини, резултати рада показују имуномодулаторни капацитет варфарина. Описани ефекти проширују листу биолошких активности варфарина које нису везане за хемостазу, чиме се указује на потребу за разматрањем штетних ефеката варфарина и додатних испитивања ефеката овог агенса. Ово може да буде важно за критичко сагледавање ризика од професионалне изложености са једне стране, а посебно клиничке примене варфарина, као лека, ако се има у виду да се овај агенс, и поред појаве нових оралних антикоагуланата са директним инхибиторним дејством на факторе коагулације IIa и Xa, и даље сврстава у оне који се најчешће препisuју као антикоагулантна терапија.

7. ЛИТЕРАТУРА

- Abdel-Aziz M.I., Ali M.A., Hassan A.K., Elfaham T.H. Factors influencing warfarin response in hospitalized patients. *Saudi Pharm J.* 2015; 23(6):642-9.
- Abell T.L., Merigian K.S., Lee J.M., Holbert J.M., McCall J.W. Cutaneous exposure to warfarin-like anticoagulant causing an intracerebral hemorrhage: a case report. *J Toxicol Clin Toxicol.* 1994; 32(1):69-73.
- Abraham N.S., Hartman C., Richardson P., et al. Risk of lower and upper gastrointestinal bleeding, transfusions, and hospitalizations with complex antithrombotic therapy in elderly patients. *Circulation.* 2013; 128:1869-77.
- Abram C.L., Lowell C.A. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27:339-62.
- Adams J., Pepping J. Vitamin K in the treatment and prevention of osteoporosis and arterial calcification. *Am J Health Syst Pharm.* 2005; 62(15):1574-81.
- Adcock D.M., Koftan C., Crisan D., Kiechle F.L. Effect of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 gene on warfarin anticoagulation. *Arch Pathol Lab Med.* 2004; 128(12):1360-1363.
- Ad-El D.D., Meirovitz A., Weinberg A., Kogan L., Arieli D., Neuman A., Linton D. Warfarin skin necrosis: local and systemic factors. *Br J Plast Surg.* 2000; 53(7):624-6.
- ADRAC, Warfarin-induced skin necrosis. *Aust Adv Drug Reactions Bull.* 2005; 24(6).
- Agarwal R. Synthesis and biological screening of some novel coumarin derivatives. *Biochem Pharmacol.* 2000; 6:1042-1051.
- Aisner J., Goutsou M., Maurer L.H., Cooper R., Chahinian P., Carey R., Skarin A., Slawson R., Perry M.C., Green M.R. Intensive combination chemotherapy, concurrent chest irradiation, and warfarin for the treatment of limited-disease small-cell lung cancer: a Cancer and Leukemia Group B pilot study. *J Clin Oncol.* 1992; 10:1230-6.
- Aithal G.P., Day C.P., Kesteven P.J., Daly A.K. Association of polymorphisms in the cytochrome P450 CYP2C9 with warfarin dose requirement and risk of bleeding complications. *Lancet.* 1999; 353(9154):717-9.
- Allen R.G., Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000; 28:463-499.
- Altıkaya N., Parlakgümüş A., Demir Ş., Alkan Ö., Yildirim T. Small bowel obstruction caused by intramural hematoma secondary to warfarin therapy: a report of two cases. *Turk J Gastroenterol.* 2011; 22(2):199-202.
- Amin T.M., Sirs J.A., Allen B.V., Colles C.M. Effects of warfarin on blood rheology in navicular disease. *Res Vet Sci.* 1986; 40(3):308-12.
- Anderson A.M., Chane T., Patel M., Chen S., Xue W., Easley K.A. Warfarin therapy in the HIV medical home model: low rates of therapeutic anticoagulation despite adherence and differences in dosing based on specific antiretrovirals. *AIDS Patient Care and STDS.* 2012; 26(8): 454-462.

Ansell J., Hirsh J., Poller L., Bussey H., Jacobson A., Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004; 126(3 Suppl):204S-233S.

Arnason T., Wells P.S., van Walraven C., Forster A.J. Accuracy of coding for possible warfarin complications in hospital discharge abstracts. *Thromb Res*. 2006; 118(2):253-62.

Babior B.M. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000; 109(1):33-44.

Baggiolini M. Activation and recruitment of neutrophil leukocytes. *Clin Exp Immunol*. 1995; 101:5-6.

Bain J.B., Bates I., Laffan M.A., Lewis S.M. Dacie and Lewis Practical Haematology, 11th Edition, Elsevier Churchill Livingstone. 2012; ISBN-13:9780702034077.

Bartoli G.M., Palozza P., Piccioni E., Enhanced sensitivity to oxidative stress in Cu, ZnSOD depleted rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1123(3): 291-5.

Baser H., Kollu K., Akgul Y.S.S., Baser S., Aygun M.S., Ecirli S. A rarely encountered complication due to the use of warfarin: spontaneous intramural hematoma in jejunum: two case reports. 2013; *J. Med. Cases* 4, 560-563.

Basir N., Chong V.H. Spontaneous intramural duodenal haematoma with transient biliary obstruction and acute cholecystitis. *Singapore Med J*. 2010; 51(12):e198-200.

Baumann H., Morella K.K., Jahreis G.P., Marinković S. Distinct regulation of the interleukin-1 and interleukin-6 response elements of the rat haptoglobin gene in rat and human hepatoma cells. *Mol Cell Biol*. 1990; 10(11):5967-76.

Beckley-Kartey S.A., Hotchkiss S.A., Capel M. Comparative in vitro skin absorption and metabolism of coumarin (1,2-benzopyrone) in human, rat, and mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 145(1):34-42.

Bekheit M., AlaaSallam M., Khafagy P.A., Corder R., Katri K. Non-traumatic intramural hematomas in patients on anticoagulant therapy: report of three cases and overview of the literature. 2014; *Afr. J. Emerg. Med*. 4, e1-e4.

Bellido-Martin L., de Frutos P.G. Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitam Horm*. 2008; 78:185-209.

Bergstein J.M. Glomerular fibrin deposition and removal. *Pediatr Nephrol*. 1990; 4(1):78-87.

Berkarda B., Bouffard-Eyüboğlu H., Derman U. The effect of coumarin derivatives on the immunological system of man. *Agents Actions*. 1983; 13(1):50-2.

Berkarda B., Marrack P., Kappler J.W., Bakemeier R.F. Effects of warfarin administration on the immune response of mice. *Arzneimittelforschung*. 1978; 28(8):1407-10.

Berkner K.L. Vitamin K-dependent carboxylation. *Vitam Horm*. 2008; 78:131-56.

- Berkner K.L., Runge K.W. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J Thromb Haemost.* 2004; 2(12):2118-32.
- Bern M.M., Hazel D., Deeran E., Richmond J.R., Ward D.M., Spitz D.J., Mattingly D.A., Bono J.V., Berezin R.H., Hou L., Miley G.B. Low dose compared to variable dose Warfarin and to Fondaparinux as prophylaxis for thromboembolism after elective hip or knee replacement surgery; a randomized, prospective study. 2015; *Thromb. J.* 13, 1.
- Berridge M.V., Tan A.S., McCoy K.D., Wang R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays that Use Tetrazolium Salts. *Biochemica.* 1996; 4:14–19.
- Bertucci C., Canepa A., Ascoli G.A., Guimaraes L.F., Felix G. Site I on human albumin: differences in the binding of (R)- and (S)-warfarin. *Chirality.* 1999; 11(9):675-9.
- Bettler S., Montani S., Bachmann F. Incidence of intramural digestive system hematoma in anticoagulation. Epidemiologic study and clinical aspects of 59 cases observed in Switzerland (1970-1975). *Schweiz Med Wochenschr.* 1983; 113(17):630-6.
- Beutler E. Catalase. In: Beutler E, editor. Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. *Grune and Stratton*, 1982; 105–106.
- Biffi W.L., Moore E.E., Moore F.A., Carl V.S., Kim F.J., Franciose R.J. Interleukin-6 potentiates neutrophil priming with platelet-activating factor. *Arch Surg.* 1994; 129:1131-6.
- Bobek V., Boubelik M., Fiserová A., L'uptovcová M., Vannucci L., Kacprzak G., Kolodziej J., Majewski A.M., Hoffman R.M. Anticoagulant drugs increase natural killer cell activity in lung cancer. *Lung Cancer.* 2005; 47(2):215-23.
- Bobek V., Kovacik J. Antitumor and antimetastatic effect of warfarin and heparins. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58(4):213-9.
- Bodin L., Verstuyft C., Tregouet D.A., Robert A., Dubert L., Funck-Brentano C., Jaillon P., Beaune P., Laurent-Puig P., Becquemont L., Lorient M.A. Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood.* 2005; 106(1):135-40.
- Bogart M.A., Cheema A., Wooten J.M., Bogart D.B. Warfarin allergy: an easy solution. *Clin Cardiol.* 2010; 33(3):31-2.
- Bogdan C., Rollingshoff M., Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunol Rev.* 2000; 173:17-26.
- Bona R.D., Hickey A.D., Wallace D.M. Warfarin is safe as secondary prophylaxis in patients with cancer and a previous episode of venous thrombosis. *Am J Clin Oncol.* 2000; 23(1):71-3.
- Borish L., Rosenbaum R., Albur L., Clark S. Activation of neutrophils by recombinant interleukin 6. *Cell Immunol.* 1989; 121: 280–289.

- Borowski M., Furie B.C., Bauminger S., Furie B. Prothrombin requires two sequential metal-dependent conformational transitions to bind phospholipid. Conformation-specific antibodies directed against the phospholipid-binding site on prothrombin. *J Biol Chem.* 1986; 261(32):14969-75.
- Bourinbaiar A.S., Jirathitikal V. Low-cost anti-HIV compounds: potential application for AIDS therapy in developing countries. *Curr Pharm Des.* 2003; 9(18): 1419-31.
- Bourinbaiar A.S., Tan X., Nagorny R. Effect of the oral anticoagulant, warfarin, on HIV-1 replication and spread. *AIDS.* 1993; 7(1):129-30.
- Bozeman P.M., Learn D.B., Thomas E.L. Assay of the human leukocyte enzymes myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *Journal of immunological methods* 1990; 126: 125-133.
- Božina N. The pharmacogenetics of warfarin in clinical practice. *Biochemia Medica.* 2010; 20(1):33-44.
- Braiteh F., Plana J.C. Spontaneous haemopericardium with subacute cardiac tamponade in a patient with lung cancer receiving coumadin. *Q J Med.* 2009; 102:575.
- Breckenringe A.M., Cholerton S., Hart J.A., Park B.K., Scott A.K. A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1985; 84(1):81-91.
- Brodsky S.V., Satoskar A., Chen J., Nadasdy G., Eagen J.W., Hamirani M., Hebert L., Calomeni E., Nadasdy T. Acute kidney injury during warfarin therapy associated with obstructive tubular red blood cell casts: a report of 9 cases. *Am J Kidney Dis.* 2009; 54(6):1121-1226.
- Brooks C., Rutherford JM., Gould J., Ramsay M.M., James D.K. Warfarin dosage in postpartum women: a case-control study. *BJOG.* 2002; 109(2):187-90.
- Brovkovych V., Gao X.P., Ong E., Brovkovych S., Brennan M.L., Su X., Hazen S.L., Malik A.B., Skidgel R.A. Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(1):L96-103.
- Carabello P.J., Heit J.A., Atkinson E.J., Silverstein M.D., O'Fallon W.M., Castro M.R. Long term use of oral anticoagulants and the risk of fracture. *Arch Intern Med.* 1999; 159(15):1750-56.
- Carson S.D., Brozna J.P. The role of tissue factor in the production of thrombin. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1993; 4:281-292.
- Chan Y.C., Valenti D., Mansfield A.O., Stansby G. Warfarin induced skin necrosis. *Brit J Surgery.* 2000; 87:266-72.
- Chang H.H., Zhou M., Tang W., Caleb A., Singh S. Risk of gastrointestinal bleeding associated with oral anticoagulants: population based retrospective cohort study. *BMJ* 2015; 350.

Chen W.C., Chen Y.H., Hsu P.I., Tsay F.W., Chan H.H., Cheng J.S., Lai K.H. Gastrointestinal Hemorrhage in Warfarin Anticoagulated Patients: Incidence, Risk Factor, Management, and Outcome. *BioMed Research International*. 2014; Vol 2014, Article ID 463767.

Choi H.S., Kim J.W., Cha Z.N., Kim G. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J Immunoassay Immunochem*. 2006; 27(1):31-44.

Choonara I.A., Malia R.G., Haynes B.P., Hay C.R., Cholerton S., Breckenridge A.M., Preston F.E., Park B.K. The relationship between inhibition of vitamin K1 2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin. *Br J Clin Pharmacol*. 1988; 25(1):1-7.

Coates T., Kirkland G.S., Dymock R.B., Murphy B.F., Brealey J.K., Mathew T.H., Disney A.P. Cutaneous necrosis from calcific uremic arteriolopathy. *Am J Kidney Dis*. 1998; 32(3):384-91.

Cohen A.J. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food Cosmet Toxicol*. 1979; 17(3):277-89.

Colman R.W., Hirsh J., Marder V.J., Clowes A.W., George J.N. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice, 4th Edition, Lippincott Williams & Wilkins. 2001; ISBN-10:0-7817-1455-9.

Comp P.C. Coumarin-induced skin necrosis. Incidence, mechanisms, management and avoidance. *Drug Saf*. 1993; 8(2):128-35.

Condliffe A.M., Kitchen E., Chilvers E.R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin Sci (Lond)*. 1998; 94(5):461-71.

Costantini V., Zacharski L.R. The role of fibrin in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 1992; 11(3-4):283-90.

Coutu D.L., Wu J.H., Monette A., Rivard G.E., Blostein M.D., Galipeau J. Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *J Biol Chem*. 2008; 283(26):17991-8001.

D'Andrea G., D'Ambrosio R.L., Di Perna P., Chetta M., Santacrose R., Brancaccio V., Grandone E., Margaglione M. A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*. 2005; 105(2):645-9.

Daly A.K., King B.P. Pharmacogenetics of oral anticoagulants. *Pharmacogenetics*. 2003; 13(5):247-52.

Danziger J. Vitamin K-dependent proteins, warfarin, and vascular calcification. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(5):1504-10.

David B., Talmadge B.S., Spyropoulos A.C. Purple Toes Syndrome Associated with Warfarin Therapy in a Patient with Antiphospholipid Syndrome *Pharmacotherapy*. 2003; 23(5):674-677.

Davidson C.J., Tuddenham E.G., McVey J.H. 450 million years of hemostasis. *J Thromb Haemost*. 2003; 1(7):1487-94.

Denholm S.W., Maynard C.A., Watson H.G. Warfarin and epistaxis--a case controlled study. *J Laryngol Otol*. 1993; 107(3):195-6.

Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 1986; 89(2):271-7.

Descotes J. Principles and Methods of Immunotoxicology, Elsevier. 2004; ISBN: 9780444510938.

Dobryszczycka W. Biological functions of haptoglobin - new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1997; 35(9):647-54.

Ducy P., Desbois C., Boyce B., Pinero G., Story B., Dunstan C., Smith E., Bonadio J., Goldstein S., Gundberg C., Bradley A., Karsenty G. Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature*. 1996; 382(6590):448-52.

Eby C.S. Warfarin-induced skin necrosis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1993; 7(6):1291-300.

Edwards A.J., Price R.J., Renwick A.B., Lake B.G. Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in the in vivo rat hepatocyte DNA repair assay. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38(5):403-9.

Edwards R.L., Rickles F.R. Delayed hypersensitivity in man: effects of systemic anticoagulation. *Science*. 1978; 200(4341):541-3.

Eichbaum F.W., Slemer O., Zyngier S.B. Anti-inflammatory effect of warfarin and vitamin K1. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1979; 307(2):185-90.

Erdogan D., Kocaman O., Oflaz H., Goren T. Alveolar hemorrhage associated with warfarin therapy: a case report and literature review. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2004; 20(2):155-9.

Faria M.A. Stalin's mysterious death. *Surg Neurol Int*. 2011; 2:161.

Fasco M.J., Hildebrandt E.F., Suttie JW. Evidence that warfarin anticoagulant action involves two distinct reductase activities. *J Biol Chem*. 1982; 257(19):11210-2.

Fasco M.J., Principe L.M. Vitamin K1 hydroquinone formation catalyzed by a microsomal reductase system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1980; 97(4):1487-1492.

Ferland G. The vitamin K-dependent proteins: an update. *Nutr Rev*. 1998; 56(8):223-30.

Ferland G. Vitamin K, an emerging nutrient in brain function. *Biofactors*. 2012; 38(2):151-7.

- Ferrer J.M., Leiton M.J., Zatón A.M. The binding of benzopyranes to human serum albumin. A structure-affinity study. *J Protein Chem.* 1998; 17(2):115-9.
- Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(2):247-54.
- Fox-Robichaud A., Kubes P. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor alpha-stimulated leukocyte recruitment into the murine hepatic circulation. *Hepatology.* 2000; 31(5):1123-7.
- Fristedt B., Sterner N. Warfarin intoxication from percutaneous absorption. *Arch Environ Health.* 1965; 11(2):205-8.
- Furie B. Oral anticoagulant therapy. In: Hoffman R., Benz E.J., Shatill S.J., Furie B., Cohen J.H., Silberstein L.E., McGlave P. (Eds.), *Hematology. Basic Principle and Practice.* A Harcourt Health Science Company, Churchill Livingstone, Philadelphia. 2000; ISBN 13: 9780443079542; 2040–2046.
- Gale R.M. Transdermal warfarin system - US Patent 7323191, 2008.
- Galižasević S., Saed G.M., Diamond M.P., Abu-Soud H.M. Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100(25):14766-71.
- Geiger T., Andus T., Klapproth J., Hirano T., Kishimoto T., Heinrich P.C. Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur J Immunol.* 1988; 18(5):717-21.
- Giffen P.S., Turton J., Andrews C.M., Barrett P., Clarke C.J., Fung K.W., Munday M.R., Roma I.F., Smyth R., Walshe K., York M.J. Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol.* 2003; 77(7):392-402.
- Goldfarb W.B. Coumarin-induced intestinal obstruction. *Ann Surg.* 1965; 161:27-34.
- Goodstadt L., Ponting C.P. Vitamin K epoxide reductase: homology, active site and catalytic mechanism. *Trends Biochem Sci.* 2004; 29(6):289-92.
- Goudarzipour K., Ghazizadeh F., Hoseini Tavassol H., Behnam B. Warfarin-induced Eosinophilia in a Child with urkitt Lymphoma: A Case Report. *Iran J Pharm Res.* 2015; 14(3):887-90.
- Greaves J.H. Resistance to anticoagulant rodenticides. In Buckle A.P., Smith R.H. (Eds.), *Rodent pests and their control.* Wallingford, Oxon, *CAB International.* 1994; 197-217.
- Greenberg S. Modular components of phagocytosis. *J Leukoc Biol.* 1999; 66(5):712-7.
- Griess J.P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH: Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ber Deutsch Chem Ges.* 1879; 12:426–428.
- Gruys E., Toussaint M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2005; 6(11):1045–1056.

- Hadler M.R., Shadbolt R.S. Novel 4-hydroxycoumarin anticoagulants active against resistant rats. *Nature* 1975; 253, 275-277.
- Hall J.G., Pauli R.M., Wilson K.M. Maternal and fetal sequelae of anticoagulation during pregnancy. *Am J Med.* 1980; 68(1):122-40.
- Hallett M.B., Lloyds D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. *Immunol Today.* 1995; 16(6):264-8.
- Halliwell B., Hoult J.R., Blake D.R. Oxidants, inflammation, and anti-inflammatory drugs. *FASEB J.* 1988; 2(13):2867-73.
- Halliwell B., Clement M.V., Long L.H. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett.* 2000; 486(1):10-3.
- Han K.H., O'Neill W.C. Increased Peripheral Arterial Calcification in Patients Receiving Warfarin. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5: e002665.
- Hara K., Kobayashi M., Akiyama Y. Comparison of inhibitory effects of warfarin on gamma-carboxylation between bone and liver in rats. *J Bone Miner Metab.* 2005; 23(5):366-72.
- Harrison L., Johnston M., Massicotte M.P., Crowther M., Moffat K., Hirsh J. Comparison of 5-mg and 10-mg loading doses in initiation of warfarin therapy. *Ann Intern Med.* 1997; 126(2):133-6.
- Hauschka P.V., Lian J.B., Cole D.E., Gundberg C.M. Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989; 69(3):990-1047.
- Heinrich P.C., Castell J.V., Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 1990; 265(3):621-636.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 1993; 11(9):1026-30.
- Hirsh J., Dalen J.E., Anderson D.R., Poller L., Bussey H., Ansell J., Deykin D., Brandt J.T. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest.* 1998; 114(5 Suppl):445S-469S.
- Hirsh J., Dalen J., Anderson D.R., Poller L., Bussey H., Ansell J., Deykin D. Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest.* 2001; 119(1 Suppl):8S-21S.
- Höhler T., Schnütgen M., Helmreich-Becker I., Mayet W.J., Mayer zum Büschenfelde K.H. Drug-induced hepatitis: a rare complication of oral anticoagulants. *J Hepatol.* 1994; 21(3):447-449.
- Holbrook A.M., Pereira J.A., Labiris R., McDonald H., Douketis J.D., Crowther M., Wells P.S. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch Intern Med.* 2005; 165(10):1095-106.

- Hoult J.R., Payá M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmacol.* 1996; 27(4):713-22.
- Howe A.M., Webster W.S. Warfarin exposure and calcification of the arterial system in the rat. *Int J Exp Pathol.* 2000; 81(1): 51–56.
- Hur D.J., Raymond G.V., Kahler S.G., Riegert-Johnson D.L., Cohen B.A., Boyadjiev S.A. A novel MGP mutation in a consanguineous family: review of the clinical and molecular characteristics of Keutel syndrome. *Am J Med Genet A.* 2005; 135(1):36-40.
- Ikawa M., Stahman M.A., Link K.P. Studies on 4-Hydroxycoumarins. V. The Condensation of α,β -Unsaturated Ketones with 4-Hydroxycoumarin. *J. Am. Chem. Soc.* 1944; 66(6):902–906.
- Ishikawa T., Hirano H., Onishi Y., Sakurai A., Tarui S. Functional evaluation of ABCB1 (P-glycoprotein) polymorphisms: high-speed screening and structure-activity relationship analyses. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004; 19(1):1-14.
- Iwamoto J. Vitamin K2 therapy for postmenopausal osteoporosis. *Nutrients.* 2014; 6(5):1971–1980.
- Jacobson A. Is there a role for warfarin anymore? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012; 2012:541-6.
- Jacques C., Perdu E., Dorio C., Bacqueville D., Mavon A., Zalko D. Percutaneous absorption and metabolism of [14C]-ethoxycoumarin in a pig ear skin model. *Toxicol In Vitro.* 2010; 24(5):1426-34.
- Jaffer A., Bragg L. Practical tips for warfarin dosing and monitoring. *Cleve Clin J Med.* 2003; 70(4):361-71.
- Jain P.K., Himanshu J. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2012; 02(06):236-240.
- Jiang N.X., Ge J.W., Xian Y.Q., Huang S.Y., Li Y.S. Clinical application of a new warfarin-dosing regimen based on the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in atrial fibrillation patients. *Biomed Rep.* 2016; 4(4):453-458.
- Jo Y.M., Park T.H., Jeong I.H., Kim H.J., Ahn J.H., Kim W.J., Cho Y.R., Baek H.K., Kim M.H., Kim Y.D. Warfarin-Induced Eosinophilic Pleural Effusion. *Korean Circ J.* 2011; 41(2): 109–112.
- Jones M., McEwan P., Morgan C.L., Peters J.R., Goodfellow J., Currie C.J. Evaluation of the pattern of treatment, level of anticoagulation control, and outcome of treatment with warfarin in patients with non-valvar atrial fibrillation: a record linkage study in a large British population. *Heart.* 2005; 91(4):472-7.
- Last J.A. The Missing Link: The Story of Karl Paul Link *Toxicol. Sci.* 2002; 66(1):4-6.
- Kapoor K.G., Bekaii-Saab T. Warfarin-induced allergic interstitial nephritis and leucocytoclastic vasculitis. *Intern Med J.* 2008; 38(4):281-3.

- Kataranovski M., Kataranovski D., Zolotarevski L., Jović M. Epicutaneous exposure to anticoagulant rodenticide warfarin modulates local skin activity in rats. *Cutan Ocul Toxicol.* 2007; 26(1):1-13.
- Kataranovski M., Mirkov I., Vranković J., Kataranovski D., Subota V. Percutaneous toxicity of anticoagulant warfarin in rats. *Cutan Ocul Toxicol.* 2008; 27(1):29-40.
- Kataranovski M., Prokić V., Kataranovski D., Zolotarevski L., Majstorović I. Dermatotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant warfarin. *Toxicology.* 2005; 212(2-3):206-18.
- Kataranovski M., Vlaški M., Kataranovski D., Tošić N., Mandić-Radić S., Todorović V. Immunotoxicity of epicutaneously applied anticoagulant rodenticide warfarin evaluation by contact hypersensitivity to DNCB in rats. *Toxicology* 2003; 188:83-100.
- Kater A.P., Peppelenbosch M.P., Brandjes D.P., Lumbantobing M. Dichotomous effect of the coumadin derivative warfarin on inflammatory signal transduction. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(6):1396-7.
- Kaya B., Yildiz I., Baha R.M., Zeytun N.E.E., Yetisgen A. Case Report: Diffuse Alveolar Hemorrhage Associated with Warfarin Therapy. *Case Reports in Medicine.* 2015; Vol 2015, Article ID 350532.
- Keskin S., Gökmen I.E., Koç O., Özbek O. Unusual complication of coumadin toxicity mimicking Crohn's disease. *BMJ Case Rep.* 2014; 2014. pii: bcr2013202755.
- Khalil S.K., El-Feky G.S., El-Banna S.T., Khalil W.A. Preparation and evaluation of warfarin- β -cyclodextrin loaded chitosan nanoparticles for transdermal delivery. *Carbohydr Polym.* 2012; 90(3):1244-53.
- Klebanoff S.J., Vadas M.A., Harlan J.M., Sparks L.H., Gamble J.R., Agosti J.M., Waltersdorff A.M. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1986; 136(11):4220-5.
- Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 2005; 5(1):29-46.
- Kovac M., Rakičević Lj., Maslač A., Radojković D. Uticaj polimorfizma c.-1639G>A gena na terapijski odgovor u toku primene oralnih antikoagulanasa. *Vojnosanitetski pregl.* 2009; 66(8): 617-21.
- Kuebler W.M. Inflammatory pathways and microvascular responses in the lung. *Pharmacol Rep.* 2005; 57 Suppl:196-205.
- Kulman J.D., Harris J.E., Xie L., Davie E.W. Identification of two novel transmembrane gamma-carboxyglutamic acid proteins expressed broadly in fetal and adult tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(4):1370-5.
- Kurohara M., Yasuda H., Moriyama H., Nakayama M., Sakata M., Yamada K., Kotani R., Hara K., Yokono K., Nagata M. Low-dose warfarin functions as an immunomodulator to prevent cyclophosphamide-induced NOD diabetes. *Kobe J Med Sci.* 2008 May 23;54(1):E1-13.

Kuwahara T., Hamada M., Inoue Y., Aono S., Hiwada K. Warfarin-induced eosinophilic pleurisy. *Intern Med.* 1995; 34(8):794-6.

Lacy A., O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Curr Pharm Des.* 2004; 10(30):3797-811.

Lake B.G., Evans J.G., Lewis D.F., Price R.J. Studies on the acute effects of coumarin and some coumarin derivatives in the rat. *Food Chem Toxicol.* 1994; 32(4):357-63.

Lamb E. Top 200 prescription drugs of 2008. *Pharmacy Times.* 2009; Vol.75 No.5.

Landefeld C.S., Goldman L. Major bleeding in outpatients treated with warfarin: incidence and prediction by factors known at the start of outpatient therapy. *Am J Med.* 1989; 87(2):144-52.

Lang F., Lang K.S., Lang P.A., Huber S.M., Wieder T. Mechanisms and significance of eryptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8(7-8):1183-92.

Lee G.S.L., Choong H.L., Chiang G.S.C., Woo K.T. Three-year randomized controlled trial of dipyridamole and low-dose warfarin in patients with IgA nephropathy and renal impairment. *Nephrology.* 2010; 3(1):117 - 121.

Lee W.M. Drug-Induced Hepatotoxicity *N Engl J Med.* 2003; 349:474-485.

Lefrere J.J, Horellou M.H., Conard J., Samama M. Proposed classification of resistances to oral anticoagulant therapy. *J Clin Pathol.* 1987; 40(2): 242.

Lennox A. F., Smout J., Shlebak A., Wolfe J. H. N. Warfarin-induced Skin Necrosis: Association with Heparin-induced Thrombocytopenia and Protein S Deficiency *EJVES Extra.* 2001; 1:25–26.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(9):678-89.

Li T., Chang C.Y., Jin D.Y., Lin P.J., Khvorova A., Stafford D.W. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature.* 2004; 427(6974):541-4.

Liem L.K., Choong L.H., Woo K.T. Action of dipyridamole and warfarin on growth of human endothelial cells cultured in serum-free media. *Clin Biochem.* 2001; 34(2):141-7.

Lin G.Q., You Q.D., Cheng J.F. Chiral Drugs: Chemistry and Biological Action, John Wiley & Sons. 2011; ISBN-13:978-0-470-58720-1.

Linder M.W. Genetic mechanisms for hypersensitivity and resistance to the anticoagulant Warfarin. *Clin Chim Acta.* 2001; 308(1-2):9-15.

Louderback A., Mealey E.H., Taylor N.A. A new dye-binding technic using bromocresol purple for determination of albumin in serum. *Clin Chem.* 1968; 14:793–4.

Lund M. Anticoagulant rodenticides. In: Prakash, I. (Ed.), *Rodent Pest Management.* CRC Press, Boca Raton, FL, 1988; 341–351.

Lutomski D.M., Palascak J.E., Bower R.H. Warfarin resistance associated with intravenous lipid administration. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1987; 11(3):316-8.

MacCallum P.K., Rudnicka A.R., Rumley A., Meade T.W., Lowe G.D. Low-intensity warfarin reduces thrombin generation and fibrin turnover, but not low-grade inflammation, in men at risk of myocardial infarction. *Br J Haematol.* 2004; 127(4):448-50.

MacLaren R., Wachsman B.A., Swift D.K., Kuhl D.A. Warfarin resistance associated with intravenous lipid administration: discussion of propofol and review of the literature. *Pharmacotherapy.* 1997; 17(6):1331-7.

Maclean P.S., Tait R.C., Rumley A., McMahon A.D., Lowe G.D. Anticoagulation with warfarin downregulates inflammation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2003; 1(8): 1838–1839.

Macnicoll A.D. Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, Chapter: Resistance to 4-Hydroxycoumarin Anticoagulants in Rodents. *National Academies Press.* 1986; 87-99.

Manfioletti G., Brancolini C., Avanzi G., Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(8):4976-85.

Marder V.J., Shulman N.R. Clinical aspects of congenital factor VII deficiency. *Am J Med.* 1964; 37:182-94.

Martin-Bouyer G., Khanh N.B., Linh P.D., Hoa D.Q., Tuan L.C., Tourneau J., Barin C., Guerbois H., Binh T.V. Epidemic of haemorrhagic disease in Vietnamese infants caused by warfarin-contaminated talcs. *Lancet.* 1983; 1(8318):230-2.

Mayot G., Breuille D., Jarret A.R., Obled C., Papet I. Systemic low-grade inflammation does not decrease skeletal muscle mass and protein synthesis in old rats. *J Musculoskeletal Neuronal Interact.* 2008; 8(4):410-7.

McPherson R.A., Pincus M.R. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.* Elsevier Saunders, 2007: ISBN:978-1-4372-0974-2.

Meyer O.O. Historical data regarding the experiences with coumarin anticoagulants at the University of Wisconsin Medical School. *Circulation.* 1959; 19(1):114-7.

Miao L., Yang J., Huang C., Shen Z. Contribution of age, body weight, and CYP2C9 and VKORC1 genotype to the anticoagulant response to warfarin: proposal for a new dosing regimen in Chinese patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007; 63(12):1135-41.

Middleton M.M., Campbell P.A. Functions of purified mouse neutrophils isolated from gelatin sponges. *J Leukoc Biol.* 1989; 46(5):461-6.

Mirkov I., Popov Aleksandrov A., Demenesku J., Ninkov M., Mileusnic D., Zolotarevski L., Subota V., Kataranovski D., Kataranovski M. Intestinal toxicity of oral warfarin intake in rats. *Food Chem Toxicol.* 2016; 94:11-18.

- Misra H.P., Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1972; 247(10):3170-5.
- Monboisse J.C., Garnotel R., Randoux A., Dufer J., Borel J.P. Adhesion of human neutrophils to and activation by type-I collagen involving a beta 2 integrin. *J Leukoc Biol.* 1991; 50(4):373-80.
- Morgan M., Khan D.A. Therapeutic alternatives for chronic urticaria: an evidence-based review, Part 1. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100(5):403-11;
- Morgan M., Khan D.A. Therapeutic alternatives for chronic urticaria: an evidence-based review, Part 2. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008; 100(6):517-26;.
- Mousa S.A. Anticoagulants in thrombosis and cancer: the missing link. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2002; 2(2):227-33.
- Murray R.D.H. Coumarins. *Nat Prod Rep.* 1989; 6:591–624.
- Murshed M., Schinke T., McKee M.D., Karsenty G. Extracellular matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *J Cell Biol.* 2004; 165(5):625-30.
- Nakagawa T., Kishino S., Itoh S., Sugawara M., Miyazaki K. Differential binding of disopyramide and warfarin enantiomers to human alpha(1)-acid glycoprotein variants. *Br J Clin Pharmacol.* 2003; 56(6):664-9.
- Nakchbandi W., Müller H., Singer M.V., Löhr M., Nakchbandi I.A. Effects of low-dose warfarin and regional chemotherapy on survival in patients with pancreatic carcinoma. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41(9):1095-104.
- Nelsestuen G.L., Broderius M., Zytovicz T.H., Howard J.B. On the role of gamma-carboxyglutamic acid in calcium and phospholipid binding. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975; 65(1):233-40.
- Nielsen S.S., Grøfte T., Tygstrup N., Vilstrup H. Synthesis of acute phase proteins in rats with cirrhosis exposed to lipopolysaccharide. *Comp Hepatol.* 2006; 5:3.
- Norman M.U., Lister K.J., Yang Y.H., Issekutz A., Hickey M.J. TNF regulates leukocyte-endothelial cell interactions and microvascular dysfunction during immune complex-mediated inflammation. *Br J Pharmacol.* 2005; 144(2):265-74.
- O'Reilly R.A., Aggeler P.M., Hoag M.S., Leong L.S., Kropatkin M.L. Hereditary transmission of exceptional resistance to coumarin anticoagulant drugs. The first reported kindred. *New England J Med.* 1964; 271:809–815.
- O'Reilly R.A., Kowitz P.E. Studies On the coumarin anticoagulant drugs: interaction of human plasma albumin and warfarin sodium. *J Clin Invest.* 1967; 46:829-837.
- O'Shaughnessy D., Makris M., Lillicrap D. Practical Hemostasis and Thrombosis, Wiley-Blackwell. 2005; ISBN-13:9781405130301.

- Oez S., Platzer E., Welte K. A quantitative colorimetric method to evaluate the functional state of human polymorphonuclear leukocytes. *Blut*. 1990; 60(2):97-102.
- Oishi K., Yokoi M., Maekawa S., Sodeyama C., Shiraishi T., Kondo R., Kuriyama T., Machida K. Oxidative stress and haematological changes in immobilized rats. *Acta Physiol Scand*. 1999; 165(1):65-9.
- Ojala T. PhD Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland. 2001; 95-106.
- Oldenburg J., Marinova M., Müller-Reible C., Watzka M. The vitamin K cycle. *Vitam Horm*. 2008; 78:35-62.
- Otagiri M., Maruyama T., Imai T., Suenaga A., Imamura Y. A comparative study of the interaction of warfarin with human alpha 1-acid glycoprotein and human albumin. *J Pharm Pharmacol*. 1987; 39(6):416-20.
- Ou Yang C.M., Hsiao T.F., Chou Y.H., Chang J.S., Chen T.J. Spontaneous intramural small-bowel hematoma due to a rare complication of warfarin therapy: Report of two cases. *JACME 2014*; 4(1):45-48.
- Owens J.M., Guiney P.D., Howard P.H., Aronson D.B., Gray D.A. Indoor household pesticides: hazardous waste concern or not? *Rev Environ Contam Toxicol*. 2000; 164:27-68.
- Palareti G., Legnani C. Warfarin withdrawal. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations. *Clin Pharmacokinet*. 1996; 30(4):300-13.
- Pan E.Y., Gomperts E.D., Millen R., Gilsanz V. Bone mineral density and its association with inherited protein S deficiency. *Thromb Res*. 1990; 58(3):221-231.
- Papin F., Clarot F., Vicomte C., Gaulier J.M., Daubin C., Chapon F., Vaz E., Proust B. Lethal paradoxical cerebral vein thrombosis due to suspicious anticoagulant rodenticide intoxication with chlorophacinone. *Forensic Sci Int*. 2007; 166(2-3):85-90.
- Park B.K., Choonara I.A., Haynes B.P., Breckenridge A.M., Malia R.G., Preston F.E. Abnormal vitamin K metabolism in the presence of normal clotting factor activity in factory workers exposed to 4-hydroxycoumarins. *Br J Clin Pharmacol*. 1986; 21(3):289-93.
- Parsi K., Younger I., Gallo J. Warfarin-induced skin necrosis associated with acquired protein C deficiency. *Australasian J Dermatol*. 2003; 44:57-61
- Parslew R., Pryce D., Ashworth J., Friedmann P.S. Warfarin treatment of chronic idiopathic urticaria and angio-oedema. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30(8):1161-5.
- Perez R.L., Roman J., Staton G.W.Jr., Hunter R.L. Extravascular coagulation and fibrinolysis in murine lung inflammation induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6' dimycolate. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994; 149(2 Pt 1):510-8.
- Petersen P., Boysen G., Godtfredsen J., Andersen E.D., Andersen B. Placebo-controlled, randomised trial of warfarin and aspirin for prevention of thromboembolic complications in chronic atrial fibrillation. *The Copenhagen AFASAK study. Lancet*. 1989; 1(8631):175-9.

- Petitpas I., Bhattacharya A.A., Twine S., East M., Curry S. Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J Biol Chem.* 2001; 276(25):22804-9.
- Pirmohamed M., James S., Meakin S., Green C., Scott A.K., Walley T.J., Farrar K., Park B.K., Breckenridge A.M. Adverse drug reactions as cause of admission to hospital: prospective analysis of 18 820 patients. *BMJ.* 2004; 329(7456):15-9.
- Pirmohamed M. Warfarin: almost 60 years old and still causing problems. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 62:509–511.
- Popov A., Belij S., Subota V., Zolotarevski L., Mirkov I., Kataranovski D., Kataranovski M. Oral warfarin affects peripheral blood leukocyte IL-6 and TNF- α production in rats. *J Immunotoxicol.* 2013; 10(1):17-24.
- Popov A., Mirkov I., Zolotarevski L., Jovic M., Belij S., Kataranovski D., Kataranovski M. Local proinflammatory effects of repeated skin exposure to warfarin, an anticoagulant rodenticide in rats. *Biomed Environ Sci.* 2011; 24(2):180-9.
- Popov Aleksandrov A., Tusup M., Mirkov I., Djokic J., Ninkov M., Zolotarevski L., Kataranovski D., Kataranovski M. Proinflammatory cytokine responses in skin and epidermal cells following epicutaneous administration of anticoagulant rodenticide warfarin in rats. *Cutan Ocul Toxicol.* 2015; 34(2):149-55.
- Porter W.R. Warfarin: history, tautomerism and activity. *J Comput Aided Mol Des.* 2010; 24(6-7):553-73.
- Pozzolini M., Scarfi S., Benatti U., Giovine M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Anal Biochem.* 2003; 313(2):338-41.
- Presnell S.R., Stafford D.W. The vitamin K-dependent carboxylase. *Thromb Haemost.* 2002; 87(6):937-46.
- Price P.A. Role of vitamin-K-dependent proteins in bone metabolism. *Annu Rev Nutr.* 1988; 8:565-83.
- Price P.A., Faus S.A., Williamson M.K. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18(9):1400-7.
- Price P.A., Urist M.R., Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983; 117(3):765-71.
- Reagan-Shaw S., Nihal M., Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 2008; 22(3):659-61.
- Rifkin M.D., Pritzker H.A. Tracheobronchial cartilage calcification in children. Case reports and review of the literature. *Br J Radiol.* 1984; 57(676):293-6.
- Roderick L.M. The pathology of sweet clover disease in cattle. *J Am Vet Med Assoc.* 1929; lxxiv:314–325.

Rosenblum W.I. In vitro measurements of the effects of anticoagulants on the flow properties of blood: the relationship of these effects to red cell shrinkage. *Blood*. 1968; 31(2):234-41.

Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Pelz H.J., Lappégard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E.G., Müller C.R., Strom T.M., Oldenburg J. Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*. 2004; 427(6974):537-41.

Rost S., Pelz H.J., Menzel S., MacNicol A.D., León V., Song K.J., Jäkel T., Oldenburg J., Müller C.R. Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice--a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genet*. 2009; 10:4.

Ruggeberg S., Horn P., Li X., Vajkoczy P., Franz T. Detection of a gamma-carboxy-glutamate as novel post-translational modification of human transthyretin. *Protein Pept Lett*. 2008; 15(1):43-6.

Ryan T.J. Urticaria and fibrinolysis. *Clin Exp Dermatol*. 1977; 2(2):177-82.

Sagar J., Kumar V., Shah D.K., Bhatnagar A. Spontaneous intra-peritoneal bleeding secondary to warfarin, presenting as an acute appendicitis: a case report and review of literature. *BMC Blood Disord*. 2006; 6:7.

Samaha A.A., Hatoum H., Matar S., Zaarour F., Haddad J.J. Complicated Gastric Ulcer and Jejunal Hematoma with Concomitant Warfarin Use: Analytical and Biomedical Case Study Report. *American Journal of Medical and Biological Research*. 2013; 1(3):58-63.

Saminathan R., Bai J., Sadrolodabaee L., Karthik G.M., Singh O., Subramaniyan K., Ching C.B., Chen W.N., Chowbay B. VKORC1 pharmacogenetics and pharmacoproteomics in patients on warfarin anticoagulant therapy: transthyretin precursor as a potential biomarker. *PLoS One*. 2010; 5(12):e15064.

Scarff C.E., Baker C., Hill P., Foley P. Late-onset warfarin necrosis. *Australasian J Dermatol*. 2002; 43:202-6.

Scott M.D., Lance H. Dietary Supplements: Altered Coagulation and Effects on Bruising. *Dermatologic Surgery*. 2005; 1:819-26.

Scott S.A., Edelman L., Kornreich R., Desnick R.J. Warfarin pharmacogenetics: CYP2C9 and VKORC1 genotypes predict different sensitivity and resistance frequencies in the Ashkenazi and Sephardi Jewish populations. *Am J Hum Genet*. 2008; 82(2):495-500.

Seo J.Y., Jeon T.J., Oh T.H. Nontraumatic spontaneous intramural small bowel hematoma caused by warfarin induced over anticoagulation. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2009; 7,1,A36.

Shapiro S. Warfarin sodium derivative: (coumadin sodium); an intravenous hypoprothrombinemia-inducing agent. *Angiology*. 1953; 4(4):380-90.

Sheps S.G., Gifford R.W.Jr. Urticaria after administration of warfarin sodium. *Am J Cardiol*. 1959; 3(1):118-20.

Sherman P.A., Sander E.G. Vitamin K epoxide reductase: evidence that vitamin K dihydroquinone is a product of vitamin K epoxide reduction. *Biochem Biophys Res Commun.* 1981; 103(3):997-1005.

Singh R., Singh B., Singh S., Kumar N., Kumar S., Arora S. Umbelliferone – An antioxidant isolated from *Acacia nilotica* (L.). *Food Chemistry.* 2010; 120:645-944.

Singhal R., Brimble K.S. Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: pathophysiology and clinical management. *Thromb Res.* 2006; 118(3):397-407.

Slagboom G., Loeliger E.A. Coumarin-associated hepatitis. Report of two cases. *Arch Intern Med.* 1980; 140(8):1028-9.

Slater T.F., Sawyer B., Straeuli U. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta.* 1963; 77:383-93.

Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10(10):712-23.

Spahr J.E., Maul J.S., Rodgers G.M. Superwarfarin poisoning: a report of two cases and review of the literature. *Am J Hematol.* 2007; 82(7):656-60.

Spiewak R. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. *Ann Agric Environ Med.* 2001; 8(1):1-5.

Spiller H.A., Gallenstein G.L., Murphy M.J. Dermal absorption of a liquid diphacinone rodenticide causing coagulaopathy. *Vet Hum Toxicol.* 2003; 45(6):313-4.

Srinivasan V., Patel H., John D.G., Worsley A. Warfarin and epistaxis: should warfarin always be discontinued? *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 1997; 22(6):542-4.

Stahmann M.A., Huebner C.F., Link K.P. Studies on the Hemorrhagic Sweet Clover Disease. V. Identification and Synthesis of the Hemorrhagic Agent. *J. Biol. Chem.* 1941; 138:513–527.

Stewart A.J., Penman I.D., Cook M.K., Ludlam C.A. Warfarin-induced skin necrosis. *Postgrad Med J.* 1999; 75:233-5.

Stockert J.C., Blázquez-Castro A., Cañete M., Horobin R.W., Villanueva A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* 2012; 114(8):785-96.

Strassheim D., Asehnoune K., Park J.S., Kim J.Y., He Q., Richter D., Mitra S., Arcaroli J., Kuhn K., Abraham E. Modulation of bone marrow-derived neutrophil signaling by H₂O₂: disparate effects on kinases, NF-kappaB, and cytokine expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 286(3):C683-92.

Sullivan J.B., Levine J.R., Bangert J.L., Maibach H., Hewitt P. Clinical dermatotoxicology. In: *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*, 2nd Edition. Sullivan J.B., Krieger G.R. eds. Lippincot, Williams & Wilkins, 2001; 182–206.

Summers C., Rankin S.M., Condliffe A.M., Singh N., Peters A.M., Chilvers E.R. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010; 31(8):318-24.

Svendsen S.W., Kolstad H.A., Steesby E. Bleeding problems associated with occupational exposure to anticoagulant rodenticides. *Int Arch Occup Environ Health.* 2002; 75(7):515-7.

Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4(1):69-83.

Takahashi O. Some properties of rat platelet aggregation and effects of butylated hydroxytoluene, warfarin and aspirin. *Food Chem Toxicol.* 1991; 29(3):173-83.

Tantisattamo E., Han K.H., O'Neill W.C. Increased Vascular Calcification in Patients Receiving Warfarin. 2014; *ATVBAHA*.114.304392.

Taybi H., Capitanio M.A. Tracheobronchial calcification: an observation in three children after mitral valve replacement and warfarin sodium therapy. *Radiology.* 1990 Sep;176(3):728-30.

Teragaki M., Kawano H., Makino R., Inoue K., Sai Y., Hosono M., Suehiro S., Okamura M. A case of warfarin-induced eosinophilia. *Intern Med.* 2012; 51(12):1627-9.

Thornes R.D., Daly L., Lynch G., Breslin B., Browne H., Browne H.Y., Corrigan T., Daly P., Edwards G., Gaffney E., et al. Treatment with coumarin to prevent or delay recurrence of malignant melanoma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1994; 120 Suppl:S32-4.

Tie J.K., Jin D.Y., Straight D.L., Stafford D.W. Functional study of the vitamin K cycle in mammalian cells. *Blood.* 2011; 117(10):2967-74.

Tishkoff G.H., Hunt L.T. Unexpected molecular mimicry among peptides MHC class II, blood-clotting factor X, and HIV-1 envelope glycoprotein GP120. *Thromb Res.* 2000; 98(4):343-6.

Toth K.M., Clifford D.P., Berger E.M., White C.W., Repine J.E. Intact human erythrocytes prevent hydrogen peroxide-mediated damage to isolated perfused rat lungs and cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *J Clin Invest.* 1984; 74(1):292-295.

Tuazon S.A. and Scarpaci A.P. Prothrombin Time. *Medscape Drugs and Diseases. Medscape (WebMD Health Professional Network)* 2014;

Tummino P.J., Ferguson D., Hupe D. Competitive inhibition of HIV-1 protease by warfarin derivatives. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 201(1):290-4.

Turpie A.G.G., Gunstensen J., Hirsh J. et al. Randomized comparison of two intensity of oral anticoagulant therapy after tissue heart valve replacement. *Lancet*, 1988; 1:1242-45.

Uysal E., Çevik E., Solak S., Acar Y.A., Yalimol M. A life-threatening complication of warfarin therapy in ED: diffuse alveolar hemorrhage. *Am J Emerg Med.* 2014; 32(6):690.

Vanscheidt W., Rabe E., Naser-Hijazi B., Ramelet A.A., Partsch H., Diehm C., Schultze-Ehrenburg U., Spengel F., Wirsching M., Götz V., Schnitker J., Henneicke-von Zepelin H.H. The efficacy and safety of a coumarin-/troxerutin-combination (SB-LOT) in patients with chronic venous insufficiency: a double blind placebo-controlled randomised study. *Vasa*. 2002; 31(3):185-90.

Velasco-Velázquez M.A., Agramonte-Hevia J., Barrera D., Jiménez-Orozco A., García-Mondragón M.J., Mendoza-Patiño N., Landa A., Mandoki J. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16-F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett*. 2003; 198(2):179-86.

Veldt B.J., Haringsma J., Florijn K.W., Kuipers E.J. Coumarin-induced intramural hematoma of the duodenum: case report and review of the literature. *Scand J Gastroenterol*. 2011; 46(3):376-9.

Versteeg H.H., Heemskerk J.W., Levi M., Reitsma P.H. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev*. 2013; 93(1):327-58.

Vervoort L.M., Ronden J.E., Thijssen H.H. The potent antioxidant activity of the vitamin K cycle in microsomal lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*. 1997; 54(8):871-6.

Vitale N., De Feo M., Cotrufo M. Anticoagulation for prosthetic heart valves during pregnancy: the importance of warfarin daily dose. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002; 22(4):656;

Wallin R., Cain D., Sane D.C. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells--a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost*. 1999; 82(6):1764-7.

Wallin R., Hutson S.M., Cain D., Sweatt A., Sane D.C. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *FASEB J*. 2001; 15(13):2542-4.

Wallin R., Martin L.F. Vitamin K-dependent carboxylation and vitamin K metabolism in liver. Effects of warfarin. *J Clin Invest*. 1985; 76(5):1879-84.

Ware K., Qamri Z., Ozcan A., Satoskar A.A., Nadasdy G., Rovin B.H., Hebert L.A., Nadasdy T., Brodsky S.V. N-acetylcysteine ameliorates acute kidney injury but not glomerular hemorrhage in an animal model of warfarin-related nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 304(12):F1421-7.

Ware K.M., Vance J.C., Muni N., Hebert L.A., Satoskar A.A., Nadasdy G., Ivanov I., Nadasdy T., Rovin B.H., Brodsky S.V. Oral warfarin and the thrombin inhibitor dabigatran increase blood pressure in rats: hidden danger of anticoagulants? *Am J Hypertens*. 2015 a; 28(2):182-9.

White R.H., McKittrick T., Takakuwa J., Callahan C., McDonell M., Fihn S. Management and prognosis of life-threatening bleeding during warfarin therapy. National Consortium of Anticoagulation Clinics. *Arch Intern Med*. 1996; 156(11):1197-1201.

Whitlon D.S., Sadowski J.A., Suttie J.W. Mechanism of coumarin action: significance of vitamin K epoxide reductase inhibition. *Biochemistry*. 1978; 17(8):1371-7.

WHO, 1995. Environmental Health Criteria 175, Anticoagulant Rodenticides. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Woo C.H., Patel N., Conell C., Rao V.A., Faigeles B.S., Patel M.C., Pombra J., Akins P.T., Axelrod Y.K., Ge I.Y., Sheridan W.F., Flint A.C. Rapid Warfarin reversal in the setting of intracranial hemorrhage: a comparison of plasma, recombinant activated factor VII, and prothrombin complex concentrate. *World Neurosurg.* 2014; 81(1):110-5.

Woo K.T., Edmondson R.P., Yap H.K., Wu A.Y., Chiang G.S., Lee E.J., Pwee H.S., Lim C.H. Effects of triple therapy on the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Clin Nephrol.* 1987; 27(2):56-64.

Woo K.T., Lee G.S., Lau Y.K., Chiang G.S., Lim C.H. Effects of triple therapy in IgA nephritis: a follow-up study 5 years later. *Clin Nephrol.* 1991; 36(2):60-6.

Yanagita M., Ishii K., Ozaki H., Arai H., Nakano T., Ohashi K., Mizuno K., Kita T., Doi T. Mechanism of inhibitory effect of warfarin on mesangial cell proliferation. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10(12):2503-9.

Yourick J.J., Bronaugh R.L. Percutaneous absorption and metabolism of Coumarin in human and rat skin. *J Appl Toxicol.* 1997; 17(3):153-8.

Zielinski C.C., Hejna M. Warfarin for Cancer Prevention. *N Engl J Med.* 2000; 342:1991-1993.

Zmijewski J.W., Zhao X., Xu Z., Abraham E. Exposure to hydrogen peroxide diminishes NF-kappaB activation, IkappaB-alpha degradation, and proteasome activity in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 293(1):C255-66.

Zolotarevski L., Jovic M., Popov Aleksandrov A., Milosavljevic P., Brajuskovic G., Demenesku J., Mirkov I., Ninkov M., Kataranovski D., Kataranovski M. Skin response to epicutaneous application of anticoagulant rodenticide warfarin is characterized by differential time- and dose-dependent changes in cell activity. *Cutan Ocul Toxicol.* 2016; 35(1):41-8.

БИОГРАФИЈА

Весна Субота је рођена 6. марта 1961. године у Београду. Године 1979/1980 уписала је Природно-математички факултет Универзитета у Београду, студијска група Биологија. Дипломирала је марта 1986. године са просечном оценом 8.21. Јануара 1991. године завршила је последипломске студије на Биолошком факултету, одбранивши магистарски рад на тему „Аполипопротеини у инсулин-зависном (тип-1) и инсулин независном (тип-2) Diabetes mellitus-у“.

Од 1991. године запослена је у Институту за медицинску биохемију Војномедицинске академије. 2004. године постављена је на место начелника Одсека за хематолошку дијагностику.

У Институту за медицинску биохемију од 2010. године обавља дужност руководиоца контроле квалитета према захтевима стандарда ISO:17025. Од 2012. године члан је Републичке стручне комисије за медицинску и клиничку биохемију при Министарству здравља Србије, а 2014. године постала је водећи оцењивач за стандард ISO:15189, при Акредитационом телу Србије.

Члан је Друштва за медицинску биохемију Србије, организационог одбора Дунавске лиге за хемостазу и тромбозу и Удружења клиничке хемије и лабораторијске медицине.

Као аутор или коаутор објавила је 27 радова у часописима са SCI листе и преко 40 сажетака на скуповима националног и међународног значаја. Предавач је у програмима Континуиране медицинске едукације.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Весна Субота

број уписа _____

Изјављујем

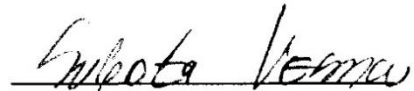
да је докторска дисертација под насловом

Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2016.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Весна Субота

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова

Ментор доц. др Јанко Пејовић и проф. др Милена Катарановски

Потписани Весна Субота

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2016.

Subota Vesna

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Имуномодулаторни ефекти антикоагуланта варфарина код пацова

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 20.06.2016.

