

# Utjecaj polimorfizama CYP2C19 i haplotipa CYP2C na kliničke ishode terapije klopidogrelom

---

Peruško, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:094478>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Karla Peruško

Utjecaj polimorfizama *CYP2C19* i haplotipa  
*CYP2C* na kliničke ishode terapije klopidogrelom

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja medicinske biokemije  
Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Odjelu za  
farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku  
dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje  
Rogić i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Lane Ganoci.

# Sadržaj

1.	Uvod .....	1
1.1.	Farmakogenetika i farmakogenomika .....	1
1.2.	Citokrom P450.....	3
1.3.	CYP2C19.....	5
1.3.1.	Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP2C19 enzima .....	6
1.3.2.	Polimorfizmi <i>CYP2C19</i> enzima i njihov utjecaj na funkciju .....	7
1.3.3.	Učestalost polimorfizama <i>CYP2C19</i> .....	9
1.4.	Klinička važnost <i>CYP2C19</i> polimorfizama.....	11
1.4.1.	Klopidogrel.....	11
1.4.2.	Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI).....	17
1.4.3.	Inhibitori protonske pumpe (eng. <i>Proton Pump Inhibitors</i> , IPP).....	18
1.4.4.	Vorikonazol .....	19
2.	Obrazloženje teme .....	21
3.	Materijali i metode.....	22
3.1.	Izdvajanje DNA metodom QIAamp.....	22
3.2.	Mjerenje koncentracije i čistoće DNA .....	24
3.3.	Genotipizacija <i>CYP2C19</i> .....	25
3.3.1.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu .....	25
3.3.2.	Genotipizacija rs2860840 i rs11188059 .....	27
3.3.3.	Statistička analiza .....	33
4.	Rezultati.....	34
4.1.	Distribucija genotipova i nuspojava .....	34
5.	Rasprava .....	38
6.	Zaključak .....	43

7.	Popis kratica, oznaka i simbola .....	44
8.	Literatura .....	46
9.	Sažetak.....	56
9.	Summary.....	57
10.	Prilog .....	58
10.1.	Popis slika.....	58
10.2.	Popis tablica.....	59
11.	Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card .....	60

# 1. Uvod

Prema Cacabelos i sur. (2019), nuspojave (eng. *adverse drug reactions*), odnosno neželjene reakcije na lijek, javljaju se u čak 30-60 % izdanih lijekova. Nuspojave lijekova jedan su od većih problema zdravstvenih sustava. Smatra se, primjerice, da krivo propisivanje terapije antidepressivima može povećati stopu samoubojstva (Roden et al., 2019). Varijabilnost terapijskog odgovora ovisi o intra- i interindividualnim čimbenicima. Intraindividualni čimbenici potječu iz raznih fiziološko-patoloških i okolišnih uzročnika (Krämer & Testa, 2009). Uz same kliničke čimbenike, kao što su dob, spol, funkcija jetre i bubrega te popratne bolesti, postoje još mnogobrojni okolišni čimbenici koji mogu imati utjecaj na farmakoterapiju i učinak lijeka, poput prehrane, pušenja i konzumacije alkohola (Božina et al., 2019). Za razliku od intra-, interindividualni čimbenici se razlikuju između pojedinaca, ali se ne mijenjaju kroz životni period. Upravo ti čimbenici su određeni genetičkim kodom (Krämer & Testa, 2009). Više od 60 % ADR-a povezano je s varijabilnošću farmakokinetike i farmakodinamike lijeka, a za 80 % ove varijabilnosti odgovorna je upravo farmakogenomika (Cacabelos et al., 2019).

## 1.1. Farmakogenetika i farmakogenomika

Farmakogenomika proučava odnos genetičkih varijacija DNA i RNA i odgovora na lijek. Odnosno, proučava utjecaje više gena i cijelog genoma na nuspojave nekog lijeka. Uz farmakogenomiku, razlikujemo i farmakogenetiku koja proučava varijaciju u sekvenci DNA određenog gena s odgovorom na lijek (Roden et al., 2019). Ovi pojmovi se povezuju s širim područjem personalizirane medicine. Njihova je zadaća pomoći prilagoditi farmakoterapiju ovisno o genetičkoj predispoziciji te time povećati učinkovitost i minimalizirati štetnost. Sam učinak gena može se vidjeti prilikom utjecaja na farmakokinetiku ili farmakodinamiku lijeka. Farmakokinetika je definirana varijabilnošću u procesima koji utječu na raspodjelu i uklanjanje lijeka i njegovih metabolita. Skraćenica ADME obuhvaća farmakokinetičke procese apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije lijeka i metabolita iz organizma (Grogan & Preuss, 2024). Genetička varijabilnost ovih procesa može se uočiti na dva primjera. Ukoliko je u organizam unesen prolijek, da bi mogao imati terapijski učinak, se

mora pretvoriti u aktivni oblik jer prolijek kao takav je ustvari inaktivna supstanca. Biološka aktivacija ovakvih lijekova provodi se pomoću metaboličkih enzima. Ukoliko je došlo do mutacije enzima koji sudjeluje u aktivaciji lijeka i time do gubitka njegove funkcije, dolazi do nakupljanja prolijeka zbog njegove nedovoljne aktivacije, i samim time lijek nema odgovarajući terapijski učinak. Primjer ovakvog gubitka funkcije su enzim CYP2C19 i njegov supstrat, prolijek klopido­grel, koji će se detaljnije obraditi u ovom radu. Osim gubitka, može doći i do povećanja funkcije enzima. Obje mogućnosti važne su ukoliko lijek ima usku terapijsku širinu te samo mala promjena doze može rezultirati opasnim nuspojavama (Roden et al., 2019). Dok farmakokinetika obuhvaća učinak organizma na lijek, farmakodinamika podrazumijeva učinak lijeka na organizam. Ciljna mjesta djelovanja lijekova su najčešće receptori, ionski kanali, enzimi, no njihovi polimorfizmi još nisu toliko istraženi kao što su komponente farmakokinetike. Ono što čini problem pri proučavanju varijacija u farmakodinamici je, primjerice, činjenica da još nije potpuno jasno kako većina lijekova točno djeluje (Pirmohamed, 2014).

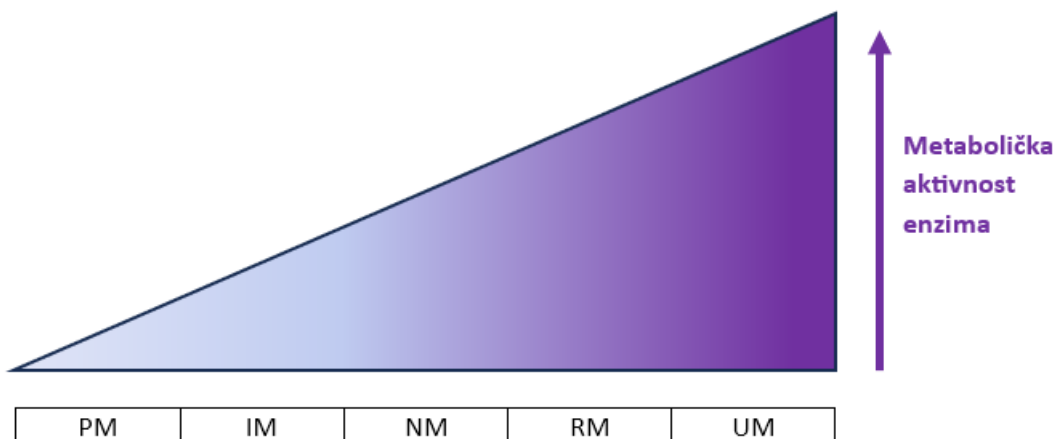
Razvijanjem farmakogenetičkih testiranja, došlo je do potrebe za standardizacijom nomenklature farmakogenetičkih varijanata kako bi se olakšala interpretacija nalaza. Tako se uvela nomenklatura označavanja zvjezdicom (eng. *star allele nomenclature*) kojom se označuju varijante u genima koje su odgovorne za varijabilnost u odgovoru na lijek. Označavanje zvjezdicom se koristi tako da svaki alel (jedan majčin i jedan očev) predstavlja specifičnu varijaciju unutar lokusa, tj. predstavlja polimorfizam jednog nukleotida (eng. *single nucleotide polymorphism*, SNP) (Božina et al., 2019). No, kako se broj varijanti i razumijevanje njihovog utjecaja povećava, pokušava se zamijeniti postojeća nomenklatura s konvencionalnom oznakom rs, odnosno referentni SNP broj (Roden et al., 2019).

Diplo­tipovima nazivamo parove alela koje onda karakteriziramo u fenotipove. Prema aktivnosti enzima fenotipove dijelimo na:

- slabi/spori metabolizator (eng. *poor metabolizer*, PM)
- srednje brzi metabolizator (eng. *intermediate metabolizer*, IM)
- brzi metabolizator (eng. *extensive metabolizer*, EM) i
- vrlo brzi metabolizator (eng. *ultra rapid metabolizer*, UM) (Caudle et al., 2017)

Izraz za funkcionalnost metaboličkih enzima "spori metabolizator" definirana je kombinacijom alela bez funkcije i/ili alela sa smanjenom funkcijom. Za razliku od sporog

metabolizatora, vrlo brzi metabolizator predstavlja prisustvo dva alela s povećanom funkcijom ili više od dva alela s normalnom funkcijom (Slika 1) (Božina et al., 2019).



**Slika 1.** Vizualna interpretativna ljestvica metaboličke aktivnosti enzima temeljena na genotipu i povezanim fenotipovima. PM – spori metabolizator (eng. *poor metabolizer*), IM – intermedijarni metabolizator (eng. *intermediate metabolizer*), NM – normalni metabolizator (eng. *normal metabolizer*), RM – brzi metabolizator (eng. *rapid metabolizer*), UM – vrlo brzi metabolizator (eng. *ultra rapid metabolizer*)

Sama svrha metaboliziranja lijeka je njegovo prevođenje u hidrofilniji oblik, odnosno oblik koji će se moći eliminirati iz organizma. Takve procese dijelimo u dvije faze biotransformacije: reakcije prve faze kojima se lijek prevodi u polarniji metabolit kako bi se mogao izlučiti iz organizma i reakcije druge faze kojima nastaju polarniji konjugati. Reakcije prve faze obuhvaćaju primjerice oksidaciju, redukciju i hidrolizu, a u drugoj fazi najčešće se provode glukuronidacije, sulfatacije i dr. Sve ove reakcije odvijaju se putem odgovarajućih enzima. Ovisno o svojstvima, ksenobiotik može podleći samo reakciji I ili II faze. Stoga, faza II biotransformacije ne slijedi nužno fazu I (Meyer, 1996).

## 1.2. Citokrom P450

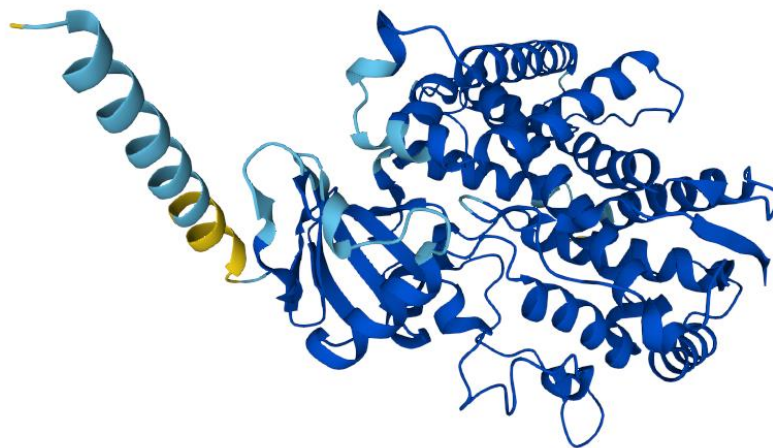
Sustav citokroma P450, tj. CYP enzima, najzastupljenija su superporodica enzima oksidoredukcijske faze metabolizma, a smješteni su u različitim tkivima i organima. Najviše



ih nalazimo u hepatocitima, unutar endoplazmatskog retikuluma, a neke i u mitohondrijima. Klasificiraju se prema sličnosti u poretku aminokiselina. Ukoliko imaju  $\geq 40\%$  sličnosti, spadaju u istu porodicu, a ukoliko je homologija aminokiselinskog slijeda  $\geq 55\%$ , smatra se da su članovi iste potporodice CYP enzima. Enzimi citokroma P450 koji imaju  $\geq 98\%$  homologije nazivaju se izoenzimi. Postoji više od 70 porodica ovih enzima, a u ljudskom organizmu otkriveno je njih 18, odnosno čak 57 enzima. Iako različiti po aminokiselinskom slijedu, ovi enzimi dijele neke zajedničke karakteristike. Ove monooksigenaze su po građi hem-tiolatni enzimi, molekulske mase  $\sim 57$  kDa, s više od 500 aminokiselinskih ostataka. Hemski dio enzima se sastoji od protoporfirina IX sa željezom u sredini. Željezo, kao metalni ion, najčešće u fero obliku ( $\text{Fe}^{2+}$ ), služi za oksidaciju ksenobiotske molekule (Testa & Krämer, 2007). Iako ih se više proučava zbog utjecaja na ksenobiotike, CYP450 enzimi imaju ulogu i u biosintezi endogenih spojeva poput vitamina, žučnih kiselina i steroidnih hormona (Guengerich et al., 2019). Za metaboliziranje lijekova i ksenobiotika u čovjeka, najvažnije porodice su CYP 1, 2 i 3, posebice enzimi 1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 i 3A5 (Testa & Krämer, 2007). Postoji puno faktora koji utječu na ekspresiju i funkciju ovih enzima. Monogeni polimorfizmi objašnjavaju veći dio varijabilnosti samo za nekolicinu enzima. Ostatak enzima je multifaktorijalno kontroliran. Pod time se obuhvaća primjerice, dodatni polimorfizmi u regulacijskim transgenima, ali i negenski čimbenici kao što su spol, dob, hormonalni i dnevni utjecaji i bolest. Vrijedi spomenuti primjer epigenetičke promjene, odnosno utjecaja okoliša na metilaciju gena *CYP1A1*. Naime, istraživanja su pokazala kako je promotor metilacije *CYP1A1* u ljudskim plućima bio najniže izražen u pušača, dok je u nepušača bio najviši (Hung et al., 2003). Za farmakogenetiku, od interesa proučavanja su genetički polimorfizmi koji dovode do pojačane ili smanjene funkcije enzima. Polimorfizmi koji dovode do smanjenja funkcije CYP enzima najviše utječu na ekspresiju i izrezivanje (eng. *splicing*), a manje na transkripciju i strukturu proteina. Za razliku od njih, promjene koje dovode do pojačane funkcije uključuju i varijante u broju kopija (eng. *copy number variants*, CNV) s povećanim brojem kopija funkcionalnih gena. Nekolicina polimorfizama jasno utječe na izbor supstrata i inducibilnost metaboličkih puteva (Zanger & Schwab, 2013.).

### 1.3. CYP2C19

CYP2C19 enzim spada u porodicu CYP2, koja je karakterizirana s 16 gena, od kojih svaki ima 9 eksona i 8 introna. Potporodica CYP2C sastoji se od jako homolognih gena *CYP2C18-CYP2C19-CYP2C9-CYP2C8* koji su u navedenom poretku i lokalizirani u klasteru gena od otprilike 390kb na kromosomu 10q23.3 (Zanger & Schwab, 2013). Gen *CYP2C19* najduži je gen ovog klastera s čak 93.9 kb te kodira istoimeni protein veličine 490 aminokiselina (Botton et al., 2021). Struktura ovog enzima prikazana je na slici 2.



**Slika 2.** Struktura CYP2C19 enzima predviđena Alphaold sistemom (preuzeto <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P33261/entry> uz dopuštenje izdavača)

Primarno je eksprimiran u jetri, točnije na endoplazmatskom retikulumu hepatocita. Supstrati ovog enzima karakterizirani su kao neutralni ili slabo bazični, umjereno lipofilni, sa dvije ili tri vodikove veze koje mogu biti donorske ili akceptorske (Testa & Krämer, 2007). To su prije svega mnogi ksenobiotici, točnije lijekovi. Najpoznatiji lijekovi koji podliježu metabolizmu putem CYP2C19 su inhibitori protonske pumpe (IPP), selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI), klopidogrel i vorikonazol. No, osim njih, ovaj enzim metabolizira i neke endogene tvari poput steroidnih hormona, kortizola, testosterona i progesterona te melatonina (Strumila et al., 2021).

### 1.3.1. Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP2C19 enzima

Kao što je prije spomenuto, postoje mnogi egzogeni i endogeni faktori koji utječu na aktivnost samog enzima. Fenokonverzija je pojam koji se odnosi na neusklađenost između genetički predviđenog fenotipa i promatranog fenotipa zbog prisutnosti inhibitora ili induktora enzima (Bousman et al., 2023). Tako se pokazalo da je aktivnost CYP2C19 enzima inducirana ligandima nuklearnih receptorskih putova PXR/CAR, glukokortikoida (GR) i vitamina D (VDR) kroz različite elemente odgovora u njihovim 5'-kraju. Naime, aktivacija transkripcije većine CYP450 enzima posredovana je nuklearnim receptorima koji reagiraju na ksenobiotike. Nuklearni receptori PXR i CAR imaju dvije domene, DNA veznu domenu i ligand veznu domenu. Nakon izlaganja ksenobioticima, ovi receptori se aktiviraju, vežu se za odgovarajuće elemente uz regrutaciju koaktivatora te tako utječu na strukturu kromatina i transkripciju gena. Lijekovi koji se vežu na ove nuklearne receptore su primjerice rifampicin, fenobarbital i deksametazon (Chen & Goldstein, 2009). Također, lijekovi flukonazol i fluoksetin su inhibitori CYP2C19, dok su rifampin i efavirenz njegovi induktori. Ovo je ponajviše od značaja za osobe koji uzimaju više lijekova, a to su najčešće osobe starije životne dobi. Pokazalo se da i upalni procesi u organizmu mijenjaju aktivnost CYP2C19 enzima. Kronična upala kod osoba koje boluju od dijabetesa tipa 2 umanjuje aktivnost ovog enzima za čak 46 % . Ostale bolesti poput različitih bolesti jetre također mogu smanjiti enzimsku aktivnost, vjerojatno zbog smanjenog protoka krvi kroz jetra, promjene građe jetre ili gubitka same funkcije jetre. Pokazano je da bolesti jetre različito smanjuju aktivnost enzima. Aktivnost CYP2C19 manja je od primjerice enzima koji sudjeluju u metabolizmu R-mefenitoina te također ovisi o ozbiljnosti bolesti (Adedoyin et al., 1998). Aktivnost mu također ovisi o dobi. Najmanja aktivnost je u fetusa i pedijatrijske populacije, ali već oko desete godine života postiže vrijednost koju nalazimo u odrasle populacije. Također, trenutno još nema dokaza kako aktivnost ovog enzima ovisi o spolu (Botton et al., 2021). Općenito, spol utječe na farmakokinetiku zbog razlike u masi, distribuciji masti, protoku krvi kroz jetru i ekspresiji enzima. U velikoj studiji koju su proveli Zhang i sur. (2011) razmatrana je razlika u ekspresiji gena u jetri s obzirom na spol. Korišteno je 112 ženskih uzoraka jetra i 112 muških, te nisu pronađene razlike u ekspresiji CYP2C19 enzima s obzirom na spol. Ipak, u studiji koju su proveli Hagg i sur. (2001) pokazano je kako oralni kontraceptivi značajno smanjuju aktivnost CYP2C19. Postoji i mogućnost da se njegova aktivnost smanjuje i u trudnoći (Tasnif et al., 2016). Osim lijekova, postoje i različite

egzogene tvari koje mogu utjecati na aktivnost ovog enzima. Gospina trava poznata je u narodnoj medicini kao lijek za blagi do umjereni oblik depresije. Hiperforin je sastojak gospine trave koji inducira metaboličke enzime CYP3A4, CYP2C9 i također CYP2C19. Posebno je opasna kombinacija gospine trave i antidepresiva skupine inhibitora ponovne pohrane serotonina. Takva kombinacija može rezultirati serotoninским sindromom, stanjem prevelike koncentracije serotonina koji uzrokuje teške kognitivne simptome poput halucinacija, glavobolje i kome, te somatske i autonomne nuspojave poput trzaja mišića i ubrzanog srčanoga ritma (Cvek, 2011).

### 1.3.2. Polimorfizmi CYP2C19 enzima i njihov utjecaj na funkciju

„Polimorfizam“ se definira kao genetička varijanta koja dovodi do najmanje dva nerijetka fenotipa s učestalošću od 1 % ili većom u populaciji. Kada je varijanta u genu koji kodira proteine uključene u apsorpciju, distribuciju, metabolizam ili izlučivanje lijeka (eng. ADME), radi se o farmakokinetičkom polimorfizmu (Martínez et al., 2021). Prema bazi podataka farmakogenetičkih varijanti PharmVar, postoji čak više od 39 star alela CYP2C19. Prema funkciji osobe dijelimo u pet fenotipskih skupina: slabi (eng. *poor*, PM), intermedijarni (eng. *intermediate*, IM), normalni (eng. *normal*, NM), brzi (eng. *rapid*, RM) i vrlo brzi metabolizatori (eng. *ultra rapid*, UM). Spori metabolizatori CYP2C19 enzima karakterizirani su sljedećim polimorfizmima: rs4244285 (c.681G>A) polimorfizam koji definira CYP2C19\*2 alel, rs4986893 (c.636G>A) kao CYP2C19\*3 alel. CYP2C19\*2 najčešći je alel koji dovodi do gubitka funkcije CYP2C19 enzima, a gubitak funkcije nastaje tako što dolazi do zamjene G>A na eksonu 5 te stvaranja aberantnog mjesta spajanja. Time dolazi do mijenjanja okvira čitanja mRNA i stvaranja nefunkcionalnog proteina. Kod CYP2C19\*3 dolazi do zamjene G>A na eksonu 4 i dolazi do prerane terminacije kodona koji kodira aminokiselinu na položaju 212. Postoje i druge varijante polimorfizama na drugim alelima koje uzrokuju smanjenu funkciju, no nisu toliko česte, a ti aleli su: CYP2C19\*4 (rs28399504), \*5 (rs56337013), \*6 (rs72552267), \*7 (rs72558186), i \*8 (rs41291556). Polimorfizam koji dovodi do povećane enzimске aktivnosti je rs12248560 (c. –806C>T) koji se nalazi na alelu CYP2C19\*17. Ova zamjena citozina za timin u promotoru dovodi do stvaranja mjesta vezanja za GATA transkripcijski faktor što u konačnici dovodi do pojačane ekspresije i aktivnosti enzima (Scott et al., 2012). Uzimajući u obzir da pojedinac ima dva haplotipa CYP2C19 enzima, jedan na svakom kromosomu, za identifikaciju funkcijske klasifikacije gleda se diplo-tip, dakle gledaju se SNP-ovi na oba

kromosoma. Normalni metabolizator prezentira se diplotipom s alelima  $*1/*1$ , dok se intermedijarni metabolizator prezentira s diplotipovima  $*1/*2$ ,  $*1/*3$ . Spori metabolizatori imaju kombinaciju alela  $*2/*2$ ,  $*2/*3$ ,  $*3/*3$ , brzi metabolizatori  $*1/*17$ , a vrlo brzi  $*17/*17$ . Pokazano je također i da alel s pojačanom funkcijom,  $*17$ , ne kompenzira nedostatak drugog nefunkcionalnog alela, primjerice  $*2$  i zbog toga diplotipovi koji sadrže jedan alel s pojačanom funkcijom i jedan nefunkcionalni alel spadaju u intermedijarne metabolizatore (Lee et al., 2022). U tablici 1. možemo vidjeti fenotipove, kojem genotipu pripadaju te njihovu enzimsku aktivnost (Sienkiewicz-Oleszkiewicz & Wiela-Hojeńska, 2018). Treba također imati na umu da razne komedikacije također mogu imati utjecaj na metabolizam koji ne mora biti jednako izražen kod određenih varijanta (Botton et al., 2021).

**Tablica 1.** CYP2C19 odnos diplotipa sa fenotipom (preuzeto i prilagođeno od Sienkiewicz-Oleszkiewicz & Wiela-Hojeńska, 2018)

FENOTIP	GENOTIP	PRIMJERI DIPLOTIPOVA/ALELA	ENZIMATSKA AKTIVNOST
<b>NORMALNI METABOLIZATOR</b>	Kombinacija alela normalne funkcije	$*1/*1$	Potpuna- normalna
<b>INTERMEDIJARNI METABOLIZATOR</b>	Kombinacija alela normalne, smanjene ili alela bez funkcije	$*1/*2$ , $*1/*3$ , $*2/*17$ , $*3/*17$	Intermedijarna (aktivnost između normalnog i slabog metabolizatora)
<b>SLABI METABOLIZATOR</b>	Kombinacija alela bez funkcije i/ili sa smanjenom funkcijom	$*2/*2$ , $*2/*3$ , $*3/*3$	Niska ili odsutna
<b>BRZI METABOLIZATOR</b>	Jedna kopija alela normalne funkcije i jedna kopija alela ubrzane funkcije	$*1/*17$	Povećana s obzirom na normalnog metabolizatora
<b>VRLO BRZI METABOLIZATOR</b>	Dvije kopije alela povećane funkcije	$*17/*17$	Povećana s obzirom na normalnog metabolizatora

Također postoje i haplotipovi \*36 i \*37, koji su karakterizirani potpunom i djelomičnom delecijom *CYP2C19* gena.

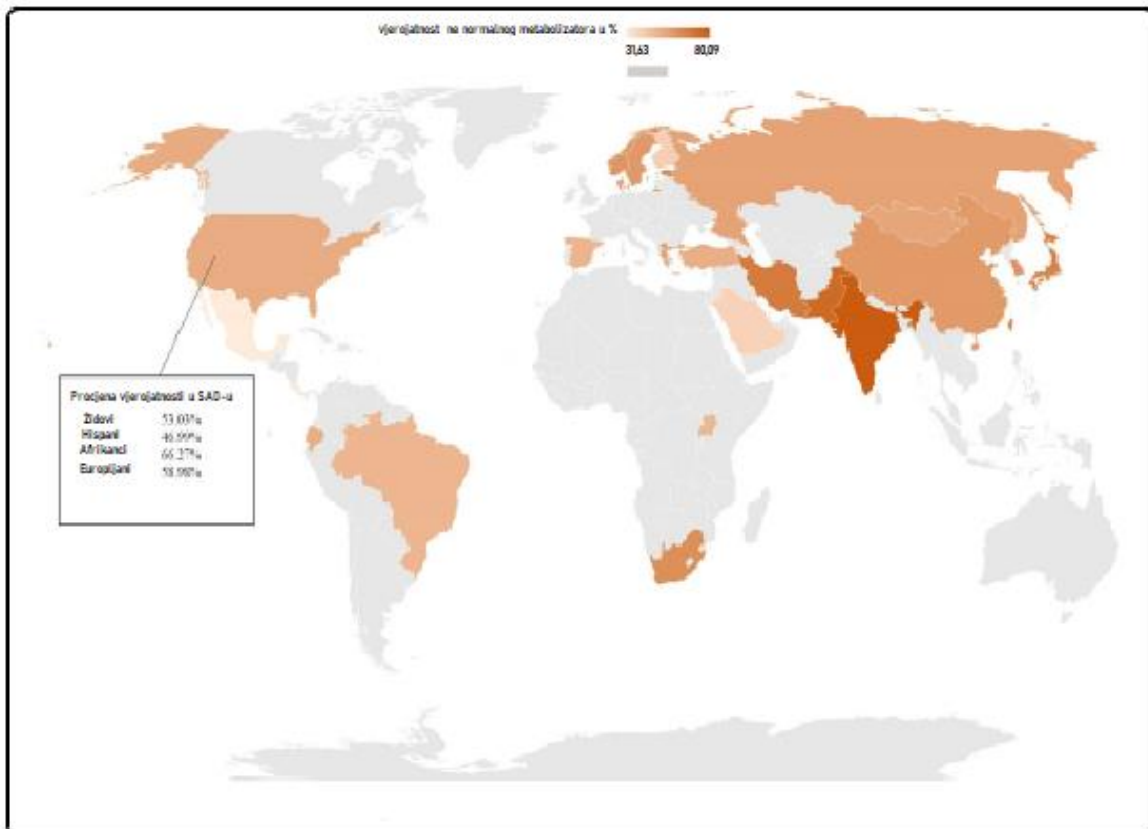
PharmVar slijedi određene kriterije za nomenklaturu. Nova zvjezdica tj. eng. "star allele", bit će izdan samo ukoliko haplotip sadrži varijantu sekvence takvu da: dovodi do promjene aminokiseline, stvara mjesto kidanja (eng. *splice site*), ili dovodi do promjene u ekspresiji čime uzrokuje smanjenu ili pojačanu aktivnost enzima (Botton et al., 2021).

Budući da je *CYP2C19* enzim polimorfan, još uvijek se otkrivaju nove varijante koje doprinose njegovoj aktivnosti. U novijoj studiji, Bråten i suradnici (2022) otkrili su novi haplotip koji dovodi do ubrzanog metabolizma *CYP2C19* enzima. Naime, dio osoba koje su svrstane pod *CYP2C19\*1/\*1* genotip imali su subterapijske koncentracije lijeka escitaloprama, odnosno imali su brži metabolizam nego što je to karakteristično za osobe s genotipom *CYP2C19\*1/\*1*. Znanstvenici su otkrili da postoje dva SNP-a, *rs2860840 (C>T, CYP2C18, 3'UTR)* i *rs11188059 (G>A, CYP2C18, intron 5)*, locirani 27.2 i 53.6 kb uzvodno od *CYP2C19* koji doprinose ubrzanom metabolizmu. Pacijenti koji su imali barem jedan alel *CYP2C:TG* haplotipa imali li su 16.7 % nižu koncentraciju lijeka, a oni s oba alela tog haplotipa čak 24.8 % nižu koncentraciju. Moguće je da varijanta T ima ulogu pojačivača, no ukoliko je u kombinaciji s varijantom A ne dolazi do ubrzanog metabolizma jer varijanta A ukida učinak varijante T. To objašnjava zašto se u *TG* haplotipu vidi ubrzani metabolizam, a u *TA* ne. Iako su ove promjene locirane na genu *CYP2C18*, koji je u jetrama eksprimiran u jako niskim koncentracijama, smatra se da ovi SNP-ovi predstavljaju tag-SNP-ove za različite haplotipove, od kojih *CYP2C:TG* uzrokuje UM fenotip.

### 1.3.3. Učestalost polimorfizama *CYP2C19*

Budući da je migracija postala fenomen današnjice, te je u stalnom porastu, važno je razmotriti razliku u polimorfizmima različitih etničkih podloga. Fenotip sporog metabolizatora najviše se pojavljuje u Azijata (15 %), dok u Europljana i Afrikanaca nije toliko čest (2-5 %). Učestalost samih alela prema kojima se dodjeljuje fenotip ide u prilog ovome. Naime, najčešći varijantni alel koji dovodi do smanjene funkcije, *CYP2C19\*2*, nalazimo najviše u Azijata (29-35 %), a u Europljana 12 % te Afro-Amerikanaca 15 %. Frekvencija \*3 alela u većini populacija je ispod 1 %, no također je češća u Azijata s čak 2-9 % učestalosti u populaciji. Učestalost alela koji dovodi do povećanja aktivnosti,

*CYP2C19*\*17, u Europljana je čak 21 %, dok je u Afro-Amerikanaca 16 % te Azijata 3 % (<https://www.pharmgkb.org/vip/PA166169770>). U velikoj meta analizi Koopmans i sur. (2021) zaključili su da je vjerojatnost za ne-normalni fenotip tj. fenotip koji nije \*1/\*1 čak 61.9 % (Slika 3.). Prema tom saznanju, poželjno bi bilo genetičko testiranje svih pacijenata koji će uzimati lijekove koji podliježu metabolizmu preko ovog enzima te ukoliko dođe do nuspojava prilikom korištenja.



**Slika 3.** Procjene vjerojatnosti nenormalnog metabolizatora CYP2C19 diljem svijeta.  
(preuzeto i prilagođeno od (Koopmans et al., 2021) uz dopuštenje izdavača)

## 1.4. Klinička važnost CYP2C19 polimorfizama

Metabolički putevi koji uključuju CYP2C19 spominju se kod metabolizma čak 30 lijekova. CPIC, *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, razvija smjernice utemeljene na dokazima za lijekove koji su pod utjecajem farmakogenetike. Cilj ovakvih smjernica je pomoći kliničarima u donošenju odluka o izboru i doziranju lijeka na temelj pacijentovog genetičkog profila. Trenutno postoje sljedeće smjernice koje se odnose na CYP2C19 i lijek koji podliježe njegovom djelovanju: smjernice za tricikličke antidepressive, selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina, klopidogrel, inhibitore protonske pumpe i vorikonazol. Svaka smjernica uključuje terapijske preporuke ovisno o fenotipu, preglede dokaza, često i dodatne materijale poput algoritma doziranja. Treba napomenuti da se ovakve smjernice stalno nadopunjuju ovisno o novim dokazima (<https://cpicpgx.org/>).

### 1.4.1. Klopidogrel

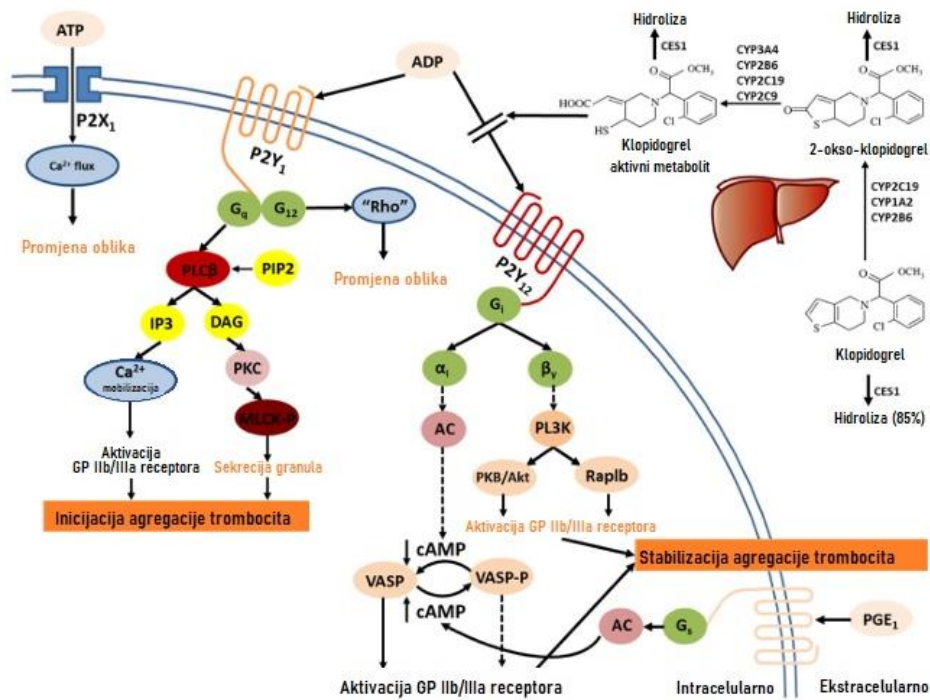
Klopidogrel je jedan od najčešće propisivanih antiagregacijskih lijekova. Takva skupina lijekova koristi se kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom, moždanim udarom i onih koji su podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji. Kod pacijenata sa kardiovaskularnim bolestima agregacija trombocita je aktivirana postojanjem ozljede ili disfunkcije vaskularnog endotela. Takvo stanje dovodi do agregacije trombocita i posljedično formacije patoloških tromba i ishemija. Zato se antiagregacijska terapija često koristi za liječenje ili sprječavanje sekundarnih kardiovaskularnih događaja (Patti et al., 2020). Studija ISAR (eng. *Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen*) usporedila je uzimanje dvojne antiagregacijske terapije (eng. *dual antiplatelet therapy*, DAPT) s kombinacijom aspirina i oralne antikoagulantne terapije te pokazala kako uvođenje antiagregacijske terapije, naspram konvencionalne antikoagulantne terapije, nakon ugradnje stenta, smanjuje incidenciju kardioloških, vaskularnih i hemoragijskih komplikacija. U toj studiji je korišten tiklopidin, predstavnik prve generacije tienopiridina. Nuspojave ovog lijeka su ozbiljna neutropenija, trombocitopenija, osip i dijareja te je iz tog razloga lijek zamijenjen klopidogrelom, koji pokazuje isti učinak, ali uz manje nuspojava. Osim ove indikacije, CAPRI (eng. *Clopidogrel versus Aspirin in Patients at risk of Ischaemic Events*) studija je pokazala učinkovitost dugotrajne primjene klopidogrela u sprječavanju kardiovaskularnih rizika te je od 1997. klopidogrel odobren i za smanjenje aterosklerotskih događaja. Ovaj lijek je pokazao učinak i kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom



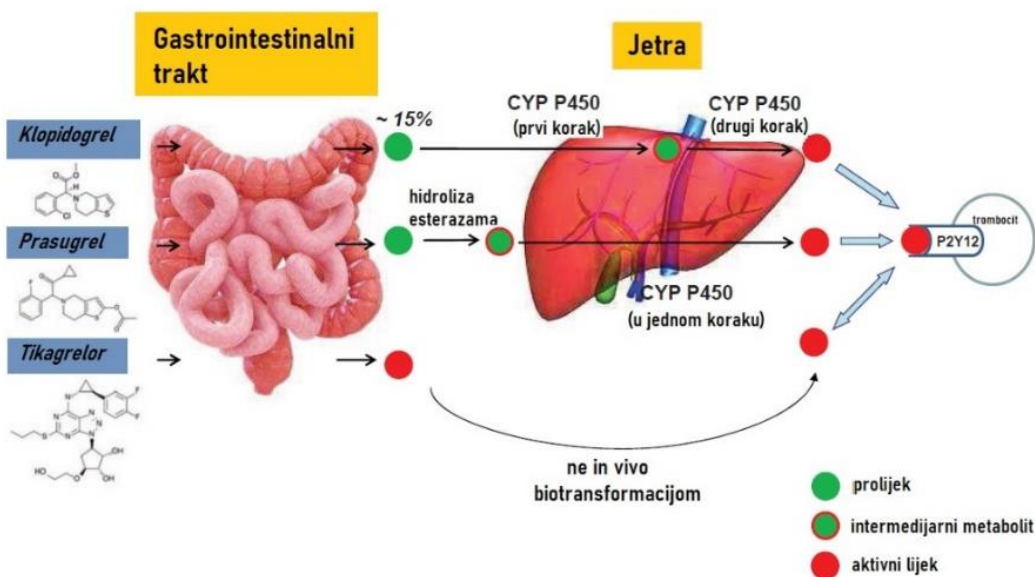
bez elevacije ST segmenta. Dodatne studije su potom pokazale učinkovitost terapije klopidogrelom prije zahvata, gdje ovaj lijek značajno smanjuje incidenciju kardiovaskularne smrti, moždanog udara ili infarkta kada se daje pacijentima koji će tek biti podvrgnuti ugradnji stenta. Također, klopidogrel se propisuje i pacijentima koji imaju veliki rizik od razvoja TIA (eng. *transient ischaemic attack*, mali moždani udar) i to u razdoblju od 90 dana. Doza prije same operacije je 300 mg, dok se nakon operacije propisuje doza od 75 mg (Sarafoff et al., 2012).

Klopidogrel je prolijek. Uzima se oralno u inaktivnom obliku te se u jetrima prevodi u aktivni oblik, kako bi onda selektivno i ireverzibilno inhibirao agregaciju trombocita. Apsorpcija se odvija u gastrointestinalnom traktu putem efluks transportera lijekova, P-glikoproteina, s učinkovitošću od otprilike 50 % (Patti et al., 2020). Potrebna su dva koraka bioaktivacije kako bi nastao aktivni tiolni metabolit koji onda ireverzibilno inhibira ADP-om posredovanu agregaciju trombocita inhibirajući P2Y<sub>12</sub> receptor (Sarafoff et al., 2012). P2Y<sub>12</sub> je receptor koji je vezan s G<sub>i</sub>-proteinom. Aktivacijom tog receptora dolazi do kaskade intracelularnih događaja, a konačni učinak je stvaranje reduciranog oblika protein kinaze (PKA) koja fosforilira VASP protein (eng. *vasodilator-stimulated phosphoprotein*) te dolazi do aktivacije glikoproteinskog (GP) receptora I<sub>1</sub>b/IIIa i oslobađanja granula, amplifikacije agregacije trombocita i stabilizacije trombocitnih agregata. Budući da se aktivni metabolit ireverzibilno veže na P2Y<sub>12</sub> receptor, ne dolazi do cijele kaskade reakcija te je tromb destabiliziran sve dok trombociti na koje je klopidogrel vezan postoje (Jiang et al., 2015) (Slika 4.). Sama aktivacija prolijeka ide preko CYP2C19 enzima. Samo 15 % prolijeka je dostupno za biotransformaciju u aktivni oblik, a ostalih 85 % se hidrolizira karboksilesterazom-1 (CES1) u inaktivni oblik. Iako postoje drugi geni za koje se misli da doprinose varijabilnosti u odgovoru na klopidogrel, CYP2C19 je najznačajniji budući da sudjeluje u oba koraka aktivacije (Slika 5.). Procijenjeno je da CYP2C19 zaslužan za 50 % stvorenog aktivnog metabolita (Jiang et al., 2015). Ukoliko osoba nosi alel koji nema funkcije ili mu je funkcija smanjena (PM i IM), posljedično ima nižu koncentraciju aktivnog metabolita klopidogrela što za posljedicu ima višu reaktivnost trombocita, odnosno povećani rizik za trombozu i ishemiju (Castrichini et al., 2023). Jedna studija je pokazala kako pacijenti koji su primili terapiju s klopidogrelom kod ishemijskog moždanog udara ili TIA-e, a genotipizirani su kao CYP2C19\*2, \*3, ili \*8 heterozigoti, imaju povećan rizik od kombinacije vaskularnih događaja u usporedbi s pacijentima koji su bez tih alela (Lee et al., 2022). CPIC zato predlaže u svojim smjernicama korištenje alternativnih antiagregacijskih

lijekova poput tikagrelora ili prasugrela, a ne korištenje klopidogrela kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom te onih podvrgnutih perkutanoj koronarnoj intervenciji, a koji spadaju u skupine IM i PM. Posebno je navedeno da se testiranje *CYP2C19* genotipa provede kod pacijenata koji idu na perkutanu koronarnu intervenciju i kod akutnog koronarnog sindroma te ukoliko su ti pacijenti IM ili PM poželjna je zamjena alternativnim lijekom. Ovi alternativni lijekovi se ne metaboliziraju preko *CYP2C19* enzima. Prema postojećim smjernicama dokazi o ovim preporukama klasificirani su kao „jaki“. Normalni metabolizatori, kao i oni koji spadaju pod brze i vrlo brze metabolizatore trebali bi koristiti normalne preporučene doze od 75 mg/dan budući da još nema dokaza u koristi povećanja doze kod bržih metabolizatora. Niti alternativni lijekovi za IM i PM fenotip nisu idealni. I tikagrelor i prasugrel spadaju u treću generaciju P2Y<sub>12</sub> inhibitora i iako su u nekim indikacijama bolji od klopidogrela (pokazuju bolji učinak sprječavanja ishemijskih događaja kod pacijenata s akutnim koronarnim sindromom), ali imaju veći rizik od krvarenja te su cjenovno skuplji. Također, kod tikagrelora postoji nuspojava, tikagrelor-povezana dispneja te se mora uzimati dvaput dnevno. Sve su ovo neki od razloga zašto je klopidogrel još uvijek često propisivan lijek (Lee et al., 2022). Zato se smatra da bi rješenje moglo biti farmakogenetički vođena dvojna terapija. Slike 6. i 7. prikazuju smjernice kod propisivanja klopidogrela s obzirom na fenotip za kardiovaskularne, odnosno neurovaskularne indikacije.



Slika 4. Prikaz kaskadne reakcije nakon vezanja klopidogrela za P2Y<sub>12</sub> receptor na trombocitima



Slika 5. Mehanizam aktivacije P2Y<sub>12</sub> inhibitora

Preporuke antiagregacijske terapije na temelju CYP2C19 fenotipa kada se razmatra klopidogrel za kardiovaskularne indikacije

CYP2C19 FENOTIP <sup>a</sup>	IMPLIKACIJE ZA FENOTIPSKO TESTIRANJE	TERAPIJSKE PREPORUKE	KLASIFIKACIJA PREPORUKA <sup>b</sup> - ACS I/ILI PCI <sup>c</sup>	KLASIFIKACIJA PREPORUKA <sup>b</sup> - BEZ-ACS, BEZ-PCI CARDIOVASKULARNE INDIKACIJE <sup>d</sup>
<b>CYP2C19 ULTRABRZI METABOLIZATOR</b>	Povećano stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; niža trombocitna aktivnost tijekom liječenja; nema povezanosti sa većim rizikom od krvarenja	Ukoliko se razmatra liječenje klopidogrelom koristiti standardnu dozu (75mg/danu)	Jaka	Nema preporuka
<b>CYP2C19 BRZI METABOLIZATOR</b>	Normalno ili povećano stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; normalna ili niža trombocitna aktivnost tijekom liječenja; nema povezanosti sa većim rizikom od krvarenja	Ukoliko se razmatra liječenje klopidogrelom koristiti standardnu dozu (75mg/danu)	Jaka	Nema preporuka
<b>CYP2C19 NORMALNI METABOLIZATOR</b>	Normalno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; normalna trombocitna aktivnost tijekom liječenja	Ukoliko se razmatra liječenje klopidogrelom koristiti standardnu dozu (75mg/danu)	Jaka	Jaka
<b>CYP2C19 VJEROJATNO INTERMEDIJARNI METABOLIZATOR</b>	Smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijeci standardnu dozu klopidogrela (75mg) ukoliko je moguće. Koristiti prasugrel ili tikagrelor u standardnim dozama ukoliko nema kontraindikacija	Jaka <sup>e</sup>	Nema preporuka <sup>e</sup>
<b>CYP2C19 INTERMEDIJARNI METABOLIZATOR</b>	Smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijeci standardnu dozu klopidogrela (75mg) ukoliko je moguće. Koristiti prasugrel ili tikagrelor u standardnim dozama ukoliko nema kontraindikacija	Jaka	Nema preporuka
<b>CYP2C19 VJEROJATNO SPORI METABOLIZATOR</b>	Značajno smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijeci klopidogrel ukoliko je moguće. Koristiti prasugrel ili tikagrelor u standardnim dozama ukoliko nema kontraindikacija	Jaka <sup>e</sup>	Umjerena <sup>e</sup>
<b>CYP2C19 SPORI METABOLIZATOR</b>	Značajno smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijeci klopidogrel ukoliko je moguće. Koristiti prasugrel ili tikagrelor u standardnim dozama ukoliko nema kontraindikacija	Jaka	Umjerena

ACS- akutni koronarni sindrom; PCI- perkutana koronarna intervencija

<sup>a</sup> Mrežna tablica učestalosti alela CYP2C19 pruža frekvencije fenotipa za glavne rase/etničke skupine, a internetska tablica CYP2C19 Diplotip-fenotip pruža potpuni popis mogućih diplotipova i dodjela fenotipa.

<sup>b</sup> Shema ocjenjivanja opisana je u dopunskom materijalu na mreži.

<sup>c</sup> ACS i/ili PCI uključuje pacijente koji su podvrgnuti PCI za ACS ili ne-ACS (elektivnu) indikaciju.

<sup>d</sup> Kardiovaskularne indikacije bez ACS-a, bez PCI uključuju perifernu arterijsku bolest i stabilnu koronarnu arterijsku bolest nakon nedavnog infarkta miokarda izvan okruženja PCI.

<sup>e</sup> Snaga preporuke za "vjerojatne" fenotipove ista je kao i za njihove odgovarajuće potvrđene fenotipove. "Vjerojatno" ukazuje na nesigurnost u dodjeli fenotipa, ali razumno je primijeniti preporuku za potvrđeni fenotip na odgovarajući "vjerojatni" fenotip.]

**Slika 6.** Prikaz preporuka antiagregacijske terapije na temelju CYP2C19 fenotipa kada se razmatra klopidogrel za kardiovaskularne indikacije (preuzeto i prilagođeno od (Lee et al., 2022) uz dopuštenje izdavača)

Preporuke za antitrombotičnu terapiju temeljene na fenotipu CYP2C19 pri razmatranju klopidogrela za neurovaskularne indikacije<sup>a</sup>

CYP2C19 fenotip <sup>b</sup>	Implikacije za fenotipsko testiranje	Terapijske preporuke	Klasifikacija preporuka <sup>c</sup>	Ostala razmatranja
<b>CYP2C19 ultrabrz metabolizator</b>	Povećano stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; niža trombocitna aktivnost tijekom liječenja	Nema preporuke	Nema preporuke	
<b>CYP2C19 brzi metabolizator</b>	Normalno ili povećano stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; normalna ili niža trombocitna aktivnost tijekom liječenja	Nema preporuke	Nema preporuke	
<b>CYP2C19 normalni metabolizator</b>	Normalno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; normalna trombocitna aktivnost tijekom liječenja	Ukoliko se razmatra korištenje klopidogrela, primijeniti standardnu dozu (75 mg/danu)	Jaka	
<b>CYP2C19 vjerojatno intermedijarni metabolizator</b>	Smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Razmotriti alternativnu terapiju P2Y <sub>12</sub> inhibitorom u standardnoj dozi ukoliko je klinički indicirano i bez kontraindikacija	Umjerena <sup>d</sup>	Alternativna terapija P2Y <sub>12</sub> inhibitorom koja nije pod utjecajem CYP2C19 genetičkih varijanti je terapija tikagrelorom ili tiklopidinom. Prasugrel je kontraindiciran kod pacijenata s poviješću moždanog udara ili TIA <sup>e</sup>
<b>CYP2C19 intermedijarni metabolizator</b>	Smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Razmotriti alternativnu terapiju P2Y <sub>12</sub> inhibitorom u standardnoj dozi ukoliko je klinički indicirano i bez kontraindikacija	Umjerena	Alternativna terapija P2Y <sub>12</sub> inhibitorom koja nije pod utjecajem CYP2C19 genetičkih varijanti je terapija tikagrelorom ili tiklopidinom. Prasugrel je kontraindiciran kod pacijenata s poviješću moždanog udara ili TIA <sup>e</sup>
<b>CYP2C19 vjerojatno spori metabolizator</b>	Značajno smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijec klopidogrel ukoliko je moguće. Razmotriti alternativnu terapiju P2Y <sub>12</sub> inhibitorom u standardnoj dozi ukoliko je klinički indicirano i bez kontraindikacija	Umjerena	Alternativna terapija P2Y <sub>12</sub> inhibitorom koja nije pod utjecajem CYP2C19 genetičkih varijanti je terapija tikagrelorom ili tiklopidinom. Prasugrel je kontraindiciran kod pacijenata s poviješću moždanog udara ili TIA <sup>e</sup>
<b>CYP2C19 spori metabolizator</b>	Značajno smanjeno stvaranje aktivnog metabolita klopidogrela; povećana trombocitna aktivnost tijekom liječenja; povećani rizik od neželjenih srčanih i cerebrovaskularnih događaja	Izbijec klopidogrel ukoliko je moguće. Razmotriti alternativnu terapiju P2Y <sub>12</sub> inhibitorom u standardnoj dozi ukoliko je klinički indicirano i bez kontraindikacija	Umjerena	Alternativna terapija P2Y <sub>12</sub> inhibitorom koja nije pod utjecajem CYP2C19 genetičkih varijanti je terapija tikagrelorom ili tiklopidinom. Prasugrel je kontraindiciran kod pacijenata s poviješću moždanog udara ili TIA <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Neurovaskularna bolest uključuje akutni ishemijski moždani udar ili prolazni ishemijski napad, sekundarnu prevenciju moždanog udara ili prevenciju tromboembolijskih događaja nakon neurointervencijskih postupaka, kao što je stentiranje karotidne arterije i namotavanje intrakranijalnih aneurizmi potpomognuto stentom.

<sup>b</sup> Mrežna tablica učestalosti alela CYP2C19 pruža frekvencije fenotipa za glavne rase/etničke skupine, a internetska tablica CYP2C19 Diplotip-fenotip pruža potpuni popis mogućih diplotipova i dodjela fenotipa.

<sup>c</sup> Shema ocjenjivanja opisana je u dodatnom materijalu na mreži.

<sup>d</sup> Snaga preporuke za "vjerojatne" fenotipove ista je kao i za njihove odgovarajuće potvrđene fenotipove. "Vjerojatno" ukazuje na nesigurnost u dodjeli fenotipa, ali razumno je primijeniti preporuku za potvrđeni fenotip na odgovarajući "vjerojatni" fenotip.

<sup>e</sup> S obzirom na ograničene podatke o rezultatima za genotipom vodenu antitrombotičnu terapiju za neurovaskularne indikacije, odabir terapije trebao bi ovisiti o individualnim ciljevima liječenja bolesnika i rizicima za nuspojave.]

**Slika 7.** Prikaz preporuka za antiagregacijsku terapiju temeljene na fenotipu CYP2C19 pri razmatranju klopidogrela za neurovaskularne indikacije (preuzeto i prilagođeno od (Lee et al., 2022) uz dopuštenje izdavača)

### 1.4.2. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI)

Smatra se da čak 50 % osoba koje uzimaju antidepresive imaju neodgovarajući odgovor na prvotnu terapiju. Također su česte i ADR. Citalopram, escitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin i sertralin su antidepresivi koji spadaju pod selektivne inhibitore ponovne pohrane serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI). SSRI spadaju u prvu liniju antidepresiva kod liječenja depresije i poremećaja anksioznosti (Bousman et al., 2023). Njihovo djelovanje zasniva se na povećanju koncentracije serotonina tj. 5-hidroksitriptamina, 5-HT . Prema monoaminskoj teoriji, smatra se da je upravo nedostatak 5-HT-a razlog nastanka navedenih bolesti. Serotonin je neurotransmitter odgovoran za puno funkcija u organizmu, uključujući automatsku funkciju, motornu aktivnost i hormonsku sekreciju. Ponovni unos serotonina u presinaptičke skladišne vezikule posredovan je vezikularnim monoaminskim transporterom SLC18A2. Transporter akumulira serotonin u sinaptičke vezikule koristeći gradijent protona preko vezikularne membrane. 5-HT koji nije pohranjen u vezikulama razgrađuje se pomoću monoaminooksidaze A (MAOA) do 5-hidroksiindolactone kiseline (5-HIAA). Serotonin dolazi u interakciju s pre- i postsinaptičkim receptorima nakon što akcijski potencijal ovisan o kalciju stimulira egzocitozno otpuštanje serotonina iz presinaptičkih vezikula. Na presinaptičkoj strani, 5-HT aktivira 5-hidroksitriptamin (serotonin) receptor 1A (HTR1A), B (HTR1B) i D (HTR1D), što rezultira slabljenjem 5-HT egzocitoze. Ova povratna sprema regulira koncentraciju 5-HT u sinaptičkoj pukotini, a time i opseg stimulacije različitih podrazreda HTR receptora na postsinaptičkoj membrani. Produljena primjena selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI) desenzibilizira te povratne sprege (<https://www.pharmgkb.org/>). Nuspojave vezane uz ovu skupinu lijekova utječu na središnji živčani sustav, gastrointestinalnu i seksualnu disfunkciju. Najznačajnije su nuspojave poput serotoniniskog sindroma i aritmija zbog produženog QT intervala (Bousman et al., 2023). Serotoninski sindrom je ugrožavajuće stanje koje se javlja zbog uporabe serotonergičnih lijekova, uslijed pretjerane aktivacije perifernih i središnjih postsinaptičkih 5-HT-1A i 5-HT-2A receptora. Ovaj sindrom se sastoji od kombinacije promjena mentalnog statusa, neuromuskularne hiperaktivnosti i autonomne hiperaktivnosti (Volpi-Abadie et al., 2013). Od navedenih SSRI, citalopram, escitalopram i sertralin se metaboliziraju preko polimorfnog CYP2C19 enzima. Kod osoba koje su UM, koncentracije citaloprama i

escitaloprama su značajno niže od osoba koje su NM. Za takve se osobe preporučuje alternativna terapija čiji metabolizam ne ide preko CYP2C19 enzima. Uočene su i više koncentracije citaloprama, escitaloprama i sertralina kod osoba koje su PM, što može dovesti do ranije spomenutih nuspojava. I za njih se preporučuje alternativna terapija ili prilagodba doze. FDA preporučuje smanjenje početne doze citaloprama za 50 % kod PM, zbog moguće QT prolongacije (Bousman et al., 2023).

### **1.4.3. Inhibitori protonske pumpe (eng. *Proton Pump Inhibitors, IPP*)**

Inhibitori protonske pumpe djeluju na smanjenje izlučivanja kiseline u želudac. Neki od lijekova koji spadaju u tu skupinu su: omeprazol, esomeprazol, lanzoprazol i pantoprazol. Omeprazol, lasoprazol i pantoprazol spadaju u prvu generaciju IPP, dok esomeprazol spada u drugu generaciju (El Rouby et al., 2018). Koriste se primjerice kod ezofagitisa, neerozivne refluksne bolesti, peptičnog ulcera, infekcije s *Helicobacter pylori* i sl. (Ahmed & Clarke, 2024). Mehanizam djelovanja ove skupine lijekova bazira se na ireverzibilnoj inhibiciji  $H^+/K^+$ ATP-azne protonske pumpe u parijetalnim stanicama gušterače, posljedično inhibirajući sekreciju želučane kiseline. Kako bi postigli optimalnu aktivnost, preporučeno je uzimanje ovih lijekova 30-60 minuta prije jela. Time se povećava apsorpcija i osigurava se da koncentracija u plazmi korelira s brojem protonskih pumpi koje se aktiviraju uzimanjem hrane (El Rouby et al., 2018).

IPP su prolijekovi, aktiviraju se protonacijom, odnosno prisustvom kiseline. Metabolizam im je većinski u jetri, a ovisi o CYP450 enzimima, najznačajniji su CYP2C19 i CYP3A4 (Shin & Kim, 2013). Čak 80 % metabolizma omeprazola, lanzoprazola i pantoprazola ovisi o CYP2C19 enzimu (El Rouby et al., 2018). Furuta i sur.(1999; 2001) su u farmakokinetičkoj studiji dokazali da učinak lanzoprazola i omeprazola na pH želuca ovisi o genotipu CYP2C19 enzima. U pacijenata koji su bili PM intragastrične pH vrijednosti su bile više u usporedbi s IM, NM, RM, UM, rezultirajući većim koncentracijama IPP i boljim uspjehom liječenja. Zaključili su da bi genotipiziranje pacijenata bilo od velike koristi kod propisivanja IPP. Prema El-Serag i sur. (2010) čak 45 % pacijenata je otporno na liječenje s IPP. Osim toga, dugotrajno korištenje IPP povezuje se i s određenim nuspojavama, kao što su neuravnoteženost elektrolita (npr. hipomagnezijemija), bubrežne bolesti, osteoporoza i

čak demencija (El Rouby et al., 2018). U meta analizi koja se provela na ~110 000 pacijenata, korištenje IPP povezano je s čak 40 % većim rizikom hipomagnezijemije (Cheungpasitporn et al., 2015). CPIC je izdao smjernice za doziranje IPP. Kod normalnih metabolizatora preporuča se započeti s normalnom dozom, osim ako se radi o infekciji s *H. pylori* ili erozivnom ezofagitisu, kad se preporučuje povećanje doze 50-100 %. Budući da PM i IM imaju veću koncentraciju lijeka, te time bolji terapijski odgovor, smatra se da su u "terapijskoj prednosti" naspram NM, RM i UM. No ipak, kod njih postoji opasnost nuspojava ukoliko se dugotrajno primjenjuju IPP. Zato CPIC predlaže da se na početku krene s normalnim dozama kako bi se postigla željena efikasnost te kad se ona postigne, predlaže se smanjenje doze za 50 % kako bi se smanjio rizik od nuspojava. Nadalje, pacijentima koji su RM predlaže se povećanje početne doze za 50-100 % prilikom liječenja infekcije s *H.pylori* i erozivnog ezofagitisa, te povećanje početne doze za 100 % kod pacijenata koji su UM. Također, naglašava se kako bi ti pacijenti trebali biti praćeni (Lima et al., 2021). Studije su čak pokazale da postoji i prednost u doziranju IPP dva do četiri puta dnevno (Furuta et al., 2007).

#### **1.4.4. Vorikonazol**

Vorikonazol spada u drugu generaciju triazola, usmjeren ka liječenju infekcija s gljivičnim patogenima kao što su *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus neoformans*. Smatra se prvom linijom antifungalnih lijekova protiv invazivne aspergiloze. Princip djelovanja je inhibicija sinteze ergosterola inhibicijom lanosterol 14 $\alpha$ -demetilaze. Vorikonazol se metabolizira primarno u jetri, N-oksidacijom pomoću enzima CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4 (Theuretzbacher et al., 2006). Za liječenje invazivne aspergiloze i ostalih gljivičnih infekcija kod odraslih propisuje se vorikonazol u početnoj dozi od 6 mg/kg i.v. svakih 12 sati za prve dvije doze te 4 mg/kg i.v. svakih 12 sati za održavanje (Moriyama et al., 2017). Nuspojave vezane uz ovaj lijek uključuju neurotoksičnost, smetnje u vidu, abnormalnosti u funkcijskim testovima jetre i kožne osipe. Od težih nuspojava spominju se vizualne halucinacije, hepatitis i fulminantno jetreno zatajenje te se zato predlaže praćenje jetrenih enzima prilikom korištenja vorikonazola (Theuretzbacher et al., 2006). Vorikonazol je lijek s uskim terapijskim indeksom i nelinearnom farmakokinetikom, a u kombinaciji s polimorfnim enzimom kao što je CYP2C19, čini savršeni recept za postizanje visoke interindividualne



varijabilnosti u kliničkom odgovoru. Budući da se vorikonazol najviše metabolizira preko polimorfnog CYP2C19 enzima, spori metabolizatori su u opasnosti od nuspojava povezanih s koncentracijom, dok su vrlo brzi metabolizatori u opasnosti od poddoziranja i neuspjeha liječenja (Obeng et al., 2014). Vorikonazol je i snažni inhibitor CYP2C19. Stupa u interakciju s brojim lijekovima, kao što su ciklofosamid, vinka alkaloidi i inhibitori HMG-CoA reduktaze (Theuretzbacher et al., 2006). Subterapijske koncentracije povezane su s terapijskim neuspjehom, što kod imunokompromitiranih i teško bolesnih pacijenata može dovesti do produljenja boravka u bolnici, eskalacije terapije i potencijalno smrtnih ishoda (Obeng et al., 2014). Iako kliničke studije nisu dokazale povezanost *CYP2C19* genotipa i nuspojava, CPIC preporučuje korištenje drugih antifungalnih lijekova kod sporih metabolizatora. Ukoliko je ipak vorikonazol indiciran zbog liječenja invazivne mikoze, preporučuje se smanjivanje doze uz praćenje koncentracije lijeka. Korištenje alternativnih antifungalnih lijekova preporučuje se i kod brzih i vrlo brzih metabolizatora. Alternativni lijekovi uključuju izavukonazol, amfotericin B i posakonazol (Moriyama et al., 2017).

## 2. Obrazloženje teme

CYP2C19 enzim jedan je od važnijih enzima u metabolizmu više od 30 lijekova. Njegova važnost ističe se i kod prevođenja klopidogrela u aktivni oblik, prilikom kojeg CYP2C19 enzim sudjeluje u oba koraka aktivacije. Budući da je ovaj enzim izuzetno polimorfan, predmet je mnogobrojnih istraživanja u rastućem polju farmakogenetike. Njegova polimorfnost utječe na veliku interindividualnu varijabilnost enzimske aktivnosti te nastanak nuspojava tj. neučinkovitosti lijeka. Klinički značajne varijante su *CYP2C19\*2*, koja dovodi do smanjenog metabolizma i *CYP2C19\*17*, koji dovodi do ubrzanog metabolizma enzima CYP2C19. Najnovija istraživanja ukazuju na postojanje haplotipa *CYP2C:TG* u klasteru gena CYP2C za koji se smatra da također utječe na brzinu metabolizma CYP2C19 enzima. Ovaj rad ispituje odnos polimorfizma gena *CYP2C19* (rs4244285 i rs12248560 ) i klastera gena *CYP2C* (rs2860840 i rs11188059) s nuspojavama krvarenja ili neučinkovitosti u pacijenata na terapiji klopidogrelom.

## 3. Materijali i metode

### 3.1. Izdvajanje DNA metodom QIAamp

Kako bi odredili polimorfizam enzima CYP sustava, prvo moramo izolirati DNA. Uzorak izbora je puna krv uzeta u epruvetu s antikoagulantom EDTA. Na tržištu postoje mnogi komercijalno dostupni kitovi za izolaciju DNA. Prednosti takvog sustava su brza i jednostavna izolacija ukupne DNA iz uzorka te je smanjena mogućnost pogrešaka i kontaminacije. QIAamp DNA Mini i QIAamp DNA Blood Mini Kit omogućuju brzo izdvajanje DNA. Za ovu metodu nije potrebno prethodno odvajanje leukocita niti fenol/kloroform ekstrakcija. Nakon izolacije QIAamp procedurom dobije se DNA eluirana u puferu. DNA izolirana QIAamp kitom veličine je do 50kb, s time da najviše prevladavaju fragmenti od 20-30kb. Ovakvim kitom može se dobiti otprilike 6  $\mu$ L ukupne DNA iz 200  $\mu$ L pune ljudske krvi.

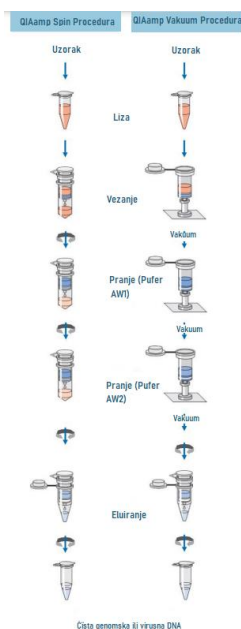
Ovaj kit upotrebljava enzim QIAGEN proteazu uz pufer za lizu stanica iz uzorka. Takva proteaza nema ni DNAaznu ni RNAznu aktivnost. Nakon lize stanica, slijedi pročišćavanje, koje se sastoji od 4 koraka koristeći QIAamp Mini spin kolone. Tijekom centrifugiranja, DNA je adsorbirana na QIAamp silika membranu. Proteini i ostale tvari koje bi mogle kontaminirati uzorak i inhibirati PCR nisu zadržane na membrani zahvaljujući soli i pH uvjetima u lizatu. Kako bi odvojili DNA od ostalih mogućih kontaminanata, potrebno je isprati kolonu sa dva pufera. Korištenje dva različita pufera za ispiranje, Buffer AW1 i Buffer AW2, poboljšava čistoću eluirane DNA. Sakupljena DNA se potom eluira u obliku koncentrirane forme u puferu AE (10 mM Tris·Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0).

Svi koraci moraju biti izvedeni na sobnoj temperaturi (15-25°).

#### Postupak

1. Otpipetirati 20  $\mu$ L QIAGEN proteaze u 1.5 mL mikroeprevetu te dodati 200  $\mu$ L uzorka.
2. Dodati 200  $\mu$ L pufera AL te promiješati na vrtložnoj miješalici 15 sekundi. Za učinkovito provođenje lize, smjesu je potrebno dobro promiješati kako bi bila homogena.

3. Inkubirati na 56 °C kroz 10 minuta te kratko centrifugirati kako bi se kapljice spustile s poklopca.
4. Dodati 200 µL etanola (96-100 %) te ponovno promiješati na vrtložnoj miješalici.
5. Kako bi se kapljice uklonile s poklopca potrebno je ponovno centrifugirati.
6. Smjesu treba otpipetirati u QIAamp Mini spin kolonu, koje su prethodno stavljene u mikroepruvete od 2 mL, i centrifugirati na 6000 x g (8000 rpm) 1 minutu.
7. Premjestiti QIAamp Mini spin kolone u nove čiste mikroepruvete volumena 2 mL.
8. Dodati 500 µL pufera AW1 i ponovno centrifugirati na 6000 x g (8000 rpm) 1 minutu.
9. Premjestiti kolonu u novu mikroepruvetu od 2 mL te dodati 500 µL pufera AW2. Centrifugirati na 20000 x g; 14000 rpm kroz 3 minute.
10. Premjestiti kolonu u čistu mikroepruvetu od 2 mL i centrifugirati na 20000 x g 1 minutu.
11. Premjestiti kolonu u novu mikroepruvetu od 1,5 mL i dodati 200 µL pufera AE ili destilirane vode i inkubirati na sobnoj temperaturi (15-25 °C) 1 minutu.
12. Centrifugirati na 6000g (8000 rpm) kroz 1 minutu kako bi se eluirala DNA (slika 8.).



**Slika 8.** Prikaz postupaka QIAamp Blood Mini Kit za izolaciju DNA (preuzeto i prilagođeno prema QIAGEN, 2018 uz dopuštenje izdavača)

### 3.2. Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Nakon izolacije DNA, potrebno je odrediti njenu koncentraciju. Koncentracija se određuje spektrofotometrijski na 260 nm. DNA apsorbira UV zračenje na valnoj duljini od 260nm, zahvaljujući konjugiranim dvostrukim vezama u strukturi nukleotida koji ih izgrađuju. Ukoliko je DNA nakon izolacije čista, otopina od 50 mg/L DNA ima apsorbanciju 1.0 na 260nm. Koncentracija DNA izračunava se na temelju optičke gustoće (OD, eng. *optical density*) otopine pri valnoj duljini od 260 nm prema sljedećoj formuli:

$$\text{koncentracija DNA } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

OD<sub>260</sub> – optička gustoća uzorka na 260 nm; 50 μg/mL – koncentracija dvolančane DNA koja odgovara OD<sub>260</sub> od 1 (Barbas et al., 2007).

RNA, koja jače apsorbira, tu vrijednost apsorbancije poprima već na koncentracijama od 30 mg/L. Ova metoda ne razlikuje DNA od RNA. Također, može doći do lažno povišenih vrijednosti koncentracija zbog kontaminanata poput proteina, nukleotida, jednolančane DNA ili primjerice fenola ili gvanidina.

Čistoća DNA se određuje omjerom apsorbancije na 260 i 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>). Suprotno nukleinskim kiselinama, proteini imaju maksimum apsorbancije na 280 nm. Omjer A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> koji je između 1,7 i 2,0 ukazuje na visoku razinu čistoće DNA, dok niže vrijednosti znače kontaminaciju uzorka proteinima. Treba imati na umu da na omjer utječe i pH uzorka, ionska jakost i rezidualne organske kemikalije (Rifai, 2017).

Koncentracija i čistoća uzorka određuju se pomoću NanoDrop Lite (ThermoFischer Scientific, Njemačka).

#### Postupak mjerenja koncentracije i čistoće DNA

Prvo se otpipetira 1 μL TE pufera i stavlja se na uređaj kao slijepa proba. Slijepa proba služi kao referentno mjerenje kojim se uklanja odziv instrumenta na dijelove matriksa. Potom slijedi mjerenje uzoraka. Također se pipetira 1 μL uzorka i stavlja na uređaj. Prije mjerenja je uzorak potrebno homogenizirati vorteksiranjem.

### 3.3. Genotipizacija CYP2C19

#### 3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

##### Načelo metode

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real-time polymerase chain reaction*) modifikacija je klasične lančane reakcije polimerazom s mogućnošću praćenja nastajanja produkata u stvarnom vremenu. To je ciljana amplifikacijska metoda koja služi da se mala količina DNA umnoži, u *in vitro* uvjetima, u veliki broj kopija. Kako ova inačica omogućava praćenje u stvarnom vremenu, također se omogućila i kvantifikacija DNA u reakcijskoj smjesi u stvarnom vremenu. Zato se ova metoda još naziva i kvantitativni PCR (*qPCR*). Ovom metodom se također može izračunati početna koncentracija DNA.

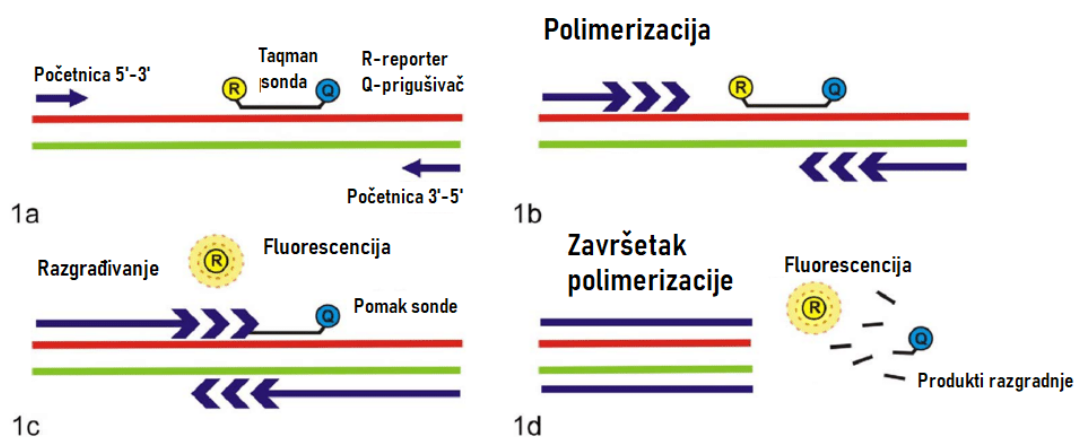
Kako bi se umnožio određeni segment DNA od interesa, potrebna je:

1. Izolirana DNA od interesa koja služi kao kalup za reakciju
2. Četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP) koji služe kao materijal za sintezu novih DNA lanaca (prisutni u suvišku)
3. Termostabilna DNA polimeraza (Taq polimeraza) kojoj je optimalna temperatura oko 72 °C pa zato može djelovati u denaturirajućim uvjetima
4. Dvije specifične početnice (eng. *primer*) budući da su Taq polimerazi potrebni postojeći oligonukleotidni sljedovi kako bi se za njih vezala i nastavila sintezu
5. Mg<sup>2+</sup> ioni koji služe kao kofaktor DNA polimerazi
6. Pufer kao materijal u kojem će se reakcija odvijati

Optimizacijom i prilagodbom sastavnica reakcijske smjese može se povećati specifičnost i prinos PCR reakcije. PCR reakcija provodi se u otprilike 20-50 ponavljajućih ciklusa, a svaki ciklus sastoji se od tri koraka: denaturacije, vezanja početnica i elongacije. Prvi korak denaturacije provodi se na 94 °C kroz otprilike 20 sekundi. U ovom koraku dolazi do međusobnog odvajanja lanaca dvolančane DNA (dsDNA, od eng. *double-stranded DNA*) na dva jednolančana lanca (ssDNA, od eng. *single-stranded DNA*). Drugi korak specifičnog vezanja početnica na ssDNA odvija se na temperaturi od 50 °C do 60 °C. Početnice se vežu za 3' kraj jednolančane DNA. Korak elongacije tj. produljenja DNA lanaca je treći korak. Optimalna temperatura za Taq polimerazu koja sintetizira komplementarni lanac je 72 °C.

Polimeraza produljuje hibridizirane početnice ugradnjom deoksiribonukleozid-fosfata, a jednolančana DNA služi kao kalup za sintezu novog komplementarnog lanca. Iza svakog ciklusa, sintetizirane molekule DNA služe kao kalup za daljnju sintezu. Nakon  $n$  ciklusa, od jedne kopije DNA dobije se  $2^n$  kopija (Kubista et al., 2006).

Jedna od izvedbi qPCR-a je metoda TaqMan<sup>®</sup> PCR u stvarnom vremenu. Za izvedbu ove metode dodatno su potrebne TaqMan<sup>®</sup> sonde, kratki jednolančani oligonukleotidi koji su komplementarni dijelu lanca DNA koji se želi umnožiti i koji se vežu kada i početnice. Karakteristika ovih sonda je da emitiraju fluorescenciju nakon što se odvoje od lanca DNA. Sonda na jednom kraju sadrži fluorescentnu boju, još nazvanu *reporter*, primjerice FAM<sup>®</sup> boja (6-karboksifluorescein), a na drugom kraju sonde se nalazi tzv. *quencher* boja odnosno prigušivač. Prigušivač može apsorbirati valnu duljinu fluorescencije sve do nekoliko nanometara udaljenosti (10-100 Å). Sve dok je sonda intaktna, dolazi do prijenosa fluorescentne energije tako da prigušivač apsorbira fluorescentnu emisiju reportera. Ova pojava se naziva fluorescentni rezonantni prijenos energije (FRET od eng. *fluorescence energy resonance transfer*). Dokle god su na maloj udaljenosti ne dolazi do fluorescencije zbog preklapanja emisijskog spektra reporterske boje i ekscitacijskog spektra prigušivača. Prigušivač emitira zračenje, ali je to na drugoj valnoj duljini koja se ne detektira. Kidanje TaqMan<sup>®</sup> sonde i detekcija fluorescencije reportera omogućena je Taq polimerazom. Naime, osim što ima 3'→5' endonukleaznu aktivnost kojom sintetizira novi lanac DNA, ova polimeraza ima i 5'→3' egzonukleaznu aktivnost kojom je omogućeno kidanje dNTP-ova koji se nalaze ispred nje. Znači, Taq polimeraza, ukoliko naiđe na TaqMan<sup>®</sup> sondu vezanu na DNA slijed ispred nje, kida sondu i time razdvaja reporter i prigušivač, dovodeći time do fluorescencije koja se onda detektira (Slika 9.). Ovaj proces događa se tijekom svakog ciklusa PCR reakcije. Specifičnost ovakve metode je što će do cijepanja sonde doći samo ukoliko je sonda u potpunosti komplementarna DNA slijedu. Ukoliko nije, Taq polimeraza neće ju pocijepati, već će se cijela sonda odvojiti od DNA kalupa. Ova metoda se zato koristi u detekciji SNP-ova (Dymond, 2013). Prisutnost određenog fluorescentnog signala upućuje na prisutnost odgovarajućih alela.



**Slika 9.** Prikaz metode TaqMan<sup>®</sup> PCR u stvarnom vremenu u kojoj se koristi sonda koja ima svojstvo fluorescencije. Ukoliko je sonda komplementarna lancu DNA doći će do razgradnje sonde i fluorescencije koja se potom detektira.

Jedna od izvedbi ovakve metode je i korištenje dvije TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde za detekciju alela. Takva metoda naziva se alelna diskriminacija i omogućava diskriminaciju dvaju alela istog gena u jednoj reakciji. Jedna sonda u tom slučaju prepoznaje nukleotidni slijed kojeg vežemo uz divlji tip, a druga se veže za nukleotidni slijed karakterističan za mutirani tip alela. Te dvije sonde označene su različitim fluorescentnim bojama. Prisutnost određenog fluorescentnog signala ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela. Ukoliko su obje sonde vezane za ciljni DNA slijed, Taq DNA polimeraza razgradit će obje sonde te će se detektirati dvije fluorescencije. Detekcija dvije boje znači da je osoba heterozigot, a detekcija jedne boje znači da je osoba homozigot divljeg ili mutiranog tipa, ovisno koja boja se detektirala ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### 3.3.2. Genotipizacija rs2860840 i rs11188059

U ovom radu qPCR-om temeljenom na TaqMan<sup>®</sup> principu genotipizirani su polimorfizmi jednog nukleotida (SNP, eng. *Single Nucleotide Polymorphism*) rs2860840 te rs11188059. Ovom genotipiziranju prethodilo je genotipiziranje *CYP2C19\*2* i *CYP2C19\*17* alela koje je izvedeno također metodom TaqMan<sup>®</sup>.

#### Potrebna oprema i reagensi

Oprema:



- uređaj za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (Applied Biosystems, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikropravete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 µL
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikropravete
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Centrifuge 5810R Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)

### Reagensi

- TaqMan® Universal PCR Master Mix
- TaqMan® Drug Metabolism Assay Genotyping
- TaqMan® SNP Genotyping Assay

**Tablica 2.** Prikaz alela, SNP, nukleotidne promjene i TaqMan® reagensa (preuzeto i prilagođeno prema TaqMan® protokolu)

Gen, alel	Db SNP*	Nukleotidna promjena**	TaqMan® Assay ID
<i>CYP2C19</i> *2	rs4244285	c.681G>A	C__25986767_70
<i>CYP2C19</i> *17	rs12248560	c.-806C>T	C__469857_10
<i>CYP2C</i> (C>T)	rs2860840	c.31C>T	C__11201742_10
<i>CYP2C</i> (G>A)	rs11188059	c.819+2182G>A	C__31983321_10

\*Single Nucleotide Polymorphism Database

\*\* The Pharmacogene Variation Consortium (<https://www.pharmvar.org>)

## Postupak

Prije samog izvođenja reakcije potrebno je pripremiti najprije reagense te razrjeđenja DNA (s vodom za PCR). Sastojci koji se dodaju u reakcijsku smjesu navedeni su u tablici 3.

**Tablica 3.** Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za TaqMan<sup>®</sup> qPCR

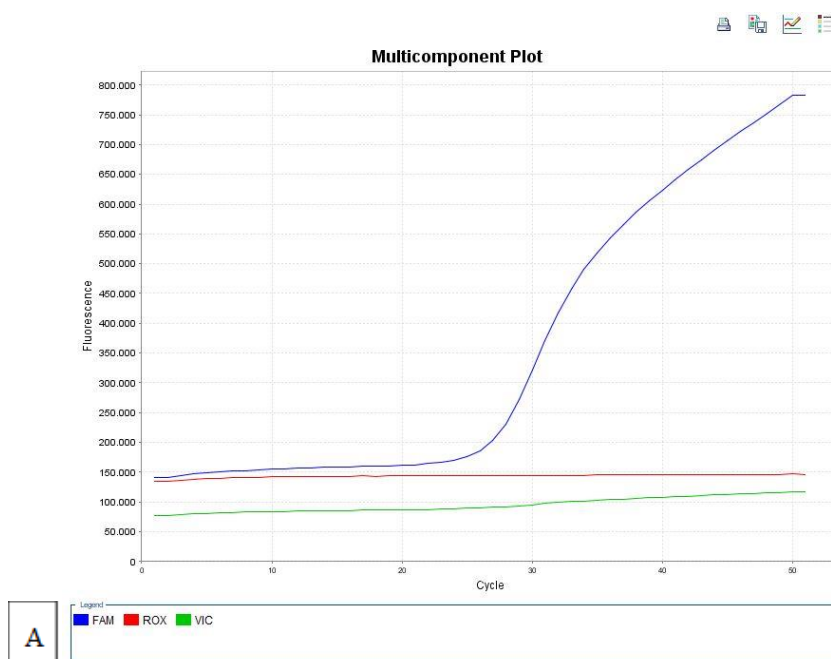
Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	5	1x
TaqMan <sup>®</sup> SNP Assay Mix*, 20x	0,5	1x
DNA razrjeđenje	4,5	1-20 ng
Ukupni volumen reakcijske smjese	10	

\*za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući TaqMan<sup>®</sup> Assay

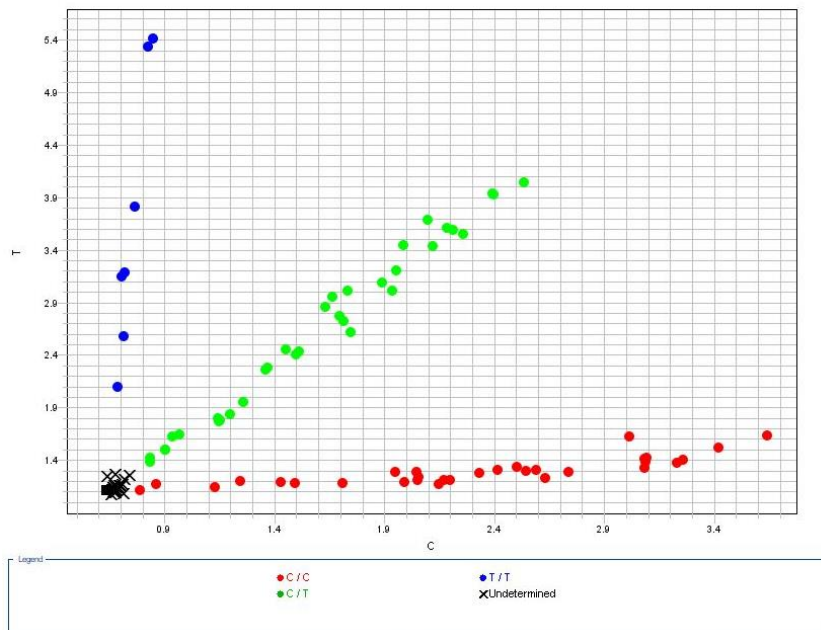
Nakon što su se reagensi pripremili, potrebno ih je lagano promiješati na vrtložnoj miješalici. Kako bi se sadržaj bočica spustio na dno, reagensi se centrifugiraju u mikrocentrifugi 3-5 sekundi pri 3000 rpm. Potom se otpipetira TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix i TaqMan<sup>®</sup> SNP Assay Mix\*, 20x u mikroepruvetu, u volumenu navedenom u tablici 3. Lagano se promiješa protresanjem mikroepruvete prstom te se centrifugira 3-5 sekundi. Reakcijska smjesa se onda otpipetira u mikrotitarsku pločicu te se doda DNA, kontrolni uzorci i negativne kontrole. U negativnu kontrolu se umjesto uzorka DNA stavlja ista količina destilirane vode za PCR. Mikrotitarska pločica se zatvori pokrovnom folijom te se cijela pločica centrifugira u centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 sekundi na 3000 rpm. Uzorci se nakon toga stave na uređaj ABI 7500 te se uređaj pokrene prema odgovarajućem programu. Uvjeti za PCR reakciju na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju navedeni su u tablici 4. Fluorescentni signal koji se stvara tijekom PCR reakcije detektira se i analizira pomoću računalnog programa. Nakon što je uređaj završio s radom, rezultate je potrebno očitati. Interpretacija signala prikazana je na slikama 8, 9, 10 i 11.

**Tablica 4.** Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju

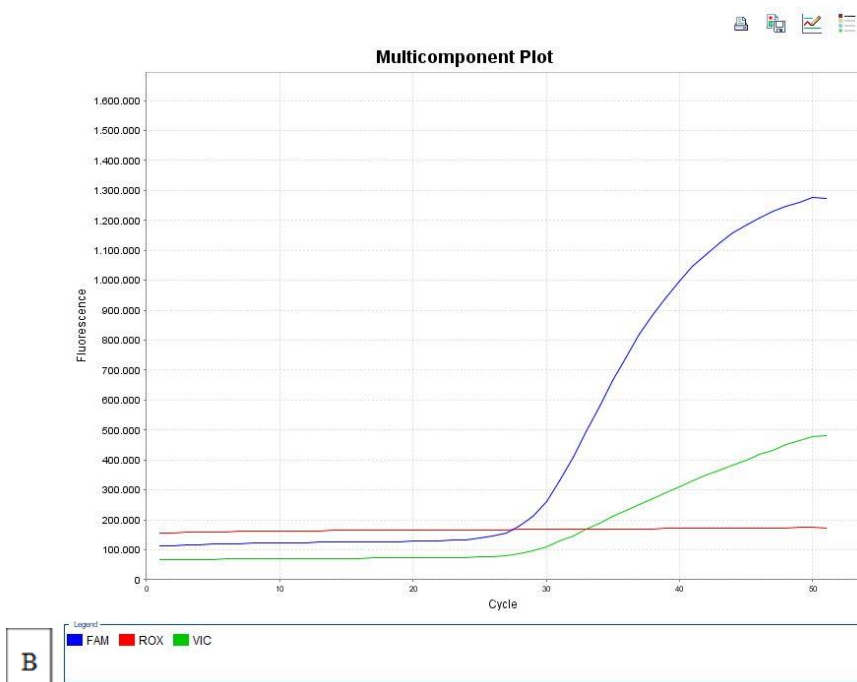
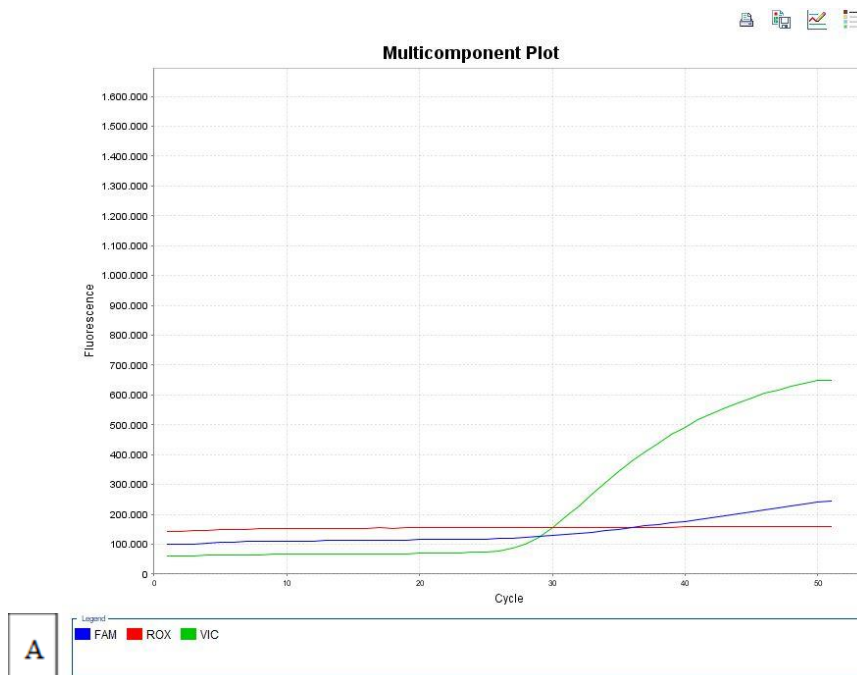
Pre-PCR Read	INICIJACIJA	DENATURACIJA	AMPLIFIKACIJA	Post-PCR Read
Temperatura /trajanje	Temperatura /trajanje	Temperatura /trajanje	Temperatura /trajanje	Temperatura /trajanje
60 °C/ 1 min	50 °C/ 2 min 95 °C/ 10 min	95 °C/ 15 s	60 °C/ 90 s	60 °C/ 1 min



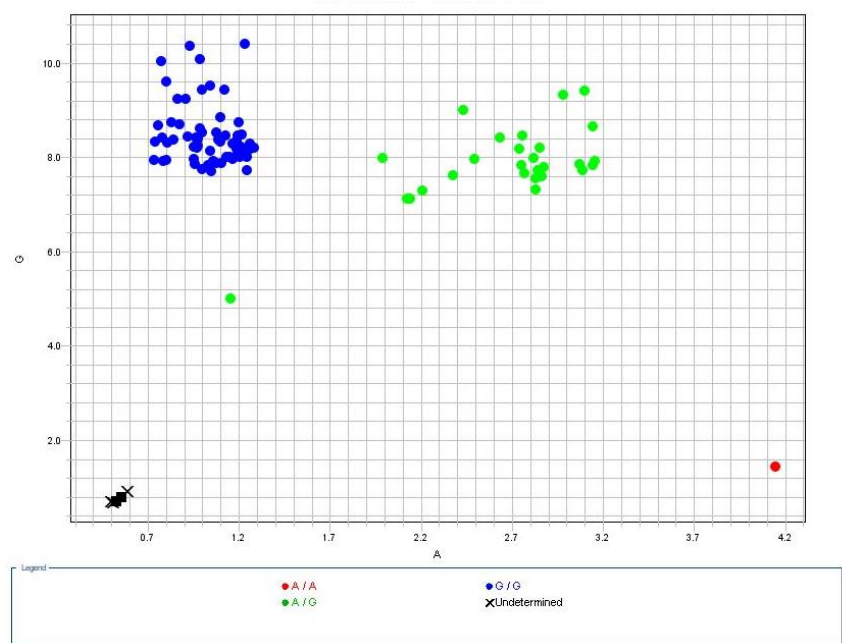
**Slika 10.** Prikaz rezultata TaqMan® PCR za polimorfizam rs2860840. Na slici A vidljiv je porast samo jedne fluorescentne boje (FAM®) kojom se otkriva prisutnost T nukleotida u rs2860840 što upućuje da je ispitivana osoba homozigot mutiranog oblika za ispitivani polimorfizam (*T/T* genotip). Na slici B vidljiv je porast obje boje (VIC® i FAM®) što ukazuje da je osoba heterozigot za ispitivani polimorfizam (*C/T* genotip). Ukoliko bi došlo do porasta fluorescencije samo VIC® boje, osoba bi bila homozigot divljeg tipa (*C/C*).



**Slika 11.** Analiza alelna diskriminacije TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu za rs2860840; crvene točke- *wt* homozigoti, zelene točke- heterozigoti, plave točke- *mut* homozigoti.



**Slika 12.** Prikaz rezultata TaqMan® PCR za polimorfizam rs11188059. Na slici A vidljiv je porast samo jedne fluorescentne boje (VIC®) kojom se otkriva prisutnost A nukleotida u rs11188059 što upućuje da je ispitivana osoba homozigot mutiranog oblika za ispitivani polimorfizam (A/A genotip). Na slici B vidljiv je porast obje boje (VIC® i FAM®) što ukazuje da je osoba heterozigot za ispitivani polimorfizam (G/A genotip). Ukoliko bi došlo do porasta fluorescencije samo FAM® boje, osoba bi bila homozigot divljeg tipa (G/G).



**Slika 13.** Analiza alelne diskriminacije TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu za rs1188059; crvene točke- *mut* homozigoti, zelene točke- heterozigoti, plave točke- *wt* homozigoti

### 3.3.3. Statistička analiza

Statistička obrada podataka dobivenih nakon očitavanja rezultata TaqMan® PCR metode provedena je uporabom programa za statističku analizu podataka JASP.

Kao mjera centralne tendencije korišteni su medijan i interkvartilni raspon, a kategoričke varijable iskazane su kao apsolutna frekvencija. Za određivanje razlika u kategoričkim varijablama korišten je  $\chi^2$  test.

## 4. Rezultati

Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb od 1.1.2021. do 31.3.2024. u skladu s Helsinškom deklaracijom te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta i KBC-a Zagreb. U studiju je uključeno 145 pacijenata koji su liječeni klopidogetrelom, a dio su veće kohorte projekta „Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova - PGx-CardioDrug“ (HRZZ-UIP-2020-02-8189). Rekrutirani ispitanici su uglavnom podrijetlom Hrvati, što je bitno imati na umu prilikom interpretacije rezultata s obzirom na spomenutu razliku u učestalosti polimorfizama između etničkih skupina. Podaci o dobi, spolu, uporabi klopidogetrela i nuspojavama prikupljeni su iz kliničke dokumentacije. Od ukupno 145 ispitanika, njih 88 čine žene, a 57 muškarci. Medijan dobi ispitanika je 64 godine, a interkvartilni raspon dobi je 24-85 godina. Istraživanje nije dizajnirano kao *case-control* studija, odnosno skupine nisu ujednačene po dobi i spolu niti su ti parametri bili isključni kriteriji. Pacijenti su praćeni do godinu dana od početka primanja terapije ili do kraja terapije ukoliko je trajala manje od godinu dana. Nuspojave su praćene putem nalaza iz kliničke dokumentacije pacijenata, odnosno otpusnih pisama, izvješća kardiologa ili neurologa. Antiagregacijska terapija i njena doza je praćena od početka terapije, pa do nuspojave ili zadnjeg *follow-upa*. Najčešće nuspojave koje su zabilježene su infarkt miokarda, stent tromboza, ishemijski udar. Takve nuspojave označavale su neučinkovitost terapije. Druga kategorija nuspojave je bilo krvarenje. Dok je od 145 ispitanika, njih 13 doživjelo neučinkovitost kao ADR, od 145 ispitanika njih 12 doživjelo je neki oblik krvarenja kao nuspojave (epistaksa, petehije, hematohezija i dr.) tj. 8.3 % ispitanika.

### 4.1. Distribucija genotipova i nuspojava

Rezultate koje smo dobili u ovom istraživanju statistički smo obradili  $\chi^2$  testom. Prvo je uspoređena neučinkovitost klopidogetrela ovisno o *CYP2C19\*2* i *CYP2C19\*17* genotipu, a njihov odnos je prikazan u tablicama 5, 6, 7 i 8. Analiza  $\chi^2$  testom pokazala je značajnu razliku u neučinkovitosti klopidogetrela u osoba koje su genotipizirane ako *CYP2C19\*2 het/mut* u odnosu na osobe koje su *CYP2C19\*2 wt*, što nam pokazuje p vrijednost koja je  $<0,05$  (točnije  $p=0,043$ ). Naspram tome, nije pokazana statistički značajna razlika u neučinkovitosti klopidogetrela kod osoba koje su genotipizirane kao *CYP2C19\*17 het/mut* u

odnosu na one genotipizirane kao *CYP2C19\*17 wt*. Od ukupno 145 pacijenata koji su genotipizirani na haplotip *CYP2C:TG*, njih 68 su bili nositelji tog haplotipa.

Prikaz omjera fenotipova dobivenih nakon genotipiziranja haplotipa *CYP2C* klastera prikazan je u tablici 9. Fenotipovi su dodijeljeni prema kriterijima prikazanim u tablici 10., koji su pokazani u studiji s podacima terapijskog praćenja sertralina (Bråten et al., 2022). Odnos krvarenja kao nuspojave u odnosu na fenotip prikazan je u tablici 11., a rezultati statističkog testiranja ovisnosti krvarenja kao nuspojave u odnosu na fenotip prikazani su u tablici br. 12.

**Tablica 5.** Odnos *CYP2C19\*2 wt i het/mut* te ADR neučinkovitosti

*CYP2C19\*2 WT (1) vs. HET/MUT (2)*

ADR neučinkovitost	2	1	Ukupno
1	6	7	13
0	28	104	132
Ukupno	34	111	145

**Tablica 6.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos *CYP2C19\*2 wt i het/mut* te ADR neučinkovitosti; df- stupnjevi slobode

	Vrijednost	df	p
$\chi^2$	4.101	1	0.043
N	145		

**Tablica 7.** Odnos *CYP2C19\*17 wt i het/mut* te ADR neučinkovitosti

*CYP2C19\*2 WT (1) vs. HET/MUT (2)*

ADR neučinkovitost	2	1	Ukupno
1	6	7	13
0	67	65	132
Ukupno	73	72	145



**Tablica 8.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos *CYP2C19\*17 wt i het/mut* te ADR neučinkovitosti; df-stupnjevi slobode

	Vrijednost	df	p
$\chi^2$	0,100	1	0,751
N	145		

**Tablica 9.** Omjer fenotipova dobivenih nakon genotipiziranja *CYP2C* klastera

UM	RM	NM	IM	PM
47	66	16	12	4

**Tablica 10.** Kriteriji prema kojima su genotipovi raspoređeni u fenotipove

NM	<i>CYP2C19*1/*1 (Ref.)</i>
UM	<i>CYP2C19*17/CYP2C19*17</i> <i>CYP2C:TG/CYP2C:TG</i> <i>CYP2C:TG/CYP2C19*17</i>
RM	<i>CYP2C19*1/CYP2C19*17</i> <i>CYP2C19*1/ CYP2C:TG</i>
IM	<i>CYP2C19*17/CYP2C19*2</i> <i>CYP2C:TG/CYP2C19*2</i> <i>CYP2C19*1/CYP2C19*2</i>
PM	<i>CYP2C19*2/CYP2C19*2</i>

**Tablica 11.** Odnos krvarenja kao nuspojave u odnosu na CYP2C19/CYP2C klaster fenotip

**CYP2C19/CYP2C klaster fenotip**

<b>ADR krvarenje</b>	<b>UM</b>	<b>RM</b>	<b>IM</b>	<b>NM</b>	<b>PM</b>	<b>Ukupno</b>
<b>1</b>	1	7	0	4	0	12
<b>0</b>	46	59	12	12	4	133
<b>Ukupno</b>	47	66	12	16	4	145

**Tablica 12.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos krvarenja kao nuspojave u odnosu na CYP2C19/CYP2C klaster fenotip; df-stupnjevi slobode

	<b>Vrijednost</b>	<b>df</b>	<b>p</b>
$\chi^2$	10,152	4	0,038
<b>N</b>	145		

## 5. Rasprava

Cilj ovog rada bio je istražiti potencijalnu povezanost polimorfizama gena *CYP2C19* (rs4244285 i rs12248560) i *CYP2C* (rs2860840 i rs11188059) s pojavom nuspojave krvarenja ili neučinkovitosti lijeka klopidogrela. Genotipizirano je 145 pacijenata, a kod 13 njih je pokazana neučinkovitost, dok je njih 12 imalo krvarenje kao nuspojavu liječenja klopidogrelom.

Većina studija koje su proučavale povezanost polimorfizma *CYP2C19* i klopidogrela dokazale su smanjenu koncentraciju aktivnog metabolita i veću trombocitnu aktivnost kod pacijenata koji su genotipizirani kao *CYP2C19* IM i PM u odnosu na NM. Upravo zato je FDA ažurirala obavijesti na kutiji klopidogrela (eng. *box warning*) upozoravajući na smanjenu učinkovitost klopidogrela u pacijenata koji su PM (Lee et al., 2022). U velikoj meta analizi koju si izveli Mega i suradnici (Mega et al., 2010) pokazano je da pacijenti koji idu na perkutanu koronarnu intervenciju te su PM ili IM imaju veći rizik razvoja velikih neželjenih kardiovaskularnih događaja (eng. *major adverse cardiovascular events, MACE*) i tromboze u usporedbi sa *CYP2C19* NM. U usporedbi s osobama koje nisu nositelji *CYP2C19* (*wt*) postoji statistički značajni rizik kardiovaskularne smrti, infarkta miokarda ili moždanog udara u 26,3 % ukupne ispitivane populacije koji su nositelji samo jednog nefunkcionalnog alela *CYP2C19*. Time su zaključili da genetički podaci o *CYP2C19* identificiraju otprilike 30 % populacije za koje postoji manja vjerojatnost da će biti zaštićeni od ponovljenih ishemijskih događaja nakon perkutane koronarne intervencije unatoč liječenju standardnom dozom klopidogrela. Osim kod pacijenata koji su bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji, pacijenti liječeni klopidogrelom zbog ishemijskog moždanog udara ili TIA-e te koji su genotipizirani kao *CYP2C19*\*2, \*3 ili \*8 heterozigoti (IM) ili homozigoti (PM) imali su povećani rizik od kompozitnih vaskularnih događaja (moždani udar ili vaskularna smrt) u usporedbi s pacijentima koje nisu nositelji tih varijantnih alela (Pan et al., 2017).

Iako ima mnogo studija koje potkrepljuju povezanost UM/RM i smanjenog odgovora na klopidogrel, povezanost \*17 alela s krvarenjem i ishemijskim ishodima kod pacijenata liječenih klopidogrelom još uvijek nije dokazana dovoljnom snagom dokaza kako bi ušla u CPIC smjernice (Lee et al., 2022). U jednoj studiji Lee i suradnici (Lee et al., 2021) istražili su utjecaj *CYP2C19*\*17 alela na ishod genotipom vođene antiagregacijske terapije nakon

perkutane koronarne intervencije. Rezultati koje su dobili pokazuju kako pacijenti koji su PM ili IM imaju veći rizik od aterotrombotskih događaja od onih koji su NM ( $p=0,003$ ). Ti podaci se i slažu s POPular Genetics i TAILOR studijama. U POPular Genetics studiji pokazano je kako je korištenje genotipom vođene terapije klopidogetrelom kod pacijenata koji su bili podvrgnuti perkutanoj koronarnoj intervenciji te koji nisu IM/PM i propisivanje terapije tikagrelorom/prasugrelom kod pacijenata koji jesu IM/PM rezultiralo manjim brojem nuspojava i smanjenjem rizika od krvarenja (Claassens et al., 2019). U studiji Lee i suradnika (2021.) nije dokazana razlika u riziku za trombotske događaje između UM/RM i NM ( $p=0,808$ ). Također nije bilo razlike u krvarenjima između UM/RM i NM niti između UM i RM.

Naši rezultati slažu se s onima koje su dobili Lee i suradnici (2021). Naime, čak 6 osoba koje su genotipizirane kao *CYP2C19\*2 het/mut* doživjelo je neki oblik neučinkovitosti ( $p=0,078$ ). Time možemo zaključiti da postoji statistički značajna razlika između osoba koje su PM/IM i NM i razvoja nekog oblika neučinkovitosti. Naspram tome, nismo utvrdili značajnu razliku između UM/RM i NM i neučinkovitosti klopidogetrela ( $p=0,780$ ). Također, nije bilo statistički značajne razlike u krvarenjima između UM/RM i NM ( $p=0,078$ ).

Iako je studija koju su proveli Sibbing i suradnici (2010) pokazala kako nositelji alela *CYP2C19\*17* imaju povećan odgovor na klopidogetrel i veći rizik od krvarenja (Sibbing et al., 2010), ova studija nije uzela u obzir neuravnoteženu povezanost \*2 i \*17 alela i podešavanje prisutnosti \*2 alela, koja se u kasnijim studijama pokazala značajnom. Budući da se alel povećane funkcije, alel T, od \*17 pojavljuje u istom haplotipu kao i normalni funkcionalni G alel od \*2, smatra se da je opažena povezanost alela \*17 s odgovorom na klopidogetrel posljedica nepostojanja alela bez funkcije \*2, a ne zbog same prisutnosti alela povećane funkcije \*17 (Lewis et al., 2013).

*CYP2C19\*17* (rs12248560) dovodi do povećane aktivnosti enzima *CYP2C19*, no ova varijanta objašnjava samo dio pacijenata kojima je metabolizam ubrzan. Prema Bråten i suradnicima (2021.), čak 20 % pacijenata koji su genotipizirani *CYP2C19\*1/\*1* poprimaju vrijednosti koncentracija escitaloprama sličnima ili istima kao osobe genotipizirane *CYP2C19\*17/\*17* ili *\*1/\*17*. Relativno nedavno otkriven je novi haplotip *CYP2C:TG* za koji se smatra da ubrzava metabolizam onih pacijenata genotipiziranih kao *\*1/\*1*. Frekvencija *CYP2C:TG* haplotipa je prema studiji Bråten i suradnika (2021) jednaka kao *CYP2C19\*17* te je učestalost alela povećane funkcije čak 40 %. Heterozigoti i homozigoti

*CYP2C:TG* su prema toj studiji povezani čak 16,7 % odnosno 24,8 % s nižim vrijednostima escitaloprama. Iako je točan mehanizam iza ovog efekta još nepoznat, Bråten i sur. (Bråten et al., 2021) smatraju kako bi se trebao uzeti u obzir prilikom propisivanja doze lijeka.

Nakon genotipiziranja pacijenata za potrebe ovog rada, od ukupnog broja pacijenata pokazalo se da su njih 68 nositelji *CYP2C:TG* haplotipa, dok je 76 osoba preostalih haplotipova (*TA*, *CG*).

U ovoj studiji nakon uzimanja u obzir *CYP2C:TG* haplotipa i njegov mogući učinak na ubrzanje metabolizma, dobiveno je da je čak 77,9 % pacijenata RM ili UM.

Nakon uzimanja u obzir novog haplotipa nije pokazana ni statistički značajna razlika između fenotipova i pojave krvarenja ili neučinkovitosti liječenja klopidogrelom. Također, nije pokazana ni statistički značajna razlika između UM /RM i ostalih fenotipova.

Ovi rezultati slažu se s radom Zubiar i suradnika (2023) koji su u svom radu procijenili utjecaj haplotipa *CYP2C:TG* na farmakokinetičku varijabilnost šest supstrata te aktivnost *CYP2C18* i *CYP2C19* proteina u uzorcima ljudskih jetara *in vitro*. Njihovo istraživanje nije rezultiralo nikakvom povezanošću *CYP2C:TG* haplotipa i aktivnosti *CYP2C19* proteina.

Kee i suradnici (2022) su u jednoj studiji ispitali neučinkovitost omeprazola kod osoba s GERD-om (eng. *gastroesophageal reflux disease*) i povezanost sa novootkrivenim *CYP2C* lokusom. Oni su uvidjeli istovremenu prisutnost nefunkcionalnih alela *CYP2C19* (*CYP2C19\*2*, *CYP2C19\*4*) s varijantama koje pojačavaju aktivnost (*CYP2C19\*17*, *CYP2C:TG*). Budući da CPIC predlaže intermedijarni fenotip kod simultane detekcije *CYP2C19\*2* i *CYP2C19\*17* zbog dominantnog efekta nefunkcionalnog alela, smatraju da je upravo prisutnost nefunkcionalnog alela zajedno sa *CYP2C19\*17* i *CYP2C:TG* dovela do neznačajnih rezultata njihove studije.

Osim povezanosti *CYP2C:TG* haplotipa, Bråten i suradnici (2021), a potom Kee i suradnici (2022) dokazali su kako su *CYP2C19\*17* i "T" alel SNP-a rs2860840 međusobno isključivi.

Iako se još ne zna sama uloga *CYP2C:TG* haplotipa moguće su za sada dvije opcije: a) *CYP2C18* je eksprimiran u jetrama u niskim razinama i nadopunjuje metabolički kapacitet povezan s *CYP2C19*, pri čemu ovaj učinak ovisi o haplotipu *CYP2C:TG*, i (b) haplotip *CYP2C:TG* utječe na razine ekspresije *CYP2C19* čime se povećava aktivnost kroz jedan ili više još neidentificiranih regulatornih mehanizama (Zubiar et al., 2023). *CYP2C:TG* haplotip nalazi se u području *CYP2C18* gena, gena koji nije dovoljno istražen budući da su Läßle i

suradnici (2003) u istraživanju provedenom prije dvadeset i jednu godinu o različitoj ekspresiji i funkciji CYP2C izoformi u jetri i crijevima zaključili kako ovaj protein nije ekspimiran. Postoji mogućnost da varijante poput *CYP2C19\*17* alela mogu utjecati na ekspresiju CYP2C18 proteina. Povećanje aktivnosti CYP2C19 i CYP2C18 proteina moglo bi doprinijeti povećanoj funkciji alela *CYP2C19\*17*. Iako genetička varijabilnost *CYP2C18* nije istražena, zbog velike polimorfnosti *CYP2C8*, *CYP2C9* i *CYP2C19*, moglo bi se zaključiti kako je i *CYP2C18* isto polimorfan te bi i njegova aktivnost mogla varirati (Zubiaur & Gaedigk, 2022).

Ukoliko bi haplotip *CYP2C:TG* bio povezan sa ubrzanim metabolizmom lijekova koji se metaboliziraju putem CYP2C19, mogli bi zaključiti da će isto tako utjecati na metabolizam klopidogrela. Budući da se klopidogrel aktivira većim dijelom preko tog enzima, to bi značilo povećanu koncentraciju klopidogrela kod pacijenata koji imaju ovaj haplotip. Povećana koncentracija klopidogrela dovodi takve pacijente u veći rizik od razvoja nuspojava. Ovaj rad nije uspio potvrditi povezanost nuspojava ili neučinkovitosti sa novootkrivenih haplotipom. Treba naravno imati na umu ograničenja ovog eksperimenta. Broj pacijenata u ovoj studiji je bio relativno mali. Zbog malog broja pacijenata i neželjenih događaja, statistička snaga je bila ograničena. Također, budući da su podaci o nuspojavama uzeti iz kliničkih nalaza i otpusnih pisama treba imati na umu da neke nuspojave, poput manjih krvarenja, nisu ni zabilježene. Uzimanje terapije ovisilo je u potpunosti o pacijentu te postoji mogućnost da pacijent nije uzimao važeću terapiju prema danim uputama što je moglo dovesti do nuspojava. Starija dob, indeks tjelesne mase, kronična bubrežna bolest i dijabetes mellitus povezani su s većom ostatnom agregacijom trombocita. Osim toga, ovaj rad nije uzeo u obzir komedikaciju koju je pacijent primao, a možda ima utjecaj na ishod. Prije svega, tu su uključeni inhibitori i induktori CYP2C19 enzima. Ovaj enzim odgovoran je za metabolizam velikog broja ksenobiotika, uključujući inhibitore protonske pumpe i neke antidepressive koji mogu utjecati na liječenje klopidogrelom. Komedikacija je značajna uzimajući u obzir prosječnu dob ispitanika, budući da kod osoba starije životne dobi postoji više komorbiditeta.

Ovaj rad nije istražio samu farmakokinetiku i farmakodinamiku klopidogrela ili odgovora na dozu te je stoga limitiran manjkom izravnog mehaničkog uvida u promatrane kliničke ishode. Budući da su genotipizirani samo \*2, \*17 i *CYP2C:TG* haplotip moguće je da su nam promakli pacijenti koji također imaju nefunkcionalne alele (npr. \*3, \*4). Također,

procijenjen je učinak samo jednog enzima, a nisu uzeti u obzir i drugi CYP enzimi koji sudjeluju u aktivaciji klopidogrela, kao ni CES1 enzim koji je važan u inaktivaciji.

Optimalna individualizirana antiagregacijska terapija trebala bi maksimizirati korist smanjenjem rizika od kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih događaja uz minimaliziranje štetnih učinaka, poput krvarenja. Još uvijek, nažalost, postoji premalo studija koje dokazuju učinak ovakvog pristupa liječenju. Iako je klopidogrel i dalje najpropisivaniji P2Y<sub>12</sub> inhibitor, povezan je s puno kardiovaskularnih događaja u pacijenata koji nose nefunkcionalne alele. Suprotno tome, tikagrelor i prasugrel moguća su alternativna terapija, no i oni imaju svoje rizike. Za razliku od klopidogrela, genotip *CYP2C19* nije utjecao na farmakokinetiku, antiagregacijski učinak ili kliničku učinkovitost prasugrela ili tikagrelora. Međutim, prasugrel i tikagrelor također su imali veći rizik od krvarenja i cijenu u usporedbi s klopidogrelom koji je, uz dispneju povezanu s tikagrelorom i potrebu za doziranjem dva puta dnevno, bio povezan s višim stopama prekida. Dodatno na izbor lijeka igra ulogu i trošak liječenja. Tikagrelor i prasugrel su skuplji od klopidogrela. Budući da dvije trećine pacijenata mogu biti tretirane klopidogrelom bez gubitka učinka antiagregacijske terapije može se reći da je takva terapija isplativa. U kliničkoj praksi važno je izvagati rizik tromboza i krvarenja i izabrati optimalnu terapijsku strategiju za svakog pacijenta posebno.

## 6. Zaključak

O važnosti *CYP2C19* govori sve veći broj radova koji istražuju njegove polimorfizme, povezanost s mnogim lijekovima i drugim ksenobioticima i važnost njegovog genotipiziranja. Već je spomenuto kako je do sad otkriveno preko 39 haplotipova ovog gena, ali vidimo kako ni tu nije kraj.

Uzimajući u obzir i fenotipsku podjelu uključujući i novi haplotip *CYP2C:TG*, u ovom radu nismo dobili statistički značajnu razliku u udjelu neučinkovitosti ili krvarenja između grupa. Ovi podaci u konačnici pokazuju kako *CYP2C19\*17* te haplotip *CYP2C:TG* nemaju značajan utjecaj na antiagregacijsku terapiju. Naspram tome, pokazali smo kako *CYP2C19\*2* ima utjecaj na razvoj nuspojava i time moguću korist genotipom vođene antiagregacijske terapije.

Ovaj rad nije uspio pokazati povezanost novootkrivenog haplotipa s neučinkovitošću liječenja klopidogetrelom, no potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika. Važno je uvidjeti kako je i ovaj rad, kao i mnogo drugih, utvrdio moguću povezanost *CYP2C19\*2* polimorfizma s neučinkovitošću terapije. Genotipom vođena antiagregacijska terapija se još uvijek primjenjuje samo u studijama, no sve je veći broj radova koji ukazuju na njenu korist. Farmakogenetiku možemo smatrati jednim od puteva ka personaliziranom liječenju. Farmakogenetičko testiranje, kao i sama farmakogenetika još je relativno novo te skupo i bit će potrebno mnogo istraživanja kako bi se ukazala korist ovakvog pristupa liječenja. No, već i sada se ovakav pristup koristi kod nekih skupih lijekova, pogotovo kod pametnih lijekova, gdje je isplativije prvo genotipizirati, nego propisati lijek bez prethodne genotipizacije. Iako je klopidogetrel široko primijenjen lijek, još uvijek genotipiziranje prije propisivanja lijeka pacijentu nije često u kliničkoj praksi.

Genetičko testiranje je važno, no treba imati na umu i utjecaj okolišnih čimbenika na ekspresiju gena. Puno je faktora koji igraju ulogu u metabolizmu jednog lijeka, od dobi, spola i osobnih navika, pa sve do enzima i njihovih genetičkih mutacija. Zato je važno uzeti sve u obzir i nikad ne promatrati samo jednu posebnu sastavnicu.



## 7. Popis kratica, oznaka i simbola

5-HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina (eng. <i>5-hydroxyindoleacetic acid</i> )
5-HT	5-hidroksitriptamin
ADME	procesi apsorpcije, distribucije, metabolizma i eliminacije
ADP	adenozin difosfat (eng. <i>adenosine diphosphate</i> )
ADR	Neželjene reakcije na lijekove (eng. <i>Adverse Drug reactions</i> )
CES1	karboksilesteraza 1 (eng. <i>carboxylesterase 1</i> )
CNV	varijante u broju kopija (eng. <i>copy number variants</i> )
CPIC	Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (eng. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i> )
CYP	citokrom P450 (eng. <i>cytochrome P450</i> )
DAPT	dvojna antiagregacijska terapija (eng. <i>dual antiplatelet therapy</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat (eng. <i>deoxyribonucleotide triphosphate</i> )
dsDNA	dvolančana DNA (eng. <i>double-stranded DNA</i> )
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (eng. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
FDA	Američka Agencija za hranu i lijekove (eng. <i>Food and Drug Administration</i> )
FRET	fluorescentni rezonantni prijenos energije (eng. <i>fluorescence energy resonance transfer</i> )
het	heterogeni
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A
IM	intermedijarni metabolizator (eng. <i>intermediate metabolizer</i> )
IPP	inhibitori protonske pumpe (eng. <i>proton pump inhibitors</i> )
MAOA	monoaminooksidaza A
mRNA	glasnička RNA (eng. <i>Messenger RNA</i> )

mut	mutirani
NM	normalni metabolizator (eng. <i>normal metabolizer</i> )
OD	optička gustoća (eng. <i>optical density</i> )
PCR	lančana reakcija polimerazom (eng. <i>polymerase chain reaction</i> )
PKA	protein kinaza A
PM	spori metabolizator (eng. <i>poor metabolizer</i> )
qPCR	kvantitativni PCR (eng. <i>quantitative PCR</i> )
RM	brzi metabolizator (eng. <i>rapid metabolizer</i> )
RNA	ribonukleinska kiselina
rs	referentni SNP broj
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (eng. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
ssDNA	jednolančana DNA (eng. <i>single-stranded DNA</i> )
SSRI	selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (eng. <i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> )
TIA	mali moždani udar (eng. <i>transient ischaemic attack</i> )
UM	vrlo brzi metabolizator (eng. <i>ultrarapid metabolizer</i> )
VASP	vazodilatatorom stimulirani fosfoprotein (eng. <i>vasodilator-stimulated phosphoprotein</i> )
wt	divlji tip (eng. <i>wild-type</i> )

## 8. Literatura

- Adedoyin, A., Arns, P. A., Richards, W. O., Wilkinson, G. R., & Branch, R. A. (1998). Selective effect of liver disease on the activities of specific metabolizing enzymes: Investigation of cytochromes P450 2C19 and 2D6. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *64*(1), 8–17. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(98\)90017-0](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(98)90017-0)
- Ahmed, A., & Clarke, J. O. (2024). Proton Pump Inhibitors (IPP). In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557385/>
- Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K., & Silverman, G. J. (2007). Quantitation of DNA and RNA. *CSH Protocols*, *2007*, pdb.ip47. <https://doi.org/10.1101/pdb.ip47>
- Botton, M. R., Whirl-Carrillo, M., Del Tredici, A. L., Sangkuhl, K., Cavallari, L. H., Agúndez, J. A. G., Duconge, J., Lee, M. T. M., Woodahl, E. L., Claudio-Campos, K., Daly, A. K., Klein, T. E., Pratt, V. M., Scott, S. A., & Gaedigk, A. (2021). PharmVar GeneFocus: CYP2C19. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *109*(2), 352–366. <https://doi.org/10.1002/cpt.1973>
- Bousman, C. A., Stevenson, J. M., Ramsey, L. B., Sangkuhl, K., Hicks, J. K., Strawn, J. R., Singh, A. B., Rúaño, G., Mueller, D. J., Tsermpini, E. E., Brown, J. T., Bell, G. C., Leeder, J. S., Gaedigk, A., Scott, S. A., Klein, T. E., Caudle, K. E., & Bishop, J. R. (2023). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6, SLC6A4, and HTR2A Genotypes and Serotonin Reuptake Inhibitor Antidepressants. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *114*(1), 51–68. <https://doi.org/10.1002/cpt.2903>
- Božina, N., Šarac, H., & Ante, T. (2019). *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini*. <https://www.bib.irb.hr:8443/1263392>

- Bråten, L. S., Haslemo, T., Jukic, M. M., Ivanov, M., Ingelman-Sundberg, M., Molden, E., & Kringen, M. K. (2021). A Novel CYP2C-Haplotype Associated With Ultrarapid Metabolism of Escitalopram. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, *110*(3), 786–793. <https://doi.org/10.1002/cpt.2233>
- Bråten, L. S., Ingelman-Sundberg, M., Jukic, M. M., Molden, E., & Kringen, M. K. (2022). Impact of the novel CYP2C: TG haplotype and CYP2B6 variants on sertraline exposure in a large patient population. *Clinical and Translational Science*, *15*(9), 2135–2145. <https://doi.org/10.1111/cts.13347>
- Cacabelos, R., Cacabelos, N., & Carril, J. C. (2019). The role of pharmacogenomics in adverse drug reactions. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *12*(5), 407–442. <https://doi.org/10.1080/17512433.2019.1597706>
- Castrichini, M., Luzum, J. A., & Pereira, N. (2023). Pharmacogenetics of Antiplatelet Therapy. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *63*, 211–229. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051921-092701>
- Caudle, K. E., Dunnenberger, H. M., Freimuth, R. R., Peterson, J. F., Burlison, J. D., Whirl-Carrillo, M., Scott, S. A., Rehm, H. L., Williams, M. S., Klein, T. E., Relling, M. V., & Hoffman, J. M. (2017). Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: Consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, *19*(2), 215–223. <https://doi.org/10.1038/gim.2016.87>
- Chen, Y., & Goldstein, J. A. (2009). The transcriptional regulation of the human CYP2C genes. *Current Drug Metabolism*, *10*(6), 567–578.
- Cheungpasitporn, W., Thongprayoon, C., Kittanamongkolchai, W., Srivali, N., Edmonds, P. J., Ungprasert, P., O’Corragain, O. A., Korpaisarn, S., & Erickson, S. B. (2015).

Proton pump inhibitors linked to hypomagnesemia: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Renal Failure*, 37(7), 1237–1241. <https://doi.org/10.3109/0886022X.2015.1057800>

Claassens, D. M. F., Vos, G. J. A., Bergmeijer, T. O., Hermanides, R. S., van 't Hof, A. W. J., van der Harst, P., Barbato, E., Morisco, C., Tjon Joe Gin, R. M., Asselbergs, F. W., Mosterd, A., Herrman, J.-P. R., Dewilde, W. J. M., Janssen, P. W. A., Kelder, J. C., Postma, M. J., de Boer, A., Boersma, C., Deneer, V. H. M., & Ten Berg, J. M. (2019). A Genotype-Guided Strategy for Oral P2Y12 Inhibitors in Primary PCI. *The New England Journal of Medicine*, 381(17), 1621–1631. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1907096>

Cvek, J. (2011). Interakcije biljnih s konvencionalnim lijekovima. *Kemija u industriji : Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 60(6), 343–349.

Dymond, J. S. (2013). Explanatory chapter: Quantitative PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 279–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>

El Rouby, N., Lima, J. J., & Johnson, J. A. (2018). Proton pump inhibitors: From CYP2C19 pharmacogenetics to precision medicine. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(4), 447–460. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1461835>

El-Serag, H., Becher, A., & Jones, R. (2010). Systematic review: Persistent reflux symptoms on proton pump inhibitor therapy in primary care and community studies. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 32(6), 720–737. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04406.x>

Furuta, T., Ohashi, K., Kosuge, K., Zhao, X. J., Takashima, M., Kimura, M., Nishimoto, M., Hanai, H., Kaneko, E., & Ishizaki, T. (1999). CYP2C19 genotype status and effect

- of omeprazole on intragastric pH in humans. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 65(5), 552–561. [https://doi.org/10.1016/S0009-9236\(99\)70075-5](https://doi.org/10.1016/S0009-9236(99)70075-5)
- Furuta, T., Shirai, N., Kodaira, M., Sugimoto, M., Nogaki, A., Kuriyama, S., Iwaizumi, M., Yamade, M., Terakawa, I., Ohashi, K., Ishizaki, T., & Hishida, A. (2007). Pharmacogenomics-based tailored versus standard therapeutic regimen for eradication of *H. pylori*. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 81(4), 521–528. <https://doi.org/10.1038/sj.clpt.6100043>
- Furuta, T., Shirai, N., Xiao, F., Ohashi, K., & Ishizaki, T. (2001). Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450C19. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 70(5), 484–492. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.119721>
- Grogan, S., & Preuss, C. V. (2024). Pharmacokinetics. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557744/>
- Guengerich, F. P., Wilkey, C. J., & Phan, T. T. N. (2019). Human cytochrome P450 enzymes bind drugs and other substrates mainly through conformational-selection modes. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(28), 10928–10941. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009305>
- Hägg, S., Spigset, O., & Dahlqvist, R. (2001). Influence of gender and oral contraceptives on CYP2D6 and CYP2C19 activity in healthy volunteers. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 51(2), 169–173. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2001.01328.x>
- Hung, R. J., Boffetta, P., Brockmüller, J., Butkiewicz, D., Cascorbi, I., Clapper, M. L., Garte, S., Haugen, A., Hirvonen, A., Anttila, S., Kalina, I., Le Marchand, L., London, S. J., Rannug, A., Romkes, M., Salagovic, J., Schoket, B., Gaspari, L., & Taioli, E. (2003). CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-

- smokers: A pooled analysis. *Carcinogenesis*, 24(5), 875–882.  
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgg026>
- Jiang, X.-L., Samant, S., Lesko, L. J., & Schmidt, S. (2015). Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel. *Clinical Pharmacokinetics*, 54(2), 147–166.  
<https://doi.org/10.1007/s40262-014-0230-6>
- Kee, P. S., Maggo, S. D. S., Kennedy, M. A., Barclay, M. L., Miller, A. L., Lehnert, K., Curtis, M. A., Faull, R. L. M., Parker, R., & Chin, P. K. L. (2022). Omeprazole Treatment Failure in Gastroesophageal Reflux Disease and Genetic Variation at the CYP2C Locus. *Frontiers in Genetics*, 13, 869160.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2022.869160>
- Koopmans, A. B., Braakman, M. H., Vinkers, D. J., Hoek, H. W., & van Harten, P. N. (2021). Meta-analysis of probability estimates of worldwide variation of CYP2D6 and CYP2C19. *Translational Psychiatry*, 11(1), 141.  
<https://doi.org/10.1038/s41398-020-01129-1>
- Krämer, S. D., & Testa, B. (2009). The Biochemistry of Drug Metabolism – An Introduction. *Chemistry & Biodiversity*, 6(7), 1144–1144.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200990008>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A., & Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 95–125.  
<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Lee, C. R., Luzum, J. A., Sangkuhl, K., Gammal, R. S., Sabatine, M. S., Stein, C. M., Kisor, D. F., Limdi, N. A., Lee, Y. M., Scott, S. A., Hulot, J.-S., Roden, D. M., Gaedigk, A., Caudle, K. E., Klein, T. E., Johnson, J. A., & Shuldiner, A. R. (2022). Clinical

Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2022 Update. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 112(5), 959–967. <https://doi.org/10.1002/cpt.2526>

- Lee, C. R., Thomas, C. D., Beitelshes, A. L., Tuteja, S., Empey, P. E., Lee, J. C., Limdi, N. A., Duarte, J. D., Skaar, T. C., Chen, Y., Cook, K. J., Coons, J. C., Dillon, C., Franchi, F., Giri, J., Gong, Y., Kreutz, R. P., McDonough, C. W., Stevenson, J. M., ... IGNITE Network Pharmacogenetics Working Group. (2021). Impact of the CYP2C19\*17 Allele on Outcomes in Patients Receiving Genotype-Guided Antiplatelet Therapy After Percutaneous Coronary Intervention. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 109(3), 705–715. <https://doi.org/10.1002/cpt.2039>
- Lewis, J., Stephens, S., Horenstein, R., O'Connell, J., Ryan, K., Peer, C., Figg, W.D., Spencer, S., Pacanowski, M., Mitchell, B., & Shuldiner, A. (2013). The CYP2C19\*17 Variant is not Independently Associated with Clopidogrel Response. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 11(9), 1640–1646. <https://doi.org/10.1111/jth.12342>
- Lima, J. J., Thomas, C. D., Barbarino, J., Desta, Z., Van Driest, S. L., El Rouby, N., Johnson, J. A., Cavallari, L. H., Shakhnovich, V., Thacker, D. L., Scott, S. A., Schwab, M., Uppugunduri, C. R. S., Formea, C. M., Franciosi, J. P., Sangkuhl, K., Gaedigk, A., Klein, T. E., Gammal, R. S., & Furuta, T. (2021). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C19 and Proton Pump Inhibitor Dosing. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 109(6), 1417–1423. <https://doi.org/10.1002/cpt.2015>
- Martínez, M. M., Cerpa, L. C., Varela, N. M., & Quiñones, L. A. (2021). Pharmacokinetic Polymorphisms. In *The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on*



*Biopharmacy and Pharmacokinetics* (pp. 1–9). Springer International Publishing.

[https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5\\_126-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_126-1)

- Mega, J. L., Simon, T., Collet, J.-P., Anderson, J. L., Antman, E. M., Bliden, K., Cannon, C. P., Danchin, N., Giusti, B., Gurbel, P., Horne, B. D., Hulot, J.-S., Kastrati, A., Montalescot, G., Neumann, F.-J., Shen, L., Sibbing, D., Steg, P. G., Trenk, D., ... Sabatine, M. S. (2010). Reduced-function CYP2C19 genotype and risk of adverse clinical outcomes among patients treated with clopidogrel predominantly for PCI: A meta-analysis. *JAMA*, *304*(16), 1821–1830. <https://doi.org/10.1001/jama.2010.1543>
- Meyer, U. A. (1996). Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, *24*(5), 449–459. <https://doi.org/10.1007/BF02353473>
- Moriyama, B., Obeng, A. O., Barbarino, J., Penzak, S. R., Henning, S. A., Scott, S. A., Agúndez, J., Wingard, J. R., McLeod, H. L., Klein, T. E., Cross, S. J., Caudle, K. E., & Walsh, T. J. (2017). Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP2C19 and Voriconazole Therapy. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *102*(1), 45–51. <https://doi.org/10.1002/cpt.583>
- Obeng, A. O., Egelund, E. F., Alsultan, A., Peloquin, C. A., & Johnson, J. A. (2014). CYP2C19 Polymorphisms and Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole: Are We Ready for Clinical Implementation of Pharmacogenomics? *Pharmacotherapy*, *34*(7), 703–718. <https://doi.org/10.1002/phar.1400>
- Pan, Y., Chen, W., Xu, Y., Yi, X., Han, Y., Yang, Q., Li, X., Huang, L., Johnston, S. C., Zhao, X., Liu, L., Zhang, Q., Wang, G., Wang, Y., & Wang, Y. (2017). Genetic Polymorphisms and Clopidogrel Efficacy for Acute Ischemic Stroke or Transient

- Ischemic Attack: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, 135(1), 21–33. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024913>
- Patti, G., Micieli, G., Cimminiello, C., & Bolognese, L. (2020). The Role of Clopidogrel in 2020: A Reappraisal. *Cardiovascular Therapeutics*, 2020, 8703627. <https://doi.org/10.1155/2020/8703627>
- Pirmohamed, M. (2014). Personalized pharmacogenomics: Predicting efficacy and adverse drug reactions. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15, 349–370. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090413-025419>
- Rifai, N. (2017). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - E-Book: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics - E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Roden, D. M., McLeod, H. L., Relling, M. V., Williams, M. S., Mensah, G. A., Peterson, J. F., & Van Driest, S. L. (2019). Pharmacogenomics. *Lancet (London, England)*, 394(10197), 521–532. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31276-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31276-0)
- Sarafoff, N., A. Byrne, R., & Sibbing, D. (2012). Clinical Use of Clopidogrel. *Current Pharmaceutical Design*, 18(33), 5224–5239. <https://doi.org/10.2174/138161212803251853>
- Scott, S. A., Sangkuhl, K., Shuldiner, A. R., Hulot, J.-S., Thorn, C. F., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2012). PharmGKB summary: Very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22(2), 159–165. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e32834d4962>

- Shin, J. M., & Kim, N. (2013). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *Journal of Neurogastroenterology and Motility*, *19*(1), 25–35.  
<https://doi.org/10.5056/jnm.2013.19.1.25>
- Sibbing, D., Koch, W., Gebhard, D., Schuster, T., Braun, S., Stegherr, J., Morath, T., Schömig, A., von Beckerath, N., & Kastrati, A. (2010). Cytochrome 2C19\*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation*, *121*(4), 512–518.  
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.885194>
- Sienkiewicz-Oleszkiewicz, B., & Wiela-Hojeńska, A. (2018). CYP2C19 polymorphism in relation to the pharmacotherapy optimization of commonly used drugs. *Die Pharmazie*, *73*(11), 619–624. <https://doi.org/10.1691/ph.2018.8689>
- Strumila, R., Lengvenyte, A., Ambrozaityte, L., Balkeliene, D., Utkus, A., & Dlugauskas, E. (2021). CYP2C19 polymorphisms are associated with severity of depression at initial evaluation and after the treatment independently of the prescribed medications: 4 weeks prospective study. *Psychiatric Genetics*, *31*(5), 177–185.  
<https://doi.org/10.1097/YPG.0000000000000287>
- Tasnif, Y., Morado, J., & Hebert, M. F. (2016). Pregnancy-related pharmacokinetic changes. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *100*(1), 53–62.  
<https://doi.org/10.1002/cpt.382>
- Testa, B., & Krämer, S. D. (2007). The biochemistry of drug metabolism--an introduction: Part 2. Redox reactions and their enzymes. *Chemistry & Biodiversity*, *4*(3), 257–405.  
<https://doi.org/10.1002/cbdv.200790032>

- Theuretzbacher, U., Ihle, F., & Derendorf, H. (2006). Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clinical Pharmacokinetics*, 45(7), 649–663. <https://doi.org/10.2165/00003088-200645070-00002>
- Volpi-Abadie, J., Kaye, A. M., & Kaye, A. D. (2013). Serotonin Syndrome. *The Ochsner Journal*, 13(4), 533–540.
- Zanger, U. M., & Schwab, M. (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacology & Therapeutics*, 138(1), 103–141. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.12.007>
- Zhang, Y., Klein, K., Sugathan, A., Nassery, N., Dombkowski, A., Zanger, U. M., & Waxman, D. J. (2011). Transcriptional profiling of human liver identifies sex-biased genes associated with polygenic dyslipidemia and coronary artery disease. *PLoS One*, 6(8), e23506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023506>
- Zubiaur, P., Soria-Chacartegui, P., Boone, E. C., Prasad, B., Dinh, J., Wang, W. Y., Zugbi, S., Rodríguez-Lopez, A., González-Iglesias, E., Leeder, J. S., Abad-Santos, F., & Gaedigk, A. (2023). Impact of CYP2C: TG Haplotype on CYP2C19 Substrates Clearance In Vivo, Protein Content, and In Vitro Activity. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 114(5), 1033–1042. <https://doi.org/10.1002/cpt.3012>

## 9. Sažetak

Zbog velike pojavnosti kardiovaskularnih bolesti, klopidogrel je često propisivan lijek. Kao i kod svakog lijeka važno je pogoditi optimalnu dozu kako pacijent ne bi bio poddoziran i tako imao povećan rizik od razvoja nuspojava poput moždanog udara i infarkta miokarda. No, isto tako može doći i to predoziranja i time rizika od krvarenja. Budući da je klopidogrel prolijek, kako bi ispoljio svoj učinak mora se aktivirati. Jedan od važnijih enzima koji sudjeluje u aktivaciji je enzim CYP2C19. Ovaj enzim je važan za metabolizam više od 30 lijekova te je njegova polimorfnost povezana s velikim interindividualnim varijacijama u terapijskom odgovoru. Novije studije pokazale su mogući utjecaj novog haplotipa *CYP2C:TG* na aktivnost enzima CYP2C19 i posljedično brzinu aktivacije klopidogrela. U ovom radu ispitivana je povezanost polimorfizama gena *CYP2C19* (rs4244285 i rs12248560) i *CYP2C* (rs2860840 i rs 11188059) s nuspojavama krvarenja ili neučinkovitosti klopidogrela. Genotipizirano je 145 ispitanika koji su primali klopidogrel kao dio terapije različitih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti. Genotipizacija je učinjena metodom TaqMan®. Pokazana je statistički značajna povezanost između nefunkcionalnog alela (*CYP2C19\*2*) i neučinkovitosti klopidogrela ( $p=0,043$ ), što se slaže s mnogobrojnim studijama koje su to dokazale. Naspram tome, nije dokazana povezanost alela povećane funkcije *CYP2C19\*17* i novog haplotipa *CYP2C:TG* niti s neučinkovitošću, niti sa pojavom krvarenja. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se ispitala povezanost polimorfizma ovog enzima i haplotipa *CYP2C:TG* s varijacijama u terapijskom odgovoru na klopidogrel.

## 9. Summary

Due to the high occurrence of cardiovascular diseases, clopidogrel is a frequently prescribed drug. As with any drug, it is important to find the optimal dose so that the patient is not underdosed and thus has an increased risk of developing side effects such as stroke and myocardial infarction. However, there can also be an overdose and thus the risk of bleeding. Because clopidogrel is a prodrug, it must be activated in order to exert its effect. One of the most important enzymes involved in activation is the CYP2C19 enzyme. This enzyme is important for more than 30 drugs, and its polymorphisms are associated with large interindividual variations in therapeutic response. Recent studies have shown a possible influence of the new haplotype *CYP2C:TG* on CYP2C19 enzyme activity and consequently clopidogrel activation. This study investigated the association of *CYP2C19* (rs4244285 and rs12248560) and *CYP2C* (rs2860840 and rs 11188059) gene polymorphisms with the side effect of bleeding or ineffectiveness of clopidogrel. 145 subjects who received clopidogrel as part of therapy for various cardiovascular and cerebrovascular diseases were genotyped. Genotyping was done using the TaqMan® method. A statistically significant association between the allele without function (*CYP2C19\*2*) and the ineffectiveness of clopidogrel was shown ( $p=0.043$ ), which is in-line with several studies that have proven this. In contrast, we were unable to prove the association of the allele of accelerated *CYP2C19\*17* function and the new haplotype *CYP2C:TG* neither with ineffectiveness nor with the occurrence of bleeding. Further research is needed on a larger number of subjects in order investigate the association of the polymorphism of this enzyme and the *CYP2C:TG* haplotype with variability in clopidogrel therapeutic response.

## 10. Prilog

### 10.1. Popis slika

- Slika 1.** Vizualna interpretativna ljestvica metaboličke aktivnosti enzima temeljena na genotipu i povezanim fenotipovima
- Slika 2.** Struktura CYP2C19 enzima predviđena Alphafold sistemom (preuzeto <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P33261/entry> uz dopuštenje izdavača)
- Slika 3.** Procjene vjerojatnosti nenormalnog metabolizatora CYP2C19 diljem svijeta. (preuzeto i prilagođeno od (Koopmans et al., 2021) uz dopuštenje izdavača)
- Slika 4.** Prikaz kaskadne reakcije nakon vezanja klopidogrela za P2Y12 receptor na trombocitima
- Slika 5.** Mehanizam aktivacije P2Y12 inhibitora
- Slika 6.** Prikaz preporuka antiagregacijske terapije na temelju CYP2C19 fenotipa kada se razmatra klopidogrel za kardiovaskularne indikacije (preuzeto i prilagođeno od (Lee et al., 2022) uz dopuštenje izdavača)
- Slika 7.** Prikaz preporuka za antitrombocitnu terapiju temeljene na fenotipu CYP2C19 pri razmatranju klopidogrela za neurovaskularne indikacije (preuzeto i prilagođeno od (Lee et al., 2022) uz dopuštenje izdavača)
- Slika 8.** Prikaz postupaka QIAamp Blood Mini Kit za izolaciju DNA (preuzeto i prilagođeno prema QIAGEN, 2018 uz dopuštenje izdavača)
- Slika 9.** Prikaz TaqMan® PCR metode u kojoj se koristi sonda koja ima svojstvo fluorescencije.
- Slika 10.** Prikaz rezultata TaqMan® PCR za polimorfizam rs2860840
- Slika 11.** Analiza alelne diskriminacije TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu za rs2860840
- Slika 12.** Prikaz rezultata TaqMan® PCR za polimorfizam rs11188059
- Slika 13.** Analiza alelne diskriminacije TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu za rs11188059

## 10.2. Popis tablica

- Tablica 1.** CYP2C19 odnos diplotipa sa fenotipom (preuzeto i prilagođeno od Sienkiewicz-Oleszkiewicz & Wiela-Hojeńska, 2018)
- Tablica 2.** Prikaz alela, SNP, nukleotidne promjene i TaqMan® reagensa (preuzeto i prilagođeno prema TaqMan® protokolu)
- Tablica 3.** Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za TaqMan® qPCR
- Tablica 4.** Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju
- Tablica 5.** Odnos CYP2C19\*2 wt i het/mut te ADR neučinkovitosti
- Tablica 6.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos CYP2C19\*2 wt i het/mut te ADR neučinkovitosti
- Tablica 7.** Odnos CYP2C19\*17 wt i het/mut te ADR neučinkovitosti
- Tablica 8.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos CYP2C19\*17 wt i het/mut te ADR **neučinkovitosti**
- Tablica 9.** Omjer fenotipova dobivenih nakon genotipiziranja CYP2C klastera
- Tablica 10.** Kriteriji prema kojima su genotipovi raspoređeni u fenotipove
- Tablica 11.** Odnos krvarenja kao nuspojave u odnosu na CYP2C19/CYP2C klaster fenotip
- Tablica 12.** Rezultati  $\chi^2$  testa za odnos krvarenja kao nuspojave u odnosu na CYP2C19/CYP2C klaster fenotip



## **11. Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card**

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Samostalni kolegij: Specijalna područja kliničke biokemije  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## Utjecaj polimorfizama *CYP2C19* i haplotipa *CYP2C* na kliničke ishode terapije klopidogetrelom

Karla Peruško

### SAŽETAK

Zbog velike pojavnosti kardiovaskularnih bolesti, klopidogetrel je često propisivan lijek. Kao i kod svakog lijeka važno je pogoditi optimalnu dozu kako pacijent ne bi bio poddoziran i tako imao povećan rizik od razvoja nuspojava poput moždanog udara i infarkta miokarda. No, isto tako može doći i to predoziranja i time rizika od krvarenja. Budući da je klopidogetrel prolijek, kako bi ispoljio svoj učinak mora se aktivirati. Jedan od važnijih enzima koji sudjeluje u aktivaciji je enzim *CYP2C19*. Ovaj enzim je važan za metabolizam više od 30 lijekova te je njegova polimorfnost povezana s velikim interindividualnim varijacijama u terapijskom odgovoru. Novije studije pokazale su mogući utjecaj novog haplotipa *CYP2C:TG* na aktivnost enzima *CYP2C19* i posljedično brzinu aktivacije klopidogetrela. U ovom radu ispitivana je povezanost polimorfizama gena *CYP2C19* (rs4244285 i rs12248560) i *CYP2C* (rs2860840 i rs 11188059) s nuspojavama krvarenja ili neučinkovitosti klopidogetrela. Genotipizirano je 145 ispitanika koji su primali klopidogetrel kao dio terapije različitih kardiovaskularnih i cerebrovaskularnih bolesti. Genotipizacija je učinjena metodom TaqMan®. Pokazana je statistički značajna povezanost između nefunkcionalnog alela (*CYP2C19\*2*) i neučinkovitosti klopidogetrela ( $p=0,043$ ), što se slaže s mnogobrojnim studijama koje su to dokazale. Naspram tome, nije dokazana povezanost alela povećane funkcije *CYP2C19\*17* i novog haplotipa *CYP2C:TG* niti s neučinkovitošću, niti sa pojavom krvarenja. Potrebna su daljnja istraživanja na većem broju ispitanika kako bi se ispitala povezanost polimorfizma ovog enzima i haplotipa *CYP2C:TG* s varijacijama u terapijskom odgovoru na klopidogetrel.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 59 stranica, 13 grafičkih prikaza, 12 tablica i 59 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: farmakogenetika, polimorfizam, citokrom P450, *CYP2C19*, *CYP2C* klaster, klopidogetrel

Mentor: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Dr. sc. Lana Ganoci**, docent, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

**Dr. sc. Lana Ganoci**, docent, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

**Dr. sc. Iva Mucalo**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Independent course: Special areas of clinical biochemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### Impact of *CYP2C19* polymorphisms and *CYP2C* haplotype on the clinical outcomes of clopidogrel therapy

Karla Peruško

#### SUMMARY

Due to the high occurrence of cardiovascular diseases, clopidogrel is a frequently prescribed drug. As with any drug, it is important to find the optimal dose so that the patient is not underdosed and thus has an increased risk of developing side effects such as stroke and myocardial infarction. However, there can also be an overdose and thus the risk of bleeding. Because clopidogrel is a prodrug, it must be activated in order to exert its effect. One of the most important enzymes involved in activation is the *CYP2C19* enzyme. This enzyme is important for more than 30 drugs, and its polymorphisms are associated with large interindividual variations in therapeutic response. Recent studies have shown a possible influence of the new haplotype *CYP2C:TG* on *CYP2C19* enzyme activity and consequently clopidogrel activation. This study investigated the association of *CYP2C19* (rs4244285 and rs12248560) and *CYP2C* (rs2860840 and rs 11188059) gene polymorphisms with the side effect of bleeding or ineffectiveness of clopidogrel. 145 subjects who received clopidogrel as part of therapy for various cardiovascular and cerebrovascular diseases were genotyped. Genotyping was done using the TaqMan® method. A statistically significant association between the allele without function (*CYP2C19\*2*) and the ineffectiveness of clopidogrel was shown ( $p=0.043$ ), which is in-line with several studies that have proven this. In contrast, we were unable to prove the association of the allele of accelerated *CYP2C19\*17* function and the new haplotype *CYP2C:TG* neither with ineffectiveness nor with the occurrence of bleeding. Further research is needed on a larger number of subjects in order to investigate the association of the polymorphism of this enzyme and the *CYP2C:TG* haplotype with variability in clopidogrel therapeutic response.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 59 pages, 13 figures, 12 tables and 59 references. The original is in Croatian language.

Keywords: pharmacogenetics, polymorphism, clopidogrel cytochrome P450, *CYP2C19*, *CYP2C* cluster

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lana Ganoci, Ph.D.**, Assistant Professor, analit. toxicol. spec., University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lana Ganoci, Ph.D.**, Assistant Professor, analit. toxicol. spec., University Hospital Centre Zagreb

**Iva Mucalo, Ph.D.**, Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2024.