

# Farmakogenetska analiza CYP2D6 i značaj u kliničkoj praksi

---

**Buben, Jelena**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2018**

*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:163:464458>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Jelena Buben**

**Farmakogenetska analiza CYP2D6 i značaj u  
kliničkoj praksi**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju *Farmakologija* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Božine i suvoditeljstvom izv. prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

*Zahvaljujem se mentoricama izv. prof. dr. sc. Nadi Božini i izv. prof. dr. sc. Lidiji Bach-Rojecky na stručnom vođenju, savjetima i strpljivosti pri izradi i pisanju diplomskog rada.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Farmakogenomika.....	1
1.2. Interindividualna varijabilnost.....	2
1.3. Neželjeni učinci lijekova.....	2
1.4. Biotransformacija ksenobiotika .....	3
1.5. Sustav citokroma P450 (CYP).....	6
1.5.1. Genetika i nomenklatura enzima CYP.....	8
1.5.2. Metabolički fenotip.....	9
1.6. CYP2D6.....	10
1.6.1. Lokus <i>CYP2D</i> .....	11
1.6.2. Aleli <i>CYP2D6</i> .....	11
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1. Izdvajanje DNA metodom <i>FlexiGene</i> <sup>®</sup> .....	17
3.2. Lančana reakcija polimeraze.....	19
3.2.1. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. <i>Real-Time PCR</i> ) .....	21
3.2.2. Long-PCR .....	23
3.3. Genotipizacija <i>CYP2D6</i> *3, *4, *6 i *41 .....	23
3.4. Genotipizacija <i>CYP2D6</i> *5 .....	27
3.5. Genotipizacija <i>CYP2D6</i> *2 .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>33</b>
4.1. Klinički značaj genske varijabilnosti <i>CYP2D6</i> .....	33
4.1.1. Opioidni analgetici.....	34
4.1.2. Tamoksifen .....	36
4.1.3. Antidepresivi.....	39
4.1.3.1 Triciklički antidepresivi (TCA).....	39
4.1.3.2. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI) .....	41
4.1.4. Antiemetici.....	43
4.1.5. Antipsihotici.....	44
4.1.6. Antiaritmici.....	45
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>49</b>
<b>7. SAŽETAK</b> .....	<b>59</b>

## POPIS KRATICA

- ADH - alkohol dehidrogenaza
- ADR - nuspojave lijekova (engl. *Adverse Drug Reaction*)
- AI - inhibitori aromataze (engl. *Aromatase Inhibitors*)
- ALDH - aldehid dehidrogenaza
- AO - aldehid oksidaza
- CNS - središnji živčani sustav (engl. *Central Nervous System*)
- CNV - varijacije u broju kopija (engl. *Copy Number Variations*)
- CYP - citokrom P450
- DAO - diamino oksidaza
- DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)
- EM - fenotip brzog metabolizma (engl. *Extensive Metabolizer*)
- FAD - flavin adenin dinukleotid
- FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (*U.S. Food and Drug Administration*)
- FMN - flavin mononukleotid
- FMO - flavin monooksigenaza
- FRET - rezonantni prijenos energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*).
- IM - fenotip srednje brzog metabolizma (engl. *Intermediate Metaboliser*)
- XDH - ksantin dehidrogenaza
- XO - ksantin oksidaza
- MAO - monoamino oksidaza
- NAD(P) - nikotinamid adenin dinukleotid (fosfat)
- NM - fenotip normalnog metabolizatora (engl. *Normal Metabolizer*)
- PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
- PM - fenotip sporog metabolizma (engl. *Poor Metabolizer*)
- RM - fenotip brzog metabolizatora (engl. *Rapid Metabolizer*)
- RNA - ribonukleinska kiselina (engl. *Ribonucleic acid*)
- SERM - selektivni modulatori estrogenih receptora
- SNP - polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*)
- TCA - triciklički antidepresivi
- UM - fenotip vrlo brzog metabolizma (engl. *Ultraextensive Metabolizer*)
- URM - fenotip vrlo brzog metabolizatora (engl. *Ultra Rapid Metabolizer*)

# 1. UVOD

## 1.1. Farmakogenomika

Interindividualnu varijabilnost u odgovoru na ksenobiotik prvi je opisao Pitagora 510. godina prije nove ere primjetivši da u nekih pojedinaca nakon ingestije bobica (lat. *Vicia faba*) dolazi do pojave simptoma anemije (Ingelman-Sundberg i Sim, 2010). Ideja o tome da je terapijski odgovor uvjetovan genetskim čimbenicima koji mijenjaju farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova razvila se u kasnim 1950-ima, kada je dokazano da urođeni nedostatak enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze može izazvati ozbiljnu hemolizu u pacijenata na terapiji antimalarikom primakinom. Ovo otkriće je objasnilo zašto je primakinom uzrokovana hemoliza uglavnom zabilježena u osoba afričkog podrijetla, u kojih je nedostatak ovog enzima uobičajen, a rijetko u osoba europskog podrijetla. Godine 1959., Vogel je prvi upotrijebio pojam farmakogenetike kako bi opisao naslijeđene razlike u terapijskom odgovoru, a definirao ju je kao proučavanje utjecaja genetike na terapijski odgovor. Pojam farmakogenomike uveden je kao posljedica prijelaza iz genetike u genomiku zbog korištenja pristupa analize čitavog genoma u svrhu identifikacije pojedinih gena koji doprinose razvoju određenih bolesti ili rezultiraju različitim terapijskim odgovorom u pojedinaca (Eichelbaum i sur., 2006).

Primjena farmakogenomike podrazumijeva razmatranje genetike pojedinca prilikom razvoja novih lijekova te u svrhu individualizacije terapije, rezultirajući sveukupnim poboljšanjem terapijskog odgovora i smanjenjem učestalosti pojave neželjenih učinaka lijekova. Iako čimbenici poput slabe suradljivosti pacijenata, vanjskih čimbenika i interakcija lijek-lijek često imaju značajan utjecaj na terapijski ishod, u nekim slučajevima genetske promjene imaju presudnu ulogu u uspješnosti terapije. Farmakogenetska varijabilnost uočena je kod transportera za lijekove, enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova i ciljnih molekula na koje lijekovi djeluju (Ingelman-Sundberg i sur., 2007). Značajan fokus ovog područja je farmakogenomika enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova jer je genetska osnova tih enzima glavni uzrok interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru i velikog broja neželjenih učinaka uzrokovanih lijekovima. Mnogi lijekovi se metaboliziraju putem enzima kodiranih polimorfnim genima te se analiza genotipa može upotrijebiti u svrhu identifikacije takvih promjena u DNA koje rezultiraju promijenjenim metaboličkim fenotipom. Međutim, nisu svi genetski polimorfizmi enzima koji sudjeluju u metabolizmu

lijekova klinički relevantni. Klinički značaj je veći za lijekove u širokoj uporabi kao i lijekove s uskim terapijskim intervalom te u slučajevima gdje polimorfni enzim ima glavnu ulogu u eliminaciji lijeka. Farmakogenetske razlike su opsežno proučavane na velikom broju enzima I. faze, kao što su izoenzimicitokroma P450 (CYP), dehidrogenaze i esteraze, kao i na enzimima II. faze (Ma MK i sur., 2002)

### 1.2. Interindividualna varijabilnost

Među pojedincima u populaciji zabilježena je velika interindividualna varijabilnost u terapijskom odgovoru i učestalosti pojave neželjenih učinaka lijekova. Za sve glavne skupine lijekova (npr. ACE inhibitori, antagonisti  $\beta$ -adrenoreceptora, selektivni inhibitori ponovnog unosa serotonina, triciklički antidepresivi, statini) vrijedi da će prilikom primjene standardne doze lijeka, u značajnog dijela pacijenata terapijski odgovor biti djelomičan, potpuno izostati ili će doći do pojave neželjenih učinaka lijekova (engl. *Adverse Drug Reaction; ADR*). Uzrok interindividualne varijabilnosti u apsorpciji, raspodjeli i metabolizmu lijeka te posljedično i plazmatskoj koncentraciji lijeka može imati genetsku, fiziološku i patofiziološku podlogu te može biti uzrokovana i vanjskim čimbenicima. Najznačajniji uzroci pojave interindividualnih razlika u metabolizmu su genski polimorfizmi te inhibicija i indukcija metabolizma lijekova (Ingelman-Sundberg, 2004). Općenito se procjenjuje da su genetski čimbenici odgovorni za 15 – 30 % interindividualnih razlika u metabolizmu lijekova i terapijskom odgovoru, ali za određene lijekove ili skupine lijekova, genetski čimbenici su od primarne važnosti te mogu biti uzrokom i do 95 % interindividualne varijabilnosti u raspoloživosti i učinku lijeka (Eichelbaum i sur., 2006).

### 1.3. Neželjeni učinci lijekova

Neželjeni učinci lijekova (engl. *Adverse Drug Reaction, ADR*) predstavljaju velik problem prilikom liječenja kao i prilikom razvoja novih lijekova. U samo 30 – 60 % bolesnika postiže se željeni terapijski učinak prilikom liječenja antidepresivima,  $\beta$ -blokatorima, statinima i antipsihoticima. Neželjeni učinci lijekova povećavaju morbiditet te dovode do značajnih troškova u zdravstvenom sustavu. Procjenjuje se da su ADR odgovorni za više od 100.000 smrtnih slučajeva godišnje u SAD-u te su uzrokom otprilike 5 – 10 % svih bolničkih prijema. Glavni uzrok interindividualne varijabilnosti u terapijskom odgovoru je varijabilna farmakokinetika prvenstveno uzrokovana različitom aktivnosti enzima sustava citokrom P450

koji su uključeni u metabolizam većine lijekova korištenih u kliničkoj praksi (Ingelman-Sundberg i Sim, 2010). Od 27 lijekova koji se često spominju u ADR studijama, 59 % ih je metabolizirano putem barem jednog polimorfnog enzima I. faze metabolizma od čega je 86 % lijekova metabolizirano putem enzima CYP. Nasuprot tome, samo 20 % lijekova koji se spominju u ADR studijama supstrati su nepolimorfnih enzima (Philipps i sur., 2002). Genetska varijabilnost enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova može imati značajan doprinos u pojavi ADR-a te bi stoga individualizirana terapija mogla rezultirati ne samo poboljšanim terapijskim odgovorom, već i klinički značajnim smanjenjem broja ADR-a (Eichelbaum i sur., 2006).

#### 1.4. Biotransformacija ksenobiotika

Svi su organizmi izloženi stranim kemijskim tvarima tj. ksenobioticima koji uključuju kemijske spojeve poput lijekova, industrijskih kemikalija, pesticida, polutanata, alkaloida, sekundarnih biljnih metabolita i toksina proizvedenih u plijesnima, biljkama i životinjama. Fizičko svojstvo koje omogućava mnogim ksenobioticima apsorpciju kroz kožu, pluća ili gastrointestinalni trakt je njihova lipofilnost. Ona također predstavlja i prepreku njihovom uklanjanju iz organizma jer se lipofilni spojevi mogu lako reapsorbirati. Posljedično, eliminacija ksenobiotika iz organizma često ovisi o njihovoj pretvorbi u vodu topljive spojeve procesom poznatim kao biotransformacija. Biotransformacija je stoga enzimski katalizirani proces kemijske modifikacije lijekova i drugih ksenobiotika kako bi se povećala njihova topljivost u vodi te olakšalo uklanjanje iz organizma. U većini slučajeva biotransformacija dovodi do prestanka farmakološkog učinka lijeka prevođenjem u inaktivne metabolite. Intenzitet i trajanje djelovanja lijekova često ovisi o enzimima koji kataliziraju biotransformacijske reakcije. Enzimi koji sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika široko su rasprostranjeni u čitavom organizmu te su prisutni u nekoliko subcelularnih odjeljaka. U kralježnjaka se ti enzimi primarno nalaze u jetri, iako su u većim količinama prisutni i u koži, plućima, gastrointestinalnom traktu, nosnoj sluznici i oku s obzirom da su to glavni putevi izloženosti ksenobioticima. Prisutni su i u brojnim drugim tkivima, uključujući bubrege, mozak, placentu, limfatičko tkivo i plazmu. Intestinalna mikroflora također ima važnu ulogu u biotransformaciji određenih ksenobiotika. Enzimi koji kataliziraju biotransformacijske reakcije primarno se nalaze u endoplazmatskom retikulumu (mikrosomima) jer su lipofilni ksenobiotici dobro topljivi u lipidnom dvosloju ER. Neki



topljivi enzimi se nalaze u citosolu, a manje količine enzima nalaze se u mitohondrijima, jezgri i lizosomima (Parkinson, 2015).

Nakon apsorpcije, ksenobiotik ulazi u portalnu cirkulaciju kojom dopijeva do jetre. Tek nakon prolaska kroz jetru ulazi u sistemsku cirkulaciju. Metabolizam ksenobiotika u intestinalnom zidu i jetri prije dolaska do sistemske cirkulacije zove se metabolizam prvog prolaza. Biotransformacijom ksenobiotika koji se apsorbiraju putem gastrointestinalnog trakta, jetra ograničava sistemsku bioraspoloživost oralno primjenjenih ksenobiotika. Varijacije u metabolizmu prvog prolaza mogu utjecati na terapijski odgovor i doprinijeti interakciji između lijekova.

Metabolizam ksenobiotika može se podijeliti u četiri faze, od čega samo faze I i II uključuju enzime koji sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika. Faza 0 podrazumijeva prolazak ksenobiotika kroz staničnu membranu posredovan inluksnim transporterima (npr. transport lijekova u hepatocite). Faza I uključuje uvođenje reaktivnih skupina u molekulu ksenobiotika, a faza II se obično sastoji od prijenosa polarnih kemijskih skupina na produkte metabolizma I. faze. Faza III se odnosi na transport vodotopljivih metabolita putem efluksnih transportera (npr. iz jetre u žuč) (Stanley, 2016).

I. faza biotransformacije ksenobiotika uključuje reakcije hidrolize, redukcije i oksidacije. Ovim reakcijama se u molekuli ksenobiotika otkrivaju ili uvode funkcionalne skupine -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH ili -COOH koje obično rezultiraju samo malim povećanjem hidrofилnosti. Funkcionalne skupine nastale tijekom I. faze biotransformacije često su konjugacijska mjesta za enzime II. faze biotransformacije. Reakcije hidrolize u čovjeka primarno kataliziraju karboksilesteraze, paraoksonaze (organofosfataze) i kolinesteraze (acetilkolinesteraze i pseudokolinesteraze). One hidroliziraju funkcionalne skupine ksenobiotika koje uključuju estere, amide, tioestere, estere fosforne kiseline i anhidride. Određeni metali (npr. arsenat) te aldehidi, ketoni, disulfidi, sulfoksidi, kinoni, N-oksidi, alkeni, azo ili nitro skupine često podliježu redukciji *in vivo*. Redukcija može biti enzimska i neenzimska mehanizmom interakcije s reducirajućim agensima kao što su reducirani oblik glutationa, FAD, FMN i NAD(P). Neke od tih funkcionalnih skupina mogu se i reducirati i oksidirati. Na primjer, aldehidi (RCHO) se mogu reducirati u primarni alkohol (RCH<sub>2</sub>OH) ili oksidirati u karboksilnu kiselinu (RCOOH), dok sulfoksidi mogu biti reducirani u sulfid ili oksidirani u sulfon. U nekim slučajevima, kao što je azo- ili nitro-redukcija, reakcija je uglavnom katalizirana crijevnom mikroflorom. Oksidoreduktaze koje imaju glavnu ulogu u metabolizmu ksenobiotika su enzimi citokroma P450 (CYP), flavin monooksigenaze (FMO), monoamino oksidaze (MAO), diamino oksidaze (DAO), alkohol dehidrogenaze (ADH),

aldehid dehidrogenaze (ALDH) i molibden hidroksilaze (aldehid oksidaze (AO), ksantin oksidaze (XO)/ksantin dehidrogenaze (XDH)).

Tablica 1: Putevi biotransformacije ksenobiotika i njihova subcelularna lokacija (*Preuzeto i prilagođeno prema Parkinson, 2015*)

Metabolizam I. faze		
Hidroliza	Esteraze	Mikrosomi, citosol, lizosomi
	Peptidaze	Lizosomi
	Epoksid hidrolaze	Mikrosomi, citosol
Redukcija	Redukcija azo- i nitro- skupina	Mikroflora, mikrosomi, citosol
	Redukcija karbonilne skupine	Mikrosomi, citosol
	Redukcija disulfida	Citosol
	Redukcija sulfoksida	Citosol
	Redukcija kinona	Mikrosomi, citosol
	Reduktivna dehalogenacija	Mikrosomi
Oksidacija	Alkohol dehidrogenaza (ADH)	Citosol
	Aldehid dehidrogenaza (ALDH)	Mitohondriji, citosol
	Aldehid oksidaza (AO)	Citosol
	Ksantin oksidaza (XO)	Citosol
	Monoamino oksidaza (MAO)	Mitohondriji
	Diamino oksidaza (DAO)	Citosol
	Prostaglandin H sintaza	Mikrosomi
	Flavin monooksigenaza (FMO),	Mikrosomi
	Citokrom P450 (CYP)	Mikrosomi
Metabolizam II. faze		
Glukuronidacija	UDP-glukuronozil transferaza (UGT)	Mikrosomi
Sulfonacija	Sulfotransferaza (SULT)	Citosol
Konjugacija glutationom	Glutation-S-transferaza (GST)	Citosol, mikrosomi
Konjugacija aminokiselinama	Aminoaciltransferata	Mitohondriji, mikrosomi
Acilacija	Aciltransferaza	Mitohondriji, citosol
Metilacija	Metiltransferaza	Citosol, mikrosomi

II. faza biotransformacije ksenobiotika uključuje reakcije glukuronidacije, glukozilacije, sulfonacije (sulfatacije), acetilacije, metilacije, konjugacije s glutationom i konjugacije s aminokiselinama (poput glicina, taurina i glutamata). Od enzima II. faze biotransformacije, najznačajnije su UDP-glukuronoziltransferaze (UGT). Kofaktori enzima koji kataliziraju reakcije II. faze biotransformacije reagiraju s funkcionalnim skupinama koje su već prisutne na ksenobiotiku ili su uvedene tijekom I. faze biotransformacije. Većina navedenih reakcija dovodi do velikog porasta hidrofилnosti ksenobiotika omogućujući njihovu eliminaciju iz organizma. II. fazi biotransformacije mogu i ne moraju prethoditi reakcije I. faze biotransformacije. Primjerice morfin, heroin i kodein se biotransformiraju u zajednički metabolit, morfin-3-glukuronid. U slučaju morfina, ovaj metabolit nastaje izravnom

konjugacijom s glukuronskom kiselinom. U druga dva slučaja, konjugaciji s glukuronskom kiselinom prethode reakcije metabolizma I. faze: hidroliza (deacetilacija) u slučaju heroina i O-demetilacija u slučaju kodeina (Parkinson, 2015).

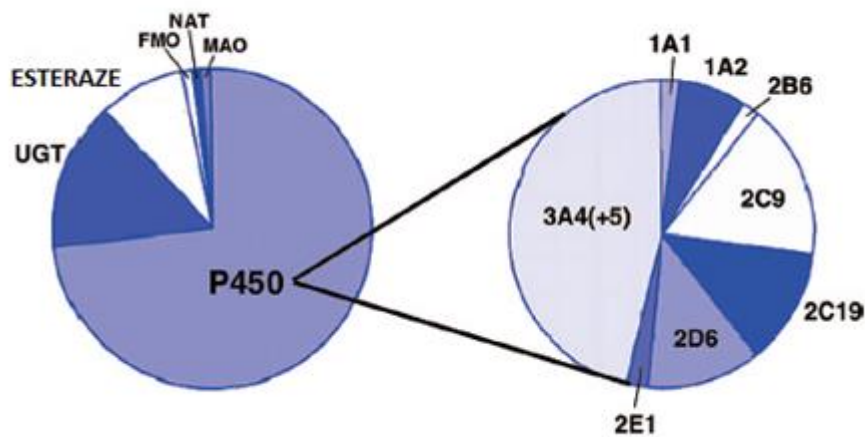
#### 1.5. Sustav citokroma P450 (CYP)

Prvi eksperimentalni dokaz o otkriću enzima CYP potječe iz 1955. godine kada je u endoplazmatskom retikulumu jetre identificiran enzimski sustav zadužen za oksidaciju ksenobiotskih spojeva (Axelrod, 1955; Brodie i sur., 1955). Kasnije je u dvije nezavisne studije u mikrosomima jetre detektiran pigment koji u reduciranom stanju te u prisutnosti ugljikovog monoksida (CO) ima maksimum apsorpcije pri 450 nm (Garfinkel, 1958; Klingenberg, 1958). 1964. godine je dokazano da se radi o hemoproteinima koji otada nose naziv CYP450 zbog karakteristične jake apsorpcije u vidljivom dijelu spektra pri valnoj duljini ( $\lambda$ ) od 450 nm (Omura i Sato, 1964a; Omura i Sato, 1964b).

Među enzimima koji kataliziraju reakcije I. faze biotransformacije, CYP prednjače po stupnju polimorfnosti i katalitičkoj raznolikosti. CYP je najznačajniji enzimski sustav uključen u biotransformaciju brojnih endogenih i egzogenih spojeva uvođenjem oksidativnih, peroksidativnih i reduktivnih promjena u male lipofilne molekule različitih kemijskih struktura. Neki od fizioloških supstrata enzima CYP su zasićene i nezasićene masne kiseline, eikozanoidi (prostaglandini, leukotrieni i tromboksan A<sub>2</sub>), steroli i steroidi, vitamini A i D, žučne kiseline, retinoidi, i biogeni amini. Egzogeni supstrati enzima CYP uključuju lijekove, prirodne biljne produkte te okolišne kemikalije i polutante. Biotransformacija ksenobiotika najčešće rezultira detoksifikacijom, međutim može rezultirati i tvorbom otrovnih metabolita koji imaju kancerogene, teratogene i druge štetne učinke (Nebert i Russell, 2002; Nelson i sur., 1993; Gonzalez i Nebert, 1990).

CYP čini skupina hemoproteina koji se nalaze u gotovo svim tkivima i organima (crijeva, pluća, bubrezi, CNS, limfatičko tkivo, placenta), a najvećim dijelom u membranama endoplazmatskog retikuluma u jetri. Enzimi CYP, posebice CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 i CYP2B6 imaju središnju ulogu u metabolizmu lijekova te su odgovorni za otprilike 75 % ukupnog metabolizma I. faze klinički značajnih lijekova u jetri, crijevima i bubrezima (Guengerich, 2008; Zanger i sur., 2008; Zanger i Schwab, 2013). Otprilike 40 % metabolizma lijekova odvija se putem visokopolimorfnih enzima CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6. Većina gena za jetrene enzime uključene u metabolizam lijekova je polimorfna. Polimorfizam je varijanta u sekvenci prisutna u > 1 % populacije. Osnovni

polimorfizmi uključuju polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism; SNP*), insercije i delecije te varijacije u broju kopija (engl. *Copy Number Variations; CNV*) (Ingelman-Sundberg i Sim, 2010). Monogeni polimorfizmi su glavni uzrok varijabilnosti za samo neke enzime CYP, posebice CYP2D6, dok je ekspresija većine enzima multifaktorske prirode te ovisi o dodatnim polimorfizmima u regulatornim genima i negenetskim čimbenicima, uključujući spol, starost, bolesti, hormonalne i cirkadijalne promjene (Zanger i Schwab, 2013)



Slika 1: Doprinos pojedinih skupina enzima metabolizmu lijekova (*Preuzeto i prilagođeno prema Guengerich, 2008*)

Metabolizam lijekova i ksenobiotika putem enzima CYP utječe na farmakokinetiku te posljedično i farmakodinamiku spoja (Sim i sur., 2013). Opseg metabolizma lijeka posredovanog enzimima CYP može biti promijenjen interakcijama između lijekova koje uključuju indukciju ili inhibiciju enzima, međutim, uočena je i značajna interindividualna varijabilnost u bazalnoj ekspresiji i/ili aktivnosti enzima CYP što dovodi do različitog stupnja eliminacije lijeka i terapijskog odgovora, uključujući i 100-struku varijabilnost u metabolizmu lijekova putem CYP2D6 (Hart i sur., 2008). Osnovni uzrok farmakogenetske varijabilnosti CYP-posredovanog metabolizma je promjena u sekvenci kodirajuće regije. Neki od klinički značajnih primjera farmakogenetske varijabilnosti opaženi su kod metabolizma putem CYP2C9 (za varfarin), CYP2C19 (za klopidoogrel i omeprazol), CYP2D6 (za tamoksifen i kodein) i CYP3A5 (za takrolimus) (Rojas i sur., 2015; Hou i sur., 2014; Gryn i sur., 2014; Madadi i sur., 2013; Cooper i sur., 2008). U nekim je slučajevima eksprimirani protein funkcionalan, ali smanjene aktivnosti, dok u drugim slučajevima ne dolazi do ekspresije

proteina ili je on potpuno bez aktivnosti. Ovisno o tome je li metabolit lijeka aktivan (npr. klopidogrel) ili inaktivan (npr. varfarin), posljedice ovih polimorfizama mogu rezultirati značajnim promjenama u terapijskom učinku. Na opseg metabolizma putem enzima CYP utječu i drugi čimbenici uključujući genetske promjene u promotorskoj regiji i regulatorima transkripcije te promijenjenu ekspresiju mikro-RNA koja utječe na ekspresiju enzima CYP (Tracy TS i sur., 2016)

### 1.5.1. Genetika i nomenklatura enzima CYP

U humanom genomu je otkriveno 115 gena CYP; 57 funkcionalnih gena i 58 pseudogena. U čovjeka je sustav citokroma P450 s obzirom na stupanj homologije aminokiselinskog slijeda u proteinskoj strukturi enzima grupiran u 18 obitelji i 44 podobitelji. Enzimi CYP u kojih je stupanj homologije aminokiselinskog slijeda  $\geq 40\%$  svrstani su u jednu od obitelji koje se označavaju arapskim brojkama (npr. CYP1). Svaka je enzimska obitelj dalje podijeljena u podobitelji. Enzimi unutar određene podobitelji imaju stupanj homologije aminokiselinskog slijeda  $\geq 50\%$ , a podobitelji se označavaju velikim slovom (npr. CYP1A). Određeni enzim unutar podobitelji (izoenzim) označava se arapskom brojkom (npr. CYP1A1 i CYP1A2). Enzimi se numeriraju u skladu s redosljedom kojim su bili otkriveni (Nelson DR 2018; Nelson DR, 2004).

U čovjeka se enzimi CYP mogu podijeliti u tri osnovne skupine. Enzimi prve skupine koja obuhvaća obitelji CYP 5-51 imaju visoki afinitet za endogene supstrate te su evolucijski relativno očuvani. Enzimi druge skupine koja obuhvaća obitelji CYP 1-3 imaju manji afinitet za endogene supstrate, manje su evolucijski očuvani te iskazuju važne genetske polimorfizme. Treću skupinu čini obitelj CYP 4 u kojoj enzimi imaju važnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina i srodnih supstrata. Svi geni iz obitelji 1-3 su vrlo polimorfni osim CYP1A1, CYP2E1 i CYP3A4, koji su relativno dobro evolucijski očuvani, a razlog tome mogao bi biti endogeni značajnih enzima. Interindividualna varijabilnost u katalitičkoj aktivnosti je zabilježena u većine enzima iz obitelji CYP 1-3. Razlog tome su genetski polimorfizmi ili varijabilna ekspresija enzima. Samo desetak enzima iz obitelji CYP 1-3 odgovorno je za 90 % metabolizma I. faze svih klinički korištenih lijekova, a to su 1A2 (4 %), 2A6 (2 %), 2C9 (10 %), 2C19 (2 %), 2E1 (2 %), 2D6 (25 %) i 3A4 (50 %) (Rendić, 2002). Velik broj različitih enzima CYP može sudjelovati u biotransformaciji istog supstrata, međutim mnogi se lijekovi u klinički značajnim koncentracijama metaboliziraju putem samo jednog ili manjeg broja enzima. (Ingelman-Sundberg, 2004).

### 1.5.2. Metabolički fenotip

Ovisno o sposobnosti metabolizma određenih lijekova, do 2017. godine, u upotrebi je bila klasifikacija sljedećih kategorija fenotipova: fenotip brzog metabolizma (engl. *Extensive Metabolizer, EM*), fenotip sporog metabolizma (engl. *Poor Metabolizer, PM*), fenotip srednje brzog metabolizma (engl. *Intermediate Metaboliser, IM*) i fenotip vrlo brzog metabolizma (engl. *Ultraextensive Metabolizer, UM*). Fenotip brzog metabolizma je prisutan u najvećem dijelu populacije, a javlja se u osoba s dva potpuno aktivna alela. Kod ovog fenotipa se javlja očekivani terapijski odgovor prilikom primjene standardne doze lijeka. Fenotip sporog metabolizma naslijeđuje se autosomno recesivno, a karakterizira ga nedostatak aktivnog alela te posljedično smanjena aktivnost enzima kodiranog tim alelom. Kao posljedica smanjene aktivnosti enzima koji sudjeluje u metabolizmu lijeka, dolazi do nagomilavanja lijeka u organizmu i pojave neželjenih učinaka lijeka. Zbog inaktivnog alela, prilikom primjene prolijeka može doći do smanjenog terapijskog učinka jer se ne postiže dovoljna koncentracija aktivnog metabolita. Fenotip srednje brzog metabolizma se javlja kod heterozigota s jednim funkcionalnim i jednim inaktivnim alelom ili homozigota za alel karakteriziran smanjenom aktivnošću enzima. Kod takvih se osoba u manjoj mjeri javljaju nuspojave karakteristične za fenotip sporog metabolizma. Fenotip vrlo brzog metabolizma naslijeđuje se autosomno dominantno, a rezultat je duplikacije funkcionalnog gena što rezultira prekomjernom ekspresijom enzima. Javlja se kod nositelja više od dvije kopije funkcionalnog gena. Kod ovog fenotipa dolazi do ubrzane razgradnje lijekova te standardne doze takvih lijekova mogu biti neučinkovite. Prilikom primjene prolijeka može doći do neželjenih učinaka zbog previsoke koncentracije aktivnog metabolita u organizmu (Božina i Pejnović., 2013).

Zbog novih, na istraživanjima temeljenih dokaza, bilo je nužno poboljšati i ujednačiti klasifikaciju na internacionalnoj razini te su od 2017. godine preporuke sljedeće:

- genotip s 2 alela s povećanom funkcijom ili više od 2 alela s normalnom funkcijom odgovara fenotipu vrlo brzog metabolizatora (engl. *Ultra Rapid Metabolizer, URM*)
- genotip kombinacije alela s normalnom funkcijom i alela s povećanom funkcijom odgovara fenotipu brzog metabolizatora (engl. *Rapid Metabolizer, RM*)
- genotip kombinacije alela s normalnom funkcijom i alela sa smanjenom funkcijom odgovara fenotipu normalnog metabolizatora (engl. *Normal Metabolizer, NM*)

- genotip kombinacije alela s normalnom funkcijom, alela sa smanjenom funkcijom i/ili alela bez funkcije odgovara fenotipu srednje brzog-intermedijarnog metabolizatora (engl. *Intermediate Metabolizer*, IM)
- genotip kombinacije alela bez funkcije i/ili alela sa smanjenom funkcijom odgovara fenotipu slabog (sporig) metabolizatora (engl. *Poor Metabolizer*, PM) (Caudle i sur., 2017)

Metabolički fenotip se određuje fenotipizacijom ili genotipizacijom. Genotipizacija podrazumijeva identifikaciju promjena na genima CYP koje rezultiraju promijenjenim metaboličkim fenotipom primjenom metoda molekularne analize. Fenotipizacija se izvodi koristeći probni lijek čiji metabolizam isključivo ovisi o funkciji ispitivanog enzima. Fenotip pojedinca se obično procjenjuje na osnovu metaboličkog omjera (engl. *Metabolic Ratio*, MR), tj. omjera količine nepromijenjenog lijeka i metabolita lijeka u urinu ili serumu u određenom vremenu nakon primjene jedne doze prikladnog probnog lijeka. Lijekovi koji se mogu primijeniti u svrhu *in vivo* fenotipizacije CYP2D6 su dekstrometorfan, bufuralol, metoprolol, tramadol, debrisoquin i spartein. Najčešće korišteni supstrat je dekstrometorfan jer se smatra sigurnim i široko dostupnim lijekom (Ito i sur., 2010). Osnovna prednost fenotipizacije u odnosu na genotipizaciju je u mogućnosti otkrivanja interakcija između lijekova koje pacijent istovremeno uzima, a nedostatak je u dobivanju nepouzdanih rezultata zbog interakcija s drugim spojevima kao i utjecaja bolesti, posebice jetre i bubrega te mogućih interakcija s drugim spojevima.

## 1.6. CYP2D6

Studija iz 1969. godine pokazala je da se plazmatske koncentracije tricikličkog antidepresiva nortriptilina u pacijenata liječenih istom dozom razlikuju 30 do 40 puta zbog varijabilnog metabolizma lijeka (Alexanderson i sur., 1969). Kasnije studije su pokazale da brzina metabolizma ima jaku genetsku komponentu te da je hidroksilacija nortriptilina katalizirana polimorfnom debrisoquin/spartein hidroksilazom (CYP2D6) (Bertilsson i sur., 1980). Dvije farmakokinetičke studije provedene 1970-ih godina pokazale su da je metabolizam debrisoquina (simpatolitički antihipertenziv) i sparteina (antiaritmik) polimorfan (Mahgoub i sur., 1977; Eichelbaum i sur., 1979). Pokazalo se da je manjkavi metabolizam oba lijeka fenotip istog genetskog nedostatka, tj. spori metabolizatori za debrisoquin su također i spori metabolizatori za spartein i obrnuto (Eichelbaum i sur., 1982). 1988. godine izolirana je humana cDNA koja kodira za novog člana podobitelji CYP2D - CYP2D6 te je potvrđeno

da se radi o genu odgovornom za varijabilnu hidroksilaciju sparteina/debrisokina (Eichelbaum i sur., 1987; Gonzalez i sur., 1988a; Gonzalez i sur., 1988b).

CYP2D6 je najopsežnije istražen polimorfni enzim koji sudjeluje u metabolizmu lijekova. Usprkos njegovom niskom udjelu u jetri (~2 – 4 %) u odnosu na sve jetrene enzime CYP, procjenjuje se da sudjeluje u metabolizmu 20 – 25 % klinički korištenih lijekova (Zanger i sur., 2004). CYP2D6 katalizira metabolizam velikog broja klinički značajnih lijekova, uključujući antidepresive, antipsihotike, antiaritmike, antiemetike, antagoniste  $\beta$ -adrenoreceptora, analgetike i antitumorske lijekove. Za razliku od drugih jetrenih enzima koji sudjeluju u metabolizmu ksenobiotika, ekspresija *CYP2D6* nije inducibilna, stoga genetske promjene uvelike doprinose interindividualnoj varijabilnosti u ekspresiji enzima i enzimskoj aktivnosti. Podložan je inhibiciji brojnim lijekovima što rezultira klinički značajnim interakcijama. Enzim ima značajnu ulogu i u metabolizmu sastavnica hrane te ima posebice visok afinitet za alkaloidne. Gen *CYP2D6* iskazuje značajnu međuetničku varijabilnost uz izražene razlike u frekvenciji alela i postojanju "populacijski specifičnih" alelnih varijanti, primjerice među Azijatima i Afrikancima (Ingelman-Sundberg, 2005).

#### 1.6.1. Lokus *CYP2D*

Humani lokus *CYP2D* nalazi se na kromosomu 22q13.1 te obuhvaća tri visoko homologna gena; *CYP2D6* i dva inaktivna pseudogena *CYP2D8P* i *CYP2D7*. Gen *CYP2D6* se sastoji od 9 egzona i 8 introna s otvorenim okvirom čitanja od 1491 parova baza koji kodiraju protein od 497 aminokiselina. *CYP2D8P* je pravi pseudogen s većim brojem delecija i insercija te bez otvorenog okvira čitanja. *CYP2D7P* je sličniji *CYP2D6* te u sekvenci sadrži samo jednu inaktivacijsku mutaciju, inserciju T138 u prvom egzonu, što rezultira pomakom okvira čitanja i preuranjenom terminacijom translacije proteina. Prisutnost vrlo sličnih pseudogena koji nose štetne mutacije može rezultirati nejednakim križanjem (engl. *crossing over*) što je dovelo do nastanka varijanti alela *CYP2D6* koje najčešće kodiraju za neispravni genski produkt (Eichelbaum i sur., 1987; Gough i sur., 1993; Kimura i sur., 1989; Heim i sur., 1990).

#### 1.6.2. Aleli *CYP2D6*

Sistematizirana nomenklatura za alele *CYP2D6* uvedena je 1996. godine (Daly i sur., 1996a). Aleli koji dijele „ključne“ mutacije tj. promjene u sekvenci s većim funkcionalnim značajem označeni su istim brojem, dok se daljnje promjene alela (s istom ključnom



mutacijom, ali različitim dodatnim varijacijama sekvence manjeg funkcionalnog značaja) obilježavaju slovima (Ingelman-Sundberg i sur., 2000; Ingelman-Sundberg i Oscarson, 2002). \*1A se odnosi na referentni haplotip odnosno divlji tip alela. Gen *CYP2D6* je visoko polimorfan, s najmanje 112 varijanti alela (\*2 do \*113) i nizom podvarijati alela opisanih do danas ([www.pharmvar.org](http://www.pharmvar.org)). Aleli se s obzirom na enzimsku funkciju mogu razvrstati u tri skupine: aleli koji rezultiraju povećanom enzimskom aktivnošću, aleli povezani sa smanjenom enzimskom aktivnošću ili gubitkom aktivnosti i aleli povezani s normalnom aktivnosti. Varijante alela rezultat su točkastih mutacija (engl. *Single Nucleotide Polymorphism; SNP*), delecija, insercija, preraspodjela gena te duplikacije i multiplikacije čitavog gena. Najznačajnije varijante alela su *CYP2D6\*2*, *CYP2D6\*3*, *CYP2D6\*4*, *CYP2D6\*5*, *CYP2D6\*6*, *CYP2D6\*10*, *CYP2D6\*17* i *CYP2D6\*41*. Razlikujemo četiri metabolička fenotipa za *CYP2D6* koji se u bijeloj rasi javljaju uz učestalost od 70 – 80 % (EM), 5 – 10 % (PM), 10 – 17 % (IM) i 3 – 5 % UM (Sachse i sur., 1997). Postoji značajna varijabilnost u raspodjeli alela *CYP2D6* među različitim etničkim skupinama što je rezultiralo različitom učestalošću PM, IM, EM i UM u određenim populacijama. Za alele koji su češće zastupljeni u populaciji prikupljene su informacije o fenotipu putem *in vivo* studija o odnosu genotipa i fenotipa, studija na humanim uzorcima jetre ili pomoću rekombinantnih ekspresijskih sustava. Za velik broj rijetkih varijanti još nema podataka o fenotipu (Zanger i sur., 2004). Procjenjuje se da bi prediktivna genotipizacija imala povoljan učinak na terapiju 30 - 50 % lijekova-supstrata enzima *CYP2D6* (Kircheiner i sur., 2004).

Null aleli (zajednički nazvani *2D6\*0*) ne kodiraju za funkcionalni protein te u slučaju *CYP2D6* nemaju detektibilne rezidualne enzimске aktivnosti. Homozigoti za kombinacije ovih alela predstavljaju fenotip sporog metabolizma (engl. *Poor Metabolizer; PM*) dok nositelji jednog null alela i jednog alela s normalnom funkcijom (npr. \*1 ili \*2) uglavnom imaju fenotip srednje brzog metabolizma (engl. *Intermediate Metabolizer; IM*). Ovi aleli su od velikog kliničkog značaja jer često rezultiraju promijenjenim klirensom lijeka i terapijskim odgovorom. PM se javlja u otprilike 5 – 10 % pripadnika bijele rase. Kod pripadnika bijele rase su null aleli \*3, \*4, \*5 i \*6 zajedno odgovorni za ~97 % fenotipa sporog metabolizma (Sachse i sur., 1997). Utvrđeno je da različiti mehanizmi dovode do potpunog gubitka funkcije gena. U nekim alela nalazimo promjene u jednom nukleotidu, male insercije i delecije koje dovode do pomaka u okviru čitanja ("*frameshift*" mutacije) ili interferiraju s prekrajanjem mRNA uzrokujući preuranjenu terminaciju translacije proteina (npr. *2D6\*3, \*4, \*6, \*8, \*11, \*15, \*19, \*20, \*38, \*40, \*42, \*44*) (Kagimoto i sur., 1990). Delecija čitavog gena *CYP2D6* nastaje kao rezultat većih kromosomskih delecija npr. *2D6\*5* (Gaedigk i sur.,

1991). Kod *CYP2D6/2D7P* hibridnih gena (*2D6\*13* i *\*16*) dolazi do prekida otvorenog okvira čitanja (dio gena koji kodira protein) zbog delecije velikog dijela sekvence lokusa *CYP2D* (Daly i sur., 1996b).

Daleko najčešći null alel u bijeloj populaciji je *CYP2D6\*4*. Javlja se uz učestalost od 20 – 25 % te je odgovoran za 70 – 90 % fenotipa sporog metabolizma. Ključna mutacija je tranzicija purinske baze A u G koja uzrokuje pomak na mjestu prekrajanja trećeg introna rezultirajući prekrojenom *mRNA* s jednom dodatnom bazom što dovodi do pomaka u okviru čitanja, preuranjene pojave stop kodona i terminacije sinteze proteina. U azijskim populacijama je učestalost *2D6\*4* alela samo 1 % ili manje dok je u Afrikanaca i Afroamerikanca 6 – 7 % (Griese i sur., 1999; Dahl i sur., 1995a; Johansson i sur., 1994). To objašnjava zašto je udio fenotipa sporog metabolizma u Kineskoj (1 %) i Afričkoj (0 – 5 %) populaciji niži u odnosu na bijelu populaciju (5 – 10 %) (Bertilsson i sur., 1992; Simooya i sur., 1993). Drugi nefunkcionalni aleli gotovo da nisu ni prisutni u tim populacijama, osim delecijskog alela *\*5* koji je u svim populacijama prisutan uz sličnu učestalost (Zanger i sur., 2004).

Aleli *CYP2D6\*9*, *\*10*, *\*17* i *\*41* dovode do značajnog smanjenja enzimske aktivnosti *CYP2D6*. Smanjena enzimska aktivnost često je rezultat smanjene stabilnosti proteina, poremećenog prepoznavanja supstrata ili smanjenog afiniteta enzima za supstrat. Nositelji ovih alela mogu biti PM ili IM. Studije o odnosu genotipa i fenotipa pokazale su da su aleli *\*9* i *\*10* zajedno odgovorni za otprilike 20 % fenotipa IM u bijeloj populaciji (Sachse i sur., 1997; Griese i sur., 1998). Alel *CYP2D6\*9* se u bijeloj rasi javlja uz učestalost od 1 - 2 % te odgovara fenotipu IM. Utvrđeno je da alelu *\*9* nedostaje kodon 281, ali je genski produkt enzimski funkcionalan (Tyndale i sur., 1991).

Mutacija 100C>T koja rezultira Pro<sup>34</sup>Ser je funkcionalno dominantna mutacija u alelu *CYP2D6\*10*. Pro<sup>34</sup> je dio regije bogate prolinom koja je visoko konzervirana među mikrosomalnim enzimima P450, a djeluje kao zglobna regija između hidrofobnog membranskog sidra i globularnog hem-vezujućeg dijela enzima (Yamazaki i sur., 1993). Studije su pokazale da polimorfizam rezultira smanjenom koncentracijom enzima *CYP2D6* u jetri, ali je zabilježena rezidualna enzimska aktivnost što objašnjava zašto homozigoti za *\*10* ili pojedinci s genotipom *\*10/\*0* fenotipski odgovaraju IM, a ne PM. (Zanger i sur., 2001). U bijeloj rasi alel *2D6\*10* ima učestalost od otprilike 2 – 5 % te je odgovoran za 10 – 20 % ukupnog fenotipa IM (Sachse i sur., 1997; Griese i sur. 1998). U azijskim populacijama je učestalost alela *2D6\*10* veća od 50 % (Zanger i sur., 2004).

Alel *CYP2D6*\*17 ima dvije nesoonimne mutacije zajedničke s \*2 i dvije dodatne mutacije koje rezultiraju smanjenjem enzimске aktivnosti (Oscarson i sur., 1997). Ovaj alel je praktički odsutan u europskih bijelaca, ali se u afričkim ili afroameričkim populacijama javlja uz učestalost od oko 30 %. (Griese i sur., 1999; Griese i sur., 1998; Leathart i sur., 1998; Eichelbaum i Woolhouse, 1985).

Studije su pokazale da nekoliko alela *CYP2D6* uključujući \*2A, \*17x2, \*27, \*35, \*39, \*41x2 i \*48 ne rezultiraju značajno promjenjenom enzimskom aktivnosti u odnosu na divlji tip alela (Gaedigk i sur., 2005).

Duplikacije i multiplikacije gena *CYP2D6* rezultat su nejednakog križanja (*engl. crossing over*) između dvije sestrinske kromatide. Otkriveni su aleli s 1, 2, 3, 4, 5 i 13 kopija gena (Aklillu i sur., 1996; Johanson i sur., 1993). U jednoj švedskoj obitelji otkriveno je čak 13 kopija funkcionalnog alela *CYP2D6* (Johanson i sur., 1993). Zabilježene su duplikacije alela \*1, \*2, \*4, \*6, \*10, \*17, \*29, \*35, \*43 i \*45 (Gaedigk i sur., 2007). U osoba s duplikacijom i multiplikacijom funkcionalnih alela \*1 i \*2 zabilježena je izuzetno visoka aktivnost enzima *CYP2D6*. Prisutnost više od 2 kopije funkcionalnog gena karakteristika je fenotipa UM. Očekuje se da će UM imati značajno povećan klirens supstrata enzima *CYP2D6* što može rezultirati smanjenjem ili izostankom terapijskog odgovora. Fenotip UM je povezan s pojavom neželjenih učinaka lijekova uglavnom zbog formiranja visokih koncentracija metabolita te se u ovog fenotipa očekuju 10 do 30 puta veće količine metabolita (Dalen i sur., 1997). Zastupljenost fenotipa UM također varira među etničkim skupinama. U nekim europskim populacijama zabilježena je niska prevalencija fenotipa UM: 0,8 % u Danskoj, 1 - 2 % u Švedskoj i 3,6 % u Njemačkoj (Sachse i sur., 1997; Dahl i sur., 1995b; Bathum i sur., 1998; Griese i sur., 1998). Nešto veća učestalost zabilježena je među bijelom i crnom populacijom u Americi (4,3 % i 4,9 %). Još je veća učestalost zabilježena u populacijama zemalja koje okružuju Sredozemno more: 8,7 % uTurskoj, 10 % na Siciliji i Italiji te 7 – 10 % u Španjolskoj (Scordo i sur., 1999; Aynacioglu i sur., 1999; Bernal i sur., 1999; Agundez i sur., 1995). Najveća učestalost fenotipa UM zabilježena je među pripadnicima crne rase: 16 % u Etiopiji i 20 % u Saudijskoj Arabiji (Aklillu i sur., 1996; McLellan i sur., 1997).

Studija provedena na populaciji Hrvatske je pokazala da je učestalost alela *CYP2D6*\*3, \*4, \*5 i \*6 slična kao i u ostalim europskim populacijama. Pokazalo se da učestalost fenotipa sporog metabolizma iznosi 5,6 % dok je učestalost pojave duplikacije gena 4,4 % (Ganoci i sur., 2017).

Tablica 2: Povezanost genotipa i fenotipa (*Preuzeto i prilagođeno prema Hicks i sur., 2016*)

Očekivani fenotip	Genotip	Učestali diplotipovi
Fenotip vrlo brzog metabolizma – UM (1 - 10 %)	Više od dvije kopije funkcionalnih alela.	*1/*1xN, *1/*2xN, *2/*2xN
Fenotip brzog metabolizma - EM (77 – 92 %)	Dva alela s potpunom ili reduciranom funkcijom. Jedan funkcionalni alel i jedan nefunkcionalni alel ili alel s reduciranom funkcijom	*1/*1, *1/*2, *2/*2, *1/*4, *1/*5, *1/*9, *1/*41, *2/*2, *41/*41
Fenotip srednje brzog metabolizma - IM (2 – 11 %)	Jedan nefunkcionalan alel i jedan alel s reduciranom funkcijom	*4/*10, *5/*41 *4/*10, *4/*41, *5/*9
Fenotip sporog metabolizma - PM (5 – 10 %)	Dva nefunkcionalna alela	*3/*4, *4/*4, *4/*5, *4/*6, *5/*5, *5/*6

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Enzim CYP2D6 je najpolimorfiji od svih enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova. Procjenjuje se da genetski polimorfizmi CYP2D6 značajno utječu na 50 % lijekova supstrata istoimenog enzima. Niz provedenih istraživanja povezalo je polimorfizme CYP2D6 s pojavom neželjenih učinaka lijekova ili izostankom terapijskog učinka. Procjenjuje se da bi prediktivna genotipizacija imala povoljan učinak na terapiju 30 – 50 % lijekova-supstrata enzima CYP2D6.

Upravo stoga se u svrhu postizanja optimalnog terapijskog učinka u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb provodi genotipizacija *CYP2D6*.

Cilj ovog rada je prikazati postupak farmakogenetske analize *CYP2D6* kao i utjecaj polimorfizama na učinkovitost i sigurnost terapije lijekovima-supstratima enzima CYP2D6.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izdvajanje DNA metodom *FlexiGene*<sup>®</sup>

##### Oprema

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10  $\mu$ L
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100  $\mu$ L
- sterilne mikroeprovete volumena 1,5 - 2,0 mL
- vrtložna miješalica
- mikrocentrifuga
- termostat

##### Reagensi:

- Reagens za izdvajanje DNA *FlexiGene*<sup>®</sup> DNA (*Qiagen, Hilden, Njemačka*)
- Otopljena *QIAGEN Protease* (*Qiagen, Hilden, Njemačka*)

##### Priprema reagensa:

*QIAGEN Protease* se priprema ovisno o vrsti kompleta reagensa:

- 50 mL *FlexiGene DNA Kit* (*Qiagen, Hilden, Njemačka*) se otapa u 0,3 mL komercijalnog pufera *FG3*
- 250 mL *FlexiGene DNA Kit* (*Qiagen, Hilden, Njemačka*) se otapa u 1,4 mL komercijalnog pufera *FG3*

Smjesa pufer *FG2/QIAGEN Protease* se priprema najviše sat vremena prije uporabe, a volumen smjese koja se priprema ovisi o volumenu krvi.

Tablica 3: Priprema smjese pufer *FG2/QIAGEN Protease* (*Qiagen, Hilden, Njemačka*)

Volumen reagensa ( $\mu$ L)	Volumen leukocitnog sloja ( $\mu$ L)						
	100	300	500	1000	3000	5000	6000
pufer <i>FG2</i>	100	300	500	1000	3000	5000	6000
<i>QIAGEN Protease</i>	1	3	5	10	30	50	60

##### Postupak izdvajanja DNA iz leukocitnog sloja:

Leukocitni sloj je gornji stanični sloj nakon centrifugiranja pune krvi u trajanju od 10 minuta pri 2500g. 1250  $\mu$ L pufera *FG1* se otpipetira u mikroeprovetu volumena 2 mL te mu se dodaje 500  $\mu$ L leukocitnog sloja. Sadržaj mikroeprovete se promiješa i potom centrifugira

u mikrocentrifugi 20 s pri 10000g. Supernatant se odlije, a talogu se dodaje 500  $\mu\text{L}$  već pripremljene smjese pufera *FG2/QIAGEN Protease*. Mikroeproveta se zatvara i protresa na vrtložnoj miješalici dok se talog ne homogenizira. Ako je uzorak želatinozan, dodaje se još 50  $\mu\text{l}$  pufera *FG2/QIAGEN Protease* te ponovo protresa na vrtložnoj miješalici. Mikroeproveta se kratko centrifugira 3-5 sekundi te se uzorak inkubira u termostatu 5 minuta na 65 °C. Zbog razgradnje proteina, boja uzorka iz crvene prelazi u zelenu. Uzorku se dodaje 500  $\mu\text{L}$  100%-tnog izopropanola te se sadržaj mikroeprove te temeljito promiješa okretanjem i potom centrifugira 3 minute na 10000 g. Supernatant se odlije, a talogu se dodaje 500  $\mu\text{L}$  70%-tnog etanola te se uzorak protresa na vrtložnoj miješalici 5 sekundi i centrifugira 3 minute na 10000 g. Supernatant se odlije, a mikroeproveta se ostavlja naopako naslonjena na sloj upijajućeg papir pritom pazeći da talog ostane u mikroeproveti. Talog se suši 5 minuta na zraku te mu se potom dodaje 200  $\mu\text{L}$  pufera *FG3*. Uzorak se lagano protresa na vrtložnoj miješalici 5 sekundi i inkubira u termostatu 30 minuta na 65 °C ili ostavlja na sobnoj temperaturi preko noći.

Tablica 4: Količina reagensa za postupak izdvajanja DNA ovisno o volumenu krvi

volumen reagenasa ( $\mu\text{L}$ )	volumen krvi ( $\mu\text{L}$ )				
	100	200	300	400	500
pufer <i>FG1</i>	250	500	750	1000	1250
pufer <i>FG2/ QIAGEN Protease</i>	100	200	300	400	500
100% izopropanol	100	200	300	400	500
70% etanol	100	200	300	400	500
pufer <i>FG3</i>	200	200	200	200	200

#### Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija DNA se mjeri na spektrofotometru te izračunava na osnovu optičke gustoće otopine (eng. *Optical Density*, OD) pri valnoj duljini od 260 nm. DNA se razrjeđuje puferom *FG3* najčešće u omjeru 1:100 (OD=1 odgovara približno 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dvolančane DNA):

$$\text{Konc. DNA } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{razrjeđenje}(100) \times 50$$

Koncentracija DNA izolirane iz 300  $\mu\text{L}$  sloja leukocita (engl. buffy coat) ( $30 \times 10^9/\text{L}$  leukocita) trebala bi iznositi 110 – 130  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Čistoća DNA se određuje mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 260 i 280 nm. Omjer  $A_{260}/A_{280}$  od 1,7 – 1,9 ukazuje na visoku

čistoću DNA bez onečišćenja proteinima. Prema uputama proizvođača, omjer  $A_{260}/A_{280}$  bi trebao biti  $> 1,7$ .

### 3.2. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) je metoda kojom se *in vitro* može vrlo brzo umnožiti specifični fragment DNA molekule u velik broj identičnih kopija. Za otkriće ove metode je Kary Mullis 1993. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. PCR se može izvesti koristeći DNA iz različitih tkiva i organizama, uključujući perifernu krv, kožu, kosu, slinu i mikroorganizme. Svaka reakcijska smjesa za PCR mora sadržavati izoliranu DNA kao kalup (npr. cDNA, genomska DNA), smjesu četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), dvije specifične početnice, termostabilnu DNA-polimerazu, katione  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ) i pufer. DNA polimeraza je ključni enzim koji povezuje pojedine dNTP u željeni PCR produkt. Za PCR se koristi termostabilna *Taq*-polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* optimalnog djelovanja pri  $72\text{ }^{\circ}C$ . *Taq*-polimeraza je identificirana kao enzim koji može djelovati pri denaturacijskim uvjetima neophodnim za izvedbu PCR dok većina drugih DNA-polimeraza pri toliko visokoj temperaturi ( $94 - 96\text{ }^{\circ}C$ ) nepovratno gubi aktivnost zbog denaturacije. Ona sintetizira novi lanac DNA komplementaran kalupu krećući od 3'-kraja lanca kalupa. Početnice (engl. *primer*) su sintetski dobivene kratke oligonukleotidne sekvence duljine 10-25 nukleotida koje određuju specifičnost fragmenta koji se umnaža. Nukleotidni slijed početnica mora biti komplementaran 3' i 5' krajevima DNA fragmenta koji želimo umnožiti. Magnezij je kofaktor DNA-polimeraze te održava stabilnost i optimalni naboj dNTP-a.

PCR se sastoji od 20-40 ponavljanih ciklusa 3 uzastopna koraka (denaturacija, povezivanje početnica i elongacija) koji zahtijevaju različite temperaturne uvjete. Svaki korak je posvećen određenom procesu, što u konačnici dovodi do nastanka velikog broja kopija željenog DNA fragmenta. Reakcija se postiže upotrebom uređaja za umnožavanje (engl. *thermocycler*) u kojemu se uzorci nalaze u termo bloku gdje se provode brze i kontrolirane temperaturne promjene prema unaprijed definiranom programu.

Faze lančane reakcije polimeraze su:

- 1) Inicijalizacija: temperatura reakcijske smjese raste na  $94 - 96\text{ }^{\circ}C$  te traje otprilike 1 minutu što dovodi do aktivacije DNA-polimeraze



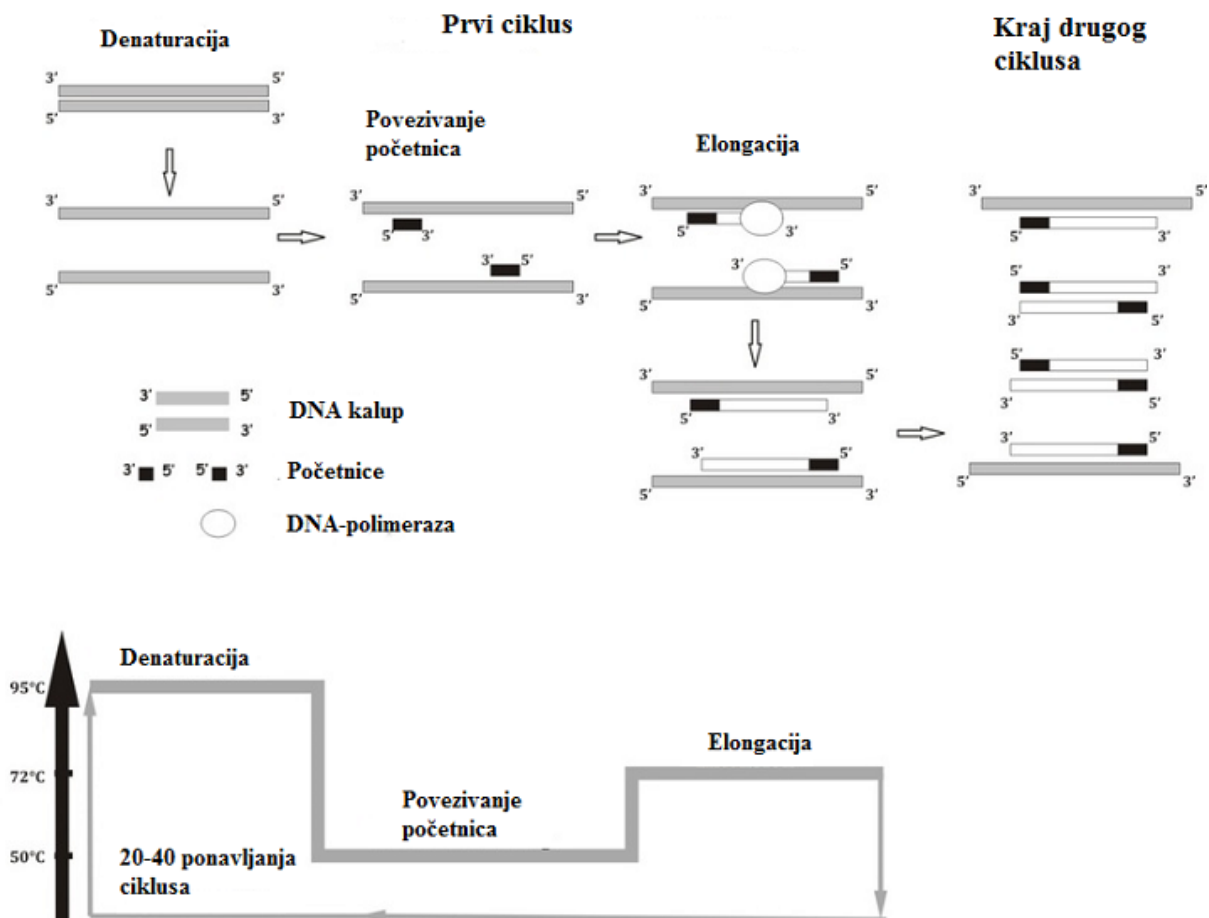
2) Denaturacija molekule DNA: razdvajanje dvolančane DNA (engl. *double-stranded DNA, dsDNA*) u dva jednolančana lanca (engl. *single stranded DNA, ssDNA*) zagrijavanjem reakcijske smjese na 94 – 98 °C u trajanju od 20-30 sekundi

3) Hibridizacija početnica (engl. *annealing*): reakcijska smjesa se hladi na 50 – 60 °C u trajanju od 20-40 s čime je omogućeno specifično vezanje početnica na ssDNA. Koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi je prisutna u suvišku u odnosu na kalup DNA što sprječava ponovno sparivanje jednolančanih lanaca DNA kalupa.

4) Sinteza komplementarnog lanca, odnosno produljenje (elongacija) DNA lanca u trajanju od otprilike 2 minute pri temperaturi od 72 °C, što je optimalna temperatura za djelovanje *Taq*-polimeraze

5) Nakon zadnjeg ciklusa produljenja DNA lanca, reakcijska smjesa ostaje na 70 – 74 °C u trajanju od 5-15 minuta kako bi se sintetizirali svi nedovršeni DNA fragmenti, a ovaj korak zovemo završno produljenje

Slika 2: Shema lančane reakcije polimeraze ([www.researchgate.net](http://www.researchgate.net))



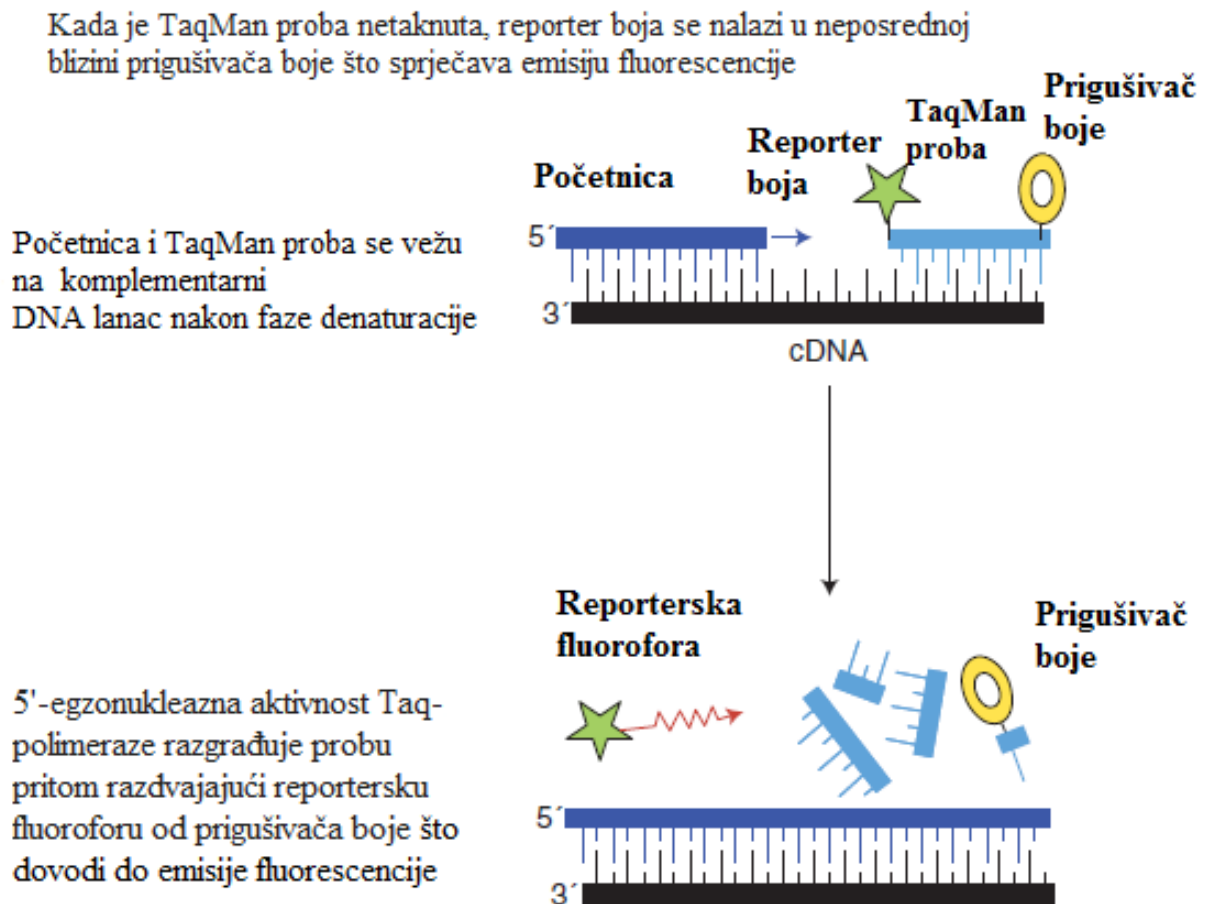
Ponavljanjem koraka denaturacije, hibridizacije početnica i elongacije tijekom 20-40 ciklusa umnožavanja, količina umnožene DNA eksponencijalno raste jer u svakom ciklusu nastaje dvostruko veći broj umnoženog fragmenta DNA te je broj molekula DNA nakon N ciklusa jednak  $2^N$ . Uspješnost provedene reakcije se provjerava elektroforezom PCR produkta na agaroznom gelu gdje se dobiveni produkti razdvajaju na temelju veličine te detektiraju spojem koji fluorescira kada je interkaliran u dvostruku uzvojnici DNA (npr. etidij-bromidom) (Ishmael i Stellato, 2008).

### 3.2.1. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time PCR*)

Real-time PCR je inačica klasičnog PCR-a koja omogućava kontinuiranu kvantifikaciju novonastale DNA praćenjem fluorescencije tijekom svakog ciklusa umnažanja. Razlikujemo dva principa kvantifikacije nastalog PCR produkta. Prvi princip podrazumijeva primjenu nespecifičnih boja koje emitiraju fluorescenciju tek nakon vezanja na dvostruku uzvojnici DNA. Primjer takve boje je SYBR Green I kod koje je emisija fluorescencije prilikom vezanja na dsDNA 1000 puta veća nego kada se nalazi slobodna u otopini. Intenzitet fluorescencije se povećava proporcionalno količini umnožene dsDNA, omogućujući kvantitativnu analizu PCR produkta. Glavni nedostatak ovakvog pristupa je što takve boje nisu specifične, odnosno vežu se na svu dsDNA prisutnu u uzorku (npr. na primer-dimere, nespecifične PCR produkte). Drugi princip podrazumijeva primjenu specifičnih fluorescentno-obilježenih proba (poznatog nukleotidnog slijeda) koje hibridiziraju na DNA od interesa (kalup) tijekom umnažanja.

Jedna izvedba metode je *TaqMan*<sup>®</sup> metoda koja podrazumijeva primjenu dvostruko obilježenih hidrolizirajućih proba (*TaqMan*<sup>®</sup> probe) koje na 5'-kraju sadrže kovalentno vezanu fluorescentnu reporter boju (engl. *reporter*), a na 3'-kraju molekule prigušivač boje (engl. *quencher*). Dok je proba netaknuta, prigušivač boje apsorbira fluorescenciju koju emitira reporter boja kroz pojavu koja se zove rezonantni prijenos energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Ako je u uzorku prisutna ciljana sekvenca, fluorescentno obilježena proba će se vezati na kalup nishodno od početnice. Prilikom umnažanja specifičnog DNA fragmenta, tijekom faze elongacije će *Taq*-polimeraza zahvaljujući svojoj 5'→3' egzonukleaznoj aktivnosti razgraditi vezanu *Taqman* probu. Kada je reporterska boja odvojena od prigušivača boje, dolazi do emisije fluorescencije koju uređaj detektira. Sa svakim ciklusom se oslobađa sve više reporterske boje te je povećanje intenziteta emitirane fluorescencije direktno proporcionalno količini umnoženog PCR produkta. Upotrebom

različito obilježenih *TaqMan* proba (različitim fluorescentnim bojama) od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu, može se izvoditi analiza više alela istovremeno.



Slika 3: Shema dvostruko obilježenih proba korištenih u *TaqMan*<sup>®</sup> metodi (*Preuzeto i prilagođeno prema Arya M i sur., 2005*)

Primjenom ove metode mogu se razlikovati homozigoti za određeni alel od heterozigota na način da se proba specifična za divlji tip alela obilježi jednom fluorescentnom bojom, a proba specifična za određenu alelnu varijantu drugom fluorescentnom bojom. Ukoliko uređaj detektira samo jednu od tih fluorescentnih boja, prisutan je homozigot za divlji tip alela odnosno homozigot za mutirani alel. U slučaju heterozigota, uređaj će detektirati dvije fluorescentne boje (Arya i sur., 2005; Pryor i Wittwer, 2006).

### 3.2.2. Long-PCR

Long PCR je inačica klasičnog PCR-a kod koje se u svrhu umnažanja većih DNA fragmenata osim *Taq*-polimeraze koristi još jedna dodatna termostabilna DNA-polimeraza. *Taq*-polimeraza je učinkovita u umnažanju DNA fragmenata manjih od 1000 bp, međutim nije pogodna za umnažanje većih DNA fragmenata. Razlog tome je nedostatak 3'→5' egzonukleazne aktivnosti što rezultira nakupljanjem PCR produkata s pogrešno ugrađenim dušičnim bazama. Nedovršeni PCR fragmenti u kojima je došlo do ugradnje krive baze na 3'-kraju često se ne sintetiziraju do kraja što rezultira smanjenom učinkovitosti umnažanja. Druge termostabilne DNA-polimeraze manje su sklone ugradnji pogrešne baze u odnosu na *Taq*-polimerazu zahvaljujući 3'→5' egzonukleaznoj aktivnosti koja im omogućava popravak krivo ugrađene baze. Korištenjem jedne od ovih polimeraza u kombinaciji s *Taq*-polimerazom smanjuje se broj pogrešno ugrađenih dušičnih baza te povećava učinkovitost umnažanja velikih DNA fragmenata (Wiltoni Lim L,1996).

### 3.3. Genotipizacija *CYP2D6*\*3, \*4, \*6 i \*41

Varijantni alel *CYP2D6*\*4 je zastupljen u 24 % bjelačke populacije, a učestalost homozigotnih nositelja \*4/\*4 iznosi otprilike 3 % u bjelačkoj populaciji. *CYP2D6*\*3 je zastupljen u 1 % bjelačke populacije, *CYP2D6*\*41 u 10 % bjelačke populacije te *CYP2D6*\*6 u 1 % bjelačke populacije.

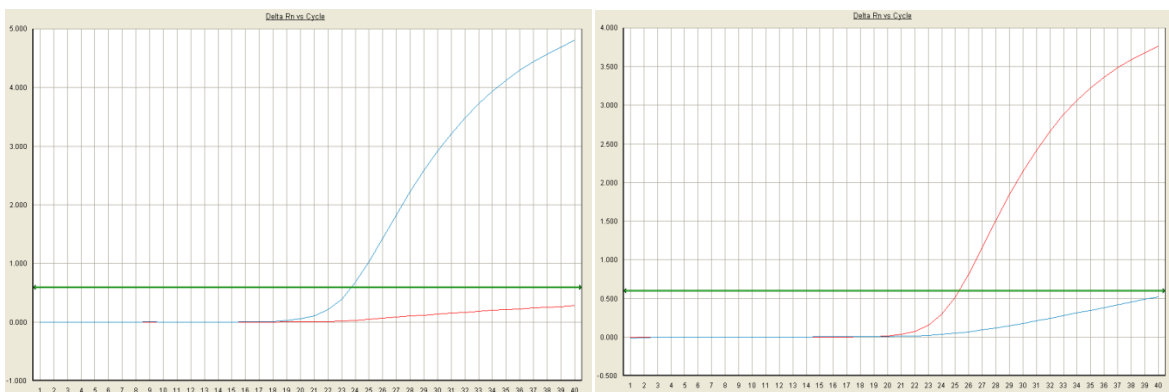
Tablica 5: Nukleotidne promjene u alelima *CYP2D6*\*3, \*4, \*6 i \*41

Gen - alel	db SNP (rs)	nukleotidna promjena	<i>TaqMan</i> ® DME Assay ID
<i>CYP2D6</i> *3	rs35742686	1749A>G; 2549delA	C__32407232_50
<i>CYP2D6</i> *4	rs3892097	1846G>A	C__27102431_D0
<i>CYP2D6</i> *6	rs5030655	1707T>del; 1707 del T	C__32407243_20
<i>CYP2D6</i> *41	rs28371725	2988G>A	C__34816116_20

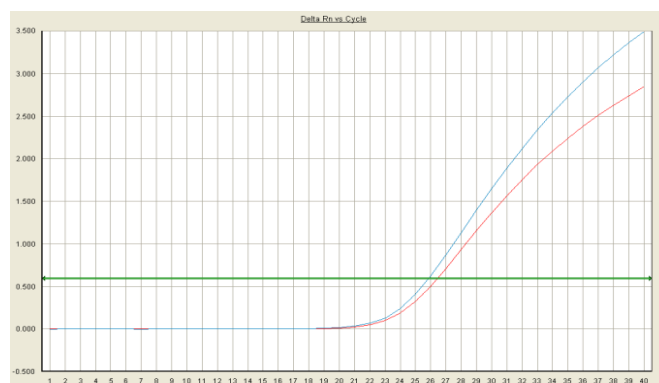
U svrhu određivanja polimorfizama *CYP2D6* \*3, \*4, \*6 i \*41 primjenjuje se *TaqMan*® metoda PCR u stvarnom vremenu. Primjenom *TaqMan*® Drug Metabolism Genotyping

Assay (*TaqMan*<sup>®</sup> *DME*) mogu se otkriti i analizirati polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism, SNP*). *TaqMan*<sup>®</sup> *DME* sadrži dvije specifične početnice i dvije *TaqMan*<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe od kojih se jedna proba veže za divlji tip alela, a druga za mutirani tip alela. Na 5'-kraju svake probe se nalazi reporter boja VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup>, a na 3'-kraju nefluorescentni prigušivač boje. Tijekom PCR reakcije *Taq*-polimeraza produžuje početnice te svojom 5'-nukleaznom aktivnošću cijepa probe koje su hibridizirane na ciljni slijed DNA. Cijepanje odvaja prigušivač boje od reporter boje što dovodi do emisije fluorescencije. Fluorescentni signal koji se stvara tijekom PCR amplifikacije detektira se i analizira pomoću računalnog programa. Prisutnost fluorescentnog signala VIC<sup>®</sup> i/ili FAM<sup>®</sup> ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela.

Slika 4: Prisutnost samo jednog fluorescentnog signala, npr. samo VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup> ukazuje na homozigotni genotip



Slika 5: Prisutnost oba fluorescentna signala (VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup>) upućuje na heterozigotni genotip



### Uzorak

- Primarni uzorak: puna krv s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA
- Sekundarni uzorak: otopina DNA u Tris-EDTA puferu

### Reagensi za genotipizaciju CYP2D6 na uređaju ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)

- *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6\*3 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*
- *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6\*4 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*
- *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6\*6 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*
- *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2D6\*41 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*
- *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*

### Kontrole:

- pozitivna kontrola za CYP2D6\*3/ CYP2D6\*4/ CYP2D6\*6/ CYP2D6\*41
- negativna kontrola

### Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10 µL
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL
- sterilne mikroeprovete volumena 0.2, 0.5 i 1.5 – 2.0 mL
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom ili „strip“ mikroeprovete s poklopcima
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete
- vrtložna miješalica
- mikrocentrifuga
- centrifuga za mikrotitarske pločice
- 

### Postupak

*TaqMan<sup>®</sup> DME Assay Mix* se otapa na sobnoj temperaturi zaštićen od svjetlosti te se pripremaju razrjeđenja DNA. Reagensi se lagano promiješaju na vrtložnoj miješalici te centrifugiraju u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se sadržaj bočica spustio na dno.

U svaku mikroeprevetu se otpipetira 12,5  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* i 1,25  $\mu\text{L}$  *TaqMan*<sup>®</sup> *DME Assay*. Sadržaj mikroeprevete se lagano promiješa protresanjem te potom centrifugira 3-5 s. Reakcijska smjesa se pipetira u mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroeprevete te joj se dodaje DNA. Ukupni volumen svakog uzorka iznosi 25  $\mu\text{L}$ .

Tablica 6: Sastojci reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu na uređaju *ABI 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*. Za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući *TaqMan*<sup>®</sup> *DME Assay*.

Sastojci reakcijske smjese	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Universal PCR Master Mix</i>	12.5
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>DME Assay Mix, 20X</i>	1.25
DNA razrjeđenje	11,25
Ukupni volumen reakcijske smjese	25

U svakoj seriji uzoraka koriste se tri pozitivne kontrole poznatog genotipa od kojih je jedna kontrola za heterozigotni genotip, a dvije kontrole za homozigotni genotip. U negativnu kontrolu se umjesto genomske DNA dodaje samo destilirana voda. Mikrotitarska pločica se zatvara pokrovnom folijom ili „strip“ mikroeprevete poklopcima te se centrifugiraju 3-5 s pri 3000 rpm. Gotovi uzorci se stavljaju u uređaj *ABI 7500 real-time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)* te se pokreće odgovarajući program (za alelnu diskriminaciju ili umnažanje). Nakon završetka programa očitava se rezultat.

Tablica 7: Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *CYP2D6*\*3,\*4, \*6 i \*41 na uređaju ABI 7500 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD).

	Temperatura	Trajanje
<b>Pre-PCR Read</b>	60 °C	1 min
<b>Inicijacija</b>	50 °C 95 °C	2 min 10 min
<b>50 ciklusa umnožavanja: Denaturacija</b>	92 °C	15 s
<b>Vežanje početnica i amplifikacija</b>	60 °C	90 s
<b>Post-PCR Read</b>	60 °C	1 min

#### 3.4. Genotipizacija *CYP2D6*\*5

Varijantni alel *CYP2D6*\*5 (delecija) je zastupljen u otprilike 1 % bjelačke populacije. U svrhu umnažanja i detekcije delecije gena *CYP2D6* koristi se metoda Long-PCR.

##### Uzorak

- Primarni uzorak: puna krv s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA
- Sekundarni uzorak: otopina DNA u *Tris*-EDTA puferu

##### Mjerni uređaji i oprema:

- Uređaj za PCR *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD).
- Sustav za elektroforezu *Sub-Cell GT* (Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD)
- Uređaj za snimanje i analizu gelova
- Mikrocentrifuga
- Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10 - 100 µL
- Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 - 10 µL
- Vrtložna miješalica
- Sterilne mikroeprovete volumena 0.2, 0.5 i 1.5 – 2.0 mL
- Sterilne eprovete za PCR uređaj volumena 200 µL



### Reagensi:

- Početnice („primeri“), 20 µM (*TIBMOLBIOL, Berlin, Njemačka*)
  - *CYP2D6\*5f* 5'-ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA -3'
  - *CYP2D6\*5r* 5'-GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C-3'
  - *DPKLow* 5'-GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA-3'
  - *DPKup* 5'-GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A-3'
- *Expand Long polymerase*, 5 U/µL (*Roche, Basel, Švicarska*)
- Set deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 10 mM (*Roche, Basel, Švicarska*)
- *PCR pufer 3* (*Roche, Basel, Švicarska*)
- Boja za nanošenje produkata PCR na gel (*Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD*)
- Agarozna za pripremu gela za elektroforezu nukleinskih kiselina (*Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD*)
- *GelRed Drops* (*Olerup, Beč, Austrija*)
- DNA Molekularni marker III, standard veličine, 0,12-21,2 kpb (*Roche, Basel, Švicarska*)

### Kontrole:

- pozitivna kontrola *CYP2D6\*5*
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda za PCR)

### Postupak:

Reagensi se lagano promiješaju na vrtložnoj miješalici te centrifugiraju u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se sadržaj bočica spustio na dno. Reakcijska smjesa za Long-PCR se priprema prema protokolu navedenom u Tablici 8. Gotovi uzorci se stavljaju u uređaj *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD*) i pokreće odgovarajući program za amplifikaciju. Kvaliteta umnoženog PCR produkta provjerava se elektroforezom u 1 % agaroznom gelu u trajanju od 45 min te pri naponu od 100 V. Veličina umnoženih DNA fragmenata analizira se uz pripadajući marker III (*Roche, Basel, Švicarska*).

Tablica 8: Sastojci reakcijske smjese za Long-PCR na uređaju *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD).

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)
Sterilna destilirana H <sub>2</sub> O za PCR	1
<i>PCR pufer 3</i>	2
dNTP (10 mM)	2
<i>CYP2D6*5f</i> (20 μM)	0,5
<i>CYP2D6*5r</i> (20 μM)	0,5
DPKLow (20 μM)	1,0
DPKup (20 μM)	1,0
<i>Expand Long polymerase</i> (5 U/μL)	1,0
Smjesa za PCR	47,0
Uzorak DNA	3,0
Ukupni volumen reakcijske smjese za PCR	50,0

Tablica 9: Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *CYP2D6\*5* na uređaju *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)

	Temperatura	Trajanje
<b>Početna denaturacija</b>	93 °C	1 min
<b>37 ciklusa umnožavanja</b>		
<b>Denaturacija</b>	93 °C	1 min
<b>Amplifikacija</b>	60 °C	1 min
<b>Elongacija</b>	68 °C	7 min
<b>Završna elongacija</b>	72 °C	10 min

### Interpretacija rezultata:

- \*1/\*1 (nije prisutna delecija gena *CYP2D6*)
- \*1/\*5 (prisutna je djelomična delecija gena *CYP2D6*)
- \*5/5\* (prisutna je obostrana delecija gena *CYP2D6*)

### 3.5. Genotipizacija *CYP2D6*\*2

Varijantni alel *CYP2D6*\*IXN (duplikacija) je zastupljen u 3 - 10 % bjelačke populacije. U svrhu umnažanja i detekcije duplikacije gena *CYP2D6* koristi se metoda Long-PCR.

### Uzorak

- Primarni uzorak: puna krv s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA
- Sekundarni uzorak: otopina DNA u *Tris*-EDTA puferu

### Mjerni uređaji i oprema:

- Uređaj za PCR *Gene Amp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD*)
- Sustav za elektroforezu *Sub-Cell GT* (*Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD*)
- Uređaj za snimanje i analizu gelova
- Mikrocentrifuga
- Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10 - 100 µL
- Automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 - 10 µL
- Vrtložna miješalica
- Sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5 - 2,0 mL
- Sterilne epruvete za PCR uređaj volumena 200 µL

### Reagensi:

- Početnice („primeri“), 5 µM (*TIB MOLBIOL, Berlin, Njemačka*)
  - *CYP2D6*-32r 5'-CAC GTG CAG GGC AC CTA GAT-3'
  - *CYP2D6*-17f 5'-TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT-3'
- *Expand Long polymerase*, 5 U/µL (*Roche, Basel, Švicarska*)
- Set deoksinukleozid trifosfata (dNTP), 10 mM (*Roche, Basel, Švicarska*)
- *PCR pufer 3* (*Roche, Basel, Švicarska*)
- Boja za nanošenje produkata PCR na gel 6X (*Sigma-Aldrich, Missouri, SAD*)

- Agarozna za pripremu gela za elektroforezu nukleinskih kiselina Grade >1000 pb (*Merck, Kenilworth, New Jersey, SAD*)
- *GelRed Drops (Olerup, Beč, Austrija)*
- DNA Molekularni marker III - standard veličine, 0,12-21,2 kpb (*Roche, Basel, Švicarska*)

Kontrole:

- pozitivna kontrola *CYP2D6*\*dupl
- negativna kontrola (sterilna destilirana voda za PCR)

Postupak:

Reagensi se lagano promiješaju na vrtložnoj miješalici te centrifugiraju u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se sadržaj bočica spustio na dno. Reakcijska smjesa za Long-PCR se priprema prema protokolu navedenom u Tablici 9. Gotovi uzorci se stavljaju u uređaj *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)* te se pokreće odgovarajući program za amplifikaciju. Detekcija i analiza PCR produkta provodi se elektroforezom umnoženih fragmenata u 1 % agaroznom gelu pri u trajanju od 45 min te pri naponu od 100 V. Veličina umnoženih DNA fragmenata analizira se uz pripadajući marker III (*Roche, Basel, Švicarska*) (5.200 pb za wt i 3.600 pb za duplikaciju).

Tablica 9: Sastojci reakcijske smjese za Long-PCR na uređaju *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD)*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)
Sterilna destilirana H <sub>2</sub> O za PCR	35,0
<i>PCR pufer 3</i>	5
dNTP (10 mM)	2
Primer f (5 μM)	2
Primer r (5 μM)	2
<i>Expand Long polymerase (5 U/μL)</i>	1,0
Smjesa za PCR	47,0
Uzorak DNA	3,0
Ukupni volumen reakcijske smjese za PCR	50,0

Tablica 10: Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *CYP2D6\*1xN* na uređaju *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems, Carlsbad, CA, SAD*)

	<b>Temperatura</b>	<b>Trajanje</b>
<b>Početna denaturacija</b>	93 °C	1 min
<b>37 ciklusa umnožavanja</b>		
<b>Denaturacija</b>	93 °C	1 min
<b>Amplifikacija</b>	67 °C	33 s
<b>Elongacija</b>	68 °C	6 min
<b>Završna elongacija</b>	72 °C	10 min

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Klinički značaj genske varijabilnosti *CYP2D6*

Procjenjuje se da je *CYP2D6* uključen u metabolizam 20 – 25 % lijekova korištenih u kliničkoj praksi (Ingelman-Sundberg, 2004b). Polimorfizmi *CYP2D6* značajno utječu na farmakokinetiku otprilike 50 % lijekova-supstrata ovog enzima. Posljedice polimorfizama mogu biti izostanak terapijskog odgovora ili pojava neželjenih učinaka lijekova. Štetni učinci zbog povišene plazmatske koncentracije lijeka češće se javljaju kod PM, u slučajevima kada je eliminacija lijeka ovisna o *CYP2D6*. Smanjena aktivnost *CYP2D6* također može rezultirati smanjenom učinkovitošću terapije prolijekovima koji se biotransformacijom prevode u aktivne metabolite. U UM može doći do izostanka terapijskog učinka prilikom primjene standardne doze lijeka ili do pojave neželjenih učinaka prilikom primjene prolijeka zbog prekomjernog nastanka aktivnog metabolita (Ingelman- Sundberg, 2004b; Ingelman-Sundberg, 1999).

Tablica 11 : Supstrati *CYP2D6* (*Preuzeto i prilagođeno prema Ingelman-Sundberg, 2005*)

Analgetici	dekstrometorfan, dihidrokodein, fentanil, hidrokodon, kodein, meperidon, metadon, morfin, oksikodon, tramadol
Antagonisti $\beta$ -adrenoreceptora	alprenolol, atenolol, bisoprolol, bufuralol, bupranolol, karvedilol, metoprolol, propranolol, timolol
Antiaritmici	enkainid, flekainid, meksiletin,
TCA	amitriptilin, desimipramin, imipramin, klomipramin,
SSRI	citalopram, demetilcitalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, venlafaksin
Drugi antidepresivi	maprotilin, mianserin, trazodon
Antiemetici	ondansetron, tropisetron
Antipsihotici	haloperidol, klorpromazin , klozapin, levopromazin, risperidon, tioridazin, trifluperidol, zuklopentiksol
Drugi lijekovi	amfetamin, indoramin, debrisoquin, flunarazin, klorpropamid, metamid
Inhibitori <i>CYP2D6</i>	kinidin, fluoksetin, levopromazin, metadon, paroksetin

Procjenjuje se da bi prediktivna genotipizacija mogla biti korisna u terapiji 30 – 40 % lijekova-supstrata *CYP2D6*, odnosno 7 – 10 % svih klinički korištenih lijekova. Genotipizacijom *CYP2D6* se može uspješno predvidjeti klirens nekih antidepresiva uključujući desipramin, fluvoksamin, meksiletin, mianserin, nortriptilin i paroksetin, kao i antipsihotika perfenazina i zuklopentiksola te kompetitivnog antagonista muskarinskih receptora tolterodina (Ingelman-Sundberg, 2005)

#### 4.1.1. Opioidni analgetici

Kodein je opioidni analgetik indiciran u terapiji blage do umjerene boli. Analgetska svojstva kodeina temelje se na njegovoj *in vivo* konverziji u morfin i morfin-6-glukuronid jer je afinitet kodeina za  $\mu$ -opioidne receptore 200 puta manji od afiniteta morfina. U brzih metabolizatora je O-demetilacija kodeina u morfin enzimom CYP2D6 minorni metabolički put, odgovoran za svega 5 – 10 % klirensa kodeina. Ovaj metabolički put je međutim esencijalan za opioidnu aktivnost kodeina. Udio kodeina prevedenog u morfin može biti pod utjecajem interakcija lijekova te isto tako može biti značajno veći u vrlo brzih metabolizatora (Gasche i sur., 2004). Morfin se potom glukuronidacijom prevodi u morfin-3-glukuronid i morfin-6-glukuronid. Morfin-6-glukuronid ima analgetsku aktivnost, a morfin-3-glukuronid nema. Otprilike 80 % doze kodeina se prevodi u inaktivne metabolite koji nemaju analgetska svojstva, enzimom UDP-glukuronozil transferazom do kodein-3-glukuronida te N-demetilacijom u norkodein putem enzima CYP3A4 (Crews i sur., 2012).

Analgetski učinak kodeina je usko povezan s farmakogenetikom *CYP2D6*. Rezultati studija upućuju na sniženu razinu morfina i smanjen analgetski učinak u sporih metabolizatora na terapiji kodeinom u usporedbi s brzim metabolizatorima (Eckhardt i sur., 1998; Lötsch i sur., 2009). U PM na terapiji kodeinom je također smanjena i učestalost pojave gastrointestinalnih nuspojava (npr. konstipacije) u odnosu na brze metabolizatore (Mikus i sur., 1997). S druge strane, povećana pretvorba kodeina u morfin u vrlo brzih metabolizatora može rezultirati visokom sistemskom koncentracijom morfina, čak i pri niskim dozama kodeina (Gasche i sur., 2004). Najčešće nuspojave kodeina uključuju pospanost, vrtoglavicu, sedaciju, otežano disanje, mučninu, povraćanje i znojenje. Ozbiljne nuspojave uključuju respiratornu i cirkulatornu depresiju, prestanak disanja i rada srca. Kodein i njegovi metaboliti, uključujući i morfin, u niskoj se količini izlučuju i u majčino mlijeko. U žena s fenotipom vrlo brzog metabolizma se prilikom primjene standardne doze kodeina može postići vrlo visoka serumska koncentracija morfina što može rezultirati visokom koncentracijom morfina u majčinom mlijeku te posljedično i visokom serumskom koncentracijom morfina u dojenčadi. Nakon slučaja fatalne intoksikacije novorođenčeta morfinom, čija je majka bila UM za CYP2D6 te kojoj je za vrijeme dojenja propisan analgetik s kodeinom, FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) je zahtijevao da u uputi o lijeku bude navedena i informacija o povećanom riziku od predoziranja novorođenčadi morfinom u razdoblju dojenja (Koren i sur., 2006; Madadi i sur., 2009). Terapija kodeinom se ne preporuča ni djeci mlađoj od 2 godine starosti kako bi se izbjegla pojava toksičnih serumskih

koncentracija morfina u vrlo brzih metabolizatora. Usprkos svim navedenim podacima, kodein je i dalje u širokoj upotrebi te kod većine pacijenata na terapiji kodeinom nije prethodno provedena genotipizacija *CYP2D6*. Smjernice preporučuju upotrebu alternativnih analgetika u osoba koje su spori ili vrlo brzi metabolizatori za *CYP2D6*.

Tablica 12: Smjernice za terapiju kodeinom ovisno o metaboličkom fenotipu *CYP2D6*  
(Preuzeto i prilagođeno prema Crews i sur., 2012).

Fenotip	Očekivani metabolizam kodeina	Smjernice za terapiju kodeinom	Preporuke za alternativnu terapiju analgeticima
<b>UM</b>	Povećana tvorba morfina (povećan rizik od toksičnosti)	Izbjegavati terapiju kodeinom zbog potencijalne toksičnosti.	Morfin ili neopioidni analgetici
<b>EM</b>	Normalna tvorba morfina	Specifično doziranje kodeina s obzirom na dob i težinu.	/
<b>IM</b>	Reducirana tvorba morfina	Specifično doziranje kodeina s obzirom na dob i težinu. U slučaju neučinkovitosti, razmotriti terapiju drugim analgeticima.	Tramadol uz praćenje učinka
<b>PM</b>	Vrlo reducirana tvorba morfina (nedostatna analgezija)	Izbjegavati terapiju kodeinom zbog neučinkovitosti..	Morfin ili neopioidni analgetici

Uz kodein se i nekoliko drugih opioida barem djelomično metabolizira putem *CYP2D6*. Ti opiodi su tramadol, hidrokodon i oksikodon koji se *O*-demetilacijom putem *CYP2D6* prevode u *O*-demetiltramadol, hidromorfon i oksimorfin (Crews i sur., 2012).

Tramadol se ekstenzivno metabolizira putem nekoliko enzima uključujući i *CYP2D6*-posredovanu *O*-demetilaciju. *O*-demetiltramadol ima 200 puta veći afinitet za  $\mu$ -opioidne receptore od samog tramadola te je posljedično zaslužan za analgeziju posredovanu opioidnim receptorima te pridonosi analgeziji mehanizmom inhibicije ponovnog povrata neurotransmitera serotonina i noradrenalina. Prilikom primjene iste doze tramadola, u sporih metabolizatora za *CYP2D6* zabilježena je značajno niža vršna koncentracija aktivnog metabolita u odnosu na brze metabolizatore (Stamer i sur., 2007). Nekoliko kliničkih studija upućuje i na izostanak analgetskog učinka tramadola u sporih metabolizatora te je stoga vjerojatno da tramadol ima smanjeni terapijski učinak u PM (Poulsen i sur., 1996; Stamer i



sur., 2003). Farmakokinetičke studije su pokazale da se u vrlo brzih metabolizatora za CYP2D6 postižu veće plazmatske koncentracije *O*-demetiltramadola u odnosu na brze metabolizatore nakon primjene iste doze. Posljedično u vrlo brzih metabolizatora dolazi do pojačane analgezije, pojačane mioze te povećane učestalosti pojave mučnine (Kircheiner i sur., 2008). Smjernice preporučuju uporabu alternativnih analgetika u osoba koje su spori ili vrlo brzi metabolizatori za CYP2D6 (Crews i sur., 2004).

Hidrokodeon se putem CYP2D6 biotransformira u hidromorfon koji ima 10-33 puta veći afinitet za  $\mu$ -opioidne receptore od samog hidrokodeona. Prilikom primjene iste doze hidrokodeona, u sporih metabolizatora je zabilježena niža vršna koncentracija hidromorfona u odnosu na brze metabolizatore, što međutim ne utječe na farmakološki učinak hidrokodeona (Otton i sur., 1993; Kaplan i sur., 1997). Ne postoji dovoljno dokaza koji bi upućivali na umanjeni analgetski učinak hidrokodeona u sporih metabolizatora ili na povećan rizik od toksičnosti u vrlo brzih metabolizatora.

Otprilike 11 % doze oksikodona se putem enzima CYP2D6 *O*-demetilacijom prevodi u minorni metabolit oksimorfin koji ima 40 puta veći afinitet za  $\mu$ -opioidne receptore. Prilikom primjene iste doze oksikodona, u sporih metabolizatora za CYP2D6 je zabilježena niža vršna koncentracija oksimorfina u odnosu na brze metabolizatore (Andreassen i sur., 2011). U provedenim kliničkim studijama dobiveni su suprotni rezultati glede odnosa između metaboličkog fenotipa za CYP2D6 te analgetskog učinka i toksičnosti oksikodona te nema dovoljno dokaza za terapiju alternativnim analgeticima u osoba koje su spori ili vrlo brzi metabolizatori za CYP2D6.

Kako bi se izbjegla pojava neželjenih učinaka, u PM i URM se preporuča terapija opioidnim i neopioidnim analgeticima koji se ne metaboliziraju putem CYP2D6 uključujući morfin, oksimorfin, buprenorfin, fentanil, metadon i hidromorfon (Rollason i sur., 2008).

#### 4.1.2. Tamoksifen

U 65 – 75 % slučajeva karcinoma dojke dolazi do prekomjerne ekspresije estrogenih ili progesteronskih receptora. Za ovu skupinu pacijenata endokrina terapija predstavlja najvažniji oblik liječenja. Tamoksifen spada u skupinu lijekova poznatih pod zajedničkim nazivom selektivni modulatori estrogenih receptora (*SERM*), a koristi se u liječenju karcinoma dojke već više od 40 godina. Adjuvantna terapija tamoksifenom u trajanju od pet godina smanjuje rizik od pojave relapsa bolesti te produljuje preživljenje žena s ER-pozitivnim tumorima. Međutim, u nekih pacijentica, maligno transformirane stanice postaju otporne na terapiju

tamoksifenom što rezultira relapsom bolesti. Mehanizmi koji su u podlozi razvoja rezistencije tumora na terapiju tamoksifenom nisu u potpunost razjašnjeni. Budući da se tamoksifen opsežno metabolizira u potentnije antiestrogene metabolite putem polimorfnih enzima, jedan od mogućih uzroka pojave rezistencije je interindividualna varijabilnost u metabolizmu lijeka koja može pridonijeti varijabilnosti serumske koncentracije tamoksifena te posljedično imati učinak na terapijski odgovor (Goetz i sur., 2018). Studije su pokazale da postoje značajne interindividualne razlike u koncentraciji metabolita tamoksifena kako u plazmi tako i lokalno u dojci (MacCallum i sur., 2000; Kisanga i sur., 2004).

Tamoksifen je prolijek koji se opsežno metabolizira u nekoliko primarnih metabolita, uključujući N-demetil-tamoksifen, 4-hidroksi-N-demetil-tamoksifen (endoksifen) i 4-hidroksi-tamoksifen. Aktivni metaboliti 4-hidroksitamoksifen i endoksifen imaju 30 do 100 puta veći afinitet prema ER receptorima u usporedbi s tamoksifenom. Budući da endoksifen doseže 6 do 10 puta veću plazmatsku koncentraciju od 4-OH-tamoksifena, smatra se najvažnijim aktivnim metabolitom prema kojemu se određuje klinička učinkovitost izvornog / roditeljskog (engl. *parent*) lijeka. CYP2D6 je najznačajniji enzim koji uvjetuje koncentraciju endoksifena u plazmi (Stearns i sur., 2003).

Studije su pokazale da su CYP3A4 i CYP3A5 glavni katalizatori N-demetilacije, dok se 4-hidroksilacija uglavnom odvija putem CYP2D6 (Crewe i sur., 1997). Najznačajniji učinak na aktivnost enzima koji sudjeluju u metabolizmu tamoksifena imaju polimorfizmi *CYP3A5*, *CYP2D6*, *SULT1A1* i *UGT2B15*. Pretpostavka je da su za povoljniji ishod bolesti odgovorni aleli koji doprinose biaktivaciji tamoksifena (poglavito *CYP2D6\*1*), kao i aleli koji odgađaju eliminaciju aktivnih metabolita (poglavito *SULT1A1\*2* i *UGT2B15\*1*).

U sporih metabolizatora i pacijenata koji su istovremeno primjenjivali lijekove - inhibitore enzima CYP2D6, zabilježena je smanjena koncentracija endoksifena u plazmi (Stearns i sur., 2003). Jedna je studija pokazala da spori metabolizatori (ispitanici s genotipom *CYP2D6\*4/\*4*) na adjuvantnoj terapiji tamoksifenom imaju čak dva puta veći rizik od relapsa bolesti (Goetz i sur., 2007). Studije ukazuju da bi genotip *CYP2D6* mogao biti koristan u predviđanju učinkovitosti terapije tamoksifenom u žena s ranim stadijem karcinoma dojke. Jedna od studija je pokazala da nositelji alelne varijante *CYP2D6\*2A* zbog povećane aktivnosti CYP2D6 enzima mogu imati veću korist od terapije tamoksifenom u odnosu na druge genotipove povezane s fenotipom brzog metabolizma te se on povezuje s nižim rizikom razvoja karcinoma dojke tijekom liječenja tamoksifenom (Serrano i sur., 2011).

Prilikom terapije tamoksifenom trebalo bi izbjegavati lijekove koji djeluju kao inhibitori enzima CYP2D6. Na osnovu trenutnih dokaza, očekuje se da će se nakon primjene standardne

doze tamoksifena u brzih i vrlo brzih metabolizatora postići terapijska koncentracija endoksifena. Preporučena početna doza je 20 mg tamoksifena na dan. U sporih i srednje brzih metabolizatora postižu se niže koncentracije endoksifena te imaju veći rizik relapsa karcinoma dojke u usporedbi s EM. Za PM se predlaže uvođenje alternativne terapije inhibitorima aromataze (AI) za žene u postmenopauzi te terapija AI u kombinaciji sa supresijom funkcije ovarija u premenopauzalnih žena. Ovaj pristup liječenju je dokazano bolji od terapije tamoksifenom bez obzira na genotip *CYP2D6* te pacijenti s fenotipom sporog metabolizma koji su terapiju tamoksifenom zamijenili terapijom AI nemaju povećani rizik relapsa bolesti. Ako je primjena AI kontraindicirana, može se razmotriti primjena tamoksifena u dozi od 40 mg/dan (Goetz i sur., 2018).

Tablica 13: Smjernice za terapiju tamoksifenom ovisno o metaboličkom fenotipu *CYP2D6* (Preuzeto i prilagođeno prema Goetz i sur., 2018)

Fenotip	Terapijske smjernice	Klinički značaj
<b>PM</b>	Razmotriti terapiju inhibitorima aromataze (AI).	Povećani rizik od relapsa karcinoma dojke. Neučinkovitost terapije u prevenciji relapsa karcinoma dojke.
<b>IM</b>	Izbjegavati istovremenu primjenu <i>CYP2D6</i> inhibitora. Razmotriti terapiju AI.	Povećani rizik od relapsa karcinoma dojke. Neučinkovitost terapije u prevenciji relapsa karcinoma dojke
<b>UM</b>	Primjena standardne početne terapijske doze (20 mg/dne).	Minorni klinički učinak.

Tablica 14: Lijekovi inhibitori enzima *CYP2D6* čija bi se primjena trebala izbjegavati prilikom terapije tamoksifenom (Preuzeto i prilagođeno prema Borges i sur., 2006).

Snažni inhibitori enzima <i>CYP2D6</i>	fluoksetin, paroksetin, bupropion, kinidin
Umjereni inhibitori enzima <i>CYP2D6</i>	duloksetin, difenihidramin, tioridazin, amiodaron, cimetidin, sertralin

#### 4.1.3. Antidepresivi

Učestalost neuspješnog liječenja psihijatrijskih poremećaja kao što je depresija iznosi 30 - 50 % što se djelomično može pripisati varijabilnoj koncentraciji lijeka u plazmi i pojavi neželjenih učinaka lijekova (Kircheiner i sur., 2007). Postoje značajni dokazi koji ukazuju na povezanost *CYP2D6* i *CYP2C19* genotipa s varijabilnošću metaboličkog fenotipa te pojavom neželjenih učinaka lijekova. Modifikacijom farmakoterapije u pacijenata s alelnim varijantama *CYP2D6* ili *CYP2C19* koje utječu na djelotvornost i sigurnost lijeka, mogao bi se poboljšati klinički ishod (Hicks i sur., 2016).

##### 4.1.3.1 Triciklički antidepresivi (TCA)

Triciklički antidepresivi (TCA) djeluju kao neselektivni inhibitori ponovnog povrata serotonina i noradrenalina te se koriste u terapiji depresije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, neuropatske boli te u profilaksi migrene. Primjena TCA u svrhu terapije psiholoških poremećaja je u padu, djelomično i zbog neželjenih učinaka te je njihova glavna terapijska primjena u otklanjanju boli (Watson, 2000). Interindividualne razlike u terapijskom učinku i pojavi neželjenih učinaka lijekova, posljedica su varijabilne plazmatske koncentracije lijeka. Učinkovitost lijekova ovisi o metabolizmu putem *CYP2D6* i *CYP2C19* enzima (Rudorfer i Potter, 1999). U sporih i vrlo brzih metabolizatora za *CYP2D6* i *CYP2C19*, plazmatske koncentracije TCA mogu biti izvan terapijskog intervala što rezultira izostankom terapijskog učinka ili pojavom neželjenih učinaka lijekova (Kircheiner i sur., 2007; Dalen i sur., 1998; Bertilsson i sur., 1985).

TCA su prema strukturi sekundarni i tercijarni amini te im se sukladno tome farmakološka svojstva razlikuju. Sekundarni amini imaju izraženiji noradrenergički, a tercijarni amini serotoninergički učinak (Gillman, 2007). Tercijarni amini (npr. amitriptilin) se biotransformiraju do N-demetiliranih metabolita tj. sekundarnih amina putem *CYP2C19*. Demetilirani metaboliti, nortriptilin i desipramin su također u uporabi kao antidepresivi, ali se po kliničkim svojstvima razlikuju od roditeljskih lijekova, amitriptilina i imipramina. I sekundarni i tercijarni amini se putem *CYP2D6* biotransformiraju u hidrosilirane metabolite smanjene aktivnosti. *CYP2C19* utječe na omjer plazmatske koncentracije sekundarnih i tercijarnih amina, međutim *CYP2D6* ima veći učinak na cjelokupni klirens lijeka. Zbog polimorfizama *CYP2D6* i *CYP2C19* koji dovode do promjene u klirensu lijeka ili omjeru roditeljskog lijeka i metabolita, u pacijenata se mogu javiti neželjeni učinci lijeka ili izostanak

terapijskog učinka. TCA se povezuju s mnogobrojnim nuspojavama, što dovodi do neuspješnog liječenja. Uobičajene nuspojave zahvaćaju središnji živčani sustav i srce te uključuju pojavu antikolinergičkih simptoma (Hicks i sur., 2016).

Tablica 15: Smjernice za terapiju amitriptilinom i nortriptilinom ovisno o metaboličkom fenotipu CYP2D6 (Preuzeto i prilagođeno prema Hicks i sur., 2016)

Fenotip	Klinički značaj	Terapijske smjernice
PM	Značajno reduciran metabolizam TCA u manje aktivne metabolite u odnosu na EM. Povećan rizik od pojave neželjenih učinaka zbog povećane plazmatske koncentracije lijeka.	Izbjegavati primjenu TCA zbog povećanog rizika od pojave neželjenih učinaka. Ako je uporaba TCA opravdana, preporuča se smanjenje početne doze za 50 % te terapijski nadzor.
IM		Preporuča se smanjenje početne doze za 25 % uz terapijski nadzor.
UM	Povećan metabolizam TCA u manje aktivne metabolite u odnosu na EM. Povećan rizik od terapijskog neuspjeha zbog niže plazmatske koncentracije lijeka.	Izbjegavati primjenu TCA zbog smanjene učinkovitosti. Ako je uporaba TCA opravdana, preporuča se povećanje početne doze uz terapijski nadzor.
EM	Normalan metabolizam lijekova.	Započeti terapiju za preporučenom početnom dozom.

Zabilježeni su slučajevi vrlo brzih metabolizatora koji primaju visoke doze nortriptilina kako bi se postigla terapijska koncentracija lijeka, međutim tada su prisutne vrlo visoke koncentracije hidrosiliranih metabolita u plazmi, što povećava rizik od kardiotsičnosti (Bertilsson i sur., 1985). U izrazito brzih metabolizatora povećana je vjerojatnost neuspješne farmakoterapije amitriptilinom i nortriptilinom zbog postizanja subterapijske koncentracije lijeka u plazmi te je stoga poželjno uvođenje alternativne terapije. Pojava neželjenih učinaka je vjerojatnija u sporih metabolizatora zbog postizanja previsoke plazmatske koncentracije tricikličkih antidepresiva te je stoga poželjno uvođenje alternativne terapije (Bertilsson i sur., 1981). Ako je uporaba TCA opravdana, preporuča se smanjenje standardne doze za 50 % te terapijski nadzor. U IM se može razmotriti smanjenje preporučene doze od 25 % (Hicks i sur., 2016).

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

Lijekovi iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI) se koriste u prvoj liniji liječenja ozbiljnih depresivnih i anksioznih poremećaja te se mogu koristiti i u liječenju drugih psihijatrijskih stanja kao što je opsesivno-kompulzivni poremećaj. Svi lijekovi iz ove skupine imaju isti mehanizam djelovanja koji se temelji na inhibiciji ponovnog unosa serotonina u presinaptički neuron što rezultira povećavanom serotonergičkom aktivnošću, a razlikuju se po farmakokinetičkim svojstvima. Terapija ovim lijekovima je neučinkovita za otprilike 50 % pacijenata s dijagnozom velikog depresivnog poremećaja. Učestalost pojave neželjenih učinaka se razlikuje među lijekovima, a uobičajeni štetni učinci izazvani ovom skupinom lijekova uključuju učinke na CNS (npr. nesanica, glavobolja), gastrointestinalnu i spolnu disfunkciju. Zabilježene su i ozbiljnije nuspojave, primjerice aritmije uzrokovane produljenjem QT-intervalu u sporih metabolizatora za CYP2C19 na terapiji citalopramom. CYP2D6 katalizira metabolizam brojnih SSRI uključujući paroksetin, fluvoksamin, fluoksetin, venlafaksin i mianserin. Pacijenti s *CYP2D6* ili *CYP2C19* polimorfizmima koji utječu na biotransformaciju SSRI mogu biti genetski predisponirani za lošiji terapijski ishod. Paroksetin i fluvoksamin se putem CYP2D6 opsežno biotransformiraju u spojeve sa slabim farmakološkim učinkom. Metabolizam fluoksetina je kompleksniji jer ga i CYP2D6 i CYP2C9 prevode u farmakološki aktivne enantiomere norfluoksetina. Citalopram je racemična smjesa R- i S-enantiomera, a farmakološki aktivni S-enantiomer je dostupan na tržištu kao escitalopram. Citalopram i escitalopram se opsežno metaboliziraju putem CYP2C19 u manje aktivne metabolite. Sertralin se metabolizira putem CYP2D6, CYP2C19 i drugih polimorfnih CYP enzima, od čega je biotransformacija putem CYP2C19 glavni metabolički put (Hicks i sur., 2015).

Studije su pokazale da UM za CYP2D6 imaju nisku ili nemjerljivu plazmatsku koncentraciju paroksetina u usporedbi s EM (Charlier i sur., 2003; Guzey i Spigset, 2006). Niska plazmatska koncentracija lijeka može rezultirati izostankom terapijskog učinka, stoga se u UM za CYP2D6 preporuča razmotriti terapiju drugim SSRI čiji metabolizam putem CYP2D6 nije opsežan. Očekuje se da će IM za CYP2D6 imati povećanu plazmatsku koncentraciju lijeka što će istovremeno dovesti i do inhibicije CYP2D6, s obzirom da je paroksetin potentni inhibitor CYP2D6. Postojeći dokazi ne upućuju na potrebu za prilagodbom terapije paroksetinom ili fluvoksaminom kod IM. Prilikom primjene terapijske doze lijeka, u PM je zabilježena značajno veća plazmatska koncentracija paroksetina i fluvoksamina u usporedbi s EM što može biti čimbenik rizika za pojavu ADR-a (Sawamura i

sur., 2004; Charlier i sur., 2003). Uputstvo za lijek odobreno od strane FDA navodi da se fluvoksamin treba pažljivo koristiti u liječenju pacijenata s niskom aktivnošću CYP2D6 i onih koji uzimaju druge lijekove za koje je poznato da inhibiraju CYP2D6 (Annotation of FDA Label for fluvoxamine and CYP2D6, 2017). U svrhu sprječavanja pojave ADR-a trebalo bi razmotriti uvođenje terapije drugim SSRI koji se ne biotransformira opsežno putem CYP2D6. Ako je terapija paroksetinom ili fluvoksaminom opravdana, preporuča se primjena za 50 % manje doze paroksetina i 25 – 50 % manje doze fluvoksamina (Hicks i sur., 2015).

Fluoksetin se putem CYP2D6 biotransformira u (S)-norfluoksetin dok se putem CYP2D6 i CYP2C9 biotransformira u R-norfluoksetin. Fluoksetin, R- i S-norfluoksetin djeluju kao inhibitori ponovne pohrane serotonina, iako se R-norfluoksetin smatra manje farmakološki aktivnim. Dokazano je da PM za CYP2D6 imaju značajno višu plazmatsku koncentraciju fluoksetina u usporedbi s EM. Međutim, ukupna suma plazmatskih koncentracija fluoksetina i norfluoksetina se ne razlikuje značajno među fenotipovima CYP2D6. Malo je podataka dostupno o utjecaju fenotipa CYP2D6 na neravnotežu između plazmatskih koncentracija fluoksetina i norfluoksetina kao i na sigurnost i učinkovitost terapije. Stoga, ne postoje preporuke za doziranje fluoksetina na temelju genotipa, ali se preporuča terapija drugim SSRI koji nije opsežno metaboliziran putem CYP2D6 zbog oprečnih podataka o utjecaju fenotipa na terapiju fluoksetinom. U uputstvima o lijeku navedeno je da se lijek treba koristiti s oprezom kod kongenitalnog sindroma produženog QT-intervalu, posebice u uvjetima koji predstavljaju rizik povećane izloženosti fluoksetinu (npr. oštećenje jetre, terapija inhibitorom CYP2D6, PM fenotip ili terapija drugim lijekovima s velikom afinitetom vezanja za proteine plazme) (Hicks i sur., 2015).

Venlafaksin se putem CYP2D6 biotransformira u glavni aktivni metabolit, O-demetilvenlafaksin, dok je N-demetilacija katalizirana putem CYP3A4, CYP2C19 i CYP2C9 (Otton i sur., 1996). Jedna je studija pokazala da PM za CYP2D6 imaju četiri puta niži klirens venlafaksina u usporedbi s EM, uglavnom zbog smanjenog stvaranja O-demetiliranih metabolita, te je u tih pacijenata zabilježena pojava kardiovaskularnih nuspojava koje subile genetski uvjetovane ili posljedica inhibicije aktivnosti CYP2D6 drugim lijekovima (Lessard i sur., 1999).

Tablica 16: Smjernice za terapiju paroksetinom i fluvoksaminom ovisno o metaboličkom fenotipu CYP2D6 (*Preuzeto i prilagođeno prema Hicks i sur., 2015.*)

Paroksetin		
Fenotip	Klinički značaj	Terapijske smjernice
UM	Povećana biotransformacija u manje aktivne metabolite u usporedbi s EM. Niža/nedetektibilna plazmatska koncentracija lijeka može rezultirati izostankom terapijskog učinka.	Preporuča se terapija drugim lijekom koji se ne metabolizira opsežno putem CYP2D6.
IM	Smanjena biotransformacija lijeka u usporedbi s EM. Više plazmatske koncentracije lijeka mogu povećati vjerojatnost pojave nuspojava.	Započeti terapiju s preporučenom terapijskom dozom.
PM		Terapija drugim lijekom koji se ne metabolizira opsežno putem CYP2D6. Ako je terapija paroksetinom opravdana, preporuča se smanjenje početne doze za 50%.
Fluvoksamin		
UM	Nema dovoljno podataka.	Nema preporuka zbog nedostatka dokaza.
IM	Smanjena biotransformacija lijeka u usporedbi s EM. Više plazmatske koncentracije lijeka mogu povećati vjerojatnost pojave nuspojava.	Započeti terapiju s preporučenom terapijskom dozom.
PM		Razmotriti smanjenje početne doze za 25 – 50 % ili terapiju drugim lijekom koji se ne metabolizira opsežno putem CYP2D6.

#### 4.1.4. Antiemetici

Ondansetron i tropisetron su vrlo specifični i selektivni lijekovi iz skupine antagonista 5-HT<sub>3</sub> receptora (5-hidroksitriptamin tip 3 receptora). Koriste se u prevenciji mučnine inducirane kemoterapijom i radioterapijom te postoperativne mučnine. Antagonisti 5-HT<sub>3</sub> receptora suzbijaju mučninu mehanizmom selektivnog vezanja na 5-HT<sub>3</sub> receptore čime je sprječena serotoninom posredovana emetogena signalizacija. Ovi se lijekovi smatraju najboljom profilaktičkom terapijom umjereno do visoko emetogene kemoterapije i radioterapije, a glavna razlika između njih je varijabilna farmakokinetika i farmakodinamika. Općenito se antagonisti 5-HT<sub>3</sub> receptora dobro podnose, a češće nuspojave uključuju blagu glavobolju, konstipaciju i prolazni porast jetrenih enzima. Ozbiljna nuspojava ondansetrona je produljenje QT-intervalu (Bell i sur., 2017). Ondansetron se biotransformira u četiri inaktivna metabolita putem većeg broja CYP enzima, uključujući CYP3A4, CYP1A2 i CYP2D6, nakon čega slijedi konjugacija glukuronskom kiselinom do metabolita koji nisu važni za farmakološki učinak. Tropisetron se putem CYP2D6 opsežno metabolizira u inaktivne



metabolite te potom konjugira do glukuronida i sulfata (Fischer i sur., 1994). Drugi antagonisti 5-HT<sub>3</sub> receptora, uključujući dolasetron, palonosetron, ramosetron i granisetron se metaboliziraju putem većeg broja CYP enzima.

Fenotip vrlo brzog metabolizma za CYP2D6 je povezan s bržom biotransformacijom ondansetrona i tropisetrona što rezultira smanjenim terapijskim odgovorom odnosno smanjenim antiemetskim učinkom, te se kod UM za CYP2D6 preporuča terapija drugim antagonistima 5-HT<sub>3</sub> receptora koji nisu supstrati CYP2D6 (npr. granisetron). S obzirom da u PM i IM nije uočena značajna razlika u incidenciji pojave mučnine u odnosu na EM, u tih pacijenata se ne preporuča smanjenje terapijske doze (Bell i sur., 2017).

#### 4.1.5. Antipsihotici

Prvi otkriveni antipsihotici bili su haloperidol i klorpromazin iz skupine tipičnih antipsihotika (antipsihotici prve generacije). Ovi se lijekovi koriste u liječenju psihoza (bez obzira na temeljni uzrok), kroničnih psihičkih poremećaja (npr. shizofrenije) i drugih psihijatrijskih stanja. Svi antipsihotici, uz iznimku aripiprazola, su antagonisti receptora za dopamin. Smatra se da blokada D<sub>2</sub> dopaminskih receptora u limbičkom sustavu mozga rezultira poboljšanjem "pozitivnih" simptoma shizofrenije kao što su deluzije i halucinacije. Međutim, tipični antipsihotici također blokiraju i dopaminske receptore u nigrostriatalnom putu što može uzrokovati pojavu ekstrapiramidalnih nuspojava. Ove nuspojave uključuju akatiziju (motorički nemir), distoniju (abnormalni mišićni tonus) i tardivnu diskineziju (nevoljni i ponavljajući pokreti). Noviji antipsihotici, poznati kao atipični antipsihotici (druga generacija antipsihotika), imaju manji rizik od pojave ekstrapiramidalnih nuspojava. Pretpostavlja se da atipični antipsihotici samo privremeno vežu D<sub>2</sub> dopaminske receptore, a zatim brzo disociraju s njih kako bi se omogućio normalni dopaminski neurotransmisijski prijenos (Seeman, 2002). CYP2D6 sudjeluje u metabolizmu brojnih antipsihotika uključujući haloperidol, risperidon, perfenazin, zuklopentiksol, tioridazin i aripiprazol (Bertilsson i Dahl, 1996).

Haloperidol je potentni antagonist D<sub>2</sub> dopaminskih receptora te se koristi u liječenju shizofrenije i drugih psihijatrijskih poremećaja. Njegova visoka učinkovitost je narušena pojavom ekstrapiramidalnih nuspojava (akutna distonija, pseudoparkinsonizam, akatizija i tardivna diskinezija) uz visoku učestalost (Casey i Keepers, 1998). Haloperidol se opsežno metabolizira u jetri te se samo 1 % primijenjene doze izlučuje nepromijenjeno urinom. Hepatička biotransformacija uključuje glukuronidaciju (50 – 60 %), redukciju, ponovnu

oksidaciju (23 %) i N-dealkilaciju (20 – 30 %). Reducirani haloperidol ima značajni farmakološki učinak (npr. visoki afinitet vezanja na dopaminske D2 i D3 receptore). Stoga su terapijski odgovor i pojava neželjenih učinaka ovisni o ukupnoj koncentraciji haloperidola i reduciranog metabolita. Većina *in vitro* studija je pokazalo da je CYP3A4 glavni enzim koji sudjeluje u metabolizmu haloperidola, dok CYP2D6 ima minornu ulogu, međutim *in vivo* studije su pokazale da aktivnost CYP2D6 ima značajnu ulogu u klirensu haloperidola (Tyndale i sur., 1991). Dokazano je da PM imaju veće serumske koncentracije haloperidola i reduciranog metabolita u odnosu na EM te se povezuje s većim rizikom pojave ekstrapiramidalnih nuspojava (Brockmüller i sur., 2002; Gassó i sur., 2013; Šimić i sur., 2016). U pacijenata s PM fenotipom za CYP2D6 se preporuča smanjenje doze lijeka za 50 % ili uvođenje alternativne terapije (npr. flufenazin, flupentiksol, kvetiapin, olanzapin, klopazin) (Swen i sur., 2011).

Risperidon je lijek iz skupine atipičnih antipsihotika (antipsihotici druge generacije) te je primarno korišten u liječenju shizofrenije i maničnih epizoda povezanih s bipolarnim poremećajem. Risperidon se putem CYP2D6 biotransformira u podjednako aktivni metabolit, 9-hidroksirisperidon, stoga je terapijski odgovor ovisan o ukupnoj plazmatskoj koncentraciji risperidona i 9-hidroksirisperidona. Genska varijabilnost CYP2D6 može pridonijeti povećanom riziku od nuspojava povezanih s terapijom risperidonom. U PM primjena standardne doze risperidona može rezultirati povećanom razinom risperidona i smanjenom razinom 9-hidroksirisperidona u plazmi. Studije su pokazale da je učestalost pojave neželjenih učinaka prilikom terapije risperidonom veću u PM u usporedbi s EM (Lisbeth i sur., 2016). Preporuča se da se u PM, IM i UM za CYP2D6 uvede terapija drugim lijekom. Ako je terapija risperidonom opravdana preporuča se strogi nadzor terapije (Swen i sur., 2011).

#### 4.1.6. Antiaritmici

Antiaritmici su lijekovi koji se koriste u liječenju srčanih aritmija koje mogu potjecati od atrijske (npr. fibrilacija atrijske) ili ventrikularne (npr. ventrikularna tahikardija, fibrilacija ventrikularne). Antiaritmici su prema nadopunjenoj Vaughan Williamsovoj podjeli razvrstani u pet glavnih skupina. I. skupinu čine blokatori natrijskih kanala te se ona dijeli na tri podskupine; IA (kinidin, prokainamid), IB (lidokain, meksiletin, fenitoin) i IC (propafenon, enkainid, flekainid). II. skupinu čine blokatori  $\beta$ -adrenergičnih receptora (alprenolol, propranolol, esmolol, atenolol, bisoprolol, metoprolol, oksiprenolol, pindolol, timolol), III. skupinu blokatori kalijevih kanala (amiodaron, sotalol, dronedaron, ibutilid, dofetilid), IV.

skupinu blokatori kalcijских kanala (verapamil, diltiazem, galopramil, nimodipin, tiapamil) te V. skupinu čine lijekovi s drugim ili nepoznatim mehanizmima djelovanja (npr. adenzin, digoksin) (Bilušić i Bilušić, 2010). Antiaritmici imaju usku terapijsku širinu, a mnogi od njih, uključujući flekainid, enkainid, propafenon i meksiletin, su supstrati CYP2D6 enzima. Može se očekivati da će PM imati povećan rizik od pojave neželjenih učinaka ovisnih o koncentraciji lijeka u organizmu (Bertilsson i sur., 2002).

Tablica 17: Terapijske smjernice zalijekove iz skupine antiaritmika s obzirom na metabolički fenotip CYP2D6 (*Preuzeto i prilagođeno prema Swen i sur., 2011*).

Fenotip	Terapijske smjernice
Flekainid	
PM	Preporuča se smanjenje doze lijeka za 50 %, nadziranje plazmatske koncentracije lijeka te praćenje rada srca snimanjem elektrokardiograma (EKG)
IM	Preporuča se smanjenje doze lijeka za 25 %, nadziranje plazmatske koncentracije lijeka te praćenje rada srca snimanjem elektrokardiograma (EKG)
URM	Preporuča se terapija drugim lijekom (npr. sotalol, kinidin, amiodaron) ili nadziranje plazmatske koncentracije lijeka i praćenje rada srca snimanjem elektrokardiograma (EKG)
Propafenon	
PM	Preporuča se smanjenje doze lijeka za 70 %, nadziranje plazmatske koncentracije lijeka te praćenje rada srca snimanjem elektrokardiograma.
IM	Nema dovoljno podataka za izračun primjerene doze. Preporuča se terapija drugim lijekom ili titracija doze u ovisnosti o plazmatskoj koncentraciji lijeka.
URM	
Metoprolol	
PM	U slučaju terapije srčanog zatajenja preporuča se smanjenje doze lijeka za 75 % ili terapija drugim lijekom (npr. bisoprolol, karvedilol). U slučaju drugih indikacija preporuča se terapija drugim lijekom (npr. atenolol, bisoprolol) ili strogo praćenje pojave nuspojava (npr. bradikardija, hladnoća u ekstremitetima)
IM	U slučaju terapije srčanog zatajenja preporuča se smanjenje doze lijeka za 50 % ili terapija drugim lijekom (npr. bisoprolol, karvedilol).
URM	Preporuča se terapija drugim lijekom (npr. bisoprolol, karvedilol, atenolol) ili titracija doze do maksimalno 250 % normalne doze.

## 5. ZAKLJUČAK

U svakodnevnom životu, ljudski je organizam izložen brojnim ksenobioticima, uključujući lijekove, prehrambene sastavnice i razne okolišne spojeve koji se *in vivo* biotransformiraju u vodotopljive metabolite što olakšava njihovu eliminaciju iz organizma. Pojedinci se razlikuju s obzirom na ekspresiju i katalitičku aktivnost enzima koji sudjeluju u aktivaciji i/ili detoksifikaciji ksenobiotika. Čimbenici koji doprinose interindividualnoj varijabilnosti u odgovoru na ksenobiotik uključuju indukciju i inhibiciju enzima te genetske polimorfizme. Naslijeđene razlike u slijedu DNA koji kodira za enzime mogu imati značajan učinak na djelotvornost kao i toksičnost ksenobiotika. Genotipizacijom ključnih enzima koji sudjeluju u biotransformaciji ksenobiotika može se predvidjeti uspješnost terapije određenim lijekom te optimizirati izbor lijeka ili prilagoditi doza lijeka u skladu s genotipom pojedinca što rezultira smanjenjem pojavnosti nuspojava lijekova i smanjenim troškovima liječenja.

Genetski polimorfizmi enzima CYP najviše utječu na metabolizam lijekova s uskom terapijskom širinom kao što su neki antidepresivi, antikoagulansi, antikonvulzivi, antipsihotici, antidijabetici i protutumorski lijekovi. Od svih enzima sustava CYP, klinički je najznačajnija genetska varijabilnost visokopolimorfni enzima CYP2D6, CYP2C9 i CYP2C19 koji su zajedno odgovorni za otprilike 40 % ukupnog metabolizma lijekova.

Otkrivene su brojne alelne varijante humanog gena *CYP2D6* karakterizirane potpunim izostankom aktivnosti enzima te smanjenom, normalnom ili povećanom aktivnosti enzima. Najznačajnije alelne varijante su *CYP2D6*\*2, \*3, \*4, \*5, \*6, \*10, \*17 i \*41, a identificiran je i veliki broj nisko zastupljenih alela *CYP2D6* koji također mogu rezultirati promijenjenim metaboličkim fenotipom. Za razliku od drugih izoenzima CYP, *CYP2D6* nije inducibilan, stoga su genetske promjene u velikoj mjeri odgovorne za interindividualnu varijabilnost u ekspresiji i aktivnosti enzima. Zabilježena je velika interindividualna varijabilnost u metabolizmu nekih lijekova-supstrata enzima *CYP2D6* što može otežati postizanje optimalnih terapijskih koncentracija. Varijabilna aktivnost enzima stoga ima značajan učinak na uspješnost terapije, odnosno na pojavu ADR-a. Na temelju kombinacije alela i metaboličkog omjera (koncentracija nepromijenjenog lijeka / koncentracija metabolita lijeka), razlikujemo četiri metabolička fenotipa: fenotip vrlo brzog, brzog, srednje brzog - intermedijarnog te sporog metabolizatora. Metabolički fenotip *CYP2D6*, osim o genetskim polimorfizmima, ovisi i o nizu čimbenika povezanih sa samim lijekom kao što je terapijska širina lijeka te o suradljivosti i stanju pacijenta, istovremenoj terapiji drugim lijekovima te ukupnom doprinosu enzima *CYP2D6* u metabolizmu lijeka. Lijekovi na koje polimorfizmi *CYP2D6* najviše utječu

obično su oni kod kojih ovaj enzim ima najveći doprinos prilikom aktivacije prolijeka ili eliminacije lijeka iz organizma.

Personalizirana terapija se temelji na ideji da svaki pacijent ima jedinstveni biološki profil kojemu bi se trebali prilagoditi izbor i doza lijeka, što bi u konačnici rezultiralo povoljnijim ishodom liječenja. Napredak na području molekularne analize gena, uključujući veću dostupnost manje skupih metoda i poboljšanja u bioinformatičkim alatima, doveo je do značajnog napretka na području farmakogenomike. S ciljem poboljšanja profila rizika / koristi farmaceutskih proizvoda, uzimajući u obzir genotip pojedinca, sve je veći interes za identifikacijom genetskih promjena koje pomažu u predviđanju učinkovitosti ili toksičnosti terapije. S obzirom na važnu ulogu polimorfnih enzima CYP u metabolizmu lijekova, smatra se da bi prediktivna genotipizacija rezultirala kliničkim poboljšanjem učinkovitosti terapije 10 – 20 % lijekova te smanjenjem incidencije neželjenih učinaka lijekova za 10 – 15 %. U kliničkoj praksi se u svrhu predviđanja metaboličkog fenotipa genotipizacijom određuju oni polimorfizmi koji su najzastupljeniji u određenoj populaciji. Međutim, za veliki broj alelnih varijanti i još veći broj kombinacija alela teško je predvidjeti fenotip.

## 6. LITERATURA

Agundez JA, Ledesma MC, Ladero JM, et al. Prevalence of CYP2D6 geneduplication and its repercussion on the oxidative phenotype in a White population. *Clin Pharmacol Ther*, 1995, 57, 265-269.

Aklillu E, Persson I, Bertilsson L, Johansson I, Rodrigues F, Ingelman-Sundberg M. Frequent distribution of ultrarapidmetabolizers of debrisoquine in an Ethiopian population carrying duplicated and multiduplicated functional CYP2D6 alleles. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 278, 441-446.

Alexanderson B, Evans DAP, Sjöqvist F. Steady-state plasma levels of nortriptyline in twins: influence of genetic factors and drug therapy. *Br Med J*, 1969, 4, 764-768.

Andreassen TN, Eftedal I, Klepstad P, Davies A, Bjordal K, Lundström S, Kaasa S, Dale O. Do CYP2D6 genotypes reflect oxycodone requirements for cancer patients treated for cancer pain? A cross-sectional multicentre study. *Eur J Clin Pharmacol*, 2011, 68, 55-64.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 2005, 5, 209-2019.

Aynacioglu AS, Sachse C, Bozkurt A, Kortunay S, Nacak M, Schröder T, Kayaalp SO, Roots I, Brockmüller J. Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. *Clin Pharmacol Ther*, 1999, 66, 185-192.

Axelrod J. The enzymatic demethylation of ephedrine. *J Pharmacol Exp Ther*, 1955, 114, 430-438.

Bathum L, Johansson I, Ingelman-Sundberg M i sur. Ultrarapid metabolism of sparteine: frequency of alleles with duplicated CYP2D6 genes in a Danish population as determined by restriction fragment length polymorphism and long polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics*, 1998, 8, 119-123.

Bell GC, Caudle KE, Whirl-Carrillo M, Gordon RJ, Hikino K, Prows CA, Gaedigk A, Agundez J, Sadhasivam S, Klein TE, Schwab M. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 Genotype and Use of Ondansetron and Tropisetron. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102, 213-218.

Bernal ML, Sinues B, Johansson I, McLellan RA, Wennerholm A, Dahl ML, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L. Ten percent of North Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 657-660.

Bertilsson L, Eichelbaum M, Mellstrom B, Sawe J, Schulz HU, Sjöqvist F. Nortriptyline and antipyrine clearance in relation to debrisoquine hydroxylation in man. *Life Sci*, 1980, 27, 1673-1677.

Bertilsson L, Aberg-Wistedt A, Gustafsson LL, Nordin C. Extremely rapid hydroxylation of debrisoquine: a case report with implication for treatment with nortriptyline and other tricyclic antidepressants. *Ther Drug Monit*, 1985, 7,478–480.

Bertilsson L, Mellström B, Sjökvist F, Mårtenson B, Asberg M. Slow hydroxylation of nortriptyline and concomitant poor debrisoquine hydroxylation: clinical implications. *Lancet*, 1981, 1, 560–561.

Bertilsson L, Lou YQ, Du YL. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther*, 1992, 51, 388-397.

Bilušić M, Bilušić A . Antiaritmici. *MEDICUS*, 2010, 2, 197 – 202.

Borges S, Desta Z, Li L, Skaar TC, Ward BA, Nguyen A, Jin Y, Storniolo AM, Nikoloff DM, Wu L, Hillman G, Hayes DF, Stearns V, Flockhart DA. Quantitative effect of CYP2D6 genotype and inhibitors on tamoxifen metabolism: implication for optimization of breast cancer treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 80, 61-74.

Božina N i Pejnović L. Farmakogenetika u kliničkoj praksi - preporuke i smjernice. Smjernice za kliničku praksu. *Paediatr Croat*, 2013, 57, 318-330.

Brockmüller J, Kirchheiner J, Schmider J, Walter S, Sachse C, Müller-Oerlinghausen B, Roots I. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 72, 438-452.

Brodie BB, Axelrod J, Cooper JR, Gaudette L, La Du BN, Mitoma C, Udenfriend S. Detoxication of drugs and other foreign compounds by liver microsomes. *Science*, 1955, 121, 603-604.

Casey DE, Keepers GA. Neuroleptic side effects: acute extrapyramidal syndromes and tardive dyskinesia. *Psychopharmacol*, 1988, 5, 74-93.

Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, Scott SA, Rehm HL, Williams MS, Klein TE, Relling MV, Hoffman JM. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med*, 2017, 19, 215-223.

Cooper GM, Johnson JA, Langaee TY, Feng H, Stanaway IB, Schwarz UI, Ritchie MD, Stein CM, Roden DM, Smith JD. A genome-wide scan for common genetic variants with a large influence on warfarin maintenance dose. *Blood*, 2008, 112, 1022–1027.

Crewe HK, Ellis SW, Lennard MS, Tucker GT. Variable contribution of cytochromes P450 2D6, 2C9 and 3A4 to the 4-hydroxylation of tamoxifen by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1997, 53, 171–178.

Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Shen DD, Callaghan JT, Kharasch ED, Skaar TC. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for codeine therapy in the context of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotype. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 91, 321–326.

- Dahl ML, Yue QY, Roh HK, Johansson I, Sawe J, Sjöqvist F, Bertilsson L. Genetic analysis of the CYP2D locus in relation to debrisoquine hydroxylation capacity in Korean, Japanese and Chinese subjects. *Pharmacogenetics*, 1995a, 5, 159–164.
- Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjöqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population: analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995b, 274, 516-520.
- Dalen P, Frengell C, Dahl ML, et al. Quick onset of severe abdominal pain after codeine in an ultrarapid metabolizer of debrisoquine. *Ther Drug Monit*, 1997, 19, 543-544.
- Dalén P, Dahl ML, Bernal Ruiz ML, Nordin J, Bertilsson L. 10-Hydroxylation of nortriptyline in white persons with 0, 1, 2, 3, and 13 functional CYP2D6 genes. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 63, 444–452.
- Daly AK, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang JD, Idle JR, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer UA, Nebert DW, Steen VM, Wolf CR, Zanger UM. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics*, 1996a, 6, 193–201.
- Daly AK, Fairbrother KS, Andreassen OA, London SJ, Idle JR, Steen VM. Characterization and PCR-based detection of two different hybrid CYP2D7P/CYP2D6 alleles associated with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1996b, 6, 319–328.
- Eckhardt K, Li S, Ammon S, Schänzle G, Mikus G, Eichelbaum M. Same incidence of adverse drug events after codeine administration irrespective of the genetically determined differences in morphine formation. *Pain*, 1998, 76, 27–33.
- Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med*, 2006, 57, 119-137.
- Eichelbaum M, Baur MP, Dengler HJ, Osikowska-Evers BO, Tieves G, Zekorn C, Rittner C. Chromosomal assignment of human cytochrome P-450 (debrisoquine/sparteine type) to chromosome 22. *Br J Clin Pharmacol*, 1987, 23, 455–458.
- Fischer V, Vickers AE, Heitz F, Mahadevan S, Baldeck JP, Minery P, Tynes R. The polymorphic cytochrome P-450 2D6 is involved in the metabolism of both 5-hydroxytryptamine antagonists, tropisetron and ondansetron. *Drug Metab Dispos*, 1994, 22, 269–274.
- Gaedigk A, Blum M, Gaedigk R, et al. Deletion of the entire cytochrome P450 CYP2D6 gene as a cause of impaired drug metabolism in poor metabolizers of the debrisoquine/sparteine polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1991, 48, 943-950.
- Gaedigk A, Bhatena A, Ndjountche L, et al. Identification and characterization of novel sequence variations in the cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) gene in African Americans. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5, 173-182.



- Gaedigk A, Ndjountché L, Divakaran K, Dianne Bradford L, Zineh I, Oberlander TF, Brousseau DC, McCarver DG, Johnson JA, Alander SW, Wayne Riggs K, Steven Leeder J. Cytochrome P4502D6 (CYP2D6) gene locus heterogeneity: characterization of gene duplication events. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81, 242-251.
- Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, and *CYP3A5* in the Croatian population. *Drug Metabol Pers Ther*, 2017, 32, 11–21.
- Garfinkel D. Studies on pig liver microsomes I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions. *Arch Biochem Biophys*, 1958, 77, 493-509.
- Gasche Y, Daali Y, Fathi M, Chiappe A, Cottini S, Dayer P, Desmeules J. Codeine intoxication associated with ultrarapid YP2D6 metabolism. *New Engl J Med*, 2004, 351, 2827-2831.
- Gassó P, Papagianni K, Mas S, de Bobadilla RF, Arnaiz JA, Bernardo M, Lafuente A. Relationship between CYP2D6 genotype and haloperidol pharmacokinetics and extrapyramidal symptoms in healthy volunteers. *Pharmacogenomics*, 2013, 14, 1551-1563.
- Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol*, 2007, 151, 737–748.
- Goetz MP, Knox SK, Suman VJ, Rae JM, Safgren SL, Ames MM. The impact of cytochrome P450 2D6 metabolism in women receiving adjuvant tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat*, 2007, 101, 113–121.
- Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, Symmans WF, McLeod HL, Ratain MJ, Zembutsu H, Gaedigk A, van Schaik RH, Ingle JN, Caudle KE, Klein TE. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103, 770-777.
- Gonzalez FJ, Nebert DW. Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant “warfare,” molecular drive, and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet*, 1990, 6, 182–186.
- Gonzalez FJ, Skoda RC, Kimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW, Gelboin HV, Hardwick JP, Meyer UA. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature*, 1988a, 331, 442–446.
- Gonzalez FJ, Vilbois F, Hardwick JP, McBride OW, Nebert DW, Gelboin HV, Meyer UA. Human debrisoquine 4-hydroxylase (P450IID1): cDNA and deduced amino acid sequence and assignment of the CYP2D locus to chromosome 22. *Genomics*, 1988b, 2, 174–179.
- Gough AC, Smith CA, Howell SM, et al. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. *Genomics*, 1993, 15, 430-432.

Griese EU, Zanger UM, Brudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, Stuvén T, Eichelbaum M. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics*, 1998, 8, 15–26.

Griese EU, Asante-Poku S, Ofori-Adjei D, Mikus G, Eichelbaum M. Analysis of the CYP2D6 gene mutations and their consequences for enzyme function in a West African population. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 715–723.

Gryn SE, Teft WA, Kim RB. Profound reduction in the tamoxifen active metabolite endoxifen in a patient on phenytoin for epilepsy compared with a CYP2D6 genotype matched cohort. *Pharmacogenet Genomics*, 2014, 24, 367–369.

Guengerich FP. Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21, 70–83.

Hart SN, Wang S, Nakamoto K, Wesselman C, Li Y, Zhong XB. Genetic polymorphisms in cytochrome P450 oxidoreductase influence microsomal P450-catalyzed drug metabolism. *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18, 11–24.

Heim M, Meyer UA. Genotyping of poor metabolisers of debrisoquine by allele-specific PCR amplification. *Lancet*, 1990, 336, 529–532.

Hicks JK, Sangkuhl K, Swen JJ, Ellingrod VL, Müller DJ, Shimoda K, Bishop JR, Kharasch ED, Skaar TC, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Caudle KE, Stigl JC. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update. *Clin Pharmacol Ther*, 2016.

Hou X, Shi J, Sun H. Gene polymorphism of cytochrome P450 2C19\*2 and clopidogrel resistance reflected by platelet function assays: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*, 2014, 70, 1041–1047.

Informacije o alelima CYP2D6, <https://www.pharmvar.org/about>, pristupljeno 15.08.2018.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20, 342–349.

Ingelman-Sundberg M, Daly AK, Oscarson M, Nebert DW. Human cytochrome P450 (CYP) genes: recommendations for the nomenclature of alleles. *Pharmacogenetics*, 2000, 10, 91–93.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M. Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol*, 2002, 357, 28–36.

Ingelman-Sundberg M. Human drug metabolising cytochrome P450 enzymes: properties and polymorphisms. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol*, 2004a, 369, 89–104.

Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future. *Trends Pharmacol Sci*, 2004b, 25, 193–200.

- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*, 2005, 5, 6-13.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, Rodriguez-Antona C. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. *Pharmacol Ther*, 2007, 116, 496-526.
- Ingelman-Sundberg M, Sim SC. Pharmacogenetic biomarkers as tools for improved drug therapy; emphasis on the cytochrome P450 system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396, 90-94.
- Ishmael FT, Stellato C. Principles and applications of polymerase chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 2008, 101, 437-443.
- Ito T, Kato M, Chiba K, Okazaki O, Sugiyama Y. Estimation of the interindividual variability of cytochrome 2D6 activity from urinary metabolic ratios in the literature. *Drug Metab. Pharmacokinet*, 2010, 25, 243–253.
- Johansson I, Lundqvist E, Bertilsson L, Dahl ML, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90, 11825–11829.
- Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P450 2D locus: characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. *Mol Pharmacol*, 1994, 46, 452–459.
- Kagimoto M, Heim M, Kagimoto K, Zeugin T, Meyer UA. Multiple mutations of the human cytochrome P450 2D6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. *J Biol Chem*, 1990, 265, 17209-17214.
- Kaplan HL, Busto UE, Baylton GJ, Cheung SW, Otton SV, Somer G, Sellers EM. Inhibition of cytochrome P450 2D6 metabolism of hydrocodone to hydromorphone does not importantly affect abuse liability. *J Pharmacol Exp Ther*, 1997, 281, 103–108.
- Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. *Am J Hum Genet*, 1989, 45, 889–904.
- Kirchheiner J, Seeringer A. Clinical implications of pharmacogenetics of cytochrome P450 drug metabolizing enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1770, 489–494.
- Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, Brockmoller J. Pharmacogenetic of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry*, 2004, 9, 442-473.

- Kirchheiner J, Keulen JT, Bauer S, Roots I, Brockmüller J. Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol*, 2008, 28, 78–83.
- Kisanga ER, Gjerde J, Guerrieri-Gonzaga A, Pigatto F, Pesci-Feltri A, Robertson C, Serrano D, Pelosi G, Decensi A, Lien EA. Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial. *Clin Cancer Res*, 2004, 10, 2336–2343.
- Klingenberg M. Pigments of rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 1958, 75, 376–386.
- Koren G, Cairns J, Chitayat D, Gaedigk A, Leeder SJ. Pharmacogenetics of morphine poisoning in a breastfed neonate of a codeine-prescribed mother. *Lancet*, 2006, 368, 704.
- Leathart JB, London SJ, Steward A, Adams JD, Idle JR, Daly AK. CYP2D6 phenotype-genotype relationships in African-Americans and Caucasians in Los Angeles. *Pharmacogenetics*, 1998, 8, 529–541.
- Lessard E, Yessine MA, Hamelin BA, O'Hara G, LeBlanc J, Turgeon J. Influence of CYP2D6 activity on the disposition and cardiovascular toxicity of the antidepressant agent venlafaxine in humans. *Pharmacogenetics*, 1999, 9, 435–443.
- Lisbeth P, Vincent H, Kristof M, Bernard S, Manuel M, Hugo N. Genotype and co-medication dependent CYP2D6 metabolic activity: effects on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, risperidone, paliperidone and zuclopenthixol. *Eur J Clin Pharmacol*, 2016, 72, 175–184.
- Lötsch J, Rohrbacher M, Schmidt H, Doehring A, Brockmüller J, Geisslinger G. Can extremely low or high morphine formation from codeine be predicted prior to therapy initiation? *Pain*, 2009, 144, 119–124.
- Ma MK, Woo MH, McLeod HL. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm*, 2002, 59, 2061–2069.
- Madadi P, Amstutz U, Rieder M, Ito S, Fung V, Hwang S, Turgeon J, Michaud V, Koren G, Carleton BC, CPNDS Clinical Recommendations Group. Clinical practice guideline: CYP2D6 genotyping for safe and efficacious codeine therapy. *J Popul Ther Clin Pharmacol*, 2013, 20, 369–396.
- Madadi P, Moretti M, Djokanovic N, Bozzo P, Nulman I, Ito S, Koren G. Guidelines for maternal codeine use during breastfeeding. *Can Fam Physician*, 2009, 55, 1077–1078.
- Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet*, 1977, 2, 584–586.
- MacCallum J, Cummings J, Dixon JM, Miller WR. Concentrations of tamoxifen and its major metabolites in hormone responsive and resistant breast tumours. *Br J Cancer*, 2000, 82, 1629–1635.

- McLellan RA, Oscarson M, Seidegard J, et al. Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*, 1997, 7, 187-191.
- Mikus G, Trausch B, Rodewald C, Hofmann U, Richter K, Gramatté T, Eichelbaum M. Effect of codeine on gastrointestinal motility in relation to CYP2D6 phenotype. *Clin Pharmacol Ther*, 1997, 61, 459–466.
- Nebert DW, Russel DW. Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet*, 2002, 360, 1155-1162.
- Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names, and nomenclature. *DNA Cell Biol*, 1993, 12, 1–51.
- Nelson DR. Citokrom P450, <http://drnelson.uthsc.edu/human.P450.table.html>, pristupljeno 20.8.2018.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 1964a, 239, 2370-2378.
- Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. solubilization, purification and properties. *J Biol Chem*, 1964b, 239, 2378-2385.
- Otton SV, Schadel M, Cheung SW, Kaplan HL, Busto UE, Sellers EM. CYP2D6 phenotype determines the metabolic conversion of hydrocodone to hydromorphone. *Clin Pharmacol Ther*, 1993, 54, 463–472.
- Otton SV, Ball SE, Cheung SW, Inaba T, Rudolf RL, Sellers EM. Venlafaxine oxidation in vitro is catalyzed by CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*, 1996, 41, 149–156.
- Parkinson A. Biotransformation of xenobiotics. Casarett & Doull's Essentials of Toxicology. Klaassen CD, Watkins III JB, New York, *Mc Graw-Hill*, 2015, str. 133-224.
- Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA*, 2001, 286, 2270-2279.
- Poulsen L, Arendt-Nielsen L, Brisen, Sindrup SH. The hypoalgesic effect of tramadol in relation to CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60, 636–644.
- Pryor RJ, Wittwer CT. Real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Methods Mol Biol*, 2006, 336, 19-32.
- Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev*, 2002, 34, 83-448.
- Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Boso V, Reig J, Poveda JL, Megias J, Bea S, Alino SF. Effect of CYP3A5\*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J*, 2015, 15, 38–48.

Rudorfer MV, Potter WZ. Metabolism of tricyclic antidepressants. *Cell Mol Neurobiol*, 1999, 19, 373–409.

Sachse C, Brockmoller J, Bauer S, et al. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet*. 1997, 60, 284–295.

Scordo MG, Spina E, Facciola G, Avenoso A, Johansson I, Dahl M-L. Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxy risperidone. *Psychopharmacology*, 1999, 147, 300–305.

Serrano D, Lazzeroni M, Zambon CF, Macis D, Maisonneuve P, Johansson H, Guerrieri-Gonzaga A, Plebani M, Basso D, Gjerde J, Mellgren G, Rotmensz N, Decensi A, Bonanni B. Efficacy of tamoxifen based on cytochrome P450 2D6, CYP2C19 and SULT1A1 genotype in the Italian Tamoxifen Prevention Trial. *Pharmacogenomics J*, 2011, 11, 100–107.

Simooya OO, Njunju E, Hodjegan AR i sur. Debrisoquine and metoprolol oxidation in Zambians: a population study. *Pharmacogenetics*, 1993, 3, 205–208.

Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J*, 2013, 13, 1–11.

Stamer UM, Musshoff F, Kobilay M, Madea B, Hoefl A, Stuber F. Concentrations of tramadol and O-desmethyltramadol enantiomers in different CYP2D6 genotypes. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82, 41–47.

Stamer UM, Lehnen K, Höthker F, Bayerer B, Wolf S, Hoefl A, Stuber F. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain*, 2003, 105, 231–238.

Stanley LA. Drug Metabolism. Pharmacogenosy: Fundamentals, Applications and Strategies. McCreath SP, Delgoda R. *Elsevier Science*, 2016, str. 527–545.

Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A. Active tamoxifen metabolite plasma concentrations after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *J Natl Cancer Inst*, 2003, 95, 1758–1764.

Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RH, Schalekamp T, Touw DJ, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VH, Guchelaar HJ. Pharmacogenetics: from bench to byte-an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89, 662–673.

Šimić I, Potočnjak I, Kraljičković I, Stanić Benić M, Čegec I, Juričić Nahal D, Ganoci L, Božina N. CYP2D6 \*6/\*6 genotype and drug interactions as cause of haloperidol-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics*, 2016, 17, 1385–1389.

Tyndale R, Aoyama T, Broly F, Matsunaga T, Inaba T, Kalow W, Gelboin HV, Meyer UA, Gonzalez FJ. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: possible association with the poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics*, 1991, 1, 26–32.

Tyndale RF, Kalow W, Inaba T. Oxidation of reduced haloperidol to haloperidol: involvement of human P450IID6 (sparteine/debrisoquine monooxygenase). *Br J Clin Pharmacol*, 1991, 31, 655–660.

Tracy TS, Chaundry AS, Prasad B, Thummel KE, Schuetz EG, Zhong X, Tien YC, Jeong H, Pan X, Shireman LM, Sontheimer JT, Lin YS. Interindividual Variability in Cytochrome P450-Mediated Drug Metabolism. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44, 343–351.

Watson CP. The treatment of neuropathic pain: antidepressants and opioids. *Clin J Pain*, 2000, 16, 49–55.

Wilton S, Lim L. Long-range PCR: synthesis of products independent of size. *Trends Genet*, 1996, 12, 458.

Yamazaki S, Sato K, Suhara K, Sakaguchi M, Mihara K, Omura T. Importance of the proline-rich region following signal anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s. *J Biochem*, 1993, 114, 652–657.

Zanger UM, Fischer J, Raimundo S, Stuvén T, Evert BO, Schwab M, Eichelbaum M. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics*, 2001, 11, 573–585.

Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 369, 23–37.

Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*, 2013, 138, 103–141.

Zanger UM, Turpeinen M, Klein K, Schwab M. Functional pharmacogenetics/genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392, 1093–1108.

## 7. SAŽETAK

CYP2D6 je najopsežnije istražen polimorfni enzim koji sudjeluje u metabolizmu lijekova. Gen *CYP2D6* je visoko polimorfan te je do danas otkriveno barem 112 alelnih varijanti koje kodiraju za inaktivni enzim, enzim sa smanjenom, normalnom ili povećanom enzimskom aktivnosti. Ovisno o kombinaciji alela i sposobnosti metabolizma lijekova, razlikujemo četiri metabolička fenotipa. Fenotip brzog metabolizma (EM) se smatra normalnom karakteristikom najvećeg dijela populacije, a javlja se u osoba s dva potpuno aktivna alela. Pojedinci s deficitom enzima CYP2D6 (5 – 10 % pripadnika bijele rase) klasificiraju se kao spori metabolizatori (PM). Karakterizira ih nedostatak aktivnog alela te posljedično smanjena aktivnost enzima kodiranog tim alelom što rezultira nakupljanjem lijeka u organizmu i povećanim rizikom od pojave neželjenih učinaka lijeka. Među ostalima je enzimska aktivnost veoma varijabilna te se kreće od ekstremno visoke u vrlo brzih metabolizatora do smanjene u srednjih (intermedijarnih) metabolizatora. Osim značajne interindividualne varijabilnosti, zabilježena je i značajna međuetnička varijabilnost u raspodjeli alelnih varijanti *CYP2D6* koja podrazumijeva i postojanje "populacijski specifičnih" alelnih varijanti.

Usprkos niskoj zastupljenosti enzima CYP2D6 (2 – 4 %) u odnosu na druge jetrene enzime CYP, ovaj enzim sudjeluje u biotransformaciji otprilike 20 - 25 % lijekova dostupnih na tržištu. Enzim CYP2D6 sudjeluje u metabolizmu velikog broja klinički značajnih lijekova, uključujući opioide (kodein, tramadol), antidepresive (amitriptilin, imipramin, fluoksetin, mianserin, venlafaksin), antipsihotike (aripiprazol, haloperidol, olanzapin, risperidon), antitustike (dekstrometorfan),  $\beta$ -blokatore (metoprolol, bufuralol, propranolol), protutumorske lijekove (tamoksifen) i antiemetike (ondansetron i tropisetron). Genotipizacija *CYP2D6* je jedan od alata koji se koriste prilikom provođenja personaliziranog liječenja, što rezultira povećanjem djelotvornosti terapije i smanjenjem troškova liječenja. Procjenjuje se da bi takav personalizirani pristup liječenju na temelju genetskih značajkimogao biti relevantan za 10 – 20 % ukupne terapije lijekovima. U ovom radu se razmatra utjecaj genetske varijabilnosti CYP2D6 na klinički ishod i terapijski učinak lijekova-supstrata CYP2D6.



## 7. SUMMARY

CYP2D6 is the most extensively studied polymorphic drug-metabolizing enzyme. *CYP2D6* gene is highly polymorphic with at least 112 allelic variants discovered so far which encode an inactive enzyme, enzyme with reduced, normal or increased enzyme activity. Subjects are classified into four metabolic phenotype groups, depending on combination of alleles and the ability to metabolise xenobiotics. Extensive metabolism (EM) is considered to be a characteristic of the normal population and is found in subjects with two fully functional alleles. Individuals who are poor metabolisers have no active alleles and, therefore, lack functional enzyme activity which, consequently, results in accumulation of specific drug substrates and adverse drug reaction (ADR) occurrence. Among other subjects, enzyme activity is highly variable and ranges from extremely high in ultrarapid metabolizers to reduced in intermediate metabolizers. Apart from significant interindividual variability, a significant interethnic variability in distribution of *CYP2D6* allelic variants has also been described, including existence of 'population-specific' allelic variants.

Although CYP2D6 constitutes only 2 – 4 % of the total hepatic CYPs, it is one of the most important drug metabolizing enzymes due to its role in biotransformation of approximately 25 % of clinically used drugs. CYP2D6 enzyme is involved in the metabolism of numerous clinically significant drugs including opioids (codeine, tramadol), antidepressants (amitriptyline, imipramine, fluoxetine, mianserin, venlafaxine), antipsychotics (aripiprazole, haloperidol, olanzapine, risperidone), antitussives (dextromethorphan), beta-blockers (metoprolol, bufuralol, propranolol), anticancer drugs (tamoxifen) and antiemetic drugs (ondansetron i tropisetron). Genotyping of CYP2D6 is one of the tools used for implementation of personalized drug treatment which results in increased drug efficacy and decreased cost of ADR treatment. It is estimated that such personalized gene-based treatment could be relevant for 10 – 20 % of all drug therapy. In this thesis, the impact of the *CYP2D6* genetic variability on the clinical outcome and therapeutic and/or adverse effects of drug-substrates of CYP2D6 is reviewed.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za farmakologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### FARMAKOGENETSKA ANALIZA CYP2D6 I ZNAČAJ U KLINIČKOJ PRAKSI

**Jelena Buben**

#### SAŽETAK

CYP2D6 je najopsežnije istražen polimorfni enzim koji sudjeluje u metabolizmu lijekova. Gen *CYP2D6* je visoko polimorfan te je do danas otkriveno barem 112 alelnih varijanti koje kodiraju za inaktivni enzim, enzim sa smanjenom, normalnom ili povećanom enzimskom aktivnosti. Ovisno o kombinaciji alela i sposobnosti metabolizma lijekova, razlikujemo četiri metabolička fenotipa. Fenotip brzog metabolizma (EM) se smatra normalnom karakteristikom najvećeg dijela populacije, a javlja se u osoba s dva potpuno aktivna alela. Pojedinci s deficitom enzima (5 – 10 % pripadnika bijele rase) klasificiraju se kao spori metabolizatori (PM). Karakterizira ih nedostatak aktivnog alela te posljedično smanjena aktivnost enzima kodiranog tim alelom što rezultira nakupljanjem lijeka u organizmu i povećanim rizikom od pojave neželjenih učinaka lijeka. Među ostalima je enzimska aktivnost veoma varijabilna te se kreće od ekstremno visoke u vrlo brzih metabolizatora do smanjene u srednjih (intermedijarnih) metabolizatora. Osim značajne interindividualne varijabilnost, zabilježena je i značajna međuetnička varijabilnost u raspodjeli alelnih varijanti CYP2D6 koja podrazumijeva i postojanje "populacijski specifičnih" alelnih varijanti.

Usprkos niskoj zastupljenosti enzima CYP2D6 (2 – 4 %) u odnosu na druge jetrene enzime CYP, ovaj enzim sudjeluje u biotransformaciji otprilike 20 – 25 % lijekova dostupnih na tržištu. Enzim CYP2D6 sudjeluje u metabolizmu velikog broja klinički značajnih lijekova, uključujući opioide (kodein, tramadol), antidepressive (amitriptilin, imipramin, fluoksetin, mianserin, venlafaksin), antipsihotike (aripiprazol, haloperidol, olanzapin, risperidon), antitustike (deksrometorfan),  $\beta$ -blokatore (metoprolol, bufuralol, propranolol), protutumorske lijekove (tamoksifen) i antiemetike (ondansetron i tropisetron). Genotipizacija CYP2D6 je jedan od alata koji se koriste prilikom provođenja personaliziranog liječenja, što rezultira povećanjem djelotvornosti terapije i smanjenjem troškova liječenja. Procjenjuje se da bi takav personalizirani pristup liječenju na temelju genetskih značajki mogao biti relevantan za terapiju s 10 – 20 % lijekova. U ovom radu se razmatra utjecaj genetske varijabilnosti *CYP2D6* na klinički ishod i terapijski učinak lijekova-supstrata CYP2D6.

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

Rad sadrži: 60 stranica, 5 grafičkih prikaza, 17 tablica i 124 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: CYP2D6, polimorfizam, ksenobiotik, metabolizam lijekova, genotipizacija, farmakogenomika, personalizirana medicina

Mentor: **Dr. sc. Nada Božina**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Božina**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr.sc. Željko Maleš**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medicinal Biochemistry  
Department of Pharmacology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### CYP2D6 POLYMORPHISM AND ITS CLINICAL SIGNIFICANCE

**Jelena Buben**

#### SUMMARY

CYP2D6 is the most extensively studied polymorphic drug-metabolizing enzyme. *CYP2D6* gene is highly polymorphic with at least 112 allelic variants discovered so far which encode an inactive enzyme, enzyme with reduced, normal or increased enzyme activity. Subjects are classified into four metabolic phenotype groups, depending on combination of alleles and the ability to metabolise xenobiotics. Extensive metabolism (EM) is considered to be a characteristic of the normal population and is found in subjects with two fully functional alleles. Individuals who are poor metabolisers have no active alleles and, therefore, lack functional enzyme activity which, consequently, results in accumulation of specific drug substrates and adverse drug reaction (ADR) occurrence. Among other subjects, enzyme activity is highly variable and ranges from extremely high in ultrarapid metabolizers to reduced in intermediate metabolizers. Apart from significant interindividual variability, a significant interethnic variability in distribution of *CYP2D6* allelic variants has also been described, including existence of 'population-specific' allelic variants.

Although CYP2D6 constitutes only 2 – 4 % of the total hepatic CYPs, it is one of the most important drug metabolizing enzymes due to its role in biotransformation of approximately 25 % of clinically used drugs. CYP2D6 enzyme is involved in the metabolism of numerous clinically significant drugs including opioids (codeine, tramadol), antidepressants (amitriptyline, imipramine, fluoxetine, mianserin, venlafaxine), antipsychotics (aripiprazole, haloperidol, olanzapine, risperidone), antitussives (dextromethorphan), beta-blockers (metoprolol, bufuralol, propranolol), anticancer drugs (tamoxifen) and antiemetic drugs (ondansetron and tropisetron). Genotyping of CYP2D6 is one of the tools used for implementation of personalized drug treatment which results in increased drug efficacy and decreased cost of ADR treatment. It is estimated that such personalized gene-based treatment could be relevant for 10 – 20 % of all drug therapy. In this thesis, the impact of the *CYP2D6* genetic variability on the clinical outcome and therapeutic and/or adverse effects of drug-substrates of CYP2D6 is reviewed.

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

Thesis includes: 60 pages, 5 figures, 17 tables and 124 references. Original is in Croatian language.

Keywords: CYP2D6, polymorphism, xenobiotic, drug metabolism, genotyping, pharmacogenomics, personalised medicine

Mentor: **Nada Božina, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Medicine.

Reviewers: **Nada Božina, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Medicine.  
**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Željko Maleš, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: September 2018.

