

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "LA SAPIENZA"**  
**Facoltà di Farmacia e Medicina**  
**Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "V. Erspamer"**  
**Anno accademico 2019-2020**

**Dottorato di Ricerca in Farmacologia e Tossicologia – XXXIII Ciclo**

**Tesi di Dottorato**

**INFLUENZA DEL MICROBIOTA INTESTINALE SU BIOMARCATORI DI EFFICACIA  
CLINICA IN PAZIENTI IN TRATTAMENTO CON FARMACI ANTICOAGULANTI**

**Candidata**  
**Dr.ssa Angela Koverech**  
**Matr. 367836**

**Relatore:**  
**Prof. Ferdinando Nicoletti**

Ai miei Genitori, punto di riferimento perenne della mia Vita,  
A mia Figlia Rita, stupore, contentezza ed eccitazione, per avermi dato Significato,  
A mio Marito per amarmi e farsi amare, per vedermi anche quando sembra che solo mi guardi,  
A Ferdinando che mi ha condotto per mano fin qui e oltre con immaginazione oltre che occhi, la  
mia gratitudine incondizionata,  
A Valeriano, Domenica, Mariangela e Valeria per “essere” e per il bene che ci vogliamo e che resta,  
vicino, sicuro e senza fretta.  
A Gian, “nel campo, oltre le idee di giusto e sbagliato”,  
A chi verra’ ed e’ li’ quieto, al di sopra di tutto, a ridere e vivere all’infinito.

## ABSTRACT

La fibrillazione atriale è una patologia frequente e associata ad elevata morbilità se non trattata efficacemente. La principale complicanza della fibrillazione atriale è lo sviluppo di eventi tromboembolici. La terapia preventiva delle complicanze tromboemboliche della fibrillazione atriale è la terapia anticoagulante orale, con farmaci antagonisti della vitamina K (TAO) e farmaci antagonisti diretti (NAO). Ampi studi osservazionali hanno dimostrato un'ampia variabilità dell'efficacia clinica di TAO e NAO. Tra i possibili fattori determinanti la variabilità inter-individuale della terapia anticoagulante orale con TAO e NAO, vanno annoverati il microbiota intestinale e le isoforme dei principali sistemi enzimatici coinvolti nel metabolismo dei farmaci (i.e., CYP450, ABCB1 e di VKORC1). Obiettivo del presente studio osservazionale, monocentrico e prospettico con follow-up di 12 mesi è stato la ricerca di possibili associazioni tra microbiota intestinale, isoforme enzimatiche, e marcatori surrogati di efficacia/sicurezza clinica della terapia anticoagulante. Pazienti con indicazione alla terapia anticoagulante sono stati arruolati nello studio, e dopo tre mesi di terapia hanno fornito un campione di feci e di sangue. L'analisi del microbiota è stata condotta con metodica 16S rRNA e sono stati misurati i livelli circolanti di metaboliti dello stesso microbiota (LPS e TMAO). Le isoforme enzimatiche sono state misurate con metodica NGS Illumina. L'efficacia clinica è stata misurata calcolando il *time in therapeutic range* (TTR) nei pazienti TAO, e dosando le concentrazioni del farmaco a picco e a valle nei pazienti NAO. Nel periodo di osservazione, sono stati studiati 103 pazienti, 51 trattati con TAO e 52 con NAO. Nei pazienti TAO, abbiamo osservato un significativo aumento di LPS nei pazienti con peggiore TTR, mentre nei pazienti NAO abbiamo osservato un aumento di TMAO al non raggiungimento delle concentrazioni di farmaco attese. Inoltre, abbiamo osservato uno specifico profilo del microbiota nei pazienti TAO e nei pazienti NAO. Infine, non sono state osservate influenze delle isoforme enzimatiche sui parametri surrogati di efficacia clinica. Il nostro studio suggerisce che il microbiota intestinale può interferire in maniera specifica e distinta sulla efficacia clinica della terapia TAO e NAO, mentre il profilo genetico degli enzimi che metabolizzano i farmaci sembra avere un ruolo minore. Ulteriori studi con più ampia casistica e prolungato periodo di osservazione potranno definire meglio le caratteristiche di queste influenze.

## INTRODUZIONE

E' in corso da decenni un progressivo aumento della età media della popolazione mondiale, associato ad un corrispondente aumento della longevità (1). Tuttavia, l'aumento della durata della vita non è accompagnato da un corrispondente aumento della durata della vita sana (i.e., *lifespan vs healthspan*)(1). Di conseguenza, la incidenza di malattie cronico-degenerative è in aumento, e le previsioni confermano questo trend anche per le prossime decadi. La strategia messa in atto per mitigare gli effetti della maggiore incidenza delle malattie cronico-degenerative sui sistemi sanitari si basa sulla attuazione di misure preventive e sull'ottimizzazione delle terapie farmacologiche attraverso lo sviluppo di nuovi farmaci e la personalizzazione dei farmaci disponibili (2-5).

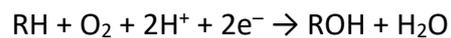
Tra le patologie croniche più frequenti dopo i 65 anni vi è l'ipertensione arteriosa, la cui storia clinica è frequentemente complicata dalla fibrillazione atriale (6). Inoltre, la fibrillazione atriale può essere non riconosciuta e diagnosticata. Recentemente, Rivezzi et al. hanno riportato una prevalenza di fibrillazione atriale sconosciuta del 5,5% in una ampia popolazione di soggetti con età  $\geq 65$ aa (7). Inoltre, la prevalenza aumentava con le classi di età, essendo del 7,5 % tra i soggetti con età  $\geq 75$ aa. Di grande interesse clinico è il riscontro che la prevalenza di fibrillazione atriale aumenta con l'aumentare del punteggio CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc, un sensibile parametro di valutazione del rischio di stroke in pazienti con fibrillazione atriale (6). Le evidenze scientifiche dunque confermano che la fibrillazione atriale rappresenta un evento clinicamente e socialmente rilevante per le sue implicazioni cliniche ed economiche.

La principale complicanza associata alla fibrillazione atriale è la comparsa di stroke cerebrale dovuto alla migrazione di emboli derivanti da trombi formati in atrio sinistro (8). Coerentemente con l'aumento della prevalenza delle malattie cronico-degenerative, esistono ormai ampie evidenze circa l'aumento di incidenza, prevalenza e mortalità della fibrillazione atriale (9).

La terapia oggi applicata per ridurre le complicanze ischemiche della fibrillazione atriale è la terapia anticoagulante, che però ha insito un rischio emorragico (10). Sono disponibili 2 classi di farmaci anticoagulanti orali: gli anticoagulanti che agiscono sui fattori della coagulazione vitamina K dipendenti, i cosiddetti farmaci della terapia orale anticoagulante (TAO), e gli anticoagulanti diretti, detti anche nuovi anticoagulanti orali (NAO). Il warfarin è il farmaco TAO più utilizzato. Tra i NAO, il dabigatran è inibitore diretto della trombina, mentre apixaban, rivaroxaban e edoxaban sono inibitori diretti del fattore Xa. Nonostante la loro efficacia clinica e sicurezza sia stata dimostrata in numerosi studi prospettici, randomizzati e controllati, esiste ancora una variabilità nella loro efficacia clinica e dunque nell'incidenza di eventi avversi. In un recente ampio studio (11), Lee S-R et al. hanno dimostrato un tasso di incidenza di stroke ischemico in pazienti in terapia con anticoagulanti orali, sia TAO che NAO, compreso tra 2 e 3 per 100 pazienti, e di emorragia maggiore compreso tra 2,65 e 3,65 per 100 pazienti.

La variabilità della efficacia clinica della terapia anticoagulante è spiegabile da una serie di fattori individuali, sia modificabili (es., *compliance* individuale o obesità) che non modificabili (es., patologie coesistenti quali il tumore). Il metabolismo dei farmaci è in gran parte dipendente dall'attività di una specifica classe enzimatica, i citocromi (12, 13). E' dunque ragionevole immaginare che le isoforme dei sistemi enzimatici coinvolti nel metabolismo dei farmaci possano spiegare almeno in parte la differente risposta individuale allo stesso farmaco (14). La famiglia del citocromo P450 (abbreviata come CYP, P450 e, molto frequentemente, CYP450) è una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutti i domini dei viventi (sono note più di 7.700 distinte macromolecole di tipo CYP), appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (o monoossigenasi). I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in grado di agire su un gran numero di differenti substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna) sia endogeni (prodotti di scarto dell'organismo)(15-17). Spesso

prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come sistemi contenenti P450. Le reazioni catalizzate dalle isoforme del citocromo P450 sono svariate. La più comune è una classica reazione da monossigenasi: il trasferimento di un atomo di ossigeno dall'ossigeno molecolare a un substrato organico, con riduzione del secondo atomo di ossigeno ad acqua:



Esempi di reazioni catalizzate dal citocromo P450 sono l'ossidazione di composti alifatici o aromatici, la formazione di epossidi e l'ossidazione di alcoli. Gli elettroni necessari alla reazione possono essere forniti dal NADPH o dal NADH attraverso altri attori proteici come la ferredossina, il citocromo b5 o la NADPH-emoproteina riduttasi, contenente FAD e FMN come gruppi prostetici. Oltre alle reazioni di eliminazione di composti esogeni, il citocromo P450 è coinvolto nella biosintesi del colesterolo e nella steroidogenesi degli ormoni steroidei (18, 19). Il citocromo P450 deriva il suo nome dal caratteristico picco di Soret di assorbimento massimo a una lunghezza d'onda di 450 nm, quando il ferro del gruppo eme si trova nello stato ridotto  $\text{Fe}^{2+}$  e legato al monossido di carbonio. A livello cellulare, negli eucarioti gli enzimi della famiglia si ritrovano principalmente legati alle membrane del reticolo endoplasmatico liscio e alla membrana mitocondriale interna tramite la regione N-terminale idrofobica, in particolare nella frazione microsomiale delle cellule epatiche. Nell'uomo sono state sinora identificati più di 63 geni codificanti per isoforme del citocromo P450, di cui 57 geni completi e 5 pseudogeni, divisi in 18 famiglie e 43 sottofamiglie, espressi nel fegato e in altri tessuti come il tratto gastrointestinale, i reni, i polmoni, la cute e il sistema nervoso centrale. Le funzioni svolte dal citocromo P450 nell'uomo sono di ossidazione ed eliminazione di sostanze endogene, come la bilirubina derivante dal metabolismo dell'emoglobina, e di sostanze esogene, come inquinanti e farmaci, ma comprendono anche la regolazione dei livelli di concentrazione degli

ormoni steroidei, come gli estrogeni e il testosterone, la biosintesi del colesterolo e il metabolismo della vitamina D. Un'ulteriore funzione svolta dal citocromo P450 a livello della barriera ematoencefalica è l'autoregolazione vascolare. Nella grande maggioranza dei casi una singola isoforma di citocromo P450 può presentare specificità multiple e catalizzare l'ossidazione di più substrati diversi, anche con differenti tipi di reazioni. La famiglia del citocromo P450 rappresenta il principale meccanismo di detossificazione dell'organismo per i farmaci, ed è una delle cause alla base della variabilità del rapporto dose/risposta in soggetti differenti che assumono lo stesso farmaco. Il differente range di risposta può infatti derivare, oltre che da fattori fisiologici come l'età, il sesso e lo stato di salute dell'individuo, da una differente velocità di metabolizzazione del principio attivo, derivante a sua volta da un polimorfismo genetico nel citocromo P450. Un più lento smaltimento della molecola farmacologicamente attiva può portare a una sua eccessiva permanenza nell'organismo, e quindi al manifestarsi di effetti collaterali dovuti al sovradosaggio, mentre un'eccessiva attività del citocromo aumenta la velocità di smaltimento del farmaco e può portare a una diminuzione del suo effetto o anche alla mancanza di effetti clinici. Lo studio genetico ha portato all'individuazione di almeno tre classi fenotipiche distinte associate a polimorfismi genetici nella famiglia del citocromo P450, ovvero i metabolizzatori lenti (PM), i metabolizzatori rapidi (EM) e i metabolizzatori ultrarapidi (UR), individuabili mediante test di fenotipizzazione o tipizzazione genetica, a seconda delle quali va calibrata la terapia farmacologica da adottare (20, 21). Di tutte le isoforme enzimatiche di citocromo P450 finora individuate, solo una piccola porzione comprendente gli enzimi CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 e CYP2E1 agisce nel metabolismo dei farmaci; fra queste l'isoforma più attiva è il CYP3A4, che costituisce circa il 30% dei citocromi P450 espressi nel fegato ed è responsabile del metabolismo del 50% dei farmaci attualmente esistenti. Nella fase I dell'eliminazione di composti xenobiotici da parte dell'organismo, i substrati della

reazione sono rappresentati principalmente da molecole lipofile in cui l'attacco di ossigeno aumenta l'idrofilicità e favorisce l'azione dei successivi enzimi detossificanti e il conseguente smaltimento.

Il microbiota intestinale, inteso come la comunità di specie batteriche risiedenti nell'intestino, è noto influenzare il metabolismo di alcuni farmaci, compresi quelli anticoagulanti (22). Inoltre, un metabolita del microbiota intestinale, trimetilamina N-ossido (TMAO) è un noto marcatore di rischio di evento cardiovascolare (23). Infine, le concentrazioni di lipopolisaccaride di origine intestinale sono associate ad un aumentato rischio di eventi cardiovascolari maggiori (24). In considerazione della possibilità di modificare il microbiota intestinale con la dieta, appare utile e rilevante investigare ulteriormente la relazione tra microbiota intestinale e efficacia clinica della terapia anticoagulante, sia TAO che NAO. Obiettivo del presente studio è dunque la ricerca di possibili associazioni tra composizione del microbiota intestinale, compresi alcuni aspetti del suo metabolismo, e efficacia/sicurezza clinica della terapia anticoagulante. Considerata la natura del presente studio, i.e., monocentrico e prospettico con follow-up di 12 mesi, l'efficacia clinica e la sicurezza della terapia anticoagulante orale è stata valutata utilizzando dei marcatori clinici e biochimici, piuttosto che la raccolta degli eventi ischemici/trombotici. In particolare, l'efficacia clinica/sicurezza della terapia con TAO è stata determinata utilizzando il *time-in-therapeutic-range* (TTR), e cioè la % di tempo nella quale il paziente è rimasto nel range terapeutico di anticoagulazione. Per i pazienti in NAO, si sono utilizzate le concentrazioni circolanti di picco e valle dei singoli farmaci, raffrontandole con i valori di riferimento presenti in letteratura.

## **MATERIALI E METODI**

### Pazienti

Il protocollo dello studio, prospettico ed osservazionale, è stato elaborato in rispetto alla Dichiarazione di Helsinki ed approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Sant'Andrea di Roma. Pazienti adulti afferenti al Centro TAO/NAO dell'Azienda Sant'Andrea (primario: prof. Maurizio Simmaco; dirigente responsabile: dr. Valeriano Soldati) per iniziare terapia anticoagulante sono stati considerati per l'inclusione nello studio. Sono stati esclusi pazienti non in grado di fornire il proprio consenso informato, pazienti obesi ( $BMI \geq 30$ ), con epatopatia cronica grave (Child-Pugh  $\geq 3$ ) e pazienti con grave insufficienza renale (i.e.,  $eGFR < 30 \text{ mL/min}$ ). In considerazione del ruolo della dieta nell'influenzare la composizione del microbiota intestinale, sono stati esclusi dallo studio i pazienti con Med Diet score estremi (i.e.,  $\geq 8$  ed  $\leq 3$ ), e sono state raccolte informazioni sugli stili di vita, in particolare sull'uso abituale di alcol e sul fumo. I pazienti venivano assegnati alla terapia con anticoagulanti TAO (i.e., warfarin o acenocumarolo) o NAO (i.e., apixaban, edoxaban, rivaroxaban) secondo valutazione clinica. Anche il dosaggio dei farmaci veniva stabilito sulla base della valutazione clinica.

### Protocollo

*Disegno dello studio e analisi biochimiche.* Dopo aver rilasciato il consenso scritto alla partecipazione allo studio, sono stati raccolti i dati clinici dei pazienti. I pazienti sono stati invitati a coinvolgere un familiare nella verifica della *compliance* al trattamento farmacologico. Inoltre, i pazienti venivano invitati a non modificare sostanzialmente il loro stile di vita nei successivi tre mesi. Nelle settimane successive, i pazienti seguivano il protocollo di controllo del centro, ed eventuali eventi avversi venivano registrati. Al controllo a 3 mesi dall'inizio della terapia anticoagulante, i pazienti arruolati nello studio e che risultavano complianti alla terapia, si presentavano con un campione di feci

emesse nella stessa giornata, raccolto secondo le indicazioni scritte ricevute nella visita iniziale, ribadite in un *recall* telefonico la sera precedente. Inoltre, per i soli pazienti in terapia con NAO, si invitava a presentarsi all'indomani senza assumere la dose mattutina del farmaco. Le feci venivano quindi immediatamente congelate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino a successiva analisi. Si procedeva quindi a prelievo ematico per il dosaggio dei livelli circolanti di LPS (ng/mL) e TMAO (ng/mL) entrambi con metodica ELISA (MyBiosource Italia, Bergamo, e BT Laboratory, Shanghai, China). Per i pazienti in trattamento con TAO, si procedeva inoltre a calcolare il TTR dei precedenti 3 mesi, utilizzando i valori di INR raccolti, e si registravano eventuali eventi avversi. Per i pazienti in trattamento con NAO, si procedeva, sul campione di sangue prelevato, al dosaggio del farmaco (valore a valle) con metodica coagulometrica con curve specifiche per farmaco e dosaggio del residuo FXa (ACL Top, Werfen, Milano; ng/mL). Quindi, si somministrava la dose mattutina del farmaco NAO e si attendevano 2 ore prima di ripetere il prelievo per il dosaggio al picco.

*Sicurezza ed efficacia clinica.* La sicurezza del farmaco TAO o NAO veniva valutata dalla presenza di eventuali eventi avversi (es., sanguinamenti, anche minimi). Nei pazienti in terapia con TAO, l'efficacia clinica è stata valutata clinicamente, i.e., raggiungimento di TTR  $>70\%$  (buon controllo), mentre TTR  $<50\%$  è stato considerato espressione di cattivo controllo (25). Nei pazienti in terapia con NAO, l'efficacia clinica è stata effettuata confrontando i livelli circolanti con gli intervalli attesi come da letteratura (Tabella 1). I pazienti in cui i livelli circolanti a picco/valle rientravano nei limiti riportati sono stati considerati aver raggiunto efficacia clinica. Eventuali eventi avversi comparsi nei 12 mesi successivi alla visita di controllo sono stati comunque annotati.

**Tabella 1** – Intervalli attesi di concentrazione (a picco e a valle) dei farmaci NAO (valori di riferimento da reff. 26-31)

<b>Farmaco</b>	<b>Obiettivo clinico</b>	<b>Concentrazione a picco (range)</b>	<b>Concentrazione a valle (range)</b>
Apixaban 5mg bid	Terapia EP/TVP	132 ng/mL (59-302)	63 ng/mL (22-177)
Apixaban 5mg bid	Prevenzione ictus	171 ng/mL (91-321)	103 ng/mL (41-230)
Edoxaban 60 mg/d	Prevenzione ictus	170 ng/mL (125-245)	36 ng/mL (19-62)
Edoxaban 60 mg/d	Terapia EP/TVP	234 ng/mL (149-317)	19 ng/mL (10-39)
Rivaroxaban 20 mg/d	Terapia EP/TVP	270 ng/mL (189-419)	26 ng/mL (6-87)

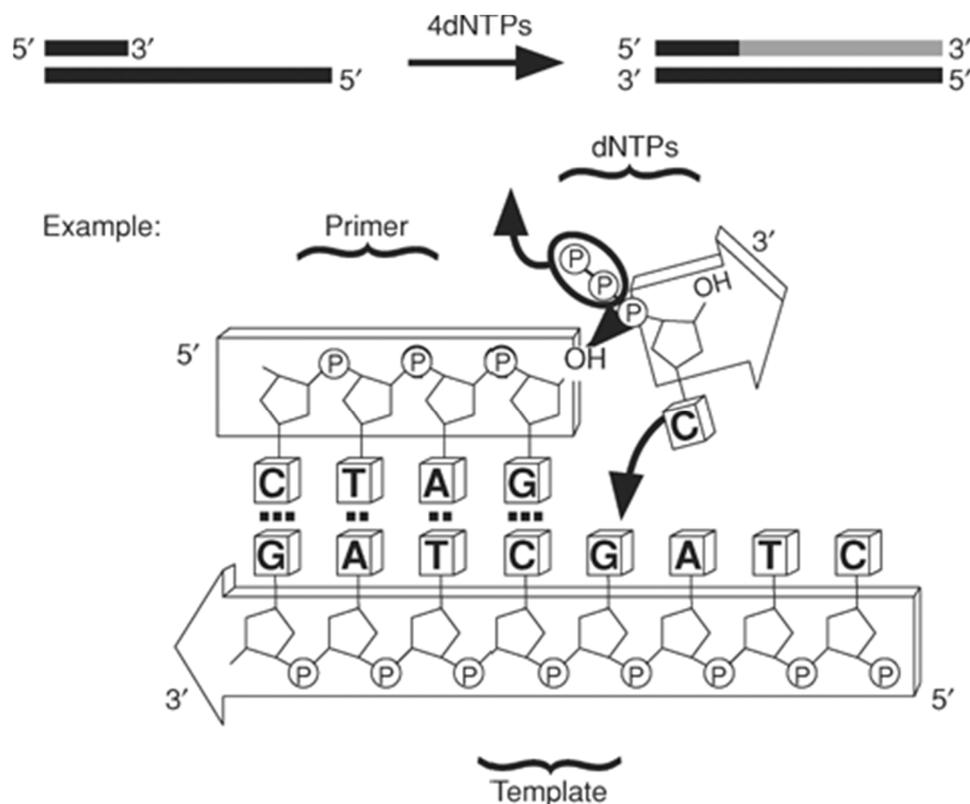
EP= embolia polmonare; TVP=trombosi venosa profonda

*Analisi del microbiota intestinale su feci.* Il sequenziamento del gene ribosomiale 16S rRNA è applicato estensivamente nella ricerca clinica allo scopo di valutare la distribuzione filogenetica del microbiota intestinale (32, 33). L'RNA ribosomiale (rRNA) è la tipologia più abbondante di RNA presente nella cellula. Non codifica direttamente le proteine, ma è il componente essenziale (circa i due terzi) dei ribosomi, macchine catalitiche che provvedono all'assemblaggio delle proteine, presenti in tutte le cellule viventi. Il ribosoma è una struttura che si auto-assembla in due subunità ripiegate (la subunità maggiore e la subunità minore) costituite dall'RNA ribosomiale, in presenza di 70-80 proteine ribosomiali, che si trovano all'esterno oppure nelle cavità presenti all'interno dell'rRNA ripiegato. Negli eucarioti, dei quattro rRNA presenti, tre (8S, 28S e 18S) sono trascritti dall'RNA polimerasi I a partire da un solo gene nella forma di un unico lungo precursore (45S) contenente due spaziatori interni, mentre il quarto (5S) è trascritto indipendentemente dall'RNA polimerasi III a partire da un secondo gene separato dal primo. Nei batteri, negli Archaea, nei mitocondri e nei cloroplasti, la subunità minore contiene l'rRNA 16S, mentre la subunità maggiore ne contiene due specie: il 5S ed il 23S. il gene 16S rRNA contiene nove regioni ipervariabili,

e le sequenze generate da differenti combinazioni di queste regioni ipervariabili consentono di distinguere differenti profili microbici.

Nel presente studio, la analisi del microbiota è stata condotta utilizzando la tecnologia Next Generation Sequencing (NGS), una tecnologia che permette di sequenziare grandi genomi in un tempo ristretto. Il NGS viene anche definito come metodo “da estensione” perché la base viene identificata durante l’aggiunta alla catena nascente. In breve potremmo riassumere il processo partendo da DNA a singolo filamento, un primer, la DNA polimerasi e singoli nucleotidi marcati. Una volta iniziata la reazione di sintesi di DNA a doppio filamento, ogni volta che la DNA polimerasi inserisce un nucleotide sulla catena in allungamento, questo viene rilevato immediatamente in quanto viene rilasciato un segnale diverso a seconda della tecnologia utilizzata, ma specifico per ognuno dei nucleotidi. In particolare, il nostro studio si è avvalso della tecnologia Ion 16S™ Metagenomics Kit (Laboratorio Genoma, Molecular Genetics Laboratories Group, Roma; responsabile, dr.ssa Marina Baldi), che utilizza due primer pools per amplificare 7 regioni ipervariabili (V2, V3, V4, V6, V7, V8 e V9) dell’rRNA 16S batterico; tale amplificazione è seguita da sequenziamento con tecnologia NGS su piattaforma Ion S5XL. L’analisi dei dati è stata effettuata mediante Ion Reporter™ Software. Solo specie batteriche con una concentrazione  $\geq 1\%$  venivano caratterizzate. La tecnologia NGS Ion è stata scelta per una serie di motivazioni, non ultima il costo ridotto rispetto alla tecnologia basata sulla fluorescenza. Ogni qual volta un nucleotide viene incorporato sul filamento in crescita viene rilasciato un protone: le variazioni di pH che avvengono all'interno nei singoli pozzetti che costituiscono il CHIP sono rilevate dallo strumento che associa ad ogni variazione l'incorporazione di un nucleotide trasformando il segnale chimico in segnale digitale (Figura 1). Poiché ogni nucleotide viene interrogato singolarmente (vale a dire che il filamento in crescita viene esposto ad un nucleotide per volta) si ha segnale solo se il nucleotide viene incorporato. Poiché questo sistema non utilizza molecole fluorescenti l'analisi è più semplice e meno

costosa non richiedendo né rivelatori di fluorescenza né elaborati sistemi di analisi. La lunghezza dei frammenti sequenziabili è variabile (200, 400 o 600 bp a seconda del quesito scientifico) e si possono analizzare più campioni in parallelo utilizzando *barcodes* specifici per ogni campione. Le analisi richiedono una quantità di materiale di partenza compreso tra 1 e 100 ng (circa 10 ng/μL) a seconda dell'applicazione. Sono disponibili chip di 4 dimensioni differenti (Ion chip 510, 520, 530 e 540) che offrono la massima flessibilità e si adattano alle diverse esigenze ed applicazioni consentendo di spaziare dai 2 agli 80 milioni di *reads* per corsa.



**Figura 1** – Principio di funzionamento della tecnologia NGS Ion S5XL

*Analisi isoforme CYP450.* L'analisi è stata condotta utilizzando la consulenza MIFAR (Metabolismo Integrato dei FARMaci) offerta dal Servizio di Diagnostica Molecolare Avanzata dell'Azienda

Ospedaliero-Universitaria Sant'Andrea di Roma (Responsabile, prof. Maurizio Simmaco). In breve, su sangue periferico, è stata eseguita estrazione del DNA e sottoposto a NGS con strumentazione Illumina, che differisce da quella precedentemente riportata per l'utilizzo di molecole fluorescenti. Sono state ricercate le seguenti isoforme di CYP450: 1A2 (\*1C; \*1F), 2C8, 2C9 (\*2; \*3), **2C19** (\*2, \*3), 3A4 (\*1B; \*22), 3A5 (\*3). Inoltre, sono state esaminate le isoforme di ABCB1 (\*rs1128503; \*rs1045642) e di VKORC1 (1639; 1673).

### Analisi Statistica.

I risultati sono presentati come Media (Errore Standard o Intervallo di Confidenza 95%), le variabili categoriche sono descritte come frequenze assolute e relative. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per paragonare variabili organizzate in tabelle di contingenza. Lo z test per il confronto di proporzioni. Il test di Mann-Whitney è stato utilizzato per il confronto di due gruppi di variabili continue, mentre per confrontare due gruppi è stata utilizzata l'analisi della varianza. Valori di  $P < 0.05$ , a due code, sono stati considerati statisticamente significativi. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software Statavers.14.2 (Stata Corp., College Station, TX, United States).

## RISULTATI

Durante il periodo di studio, tra novembre 2017 e gennaio 2019, 378 pazienti si sono presentati al centro TAO/NAO per iniziare terapia anticoagulante. Di questi, 145 non sono stati arruolati per la presenza di criteri di esclusione ed 89 pazienti per il diniego a fornire il consenso informato. Inoltre, 41 pazienti hanno ritirato il loro consenso prima di presentarsi al controllo dei 3 mesi. In totale, 103 pazienti hanno completato lo studio. In particolare, 51 pazienti sono stati arruolati nel braccio TAO e 52 pazienti sono stati arruolati nel braccio NAO. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in Tabella 2.

**Tabella 2** – Caratteristiche cliniche dei pazienti studiati

	F/M	Età (M±DS)	Indicazione (FA/TV/EP)	Farmaco	Comorbidità
Gruppo TAO (n=51)	27/24	68±14.9 anni	25/17/9	2 AC; 49 W	26 IT; 18 DM; 20 N
Gruppo NAO (n=52)	20/32	71.8±13.2 anni	32/10/10	31 AX; 19 EX; 2 RX	33 IT; 18 DM; 9N

DS: deviazione standard; FA: fibrillazione atriale; TV: trombosi venosa; EP: embolia polmonare; AC: acenocumarolo; W: warfarin; IT: ipertensione; DM: diabete mellito (e/o altre alterazioni metaboliche); N: neoplasia; AX: apixaban; EX: edoxaban; RX: rivaroxaban.

**Sicurezza.** Durante il periodo di studio e nella successiva fase di osservazione, non si sono osservati eventi avversi che hanno portato alla necessità di modificare la terapia anticoagulante in atto.

**Efficacia clinica e marcatori biochimici.** Nel gruppo TAO, 15 pazienti sono risultati in buon controllo della terapia anticoagulante come verificato dal TTR. In intermedio controllo terapeutico (TTR compreso tra 70% e 50%) sono risultati 14 pazienti, mentre 22 pazienti sono risultati in scarso controllo terapeutico (TTR <50%). Confrontando, attraverso l'analisi della varianza, i tre gruppi di TTR nelle concentrazioni di LPS e TMAO, si è messa in evidenza una differenza statisticamente

significativa tra i tre gruppi di TTR per le concentrazioni di LPS, al contrario inesistente per le concentrazioni di TMAO (Tabella 3).

**Tabella 3** – Concentrazioni di LPS e TMAO a seconda del TTR

	<b>TTR &gt;70% (n=15)</b>	<b>70%&gt;TTR&gt;50% (n=14)</b>	<b>TTR&lt;50% (n=22)</b>	<b>P</b>
LPS (ng/mL)*	470,8 (409,3 - 532,3)	488,6 (448,5 - 528,6)	547,8 (511.1 - 584.6)	0.0281
TMAO (ng/mL)*	7,3 (3,4 - 11,2)	9,9 (5,8 - 13,9)	10.1 (4,6 - 15,7)	0.6656

\* I dati sono riportati come media (intervallo di confidenza al 95%).

Nel gruppo NAO, nessun paziente trattato con rivaroxaban ha mostrato livelli circolanti di farmaco nel range atteso, né al picco ( $C_{max}$ ) né al nadir ( $C_{min}$ ). Solo 4 pazienti del gruppo trattato con edoxaban (n=19) hanno mostrato valori di  $C_{max}$  e  $C_{min}$  nel range atteso. Al contrario, 22 pazienti sui 31 trattati con apixaban hanno mostrato livelli di  $C_{max}$  e  $C_{min}$  di farmaco nell'intervallo atteso. La età media dei 2 gruppi, i.e., in range (n=26) e fuori range (n=26) è risultata statisticamente diversa ( $68.0 \pm 16.5$  anni vs  $75.5 \pm 7.3$  anni, rispettivamente;  $p=0.04$ ).

Confrontando, attraverso l'analisi della varianza, le concentrazioni di LPS e TMAO, nei tre gruppi di pazienti selezionati in base ai valori di  $C_{max}$  e  $C_{min}$  (entrambi nel range previsto, solo uno nel range previsto, e nessuno dei due nel range previsto), si è osservata una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi per le concentrazioni di TMAO, ma non per le concentrazioni di LPS. I livelli di LPS e TMAO nei tre gruppi di pazienti sono riportati nella Tabella 4.

**Tabella 4** – Concentrazioni di LPS e TMAO nei tre gruppi di pazienti selezionati in base ai valori di  $C_{max}$  e  $C_{min}$  (in range o fuori range)

	Valori di $C_{max}$ e $C_{min}$ in range (n=26)	Valori di $C_{max}$ o di $C_{min}$ in range (n=21)	Valori di $C_{max}$ e $C_{min}$ non in range (n=5)	P
LPS (ng/mL)*	486,7 (444,9 - 528,6)	467,7 (438,0 - 497,5)	504,9 (404,3 - 605,6)	0.6219
TMAO (ng/mL)*	6,5 (5,8 - 7,2)	7,0 (5,9 - 8,1)	11,6 (-3,2 - 26,4)	0.0354

\* I dati sono riportati come media (intervallo di confidenza al 95%).

Efficacia clinica e microbiota intestinale. L'analisi del microbiota intestinale è stata possibile solo in 58 pazienti dei 103 arruolati (20 pazienti TAO e 38 pazienti NAO). L'abbondanza relativa dei *phyla* batterici nei pazienti TAO e NAO è riportata in Tabella 5. Confrontando, attraverso il test di Mann-Whitney, i pazienti TAO e NAO, si è messa in evidenza una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi solo per l'abbondanza relativa (%) del *phylum* Bacteroidetes.

**Tabella 5** – Abbondanza relativa (%) dei *phyla* batterici nelle feci dei pazienti TAO e NAO

	Pazienti TAO (n=20)	Pazienti NAO (n=38)	P
<b>Bacteroidetes</b>	12.6±2.9	5.3±1.2	0.0193
<b>Firmicutes</b>	38.2±4.0	44.3±2.9	0.2352
<b>Actinobacteria</b>	9.7±2.3	10.1±1.4	0.7430
<b>Proteobacteria</b>	31.0±3.1	32.6±3.1	0.9674
<b>Altri</b>	8.3±0.5	7.7±0.4	0.4286

All'interno di ogni singolo gruppo (TAO vs NAO) è stata ricercata la presenza di un possibile profilo legato al farmaco utilizzato ed alla risposta alla terapia. Nel gruppo TAO, essendo solo 2 i pazienti in terapia con farmaco diverso dal warfarin, l'analisi dell'influenza del farmaco sulla abbondanza

relativa batterica non è stata condotta. I risultati relativi all'abbondanza batterica relativa in relazione alla risposta clinica sono riportati in Tabella 6.

**Tabella 6** – Abbondanza batterica relativa (%) nei pazienti con TTR>70%, TTR tra 50% e 70%, e TTR<50%

	TTR>70% (n=5)	70%>TTR>50% (n=4)	TTR<50% (n=11)	P
Bacteroidetes	4.6±1.4	2±1.4	20±4.1	0.0090
Firmicutes	38.0±7.2	39±3.9	38.1±6.7	0.9961
Actinobacteria	15.8±6.1	10.7±5.1	6.6±2.3	0.2474
Proteobacteria	34.0±6.9	38.7±2.5	26.9±4.4	0.3088
Altri	7.6±0.5	9.5±0.5	8.3±0.8	0.4717

Confrontando, attraverso l'analisi della varianza, i tre gruppi di TTR nella distribuzione relativa (%) dei *phyla* batterici nelle feci, si è messa in evidenza una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi di TTR solo per la distribuzione relativa (%) del *phyla* Bacteroidetes.

Nei pazienti NAO, la distribuzione batterica relativa a seconda del farmaco utilizzato e della risposta clinica è riportata nella Tabella 7. Dal momento che solo 2 pazienti nel gruppo NAO hanno ricevuto rivaroxaban, questi sono stati esclusi dalla analisi.

**Tabella 7** – Distribuzione relativa dei *phyla* batterici (%) nei pazienti che hanno ricevuto apixaban, edoxaban e nei pazienti con/senza concentrazioni di farmaco nel range atteso.

	<b>Bacteroidetes</b>	<b>Firmicutes</b>	<b>Actinobacteria</b>	<b>Proteobacteria</b>	<b>Altri</b>
apixaban (n=19)	4.6±7.2	43.7±12.9	12.4±9.2	31.2±14.1	7.9±2.5
edoxaban (n=19)	5.9±7.5	44.7±21.7	7.7±7.7	34±23.9	7.5±2.3
Farmaco in range (n=14)	5.8±8.5	41.7±14.9	13.9±9.1	29.7±18.4	8.6±1.8
Farmaco non in range (n=24)	4.9±6.7	45.7±19.6	7.8±7.7	34.3±20.1	7.2±2.5

Allo scopo di ulteriormente valutare il ruolo del microbiota intestinale nella risposta alla terapia anticoagulante, per ogni gruppo di pazienti è stato misurato il numero di diversi *phyla*/specie di batteri (Operational Taxonomic Unit, OTU) per ogni paziente. I risultati sono riportati in Tabella 8.

**Tabella 8** – Numero di diversi *phyla*/specie di batteri

	<b>OTU</b>
TAO – TTR>70%	16.6±2.5
TAO - 70%>TTR>50%	19±1.6
TAO – TTR<50%	17.3±3.2
NAO – farmaco in range	18±2.5
NAO – farmaco non in range	15.4±4.2*

\*p<0.01 vs NAO – farmaco in range

Per quel che riguarda invece abbondanza o la diversità di singole specie batteriche, la attenzione è stata rivolta ai batteri maggiormente presenti nei campioni studiati. Le relative concentrazioni di queste specie nei diversi gruppi in studio è riportata in Tabella 9 (pazienti TAO) e Tabella 10 (pazienti NAO).

**Tabella 9** – Abbondanza (%) di singole specie batteriche nei pazienti TAO.

	<b>TTR&gt;70%</b>	<b>70%&gt;TTR&gt;50%</b>	<b>TTR&lt;50%</b>
<i>Blautia</i>	5.2	3.7	1.1
<i>Coriobacteriaceae</i>	2.2	1.0	2.0
<i>Enterobacteriaceae</i>	28.8	32.7	21.9
<i>Lachnospiraceae</i>	7.2	9.2	5.5
<i>Peptostreptococcaceae</i>	2.4	3.5	0.3
<i>Ruminococcaceae</i>	2	1.7	0.6
<i>Streptococcus</i>	3.8	0.7	5.4
<i>Collinsella aerofaciens</i>	5.2	0.7	0.6
<i>Dorea longicatena</i>	1.4	1.0	0.1
<i>Eubacterium hallii</i>	1.8	2.0	0.2
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	2.2	0.5	5.1
<i>Gemmiger formicilis</i>	2.8	1.2	1.3
<i>Ruminococcus bromii</i>	2.2	1.2	0.9

**Tabella 10** – Abbondanza (%) di singole specie batteriche nei pazienti NAO.

	NAO in range	NAO non in range
<i>Blautia</i>	4.7	4.0
<i>Coriobacteriaceae</i>	5	2.1*
<i>Enterobacteriaceae</i>	21.7	30.0
<i>Lachnospiraceae</i>	9.3	10.0
<i>Peptostreptococcaceae</i>	2.6	2.5
<i>Ruminococcaceae</i>	2.7	1.6
<i>Streptococcus</i>	2.2	6.2
<i>Collinsella aerofaciens</i>	2.5	1.7
<i>Dorea longicatena</i>	1.0	0.8
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1.9	2.2
<i>Gemmiger formicilis</i>	1.6	0.9
<i>Ruminococcus bromii</i>	1.1	0.3*

\*p<0.05 vs NAO in range

Efficacia clinica e isoforme CYP450. Non sono state rilevate associazioni significative tra specifici isoforme di CYP450 e degli altri modulatori del metabolismo dei farmaci e l'efficacia clinica della terapia anticoagulante, né nei pazienti sottoposti a TAO nei pazienti sottoposti a NAO. I risultati ottenuti sono comunque presentati nelle Tabelle 11-18.

**Tabella 11** – Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con TAO.

	<b>1A2 (*C; *1F)</b>			<b>VKORC (1639; 1173)</b>				<b>2CB</b>	
	<i>G/G, C/A</i>	<i>G/G; A/A</i>	<i>G/G; C/C</i>	<i>G/A; C/T</i>	<i>G/G; C/C</i>	<i>A/A; T/T</i>	<i>G/G; C/T</i>	<i>altro</i>	<i>normale</i>
TTR>70%	47%	30%	23%	27%	37%	27%	9%	0%	100%
TTR≤70%	59%	35%	6%	38%	30%	20%	0%	12% <sup>1</sup>	100%

Note: 1) G/A; C/T=3%; G/A; C/C=3%; A/A; C/C=3%; G/A; T/T=3%

**Tabella 12** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con TAO.

	<b>3A4 (*1B; *22)</b>			<b>2C9 (*2; *3)</b>			
	<i>normale</i>	<i>A/G; C/C</i>	<i>A/A; C/T</i>	<i>normale</i>	<i>C/C; A/C</i>	<i>C/T; A/A</i>	<i>T/T; A/A</i>
TTR>70%	84%	8%	8%	70%	15%	15%	0%
TTR≤70%	84%	6%	10%	74%	6%	13%	7%

**Tabella 13** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con TAO.

	<b>3A5 (*3)</b>			<b>2C19</b>			
	<i>normale</i>	<i>A/G</i>	<i>A/A</i>	<i>ultrarapido</i>	<i>intermedio</i>	<i>norm/inter</i>	<i>Normale</i>
TTR>70%	85%	15%	0%	38%	16%	8%	38%
TTR≤70% <sup>#</sup>	87%	10%	3%	32%	23%	3%	39%

<sup>#</sup>nel gruppo TTR≤70%, 1 paziente (3% del gruppo) ha mostrato attività assente di 2C19

**Tabella 14** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con TAO.

	<b>ABCB1 (rs1128503; rs1045642)</b>					
	<i>C/T; C/T</i>	<i>C/T; C/C</i>	<i>C/C; T/T</i>	<i>C/C; C/T</i>	<i>T/T; T/T</i>	<i>C/C; C/C</i>
TTR>70%	23%	8%	8%	8%	23%	30%
TTR≤70% <sup>#</sup>	52%	3%	3%	0%	13%	23%

#nel gruppo TTR≤70%, 1 paziente (3% del gruppo) ha mostrato profilo C/T; T/T. Nello stesso gruppo, 1 paziente (3% del gruppo) ha mostrato profilo T/T; C/C

**Tabella 15** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con NAO.

	<b>1A2 (*1C; *1F)</b>			<b>VKORC (1639; 1173)</b>					<b>2C8</b>
	<i>G/G, C/A</i>	<i>G/G; A/A</i>	<i>G/G; C/C</i>	<i>G/A; C/T</i>	<i>G/G; C/C</i>	<i>A/A; T/T</i>	<i>G/G; C/T</i>	<i>altro</i>	<i>normale</i>
In range <sup>#</sup>	39%	50%	11%	33%	28%	28%	0%	11%	94%
Non in range	45%	45%	10%	45%	15%	25%	0%	15%	100%

#nel gruppo in range, 1 paziente (6% del gruppo) ha presentato profilo A/T; C/C

**Tabella 16** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con NAO.

	<b>3A4 (*1B; *22)</b>			<b>2C9 (*2; *3)</b>			
	<i>normale</i>	<i>A/G; C/C</i>	<i>A/A; C/T</i>	<i>normale</i>	<i>C/C; A/C</i>	<i>C/T; A/A</i>	<i>T/T; A/A</i>
In range	78%	6%	16%	60%	6%	28%	6%
Non in range <sup>#</sup>	74%	10%	16%	63%	21%	11%	0%

#nel gruppo non in range, 1 paziente (5% del gruppo) ha presentato profilo C/T; A/C

**Tabella 17** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con NAO.

	<b>3A5 (*3)</b>			<b>2C19</b>			
	<i>normale</i>	<i>A/G</i>	<i>A/A</i>	<i>ultrarapido</i>	<i>intermedio</i>	<i>norm/inter</i>	<i>Normale</i>
In range	94%	6%	0%	39%	22%	0%	39%
Non in range	89%	11%	0%	16%	32%	5%	47%

**Tabella 18** - Proporzione della prevalenza di specifiche isoforme nei pazienti sottoposti a terapia con NAO.

	<b>ABCB1 (rs1128503; rs1045642)</b>					
	<i>C/T; C/T</i>	<i>C/T; C/C</i>	<i>C/C; T/T</i>	<i>C/C; C/T</i>	<i>T/T; T/T</i>	<i>C/C; C/C</i>
In range <sup>#</sup>	44%	0%	0%	6%	11%	28%
Non in range	47%	0%	6%	6%	6%	35%

#nel gruppo in range, 2 pazienti (11% del gruppo) ha presentato profilo T/T; C/T

## DISCUSSIONE

Il nostro studio, per la prima volta, ha indagato in pazienti sottoposti a terapia anticoagulante il contributo specifico del microbiota intestinale e del polimorfismo genico di enzimi deputati al metabolismo dei farmaci sulla efficacia clinica della terapia anticoagulante. I risultati ottenuti dimostrano che il microbiota intestinale può interferire in maniera specifica e distinta sulla efficacia clinica della terapia TAO e NAO, mentre il profilo genetico degli enzimi che metabolizzano i farmaci sembra avere un ruolo minore.

L'efficacia clinica della terapia anticoagulante si basa sulla prevenzione della ischemia minimizzando il rischio di complicanze emorragiche. Il gold-standard per la valutazione della efficacia clinica della terapia farmacologica anticoagulante rimane dunque la registrazione degli eventi ischemici e emorragici di una determinata popolazione (34). Tale misurazione può tuttavia riuscire impossibile in popolazioni rilevanti, ma comunque limitate, o quando la durata del tempo di osservazione è limitata a pochi mesi, come nel nostro studio. Tuttavia, l'utilizzo di marcatori surrogati di efficacia clinica è confortato da adeguata evidenza scientifica. In oltre 2000 pazienti inclusi in un registro nazionale di pazienti con fibrillazione atriale non-valvolare ed in terapia con TAO, aventi un TTR medio simile a quello riportato nei nostri pazienti, si è osservato che un TTR<65% determina un maggior rischio corretto (adjusted HR) per ictus ischemico/TIA, sanguinamento maggiore, emorragia intracerebrale e morte pari a 3.07, 1.90, 2.34, e 2.11, rispettivamente (35). Similmente, la deviazione dalle concentrazioni attese di farmaci NAO aumenta il rischio di complicanze emorragiche ed ischemiche (36).

Nei pazienti inclusi nel nostro studio, abbiamo osservato un profilo del microbiota differente tra coloro che assumevano TAO e coloro che assumevano NAO. In particolare, il *phylum* Bacteroidetes è risultato più abbondante nel gruppo TAO rispetto al gruppo NAO. Tale differenza non sembra poter essere dovuta ad un bias del reclutamento, dal momento che dallo studio sono stati esclusi i pazienti

con alimentazione estrema secondo il MedDiet Score allo scopo di rendere più omogenei i gruppi. La rilevanza del *phylum* Bacteroidetes per i pazienti in TAO è stata recentemente sottolineata da Yagi et al., che in oltre 1000 pazienti in trattamento con warfarin, hanno dimostrato che l'utilizzo di fluorochinolonici o di farmaci verso cui il *Bacteroides fragilis* è sensibile porta ad un aumentato rischio di anticoagulazione eccessiva (37). L'analisi del *phylum* Bacteroidetes nei pazienti TAO con TTR in range o non in range evidenzia una sua significativamente aumentata abbondanza nei pazienti non in range. Se questo dato sembra essere in contrasto con i risultati di Yagi et al. (37), va altresì ricordato che il *phylum* è costituito da altri batteri oltre il *Bacteroides fragilis*, e soprattutto che TTR non in range può essere espressione sia di eccessiva che di insufficiente coagulazione. Infine, va ricordato che nell'analisi dei singoli batteri con abbondanza relativa >1%, non abbiamo riscontrato modificazioni significative di *Bacteroides fragilis*. Il motivo per il quale il *phylum* Bacteroidetes è meno abbondante nei pazienti trattati con NAO rispetto ai pazienti TAO non è noto. Inoltre, va ricordato che in entrambi i gruppi, l'abbondanza relativa di Bacteroidetes appare inferiore a quella normalmente osservabile nella popolazione sana, in cui si attesta intorno al 30-35% (38). La analisi dei nostri risultati permette di generare una ipotesi di lavoro per la quale lo stato di malattia, comparabile tra i due gruppi da noi studiati (i.e., fibrillazione atriale, ictus, trombosi venosa profonda), e le terapie in atto, anch'esse comparabili tra i due gruppi, determinano una riduzione dell'abbondanza relativa del *phylum* Bacteroidetes, mentre l'uso di TAO vs NAO determina un ulteriore effetto sullo stesso *phylum*.

La specificità delle terapie anticoagulanti sul microbiota intestinale dei pazienti è ulteriormente suffragata dall'analisi di due metaboliti del microbiota intestinale. Infatti, abbiamo evidenziato che nei pazienti TAO non in range si innalzano significativamente i livelli circolanti di LPS, ma non di TMAO. Al contrario, nei pazienti NAO, il non raggiungimento delle concentrazioni attese è associato ad elevati livelli di TMAO, ma non di LPS. I livelli circolanti di LPS di derivazione batterica sono

associati a stati di ipercoagulabilità, legandosi ai recettori toll-like e dunque attivando le cellule endoteliali e le piastrine, e, conseguentemente la cascata della coagulazione (39). E' pertanto possibile ipotizzare che proprio un maggiore stato di ipercoagulabilità individuale sia responsabile del basso TTR. Tuttavia, questa spiegazione è insufficiente a spiegare le differenze osservate tra pazienti TAO e NAO. Una possibile spiegazione alla differenza osservata tra pazienti TAO e NAO potrebbe derivare dagli effetti antiinfiammatori della vitamina K. Ohsaki et al. hanno dimostrato che gli effetti antiinfiammatori della vitamina K sono mediati dalla inattivazione della via di NFκB (40), e dunque è possibile ipotizzare che l'utilizzo di farmaci anti-vitamina K possa determinare una riduzione dell'effetto antiinfiammatorio di vitamina K con conseguente aumento di LPS e inefficiente anticoagulazione.

TMAO è un prodotto del metabolismo del microbiota ed è associato al rischio cardiovascolare (39). Per i criteri di esclusione adottati nel nostro studio, è improbabile che le differenze nelle concentrazioni di TMAO osservate tra pazienti TAO e NAO possano ricondursi ad una differente assunzione di carnitina con la dieta (41). E' stato recentemente dimostrato che nella superfamiglia della trimetilamina transferasi, l'enzima MtcB è presente nel batterio *Eubacterium limosum* ATCC 8486 isolato nell'intestino umano (42). MtcB catalizza la demetilazione della carnitina, impedendo così la sintesi di TMAO riducendo il substrato disponibile per gli enzimi epatici. Di conseguenza, abbondanza relativa di *Eubacterium limosum* nel microbiota intestinale potrebbe determinare una ridotta produzione di TMAO e ridurre il rischio cardiovascolare associato ad incorretti stili di vita. *Eubacterium limosum* appartiene al *phylum* Firmicutes, ma nel nostro studio non abbiamo riscontrato differenze significative per questo *phylum* tra pazienti in TAO e NAO. Inoltre, non abbiamo riscontrato maggiore abbondanza di Firmicutes né di *Eubacterium limosum* tra pazienti NAO in range e pazienti NAO non in range. La possibile spiegazione di perché nei pazienti NAO con inefficiente anticoagulazione si osservino livelli elevati di TMAO rimane pertanto elusiva. E' tuttavia

possibile ipotizzare che i NAO possano interagire con batteri diversi da *Eubacterium limosum*, e che l'interazione, in presenza di concentrazioni non in range, determini una riduzione selettiva di batteri in grado di demetilare la carnitina a norcarnitina, con conseguente aumento dei livelli di TMAO circolanti, con conseguente aumento del rischio cardiovascolare. Tuttavia il ruolo dei batteri intestinali sul rischio cardiovascolare residuo nei pazienti NAO sembra avvalorato dalla nostra osservazione di una ridotta ricchezza batterica nei soggetti non in range rispetto ai soggetti in range. Nel nostro studio, sorprendentemente, non abbiamo osservato variazioni significative del profilo genetico di isoforme di CyP450 né di altri enzimi coinvolti nel metabolismo dei farmaci associate alla efficacia clinica della terapia anticoagulante. Questo dato appare in contrasto con la letteratura esistente. Bryk et al. (43) hanno studiato 324 pazienti in terapia con antagonisti della vitamina K, i.e., warfarin o acenocumarolo. Nei 48 mesi precedenti l'arruolamento, sono state osservati episodi di sanguinamento in 80 pazienti, compresi 14 sanguinamenti maggiori. Come atteso, i pazienti con sanguinamento presentavano un più basso TTR, ed erano più frequentemente portatori della variante CYP2C9\*3 (29). Nel nostro studio, non abbiamo osservato differenze significative, forse dovute anche alla ridotta popolazione studiata rispetto a quella di Bryk et al. (43).

Anche per i pazienti in NAO, sono state osservate delle interazioni farmacologiche che suggeriscono come alcune varianti di CyP450 possano essere coinvolte nella efficacia dei farmaci. Ad esempio, varianti di CYP3A4 possono interagire con i farmaci antidepressivi e alterare la risposta anticoagulante (44). Tuttavia, va precisato che nel nostro studio i farmaci assunti dai pazienti sia NAO che TAO erano uniformemente distribuiti nei gruppi con buon controllo e con scarso controllo della coagulazione. E' dunque improbabile che la terapia contemporaneamente assunta dai nostri pazienti possa spiegare i risultati ottenuti. Infine, va ricordato che in letteratura riferimenti al ruolo di specifiche isoforme sull'efficacia dei NAO si basano principalmente sulla terapia con dabigatran, farmaco non utilizzato nel nostro studio. Gouin-Thibault et al. hanno dimostrato in volontari sani

che il genotipo di ABCB1 non influenza la farmacocinetica di dabigatran (45). Simili risultati sono stati riportati da Rosian et al. in 218 pazienti con fibrillazione atriale e trattati con dabigatran o apixaban (46). Gli autori non hanno dimostrato alcuna associazione statisticamente significativa tra il genotipo di ABCB1 ed il rischio di sanguinamento. Al contrario, Sychev et al., studiando 60 pazienti sottoposti a chirurgia del ginocchio e sottoposti a profilassi della trombosi venosa profonda con dabigatran, hanno evidenziato che il polimorfismo di ABCB1 rs1045642 contribuisce al profilo di sicurezza di dabigatran (47). In particolare, il genotipo TT è risultato associato al rischio di complicazioni emorragiche in questa selezionata popolazione. Inoltre, va segnalata una recente rassegna sistematica con metaanalisi che ha evidenziato come la  $C_{max}$  di dabigatran è più bassa nei portatori del genotipo CC di ABCB1 rs1045642 (48)

Il nostro studio ha degli evidenti punti di forza, rappresentati dalla buona numerosità, dalla analisi contemporanea della efficacia clinica e di parametri biochimici, batterici e genetici in grado di spiegare i diversi fenotipi, e dalla omogeneizzazione delle abitudini alimentari dei pazienti, quest'ultimo particolarmente importante in uno studio che vuole misurare la composizione del microbiota intestinale. Tuttavia, lo studio ha anche dei limiti. In particolare, il disegno monocentrico che non ha consentito un arruolamento più numeroso, e il limitato periodo di follow-up. Inoltre, non è stato possibile l'impatto delle isoforme di FMO3, enzima che trasforma TMA in TMAO nel tessuto epatico.

In conclusione, il nostro studio conferma un ruolo per il microbiota intestinale nella efficacia clinica della terapia anticoagulante, ed indica una possibile differente, ma specifica influenza sulla terapia con TAO e sulla terapia con NAO. Inoltre, non sembra rilevare, almeno nella popolazione studiata e limitatamente alle isoforme studiate, una influenza significativa delle isoforme degli enzimi deputati al metabolismo dei farmaci. Il nostro studio può pertanto essere considerato come un punto di inizio

per ulteriori ricerche che permettano di sviluppare una medicina personalizzata per i pazienti per cui è necessaria la terapia anticoagulante.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Kolovou G, Katsiki N, Pavlidis A, Bilianou H, Goumas G, Mikhailidis DP. Ageing mechanisms and associated lipid changes. *Curr Vasc Pharmacol*. 2014;12(5):682-9.
2. Chung WK, Erion K, Florez JC, Hattersley AT, Hivert MF, Lee CG, McCarthy MI, Nolan JJ, Norris JM, Pearson ER, Philipson L, McElvaine AT, Cefalu WT, Rich SS, Franks PW. Precision Medicine in Diabetes: A Consensus Report From the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2020 Jul;43(7):1617-1635.
3. Lenze EJ, Nicol GE, Barbour DL, Kannampallil T, Wong AWK, Piccirillo J, Drysdale AT, Sylvester CM, Haddad R, Miller JP, Low CA, Lenze SN, Freedland KE, Rodebaugh TL. Precision clinical trials: a framework for getting to precision medicine for neurobehavioural disorders. *J Psychiatry Neurosci*. 2021 Jan 4;46(1):E97-E110.
4. Kobuchi S, Ito Y. Semi-Mechanism-Based Pharmacokinetic-Toxicodynamic Model of Oxaliplatin-Induced Acute and Chronic Neuropathy. *Anticancer Res*. 2020 Dec; 40(12):6585-6597
5. Li A, Li MK, Crowther M, Vazquez SR. Drug-drug interactions with direct oral anticoagulants associated with adverse events in the real world: A systematic review. *Thromb Res*. 2020 Oct; 194:240-245.

6. Fumagalli S, Pelagalli G, Franci Montorzi R, Li KM, Chang MS, Chuang SC, Lebrun E, Fumagalli C, Ricciardi G, Ungar A, Marchionni N. Atrial fibrillation in older patients and artificial intelligence: a quantitative demonstration of a link with some of the geriatric multidimensional assessment tools- a preliminary report. *Aging Clin Exp Res*. 2020 Oct 23. doi: 10.1007/s40520-020-01723-9
7. Rivezzi F, Vio R, Bilato C, Pagliani L, Pasquetto G, Saccà S, Verlato R, Migliore F, Iliceto S, Bossone V, Bertaglia E. Screening of unknown atrial fibrillation through handheld device in the elderly. *J Geriatr Cardiol*. 2020 Aug;17(8):495-501
8. Campbell BCV, Khatri P. Stroke. *Lancet*. 2020 Jul 11;396(10244):129-142.
9. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH Jr, Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation*. 2014 Feb 25;129(8):837-47.
10. Grymonprez M, Steurbaut S, De Backer TL, Petrovic M, Lahousse L. Effectiveness and Safety of Oral Anticoagulants in Older Patients With Atrial Fibrillation: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Pharmacol*. 2020 Sep 9;11:583311.
11. Lee SR, Choi EK, Kwon S, Han KD, Jung JH, Cha MJ, Oh S, Lip GYH. Effectiveness and Safety of Contemporary Oral Anticoagulants Among Asians With Nonvalvular Atrial Fibrillation. *Stroke*. 2019 Aug;50(8):2245-2249.

12. Akamine Y, Yasui-Furukori N, Uno T. Drug-Drug Interactions of P-gp Substrates Unrelated to CYP Metabolism. *Curr Drug Metab*. 2019;20(2):124-129.
13. Wang K, Gao Q, Zhang T, Rao J, Ding L, Qiu F. Inhibition of CYP2C9 by natural products: insight into the potential risk of herb-drug interactions. *Drug Metab Rev*. 2020 May;52(2):235-257
14. Elfaki I., Mir R., Almutairi F.M., Abu Duhier F.M. Cytochrome P450: Polymorphisms and Roles in Cancer, Diabetes and Atherosclerosis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19:2057-70
15. Alzahrani AM, Rajendran P. The Multifarious Link between Cytochrome P450s and Cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 3;2020:3028387.
16. Fatunde O.A., Brown S.-A. The role of CYP450 drug metabolism in precision cardio-oncology. *Int J Mol Sci*. 2020 Jan 17; 21(2):604
17. Jarrar YB, Lee SJ. Molecular Functionality of Cytochrome P450 4 (CYP4) Genetic Polymorphisms and Their Clinical Implications. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 31;20(17):4274.
18. Yadav R, Petrunak EM, Estrada DF, Scott EE. Structural insights into the function of steroidogenic cytochrome P450 17A1. *Mol Cell Endocrinol*. 2017 Feb 5;441:68-75.
19. Neunzig J, Bernhardt R. Effect of sulfonated steroids on steroidogenic cytochrome P450-dependent steroid hydroxylases. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2018 May;179:3-7.

20. Daly AK. Are Polymorphisms in Genes Relevant to Drug Disposition Predictors of Susceptibility to Drug-Induced Liver Injury? *Pharm Res.* 2017 Aug;34(8):1564-1569.
21. Miller DB, O'Callaghan JP. Personalized medicine in major depressive disorder -- opportunities and pitfalls. *Metabolism.* 2013 Jan;62 Suppl 1(0 1):S34-9.
22. Wang L, Liu L, Liu X, Xiang M, Zhou L, Huang C, Shen Z, Miao L. The gut microbes, *Enterococcus* and *Escherichia-Shigella*, affect the responses of heart valve replacement patients to the anticoagulant warfarin. *Pharmacol Res.* 2020 Sep;159:104979.
23. Li XS, Wang Z, Cajka T, Buffa JA, Nemet I, Hurd AG, Gu X, Skye SM, Roberts AB, Wu Y, Li L, Shahen CJ, Wagner MA, Hartiala JA, Kerby RL, Romano KA, Han Y, Obeid S, Lüscher TF, Allayee H, Rey FE, DiDonato JA, Fiehn O, Tang WHW, Hazen SL. Untargeted metabolomics identifies trimethyllysine, a TMAO-producing nutrient precursor, as a predictor of incident cardiovascular disease risk. *JCI Insight.* 2018 Mar 22;3(6):e99096.
24. Pastori D, Carnevale R, Nocella C, Novo M, Santulli M, Cammisotto V, Menichelli D, Pignatelli P, Violi F. Gut-Derived Serum Lipopolysaccharide is Associated With Enhanced Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation: Effect of Adherence to Mediterranean Diet. *J Am Heart Assoc.* 2017 Jun 5;6(6):e005784.
25. Farsad BF, Abbasinazari M, Dabagh A, Bakshandeh H. Evaluation of Time in Therapeutic Range (TTR) in Patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation Receiving Treatment with Warfarin in Tehran, Iran: A Cross-Sectional Study. *J Clin Diagn Res.* 2016 Sep;10(9):FC04-FC06.

26. Testa S, Tripodi A, Legnani C, Pengo V, Abbate R, Dellanoce C, Carraro P, Salomone L, Paniccia R, Paoletti O, Poli D, Palareti G; START-Laboratory Register. Plasma levels of direct oral anticoagulants in real life patients with atrial fibrillation: Results observed in four anticoagulation clinics. *Thromb Res.* 2016 Jan;137:178-183
27. Douxfils J, Ageno W, Samama CM, Lessire S, Ten Cate H, Verhamme P, Dogné JM, Mullier F. Laboratory testing in patients treated with direct oral anticoagulants: a practical guide for clinicians. *J Thromb Haemost.* 2018 Feb;16(2):209-219.
28. Gosselin RC, Adcock DM, Bates SM, Douxfils J, Favaloro EJ, Gouin-Thibault I, Guillermo C, Kawai Y, Lindhoff-Last E, Kitchen S. International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for Laboratory Measurement of Direct Oral Anticoagulants. *Thromb Haemost.* 2018 Mar;118(3):437-450.
29. Patel JP, Byrne RA, Patel RK, Arya R. Progress in the monitoring of direct oral anticoagulant therapy. *Br J Haematol.* 2019 Mar;184(6):912-924.
30. Testa S, Dellanoce C, Paoletti O, Cancellieri E, Morandini R, Tala M, Zambelli S, Legnani C. Edoxaban plasma levels in patients with non-valvular atrial fibrillation: Inter and intra-individual variability, correlation with coagulation screening test and renal function. *Thromb Res.* 2019 Mar;175:61-67.

31. Testa S, Legnani C, Antonucci E, Paoletti O, Dellanoce C, Cosmi B, Pengo V, Poli D, Morandini R, Testa R, Tripodi A, Palareti G; Coordinator of START2-Register. Drug levels and bleeding complications in atrial fibrillation patients treated with direct oral anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2019 Jul;17(7):1064-1072.
32. Uchiyama K, Naito Y, Takagi T. Intestinal microbiome as a novel therapeutic target for local and systemic inflammation. *Pharmacol Ther.* 2019 Jul;199:164-172.
33. Contijoch EJ, Britton GJ, Yang C, Mogno I, Li Z, Ng R, Llewellyn SR, Hira S, Johnson C, Rabinowitz KM, Barkan R, Dotan I, Hirten RP, Fu SC, Luo Y, Yang N, Luong T, Labrias PR, Lira S, Peter I, Grinspan A, Clemente JC, Kosoy R, Kim-Schulze S, Qin X, Castillo A, Hurley A, Atreja A, Rogers J, Fasihuddin F, Saliq M, Nolan A, Reyes-Mercedes P, Rodriguez C, Aly S, Santa-Cruz K, Peters L, Suárez-Fariñas M, Huang R, Hao K, Zhu J, Zhang B, Losic B, Irizar H, Song WM, Di Narzo A, Wang W, Cohen BL, DiMaio C, Greenwald D, Itzkowitz S, Lucas A, Marion J, Maser E, Ungaro R, Naymagon S, Novak J, Shah B, Ullman T, Rubin P, George J, Legnani P, Telesco SE, Friedman JR, Brodmerkel C, Plevy S, Cho JH, Colombel JF, Schadt EE, Argmann C, Dubinsky M, Kasarskis A, Sands B, Faith JJ. Gut microbiota density influences host physiology and is shaped by host and microbial factors. *Elife.* 2019 Jan 22;8:e40553.
34. Trongtorsak A, Thangjui S, Kewcharoen J, Polpichai N, Yodsuwan R, Kittipibul V, Friedman HJ, Estrada AQ. Direct oral anticoagulants vs. vitamin K antagonists for left ventricular thrombus: a systematic review and meta-analysis. *Acta Cardiol.* 2021 Jan 4:1-10

35. Krittayaphong R, Chantrarat T, Rojjarekumpai R, Jittham P, Sairat P, Lip GYH. Poor Time in Therapeutic Range Control is Associated with Adverse Clinical Outcomes in Patients with Non-Valvular Atrial Fibrillation: A Report from the Nationwide COOL-AF Registry. *J Clin Med*. 2020 Jun 2;9(6):1698.
36. Bernier M, Lancrerot SL, Parassol N, Lavrut T, Viotti J, Rocher F, Drici MD. Therapeutic Drug Monitoring of Direct Oral Anticoagulants May Increase Their Benefit-Risk Ratio. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2020 Oct;76(4):472-477.
37. Yagi T, Naito T, Kato A, Hirao K, Kawakami J. Association Between the Prothrombin Time-International Normalized Ratio and Concomitant Use of Antibiotics in Warfarin Users: Focus on Type of Antibiotic and Susceptibility of *Bacteroides fragilis* to Antibiotics. *Ann Pharmacother*. 2021 Feb;55(2):157-164.
38. Ahmad A, Yang W, Chen G, Shafiq M, Javed S, Ali Zaidi SS, Shahid R, Liu C, Bokhari H. Analysis of gut microbiota of obese individuals with type 2 diabetes and healthy individuals. *PLoS One*. 2019 Dec 31;14(12):e0226372
39. Hasan RA, Koh AY, Zia A. The gut microbiome and thromboembolism. *Thromb Res*. 2020 May;189:77-87.

40. Ohsaki Y, Shirakawa H, Miura A, Giriwono PE, Sato S, Ohashi A, Iribe M, Goto T, Komai M. Vitamin K suppresses the lipopolysaccharide-induced expression of inflammatory cytokines in cultured macrophage-like cells via the inhibition of the activation of nuclear factor  $\kappa$ B through the repression of IKK $\alpha$ / $\beta$  phosphorylation. *J Nutr Biochem*. 2010 Nov;21(11):1120-6.
41. Lichota A, Gwozdziński K, Szewczyk EM. Microbial Modulation of Coagulation Disorders in Venous Thromboembolism. *J Inflamm Res*. 2020 Jul 30;13:387-400.
42. Kountz D.J., Behrman E.J., Zhang L., Krzycki J.A. MtcB, a member of the MttB superfamily from the human gut acetogen *Eubacterium limosum*, is a cobalamin-dependent carnitine demethylase. *J Biol Chem* 2020; 295:11971-81
43. Bryk AH, Wypasek E, Plens K, Awsiuk M, Undas A. Bleeding predictors in patients following venous thromboembolism treated with vitamin K antagonists: Association with increased number of single nucleotide polymorphisms. *Vascul Pharmacol*. 2018 Jul;106:22-27.
44. Spina E, Barbieri MA, Cicala G, Bruno A, de Leon J. Clinically relevant drug interactions between newer antidepressants and oral anticoagulants. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2020 Jan; 16(1):31-44.
45. Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, Siguret V, Salem JE, Narjoz C, Gaussem P, Beaune P, Funck-Brentano C, Azizi M, Mismetti P, Lorient MA. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost*. 2017 Feb;15(2):273-283.

46. Roşian AN, Iancu M, Trifa AP, Roşian ŞH, Mada C, Gocan CP, Niţă T, Istratoaie S, Boarescu PM, Buzoianu AD. An Exploratory Association Analysis of *ABCB1* rs1045642 and *ABCB1* rs4148738 with Non-Major Bleeding Risk in Atrial Fibrillation Patients Treated with Dabigatran or Apixaban. *J Pers Med*. 2020 Sep 18;10(3):133.
47. Xie Q, Xiang Q, Mu G, Ma L, Chen S, Zhou S, Hu K, Zhang Z, Cui Y, Jiang J. Effect of *ABCB1* Genotypes on the Pharmacokinetics and Clinical Outcomes of New Oral Anticoagulants: A Systematic Review and Meta-analysis. *Curr Pharm Des*. 2018;24(30):3558-3565.
48. Sychev DA, Levanov AN, Shelekhova TV, Bochkov PO, Denisenko NP, Ryzhikova KA, Mirzaev KB, Grishina EA, Gavrilov MA, Ramenskaya GV, Kozlov AV, Bogoslovsky T. The impact of *ABCB1* (rs1045642 and rs4148738) and *CES1* (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty. *Pharmgenomics Pers Med*. 2018 Jul 25;11:127-137.