

# Polimorfizmi gena ABCG2 i SLC01B1 kao rizični čimbenici terapije statinima (ABCG2 and SLC01B1 gene polymorphisms as risk factors to statin therapy)

---

Karačić, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:163:755835>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

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



**Ena Karačić**

**Polimorfizmi gena *ABCG2* i *SLCO1B1* kao rizični  
čimbenici terapije statinima**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

*Zahvaljujem mentoricama izv. prof. dr. sc. Nadi Božini i prof. dr. sc. Karmeli Barišić na stručnom vođenju, povjerenju i savjetima pri izradi i pisanju diplomskog rada.*

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....   | 1  |
| 1.1. Farmakogenomika.....   | 2  |
| 1.2. Smjernice o doziranju lijekova prema rezultatima farmakogenomskog testiranja.....              | 5  |
| 1.3. Uloga farmakogenomičkog testiranja u klinički sigurnoj i djelotvornoj terapiji lijekovima..... | 7  |
| 1.4. Statini – zlatni standard u terapiji hiperkolesterolemije.....                                 | 7  |
| 1.5. Farmakodinamika statina.....   | 8  |
| 1.6. Nuspojave statina.....   | 10 |
| 1.7. Farmakokinetika statina.....   | 11 |
| 1.7.1. Simvastatin.....   | 12 |
| 1.7.2. Atorvastatin .....   | 13 |
| 1.7.3. Fluvastatin.....   | 14 |
| 1.7.4. Rosuvastatin.....  | 16 |
| 1.8. Utjecaj polimorfizma OATP1B1 na metabolizam statina.....                                       | 17 |
| 1.9. PharmGKB – kliničke smjernice za simvastatin i atorvastatin.....                               | 20 |
| 1.10. OATP1B1 – supstrati, inhibitori i interakcije.....  | 23 |
| 1.11. Utjecaj polimorfizma BCRP na metabolizam statina.....   | 26 |
| 1.12. BCRP – supstrati, inhibitori i interakcije.....   | 28 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME.....   | 30 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....   | 31 |
| 3.1. Izdvajanje DNA metodom QIAamp®.....  | 31 |
| 3.2. Lančana reakcija polimeraze.....   | 33 |
| 3.3. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. <i>Real-Time PCR</i> ) .....             | 35 |
| 3.4. Genotipizacija <i>ABCG2</i> c.421C>A i <i>SLCO1B1</i> c.521T>C .....                           | 37 |
| 4. REZULTATI.....   | 42 |
| 4.1. Učestalost alela polimorfizma gena <i>SLCO1B1</i> c.521T>C.....                                | 42 |
| 4.2. Učestalost alela polimorfizma gena <i>ABCG2</i> c.421C>A.....                                  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 4.3. Prikaz slučaja pacijenta I .....                           | 46 |
| 4.4. Prikaz slučaja pacijenta II .....                          | 47 |
| 5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK.....                                    | 49 |
| 6. LITERATURA.....  | 51 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY.....   | 67 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION<br>CARD |    |

## POPIS KRATICA

ADR – nuspojave; neželjeni učinci lijeka (engl. *adverse drug reactions*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*)

TDM – praćenje farmakoterapije (engl. *therapeutic drug monitoring*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

dsDNA – dvolančana deoksiribonukleinska kiselina

ssDNA – jednolančana deoksiribonukleinska kiselina

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. *messenger RNA*)

SNP – jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single nucleotide polymorphism*)

wt – alel divljeg tipa (engl. *wild type*)

mut – mutirani alel (engl. *mutated type*)

CYP – superobitelj citokrom P-450 izoenzima

WHO – Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organisation*)

CAD – koronarna arterijska bolest (engl. *coronary artery disease*)

LDL – lipoproteini niske gustoće (engl. *low density lipoprotein*)

TG - trigliceridi

HDL – lipoproteini visoke gustoće (engl. *high density lipoprotein*)

SRB proteini – engl. *sterol regulatory binding proteins*

HMG-CoA – 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A

GTP-aza – gvanozin-trifosfataza

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

ALT – alanin-transaminaza

AST – aspartat-transaminaza

GWA – engl. *genome-wide association*

HLA – humani leukocitni antigen

AUC – površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi o vremenu (engl. *area under the curve*)

GGT – gama-glutamilttransferaza

AP – alkalna-fosfataza

UGT – uridin-5'-difosfo-glukuronoziltransferaza (UDP-glukuronoziltransferaza)

CK – kreatin-kinaza

eNOS – endotelna sintaza dušikovog (II) oksida

NO – dušikov (II) oksid

OATP – organski anionski transportni polipeptid (engl. *Organic Anion Transporting Polypeptide*)

OATP1B1 - organski anionski transportni polipeptid 1B1 (engl. *Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*)

ABC – prijenosnik ovisan o ATP-u (engl. *ATP Binding Cassette*)

ABCG2 - prijenosnik ovisan o ATP-u G2 (engl. *ATP Binding Cassette G2*)

BCRP – protein rezistencije na lijekove otkriven u stanicama raka dojke (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*)

CPIC - Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenetike (engl. *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

FRET – fluorescencijski rezonantni prijenos energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*)

PIL – uputa o lijeku (engl. *Patient Information Leaflet*)

SmPC – sažetak opisa svojstava lijeka (engl. *Summary of Product Characteristics*)

PGRN – Farmakogenomska istraživačka mreža (engl. *Pharmacogenomics Research Network*)

PharmGKB – Farmakogenomska baza podataka (engl. *Pharmacogenomics Knowledge Base*)

DPWG – Nizozemska farmakogenomska radna skupina (engl. *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*)

NIH - Nacionalni institut za zdravlje (engl. *National Institutes of Health*)

CPNDS – Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnu primjenu lijekova (engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*)

OD – optička gustoća (engl. *optical density*)

dNTP - deoksiribonukleozid-trifosfat

KV – kardiovaskularni

ACE – angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme*)

DDI – lijek-lijek interakcija (engl. *drug-drug interaction*)

DGI – lijek-gen interakcija (engl. *drug-gene interaction*)

DDGI – lijek-lijek-gen interakcija (engl. *drug-drug-gene interaction*)

TKI – inhibitori tirozinske kinaze

AZT – azidotimidin (zidovudin)

P-gp – P-glikoprotein

FDA – engl. *Food and Drug Administration*

EMA – engl. *European Medicines Agency*

IPP – inhibitori protonske crpke

PCI – perkutana koronarna intervencija

HIV – virus humane imunodeficijencije

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest



## 1. UVOD

Nuspojave (ADR) su važan uzrok komorbiditeta i smrtnosti u svijetu, sa sve većim i značajnijim utjecajem na javno zdravstvo i ekonomiju. Sustavnim pregledom i meta-analizom 39 prospektivnih studija provedenih u SAD-u, utvrđeno je da se učestalost ozbiljnih neželjenih reakcija koje su dovele do hospitalizacija, kretala od 1,0 % do 16,8 % (Formica i sur., 2018). Što se tiče preventabilnih nuspojava, procjenjuje se da je oko 70 % neželjenih reakcija na lijekove, koje su dovele do hospitalizacije, moguće spriječiti (Formica i sur., 2018). Međutim, druge studije provedene isključivo na populaciji hospitaliziranih pacijenata, utvrdile su puno veću ukupnu učestalost ozbiljnih neželjenih reakcija na lijekove. Ove studije procjenjuju da čak 6,7 % hospitaliziranih pacijenata ima ozbiljnu neželjenu reakciju na lijek, sa stopom smrtnosti od 0,32 %. Ako su ove procjene točne, tada postoji više od 2 216 000 ozbiljnih neželjenih reakcija na lijekove kod hospitaliziranih pacijenata u SAD-u, što godišnje uzrokuje više od 106 000 smrtnih slučajeva. Prema ovim podacima, nuspojave su četvrti vodeći uzrok smrtnosti u SAD-u, ispred plućnih bolesti, dijabetesa, AIDS-a, upale pluća i automobilskih nesreća (Gurwitz i sur., 2000; Lazarou i sur., 1998). Mnogi čimbenici mogu pridonijeti visokoj incidenciji nuspojava, a jedan od najvažnijih razloga izrazito visoke pojavnosti nuspojava jesu intra- i interindividualne razlike u odgovoru na farmakoterapiju (Khan, 2016).

Danas se farmakoterapija, odnosno izbor i doziranje lijeka za pojedinog pacijenta, temelji na empiriji, tj. na podacima o prosječnom odgovoru populacije na lijek, koji su opisani u odobrenim uputama o lijeku i sažetcima opisa svojstava lijeka. Međutim, različite genske varijante među pojedincima rezultiraju različitim fenotipovima, odnosno izražavanjem različitih svojstava, a fenotip se odražava na farmakodinamiku (mehanizam djelovanja) i farmakokinetiku (oslobađanje, apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju) lijeka. Stoga se zaključuje da genetička svojstva i pojedinosti neke osobe, koja se fenotipski izražavaju u strukturnim promjenama, promjenama učestalosti ili koncentracije bioloških makromolekula tj. proteina, s kojima molekule lijeka stupaju u interakciju, bilo na farmakodinamičkoj ili farmakokinetičkoj razini, mogu značajno utjecati na farmakoterapijski odgovor te bi posljedično, odabir i doziranje farmakoterapije trebao uzeti u obzir genska

svojstva farmakodinamičkih i farmakokinetičkih biljega svakoga pojedinca, važnih za određenu vrstu farmakoterapije (Hilal-Dandan i Brunton, 2013).

### **1.1. Farmakogenomika**

Jedan je od najvažnijih ciljeva suvremene farmacije i personalizirane medicine potreba da pacijent dobije odgovarajući lijek u odgovarajućoj dozi s minimalnim toksičnim učincima. Individualizacija farmakoterapije, koja se opisuje kao prilagođavanje odabira i doziranja lijeka za određenog pacijenta, stoljećima je bila cilj liječnika i drugih pružatelja zdravstvene skrbi i zaštite. Razumijevanje patogeneze bolesti, mehanizma djelovanja lijeka te odnosa izloženosti lijeku i odgovora na terapiju, pruža okvir za individualizaciju terapije. Postoje mnogi pristupi u individualizaciji farmakoterapije, primjerice, odabir antibiotika na temelju minimalnih učinkovitih koncentracija i osjetljivosti na bakterije, TDM i u novije vrijeme, farmakogenomika (Lesko i Schmidt, 2012).

Farmakogenomika je grana farmakologije, a definira se kao studija o varijabilnosti učinka lijekova tj. odgovora na farmakoterapiju uzrokovanih genetičkim čimbenicima. U novije vrijeme, s trendom dodavanja sufiksa „-omika“ područjima znanstvenoga interesa, uveden je pojam „farmakogenomika“. Dok se izraz farmakogenetika koristi ponajviše u kontekstu pojedinačnih gena koji određuju metabolizam lijekova, pojam farmakogenomike širi je pojam, odnosi se na cijeli genom i sve gene čovjeka čiji produkti mogu utjecati na odgovor na lijek (Katzung i sur., 2018; Pirmohamed, 2001).

Farmakogenomika podrazumijeva da višestruke genske varijante mogu pridonijeti varijabilnosti u odgovoru na primjenjenu farmakoterapiju. Povijesno gledano, ovo je znanstveno područje počelo s opažanjima nuspojava na lijekove u određenih pojedinaca za koje se utvrdilo da su nositelji genetičkih varijanti za enzime uključene u metabolizam lijeka. Povijest seže još u daleku prošlost kada je Pitagora, 510. godine prije nove ere, opisao neželjenu reakciju prilikom konzumacije boba, koja je bila kobna samo kod nekih, ali ne i kod svih pojedinaca koji su konzumirali bob. Od tada postoji još bezbroj saznanja koja su oblikovala ovo područje istraživanja i dovela do trenutne lavine interesa (Katzung i sur., 2018; Pirmohamed, 2001).

Kao znanstveno područje farmakogenomika se ubrzano razvija nakon sekvenciranja ljudskoga genoma. U posljednjem desetljeću, iscrpna istraživanja cijeloga genoma (engl. *genome-wide association*, GWA), u okviru kojih je ispitana povezanost stotina tisuća genskih inačica s odgovorom pojedinca na lijekove, dovela su do otkrića mnogih drugih važnih polimorfizama koji mogu rezultirati varijabilnim terapijskim i štetnim učincima lijekova (Katzung i sur., 2018).

Osim polimorfizama u genima koji kodiraju enzime uključene u metabolizam lijeka, sada se zna da su polimorfizmi, prisutni i u genima koji kodiraju transportere, lokuse humanog leukocitnog antigena (HLA), citokine i razne druge proteine, prediktori varijabilnosti terapijskog i štetnog učinka lijeka. Osim novih otkrića, prošlo je desetljeće uvelo i izraz „precizna medicina“, također poznata pod nazivom „stratificirana ili personalizirana medicina“, u kojoj se genetičke informacije koriste za odabir lijeka i režima doziranja u podskupina bolesnika ili pojedinih bolesnika u kliničkoj praksi. Konzorcij za provedbu kliničke farmakogenetike (engl. *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, CPIC) objavio je niz smjernica za upotrebu genetičkih informacija u odabiru lijeka i režima doziranja. Ove vrlo informativne smjernice koriste kliničari u propisivanju lijekova za učinkovitije liječenje bolesnika (Katzung i sur., 2018). Štoviše, tijekom nekoliko posljednjih godina, u različitim se časopisima pojavio veliki broj znanstvenih članaka na temu farmakogenomike. Također, pokrenuto je nekoliko novih znanstvenih časopisa s pojmom „farmakogenomika“ u svom naslovu, što je samo dokaz da se na farmakogenomiku gleda kao na vrlo važno područje u farmakoterapiji te se poistovjećuje s budućnosti iste (Pirmohamed, 2001).

Poznato je da svaka jedinka nosi dvije kopije svakoga gena. Kopije određenog gena unutar populacije neće imati identične nukleotidne sekvence, a te su promjene unutar jednog nukleotida raspršene po genomu i čine osnovu ljudske raznolikosti (Alwi, 2005). Smatra se da se varijacije unutar ljudskog genoma uočavaju otprilike svakih 100 - 300 nukleotida, a varijacije u sekvenci DNA koje su unutar populacije prisutne s učestalošću od 1 % ili više, nazivaju se polimorfizmima. Genski se polimorfizam, dakle definira kao pojavljivanje varijantnog alela gena s učestalosti od  $> 1\%$  u populaciji, što može uzrokovati promijenjenu ekspresiju ili funkcionalnu aktivnost genskog produkta, ili oboje. Iako postoji niz različitih

vrsta polimorfizama, najviše se pozornosti pridaje jednonukleotidnim polimorfizmima (SNP) i njihovom potencijalu za određivanje individualnog odgovora na lijek, zbog zapažene velike varijabilnosti u terapijskom odgovoru i incidenciji pojave nuspojava među pojedincima (Katzung i sur., 2018; Pirmohamed, 2001). SNP-ovi predstavljaju supstituciju jednog nukleotida na specifičnoj poziciji u genomu, koja je prisutna s relativno visokom učestalošću u populaciji (npr. 1 % ili više), te se upravo oni smatraju ključnima u definiranju osjetljivosti pojedinca na različite patološke procese te odgovoru na farmakoterapiju (Katzung i sur., 2018; Katara, 2014).

Najučestaliji alel u određenoj populaciji naziva se alelom divljeg tipa (engl. *wild type* – wt) te se podrazumijeva „normalnim“, dok se alel s promjenom u nukleotidu u odnosu na alel divljeg tipa, podrazumijeva mutiranim, odnosno promijenjenim (varijantnim) alelom (mut). SNP-ove nalazimo jednako u kodirajućim i nekodirajućim regijama genoma, dok varijacije u kodirajućoj regiji mogu dovesti do promjena u slijedu aminokiselina, koje mogu biti uzrok promjena u strukturi, a posljedično i u funkciji produkata genske ekspresije, odnosno proteina, što se može odraziti na farmakodinamičkoj, ali i na farmakokinetičkoj razini međudjelovanja organizma i lijeka (Hilal-Dandan i Brunton, 2013).

Najnovija saznanja u području farmakogenomike počela su pojašnjavati genetičku pozadinu interindividualnih razlika u nuspojavama i toksičnosti lijekova te u farmakoterapijskom odgovoru. Proučavanjem genskih polimorfizama mogu se objasniti neke od varijabilnosti u aktivnostima enzima koji metaboliziraju ksenobiotike te pridonose promjenama u bioraspoloživosti i klirensu lijeka te posljedično mogu utjecati na odgovor pacijenta na farmakoterapiju. Dobro definirani i klinički relevantni genski polimorfizmi postoje u enzimima metabolizma lijekova u I. i II. fazi, koji rezultiraju promijenjenom djelotvornošću ili nuspojavama (ADR). Ovo posljednje često zahtijeva prilagodbu doze, što je posebno važno za lijekove s uskom terapijskom širinom te dugotrajnom primjenom. Povijesni i trenutni primjeri nekoliko opsežno proučavanih SNP-ova uključuju gene koji kodiraju za glukoza-6-fosfat-dehidrogenazu, N-acetiltransferaze i obitelj izoenzima citokroma P-450 (CYP). Budući da CYP izoenzimi metaboliziraju veliki broj strukturno raznolikih ksenobiotika, većina varijantnih genotipova za gene *CYP2D6*, *CYP2D9*, *CYP2C19* i *CYP3A*,

rano su identificirana i široko proučavana. Pojedinci s aberantnim genima za neki od ovih enzima, mogu iskusiti smanjenu djelotvornost ili povećanu toksičnost kao odgovor na terapiju nekim lijekom, zbog različitih razina aktivnosti povezanih s varijantnim genotipovima (Katzung i sur., 2018; Ma i sur., 2002).

Proteinski prijenosnici (transporteri) na membranama, smješteni na epitelnim stanicama mnogih tkiva, poput intestinalne, bubrežne i jetrene membrane, posreduju selektivni unos u stanicu i iznošenje iz stanice endogenih spojeva i ksenobiotika, uključujući mnoge lijekove. Transporteri, koji često djeluju zajedno s enzimima za metabolizam lijekova, značajno određuju koncentracije lijekova i njihovih metabolita u plazmi i tkivu. Genetičke razlike transportera mogu bitno izmijeniti izloženost lijeku, kao i njegovu učinkovitost, te stoga mogu i povećati rizik od razvoja štetnih učinaka. Dakle, kontinuirano istraživanje u području farmakogenetike proširit će naša saznanja o interindividualnim razlikama u farmakoterapiji, a u konačnici će primjena ovih saznanja uvelike pomoći u individualizaciji farmakoterapije, predviđanju toksičnosti ili terapijskog neuspjeha te u poboljšanju kliničkih ishoda (Katzung i sur., 2018).

## **1.2. Smjernice o doziranju lijekova prema rezultatima farmakogenomskog testiranja**

Premda je ustanovljena jasna poveznica između genetičke predispozicije i učinkovitosti te toksičnosti određenih lijekova, implementacija farmakogenomike u kliničkoj praksi zaostaje za tim saznanjima. Jaz između jasnih dokaza te prihvaćanja i primjene novih farmakogenetičkih testova nastoji se prebroditi razvojem uputa i smjernica utemeljenih na konsenzusu te edukacijom zdravstvenih profesionalaca (Božina i Macolić Šarinić, 2013). Smjernice objavljuju radne skupine i društva, a neke su od smjernica regulatorna tijela uključila u upute o lijeku (PIL) i sažetke opisa svojstava lijeka (SmPC) (Plečko, 2018; Mirošević Skvrce, 2014).

Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, CPIC) međunarodni je konzorcij s glavnim

ciljem prijenosa znanja i upotrebe rezultata farmakogenomskih testiranja za kliničke svrhe. Jedna je od prepreka provedbi farmakogenetičkog testiranja u kliničkoj praksi poteškoća u prijenosu genetičkih rezultata u konkretne odluke o propisivanju lijekova. Cilj CPIC-a je adresirati ovu prepreku za kliničku provedbu farmakogenomskih testova stvaranjem i objavljivanjem slobodno dostupnih, recenziranih, temeljenih na dokazima, ažuriranih i detaljnih smjernica, za primjenu u kliničkoj praksi. CPIC je započeo s djelovanjem kao dio zajedničkog projekta PharmGKB-a (engl. *Pharmacogenomics Knowledge Base*) i Farmakogenomske istraživačke mreže (engl. *Pharmacogenomics Research Network*, PGRN) 2009. godine, a smjernice prate standardiziran format i uključuju sistematično određivanje razine dokaza i kliničke preporuke te koriste standardiziranu terminologiju ([www.cpicpgx.org/](http://www.cpicpgx.org/)).

Nizozemsku farmakogenetičku radnu skupinu (engl. *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*, DPWG) osnovalo je 2005. godine Nizozemsko kraljevsko farmaceutsko društvo. DPWG čini multidisciplinarni tim koji uključuje kliničke farmaceute, liječnike, kliničke farmakologe, kliničke kemičare, epidemiologe i toksikologe. Ciljevi DPWG-a jesu razviti farmakoterapijske preporuke temeljene na farmakogenetici te pomoći propisivačima i farmaceutima integrirajući preporuke u računalne sustave za propisivanje/izdavanje i automatizirano praćenje terapije. DPWG se koristi metodom sistematičnog pretraživanja objavljenih radova za svaki pojedini lijek. Za sve su članke definirana dva parametra: razina dokaza za interakciju gen-lijek i klinički značaj potencijalne nuspojave, smanjenog terapijskog odgovora ili drugih kliničkih učinaka koji proizlaze iz interakcije gen-lijek ([www.pharmgkb.org/page/dpwwg](http://www.pharmgkb.org/page/dpwwg); Krivokapić, 2019).

PharmGKB je javno dostupna platforma koju je razvilo Sveučilište Stanford, a financirana je od strane američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH). PharmGKB je izvor širokog farmakogenomskog znanja koje obuhvaća kliničke informacije, uključujući kliničke smjernice, potencijalno klinički djelotvorne asocijacije gena i lijeka te odnose genotipa i fenotipa. Dakle, PharmGKB prikuplja i distribuira znanje o utjecaju ljudskih genetičkih informacija na farmakoterapijski odgovor ([www.pharmgkb.org/about](http://www.pharmgkb.org/about); Krivokapić, 2019).

### **1.3. Uloga farmakogenomičkog testiranja u klinički sigurnoj i djelotvornoj terapiji lijekovima**

Unatoč našem poboljšanom razumijevanju molekularne osnove farmakogenetičkih defekata u enzimima koji metaboliziraju lijek, njihovog utjecaja na terapiju i razvoj štetnih učinaka, te dostupnosti validiranih farmakogenetičkih biomarkera za identifikaciju bolesnika s povećanim rizikom, ova klinički relevantna informacija nije učinkovito prevedena u skrb o bolesniku. Tako je ta naširoko najavljuvana mogućnost personalizirane medicine uglavnom ostala nerealizirana, osim u nekoliko slučajeva lijekova s relativno uskim terapijskim indeksom (npr. varfarin), unatoč tome što 98 % američkih liječnika zna da takva genetička informacija može značajno utjecati na terapiju. Djelomično je razlog u nedostatku odgovarajuće obuke za prijenos znanja u medicinsku praksu, a dijelom u nedostatnoj logistici za genetičko testiranje i pitanjima njegove isplativosti. Poznato je da teške nuspojave lijekova uzrokuju više od 100 000 smrtnih slučajeva godišnje u SAD-u, oko 7 % svih prijema u bolnicu i produljen prosječan boravak u bolnici. Informacije o genotipu mogu uvelike poboljšati sigurno i djelotvorno kliničko liječenje putem prilagodbe doze ili terapije alternativnim lijekom, čime bi se smanjio veći dio incidencije nuspojava lijekova i s njima povezanih troškova (Katzung i sur., 2018).

### **1.4. Statini – zlatni standard u terapiji hiperkolesterolemije**

Prema podacima WHO-a, koronarna arterijska bolest (CAD) postala je jednom od najvećih „ubojica“ suvremenoga svijeta. Dislipidemija, odnosno povišene razine ukupnog kolesterola, lipoproteina niske gustoće (LDL), triglicerida (TG) ili snižene razine lipoproteina visoke gustoće (HDL), smatra se jednim od kritičnih čimbenika za razvoj CAD-a. U posljednje su vrijeme statini najšire propisivani lijekovi u prevenciji i terapiji CAD-a i ishemijskog inzulta. Štoviše, oni dokazano smanjuju morbiditet i mortalitet snižavanjem razine LDL - kolesterola u krvnoj plazmi. Međutim, statini uzrokuju mnoge ozbiljne nuspojave, poput miopatije i rabdomiolize. Štoviše, kako se statini koriste u dugotrajnoj terapiji kroničnih bolesti, velik je i rizik od nuspojava kao posljedice interakcija s drugim lijekovima u politerapiji. Također, utvrđene su velike interindividualne razlike u smanjenju

razina LDL - kolesterola te u incidenciji ADR-a prilikom terapije statinima. Provedena su opsežna istraživanja u području genetičkih varijacija i interindividualnih odgovora, kako u kliničkim ishodima i toksičnosti, tako i na razini snižavanja LDL – kolesterola. Dokazano je da su neki od ispitivanih genskih polimorfizama povezani s nuspojavama statina (Calderon-Ospina i sur., 2020; Guan i sur., 2019; Thompson i sur., 2003; Staffa i sur., 2002; Downs i sur., 1998; Sacks i sur., 1996; Shepherd i sur., 1995). Štoviše, cerivastatin je 2001. godine dobrovoljno povučen s tržišta zbog visokog rizika od rabdomiolize, korišten u monoterapiji ili u kombinaciji s fibratima, posebice gemfibrozilom. Posljedično, istraživači su potvrdili peterostruko povećanje površine ispod krivulje (AUC) ovisnosti koncentracije lijeka u krvnoj plazmi o vremenu, kada se cerivastatin koristio kao komedikacija s gemfibrozilom (Marciante i sur., 2011; Saito i sur., 2005; Thompson i sur., 2003; Davidson, 2002; Lucas i sur., 2002; Staffa i sur., 2002; Furberg i Pitt, 2001; Wooltorton, 2001).

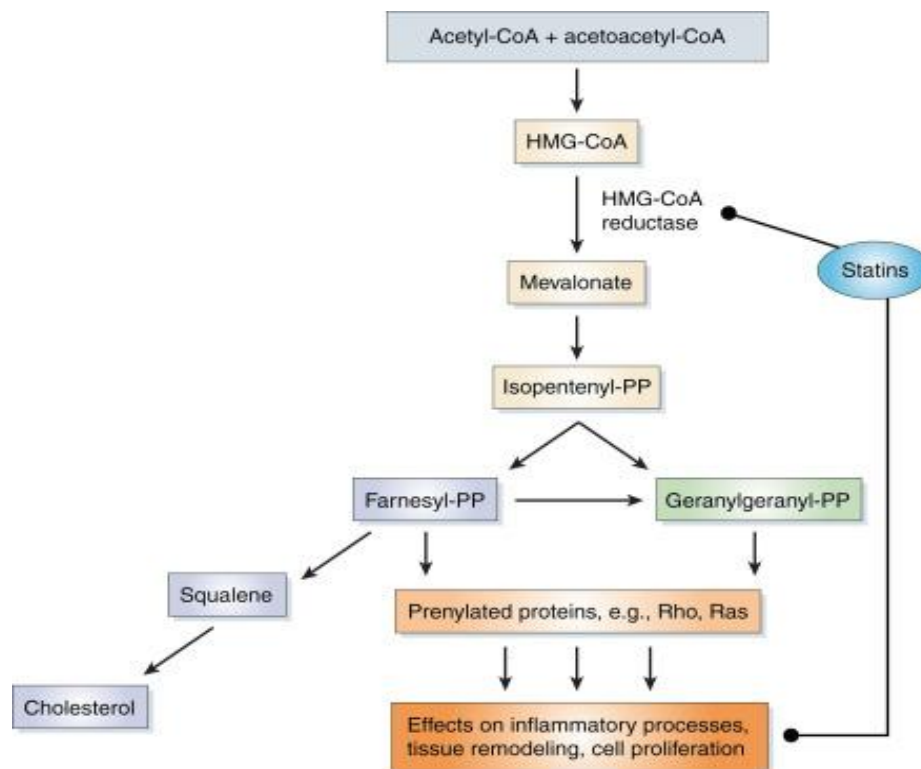
### **1.5. Farmakodinamika statina**

Statini djeluju na sniženje ukupnog staničnog sadržaja kolesterola, selektivnom inhibicijom enzima HMG–CoA-reduktaze, ključnog u mevalonatnom putu endogene sinteze kolesterola. Inhibicijom sinteze mevalonata, te posljedično i kolesterola, ograničava se biosinteza kolesterola te njegova koncentracija u jetri. Nedostatkom kolesterola u hepatocitima, aktiviraju se SRB proteini (*engl. sterol regulatory binding proteins*) koji povećavaju transkripciju gena za LDL receptor, što rezultira povišenom ekspresijom LDL receptora u membrani hepatocita. Na taj se način povećava klirens LDL – kolesterola u hepatocite, odnosno smanjuju se koncentracije LDL – kolesterola u krvnoj plazmi (Sirtori, 2014).

Ipak, važno je naglasiti da rezultati drugih studija na pojedincima s normalnim razinama kolesterola u krvnoj plazmi, sugeriraju da statini osim hipolipemičkog učinka imaju i druge dodatne kardioprotektivne učinke, koji su danas poznati kao pleiotropni učinci, te uključuju imunomodulaciju, protuupalno i antioksidacijsko djelovanje, zaštitu endotela i pro-angiogenezu. Rezultati eksperimentalnih i kliničkih istraživanja ukazuju da su pleiotropni učinci liječenja statinima uglavnom izvedeni iz njihovih snažnih inhibitornih djelovanja na izoprenilaciju Rho GTP-aze, smanjenjem stvaranja geranil-geranilpirofosfata tijekom biosinteze kolesterola. Porodica Rho GTP-aza uključuje gotovo 20 članova kod ljudi, među



kojima su Rac1, RhoA i Cdc42, koji su najviše istraživani članovi. Oni ostvaruju složene i esencijalne učinke na regulaciju ekspresije endotelne sintetaze dušikovog (II) oksida (eNOS) i proizvodnje NO, migraciju i proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica, stvaranje reaktivnih kisikovih specija te infiltraciju i migraciju proupalnih stanica, poput makrofaga. Trenutno se, na temelju atraktivnih i korisnih pleiotropnih učinaka statina u održavanju vaskularne homeostaze, kao i u poboljšanju upalnih reakcija i oksidacijskoga stresa, provode brojna istraživanja kako bi se ispitali učinci terapije statinima u različitim patološkim stanjima, poput zatajenja srca, aritmija, hipertrofije lijevog ventrikula, diabetes mellitusa i malignih tumora (Ahmadi i sur., 2020; Zeiser, 2018; Cai i sur., 2015).



**Slika 1.** Shematski prikaz biosintetskog puta kolesterola i meta farmakološkog djelovanja statina (Haslinger-Löffler, 2008)

## 1.6. Nuspojave statina

Najčešće prepoznate i najviše prijavljivane nuspojave statina su mišićne, uključujući mialgiju (bolovi i slabost u mišićima), miozitis (bol uz prisutnost oštećenja skeletnih mišića) s povišenjem kreatin-kinaze (CK) manje od 10 puta od gornje referentne vrijednosti, i rabdomiolizu (značajno oštećenje mišića, uz mioglobinuriju, koje najčešće vodi do zatajenja bubrega) (Chatzizisis i sur., 2010; Rowan i sur. 2009; Golomb i Evans, 2008; Schech i sur., 2007). Rizik od razvoja miotoksičnosti raste s porastom primijenjene doze statina, tj. s porastom koncentracijskih razina statina u krvnoj plazmi, koji dijelom može biti posljedica istodobne primjene drugih lijekova s kojima statini ulaze u interakcije ili interferiraju s njima na razini metabolizma odnosno prijenosa. Prema meta-analizi ispitivanja koja uspoređuju standardne doze svih trenutno dostupnih statina, atorvastatin je povezan s općenito najvećim rizikom od nuspojava, dok je fluvastatin povezan s najnižim rizikom od potencijalnih neželjenih učinaka lijeka. Također, još jedna meta-analiza randomiziranih kontroliranih studija, koje su uspoređivale različite doze atorvastatina i rosuvastatina, nije otkrila značajnu razliku u miotoksičnosti između te dvije djelatne tvari, u bilo kojem omjeru doza (Turner i Pirmohamed, 2019; Abd i Jacobson, 2011; Chatzizisis i sur., 2010; Armitage, 2007; Schech i sur., 2007; Ronaldson i sur., 2006; Graham i sur., 2004).

Čimbenici rizika za razvoj statinima izazvane miotoksičnosti uključuju povišenje doze, lijek-lijek interakcije, stariju životnu dob, nizak indeks tjelesne mase (BMI), ženski spol, komorbiditete (npr. hipotiroidizam, transplantacija bubrega) te intenzivnu fizičku aktivnost. Pripadnost azijskoj ili afričkoj populaciji također predstavlja veći rizik u odnosu na bjelačku populaciju (Chatzizisis i sur., 2010).

Od prvog uvođenja statina, bilo je jasno kako kod malog broja bolesnika dolazi i do povećanja vrijednosti jetrenih enzima, posebice alanin-transaminaze (ALT) i aspartat-transaminaze (AST). Tipično, kod primjene standardnih doza statina učinak na gama-glutamilttransferazu (GGT), alkalnu-fosfatazu (AP) i bilirubin je minimalan ili izostaje. Povećanje transaminaza obično je asimptomatsko, opaža se unutar prvih 6 mjeseci liječenja, nestaje prekidom liječenja, ovisno je o primijenjenoj dozi te je učinak na povećanje transaminaza i bilirubina evidentan kod primjene visokih doza statina. Za razliku od

miotoksičnosti, povećanje transaminaza povezano je s boljim učinkom na snižavanje LDL kolesterola. Postavlja se pitanje ukazuje li učinak na transaminaze na hepatotoksičnost ili na neku vrstu jetrene reakcije posljedično smanjenju sinteze kolesterola. Ostali lijekovi za sniženje kolesterola, poput fibrata, smola (kolestiramina), niacina i ezetimiba, također dovode do povišenja jetrenih enzima, što sugerira da se ne radi nužno o hepatotoksičnosti (Turner i Pirmohamed, 2019; Armitage, 2007).

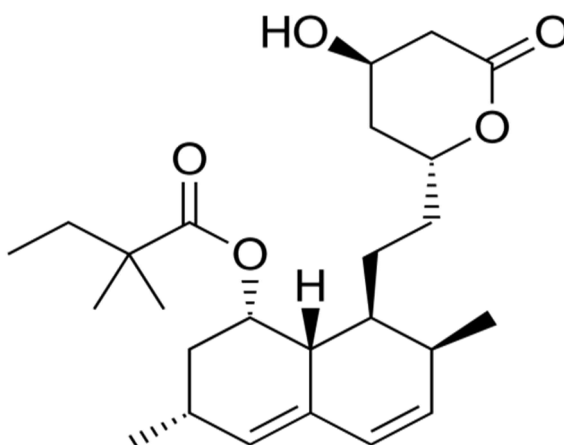
### **1.7. Farmakokinetika statina**

Iako svi statini imaju zajednički mehanizam djelovanja, oni se razlikuju u pogledu svoje kemijske strukture, farmakokinetičkih profila i djelotvornosti modificiranja razina lipida. Kemijska struktura statina određuje njihovu topljivost u vodi, što opet utječe na njihovu apsorpciju, distribuciju, metabolizam i eliminaciju, odnosno farmakokinetiku. Lovastatin, pravastatin i simvastatin derivati su gljivičnih metabolita te imaju vrijeme polueliminacije 1 - 3 h. Atorvastatin, cerivastatin (povučen iz kliničke upotrebe u 2001. godini), fluvastatin i rosuvastatin, u potpunosti su sintetski spojevi s vremenom polueliminacije od 1 h za fluvastatin, te sve do 19 h za rosuvastatin. Atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin i cerivastatin, relativno su lipofilni spojevi te su posljedično svojoj lipofilnosti osjetljiviji na metabolizam putem sustava citokroma P-450. Također, simvastatin i lovastatin, u obliku laktonskog prstena, lipofilniji su od statina koji se primjenjuju u obliku kiseline jer imaju prsten zatvoren esterifikacijom. Pravastatin i rosuvastatin relativno su hidrofilni spojevi te stoga nije značajan njihov metabolizam putem enzima citokroma P-450. Svi su statini selektivni za učinak u jetri, ponajviše zbog vrlo učinkovitog prvog prolaska kroz jetru; pasivna difuzija kroz membrane hepatocita primarno je odgovorna za unos lipofilnih statina u jetru, dok se unos hidrofilnih spojeva odvija putem aktivnog transporta posredovanog nosačem. Rosuvastatin i pravastatin pokazali su veću hepatoselektivnost u odnosu na lipofilne spojeve, kao i smanjen potencijal za unos od strane stanica perifernih tkiva, što može ukazati i na smanjeni potencijal uzrokovanja perifernih ADR-a. Bioraspoloživost statina uvelike se razlikuje, od 5 % za lovastatin i simvastatin, do 60 % ili više za cerivastatin. Klinička su ispitivanja pokazala da je rosuvastatin najefikasniji u sniženju LDL – kolesterola, a iza njega slijede atorvastatin i simvastatin. Kao skupina lijekova, statini

se općenito dobro podnose, a ozbiljni neželjeni događaji, poput miotoksičnosti koja dovodi do rabdomiolize, vrlo su rijetki. Stoga, promatranje razlika među statinima može pružiti racionalnu osnovu za njihovu upotrebu u kliničkoj praksi (Turner i Pirohamed, 2019; Hubacek i sur., 2008; Shitara i Sugiyama, 2006; Schachter, 2005; Garcia i sur., 2003; Prueksaritanont i sur., 2003; Reinoso i sur., 2002; Lennernäs i Fager, 1997).

### 1.7.1. Simvastatin

Simvastatin, (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksotetrahydro-2H-piran-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il 2,2-dimetilbutanoat, polusintetski je derivat metabolita gljivica. Strukturno je primarno u obliku inaktivnog laktonskog prstena, dok u *in vivo* uvjetima, pod djelovanjem karboksilesteraza u crijevnoj mukozi, krvnoj plazmi i jetri, hidrolizom prelazi u aktivan oblik kiseline. Za proteine plazme veže se u visokom postotoku (> 95 %). Također, apsorpcija mu je relativno visoka te iznosi od 60 do 85 %, dok vrijeme polueliminacije iznosi 2 - 5 h. Podložan je ekstenzivnom metabolizmu u crijevnoj mukozi i jetri te mu stoga bioraspodivnost iznosi svega 5 %. U aktivnom se kiselinom obliku dalje metabolizira pretežito putem CYP3A4 enzima, dok se eliminira većim dijelom hepatski putem žuči, a u manjoj mjeri renalno, svega oko 13 % (Prueksaritanont i sur., 2003; Lennernäs i Fager, 1997). Supstrat je i inhibitor OATP1B1 transportera (go.drugbank.com/drugs/DB00641).

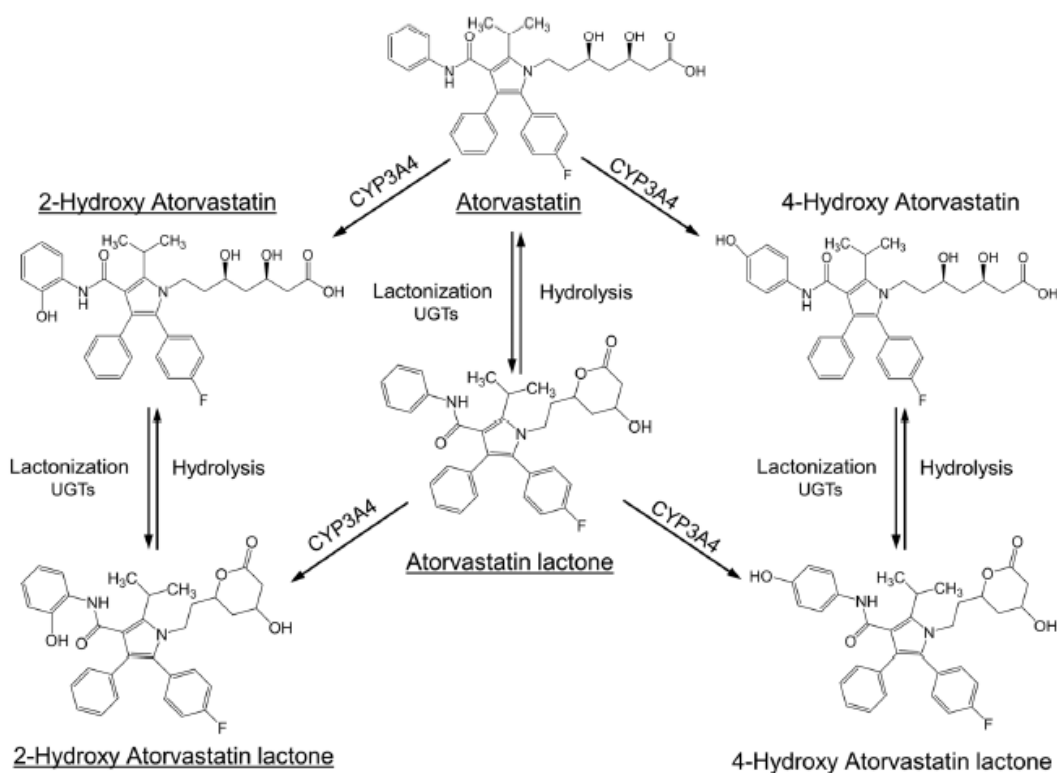


Slika 2. Kemijska struktura simvastatina ([www.medchemexpress.com/Simvastatin.html](http://www.medchemexpress.com/Simvastatin.html))

### 1.7.2. Atorvastatin

Atorvastatin je trenutno hipolipemik prve linije po preporuci smjernica za prevenciju primarne i sekundarne kardiovaskularne bolesti. Uglavnom se metabolizira u jetri putem sustava CYP-a, posebice putem CYP3A4 izoenzima. Stoga, ima visok potencijal za razvoj lijek-lijek interakcija posredovanih CYP-om, posebice s CYP3A4 inhibitorima. Utvrđeno je da je 50 % slučajeva rabdmiolize uzrokovanih statinima povezano upravo s istovremenom primjenom CYP3A4 inhibitora (Turner i sur., 2020; Marusic i sur., 2012; Bottorf, 2006; LaRosa i sur., 2005).

Atorvastatin, (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1Hpirol-1-il]-3,5-dihidroheptanoatna kiselina, daje se kao kalcijeva sol svoga aktivnoga oblika, odnosno slabe karboksilne kiseline. Hidrofilan je statin te se primijenjen oralno, brzo i potpuno apsorbira (> 98 %). Nakon apsorpcije podliježe ekstenzivnom metabolizmu u mukozi tankog crijeva te u jetri. Ukratko, atorvastatin se može podvrgnuti hidroksilaciji i/ili laktonizaciji, posredstvom CYP3A4 i uridin-5'-difosfo-glukuronoziltransferaze (UGT). Atorvastatin i njegovi kiselinski metaboliti, 4-hidroksi-atorvastatin te 2-hidroksi-atorvastatin, svi inhibiraju HMG-CoA reduktazu, kako bi snizili koncentracije LDL – kolesterola u krvnoj plazmi. Aktivnim je metabolitima svojstveno dugo vrijeme polueliminacije (9 – 32 h), što implicira da djelotvornost atorvastatina nije ovisna o vremenu primjene. Nasuprot tome, sva tri laktonska metabolita potpuno su inaktivna prema HMG-CoA-reduktazi, ali mogu podlijevati hidrolizi, što neenzimatski, što putem esteraza i paraoksonaza, do odgovarajućih kiselinskih oblika. Atorvastatin i njegovi metaboliti predominantno se izlučuju bilijarnim putem, a svega 1 – 2 % izlučuje se bubrezima (Turner i sur., 2020; Schiris i sur., 2015; Reidmaier i sur., 2011; Pasanen i sur., 2007; Lins i sur., 2003; Stern i sur., 1997; Gibson i sur., 1996). Supstrat je i inhibitor OATP1B1 transportera ([go.drugbank.com/drugs/DB01076](http://go.drugbank.com/drugs/DB01076)).

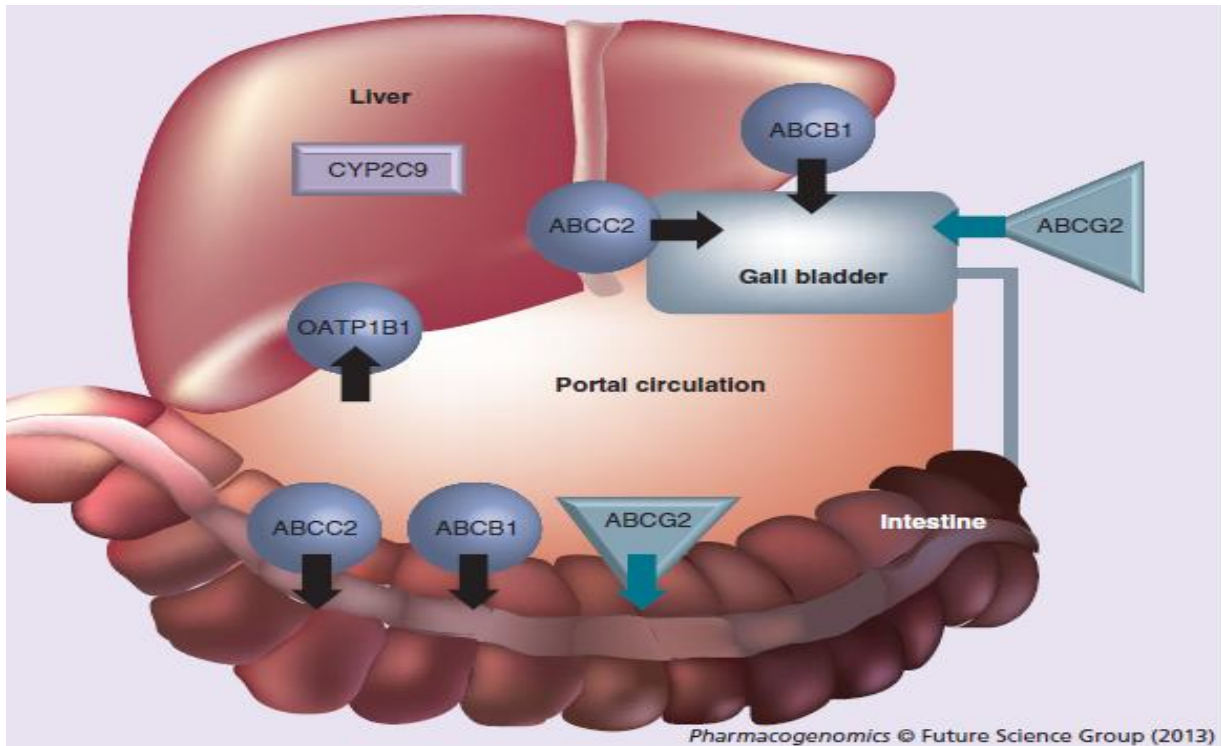


**Slika 3.** Biotransformacija atorvastatina (Turner i sur., 2020)

### 1.7.3. Fluvastatin

Fluvastatinatrij,  $[R^*,S^*-(E)]-(\pm)-7-[3-(4\text{-fluorofenil})-1-(1\text{-metiletil})-1H\text{-indol-2-il}]-3,5\text{-dihidroksi-6-heptenoatna}$  kiselina, prvi je u potpunosti sintetski inhibitor HMG-CoA-reduktaze odobren za kliničku upotrebu, opsežno proučavan na ljudima još od 1986. Po kemijskoj je strukturi slaba kiselina te je hidrofilnija molekula u usporedbi sa simvastatinom. Apsorpcija fluvastatina gotovo je potpuna kod svih vrsta (95 %), uključujući čovjeka, te su studije utjecaja hrane na farmakokinetiku pokazale značajno smanjenje apsorpcije i biorasploživosti pri istodobnoj primjeni s hranom. Nakon apsorpcije, fluvastatin je podložan ekstenzivnoj presistenskoj eliminaciji, odnosno procesu prvoga prolaska kroz jetru, te mu je stoga biorasploživost niska i izrazito varijabilna, a vrijeme polueliminacije lijeka iznosi oko 30 min. U jetri se fluvastatin metabolizira u dva hidroksilna metabolita i N-deizopropil metabolit te se u najvećoj mjeri biotransformira putem enzima CYP2C9, a u manjoj mjeri i putem CYP3A4 i CYP2C8. Otprilike se 95 % od početne doze lijeka izlučuje putem žuči, pri

čemu je prisutno samo oko 2 % početnog spoja (Jokubaitis, 1996; Scripture i Pieper, 2001; Fischer i sur., 1999; Herd i sur., 1997; Transon i sur., 1996). Supstrat je i inhibitor OATP1B1 transportera (go.drugbank.com/drugs/DB01095).

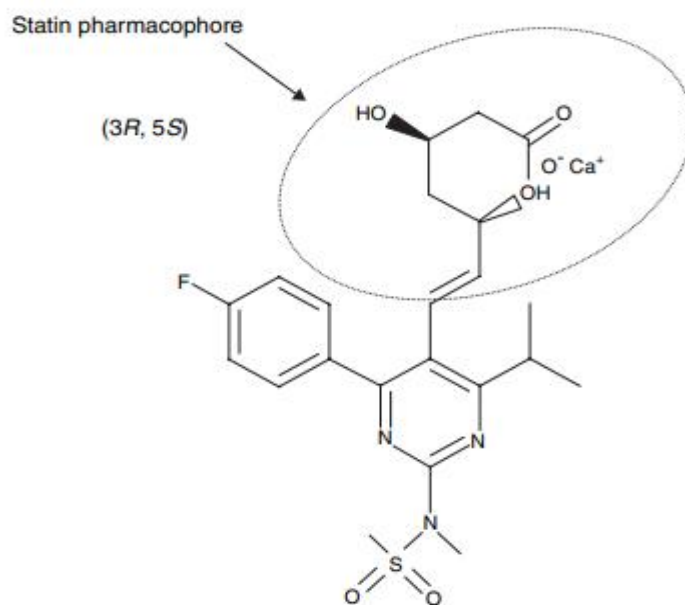


**Slika 4.** Farmakokinetika fluvastatina (Mirosevic Skvrce i sur., 2013)

Uzimajući u obzir prethodno navedeno, ne očekuju se farmakokinetičke interakcije fluvastatina s inhibitorima i supstratima CYP3A4 enzima. Iz tog se razloga fluvastatin najčešće propisuje pacijentima s transplantiranim organima, kako bi se izbjegla interakcija s imunosupresivima, prvenstveno ciklosporinom, koji se koriste kao dio posttransplantacijske imunosupresivne farmakoterapije. Fluvastatin je dijelom supstrat i inhibitor CYP3A4 enzima pa lako ulazi u interakcije s drugim statinima koji se prvenstveno metaboliziraju putem CYP3A4 enzima (Mirosevic Skvrce, 2014; Holdaas i sur., 2006; Launey-Vacher i sur., 2005; Asberg, 2003; Jardine i Holdaas, 1999; Li i sur., 1995). Kod pacijenata sa smanjenom aktivnosti enzima CYP2C9 mogu doći do izražaja interakcije s CYP3A4 supstratima/inhibitorima. Također, postoje i zabilježeni pojedinačni slučajevi ADR-a uzrokovanih upravo interakcijama fluvastatina i CYP3A4 inhibitora/supstrata (Mukai i sur., 2017; Mirosevic Skvrce, 2014; Williams i Feely, 2002).

#### 1.7.4. Rosuvastatin

Rosuvastatin (bis [(E) -7- [4- (4-fluorofenil) -6-izopropil-2-[metil (metilsulfonil) amino] pirimidin-5-il] (3R, 5S) -3,5-dihidroksihepta-6-enoična kiselina] kalcijeva sol) je sintetski spoj koji se sastoji od jednog enantiomera, a formuliran je i aplicira se kao kalcijeva sol aktivne karboksilne kiseline. Kao i svi ostali statini, rosuvastatin sadrži farmakofor tipičan za sve statine, te je trenutno jedini statin na tržištu koji sadrži polarnu metil sulfonamidnu skupinu. Kristalografija rendgenskim zrakama pokazala je da rosuvastatin ulazi u interakciju s HMG-CoA-reduktazom ionskim i polarnim interakcijama, sterički sprječavajući vezanje nativnog supstrata za aktivno mjesto (Crouse, 2008).



Slika 5. Kemijska struktura rosuvastatina (Crouse, 2008)

Rosuvastatin se apsorbira brzo i u potpunosti nakon oralne primjene, a maksimalnu koncentraciju ( $C_{max}$ ) u krvnoj plazmi dostigne za 3 – 5 h nakon oralne primjene. U skladu s dugim vremenom polueliminacije (~ 19 h), farmakokinetika rosuvastatina ne ovisi o vremenu primjene tijekom dana. Bioraspoloživost iznosi svega ~ 20 %, a hepatički ekstrakcijski omjer jest 0,63, što implicira ekstenzivan presistemskei metabolizam prvog prolaska kroz jetru. Rosuvastatin se veže za proteine plazme u visokom postotku (~ 88 %), prvenstveno za albumin, te je posljedično sistemska izloženost nevezanoj, aktivnoj frakciji lijeka puno manja.



Također, zbog hidrofilnosti rosuvastatina, hepatski „uptake“ posredovan je s više transportera, uključujući i transportere iz OATP porodice. Slijedom toga, ekspresija enzima i polimorfizmi mogu imati utjecaj na varijabilnost u odgovoru na farmakoterapiju rosuvastatinom. 90 % unesenog lijeka izlučuje se nepromijenjeno bilijarnim i renalnim putem, dok glavni metabolit, N-desmetil rosuvastatin nastaje primarno metabolizmom putem CYP2C9 enzima. Metabolizam putem CYP2C19 enzima je limitiran, dok CYP2C8 i CYP3A4 nisu uključeni u metabolizam rosuvastatina (Crouse, 2008; Bergman i sur., 2006; Lee i sur., 2005; Martin i sur., 2003; Martin i sur., 2002; Brown i sur., 2001). Supstrat je i inhibitor OATP1B1 transportera. Također, supstrat je BCRP/ABCG2 (go.drugbank.com/drugs/DB01098).

### **1.8. Utjecaj polimorfizma OATP1B1 na metabolizam statina**




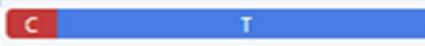

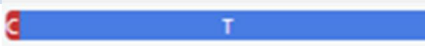


Organski anionski transportni polipeptid 1B1, OATP1B1 (kodiran genom *SLCO1B1*), nalazi se na sinusoidnoj membrani (okrenutoj krvi) hepatocita i odgovoran je za unos u jetru uglavnom slabo kiselih lijekova i endogenih spojeva, npr. statina, metotreksata, rifampicina, aktivnog metabolita irinotekana SN-38 te bilirubina i leukotriena c4. U ovom transporteru identificirano je više od 40 nesinonimnih varijanti (nsSNP), od kojih neke rezultiraju smanjenom transportnom funkcijom. Za dva je polimorfizma gena *SLCO1B1* 388A>G (p.Asn130Asp; rs2306283) i 521T>C (p.Val174Ala; rs4149056) pokazano kako mogu mijenjati prijenosni kapacitet OATP1B1. Njihov učinak na aktivnost OATP1B1 ovisi o međusobnoj kombinaciji u haplotipovima. U slučaju prisutnosti polimorfizma 388A>G bez prisustva polimorfizma 521T>C, haplotip se označava *SLCO1B1\*1B* i povezan je s povećanom aktivnosti prijenosnika OATP1B1 te posljedično smanjenom koncentracijom njegovih supstrata u plazmi. Varijanta 521T>C smanjuje prijenosni kapacitet OATP1B1 i posljedično dolazi do povećanih koncentracija njegovih supstrata u plazmi, u oba haplotipa *SLCO1B1\*5* (prisutan samo c.521T>C) i *SLCO1B1\*15* (c.521T>C prisutan zajedno s c.388A>G). Pokazalo se da uobičajeni polimorfizam smanjene funkcije, rs4149056, smanjuje transport supstrata OATP1B1 *in vitro*, kao i da mijenja farmakokinetičke i kliničke ishode *in vivo*. Varijanta, tj. polimorfizam, rezultira promjenom aminokiselina u slijedu, Val174Ala, i povezana je sa smanjenom ekspresijom transportera na membrani, s posljedično smanjenim

transportnim kapacitetom. Alel \*5 relativno je rijedak (rs4149056 sam; ~ 1 %), ali razni drugi aleli smanjene funkcije (\*5 i \*17; haplotipovi koji sadrže rs4149056) česti su u većini europskih i azijskih populacija (između 5 % i 15 %). Nadalje, česta varijanta rs4149056 u OATP1B1 povećava sistemsku izloženost simvastatinu (221 % povećanje površine ispod krivulje u plazmi za bolesnike homozigote za varijantu rs4149056, npr. *SLCO1B1* \*5/\*5; \*5/\*15 ili \*17 ili [\*15 ili \*17] / [\*15 ili \*17]) i u GWA analizi ustanovljeno je da ima najjaču povezanost s miopatijom induciranom primjenom simvastatina. Za pojedince sa smanjenom funkcijom OATP1B1 (imaju barem jedan nefunkcionalni alel), koji primaju simvastatin, CPIC preporučuje nižu dozu simvastatina ili drugi statin. Osim toga, smjernice preporučuju i upotrebu alternativnog statina, poput rosuvastatina ili pravastatina, na koje manje utječe *SLCO1B1* polimorfizam (Hirota i sur., 2020; Turner i sur., 2020; Katzung i sur., 2018; Hirota i Ieiri, 2015; Hagenbuch i Meier, 2004; Hagenbuch i Meier, 2003; Nishizato i sur., 2003; Tirona i sur., 2001; König i sur., 2000).


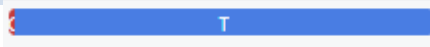

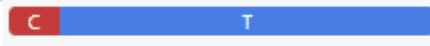

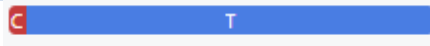
**Tablica 1.** Učinak *SLCO1B1* c.521T>C na farmakokinetiku statina. Svi statini su supstrati OATP1B1, međutim, učinak *SLCO1B1* polimorfizama na pojedine statine se razlikuje (Wilke i sur., 2012).

| STATIN       | POVEĆANJE AUC U<br><i>SLCO1B1</i> 521 C/C U USPOREDBI S 521 T/T |
|--------------|---|
| simvastatin  | 221 %   |
| pitavastatin | 173 %   |
| atorvastatin | 144 %   |
| pravastatin  | 90 %  |
| rosuvastatin | 87 %  |
| fluvastatin  | 30 %  |

**Tablica 2.** Frekvencija alela *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056) među rasama, prema Allele Frequency Aggregator (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/)

| POPULACIJA         | UZORAK | ALEL C (%) | ALEL T (%) | RASPODJELA ALELA  |
|--------------------|--------|------------|------------|---|
| ukupno             | 304594 | 14,95      | 85,05      |  |
| Europljani         | 251826 | 15,86      | 84,14      |  |
| Latinoamerikanci 1 | 1336   | 13,55      | 86,45      |  |
| Latinoamerikanci 2 | 9048   | 12,27      | 87,73      |  |
| Južnoazijati       | 5054   | 4,77       | 95,23      |  |
| Afrikanci          | 11554  | 3,60       | 96,40      |  |
| Azijati            | 3846   | 11,99      | 88,01      |  |
| drugi              | 21930  | 14,58      | 85,42      |  |

**Tablica 3.** Frekvencija alela *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056) među rasama, prema 1000 Genomes projektu, faza III (grch37.ensembl.org/Homo\_sapiens/Info/Index)

| POPULACIJA   | UZORAK | ALEL C (%) | ALEL T (%) | RASPODJELA ALELA  |
|--------------|--------|------------|------------|---|
| ukupno       | 5008   | 8,77       | 91,23      |  |
| Afrikanci    | 1322   | 1,36       | 98,64      |  |
| Amerikanci   | 694    | 13,40      | 86,60      |  |
| Azijati      | 1008   | 12,30      | 87,70      |  |
| Europljani   | 1006   | 16,10      | 83,90      |  |
| Južnoazijati | 978    | 4,29       | 95,71      |  |

## 1.9. PharmGKB – kliničke smjernice za simvastatin i atorvastatin

Kliničke smjernice daju upute na koji način prilagoditi primjenu lijeka s obzirom na genetički kod osobe koja lijek primjenjuje. PharmGKB objavljuje i sistematizira smjernice koje pripremaju Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC), Nizozemska farmakogenetička radna skupina (DPWG), Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnu primjenu lijekova (CPNDS) te ostale radne skupine i stručne organizacije ([www.pharmgkb.org/about](http://www.pharmgkb.org/about); Krivokapić, 2019).

**Tablica 4.** CPIC kliničke smjernice za doziranje simvastatina  
([www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166105005](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166105005))

| FENOTIP  | <i>SLCO1B1</i><br>GENOTIP<br>(rs4149056) | IMPLIKACIJE<br>ZA<br>SIMVASTATIN      | PREPORUKE<br>DOZIRANJA ZA<br>SIMVASTATIN   |
|--|--|---------------------------------------|--|
| normalna funkcija,<br>homozigot<br>wt (2 funkcionalna alela)                                   | T/T                                      | normalan rizik za<br>razvoj miopatije | Propisati željenu<br>početnu dozu<br>simvastatina te<br>prilagođavati dozu<br>koristeći <i>disease-<br/>specific</i> smjernice<br>(smjernice za kroničnu<br>bolest). |
| umjereno normalna<br>funkcija, heterozigot (1<br>funkcionalan alel, 1<br>disfunkcionalan alel) | T/C                                      | umjeren rizik za<br>razvoj miopatije  | Propisati nižu dozu<br>simvastatina ili<br>propisati alternativni<br>statin (npr. pravastatin<br>ili rosuvastatin). Pratiti<br>CK.                                   |
| niska funkcija,<br>homozigot mut (2<br>disfunkcionalna alela)                                  | C/C                                      | visok rizik za<br>razvoj miopatije    | Propisati nižu dozu<br>simvastatina ili<br>propisati alternativni<br>statin (npr. pravastatin<br>ili rosuvastatin). Pratiti<br>CK.                                   |

**Tablica 5.** DPWG kliničke smjernice za doziranje simvastatina  
([www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182844](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182844))

|                              |   |   |
|------------------------------|---|---|
| <b><i>SLCO1B1 521C/C</i></b> | <p>Kada se koristi simvastatin u dozi od 80 mg/dan, rizik od miopatije povećava se 30 puta na 18 %, a rizik od teške miopatije 40 puta na 12 %. Ukoliko se koristi 40 mg simvastatina dnevno, ovaj se rizik povećava 7 puta na 1 %, odnosno 11 puta na 0,68 %. Varijacija gena dovodi do smanjenog transporta simvastatina u jetru, što povećava koncentraciju simvastatina u krvnoj plazmi, a time i rizik od razvoja ADR-a.</p> | <p>Preporuča se izabrati alternativni statin. Na atorvastatin manje utječe varijacija gena <i>SLCO1B1</i>, ali na njega utječu i inhibitori CYP3A4 kao što su amiodaron, verapamil i diltiazem. Primjena atorvastatina ne preporučuje se pacijentima s dodatnim čimbenicima rizika razvoja miopatije izazvane statinima.</p> <p>Varijacija gena <i>SLCO1B1</i> u manjoj je mjeri pod utjecajem rosuvastatina i pravastatina. Na njih također ne utječu inhibitori CYP3A4 kao što su amiodaron, verapamil i diltiazem.</p> <p>Varijacija gena <i>SLCO1B1</i> ili inhibitori CYP3A4 nemaju značajan utjecaj na fluvastatin.</p> |
| <b><i>SLCO1B1 521T/C</i></b> | <p>Kada se koristi simvastatin 80 mg/dan, rizik od miopatije povećava se 5 puta na 3 % za umjereno tešku do tešku miopatiju i 1,3 % za tešku miopatiju. Kada se koristi 40 mg/dan, ovaj se rizik povećava 2,6 puta na 0,39 %, odnosno 0,17 %. Varijacija gena može dovesti do smanjenog transporta simvastatina u jetru, što može povećati koncentraciju simvastatina u plazmi, a time i rizik od nuspojava.</p>                  | <p>Preporuča se izabrati alternativni statin.</p> <p>Ukoliko alternativa nije opcija, izbjegavati dnevne doze simvastatina više od 40 mg/dan.</p>   |

**Tablica 6.** DPWG kliničke smjernice za doziranje atorvastatina  
([www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182843](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182843))

|  |  |   |
|--|--|---|
| <p><b><i>SLCO1B1</i></b><br/><b>521C/C</b></p> | <p>Rizik od razvoja miopatije može se povećati. Varijacija gena može dovesti do smanjenog transporta atorvastatina u jetru, što može povećati koncentraciju atorvastatina u plazmi.</p>  | <p>Ukoliko pacijent ima dodatne čimbenike rizika za razvoj statinima inducirane miopatije: 1. Izaberite alternativan statin (osim simvastatina). Na rosuvastatin i pravastatin utječu u sličnoj mjeri polimorfizmi <i>SLCO1B1</i>, ali na njih ne utječu inhibitori CYP3A4 poput amiodarona, verapamila i diltiazema. Varijacija gena <i>SLCO1B1</i> ili inhibitori CYP3A4 ne utječu značajno na fluvastatin. 2. Ukoliko alternativa nije moguća, savjetovati pacijentu da se javi liječniku u slučaju mišićnih ADR. Ako pacijent nema dodatnih rizičnih čimbenika za razvoj statinima inducirane miopatije, savjetovati pacijentu da se javi liječniku u slučaju mišićnih ADR.</p> |
| <p><b><i>SLCO1B1</i></b><br/><b>521T/C</b></p> | <p>Rizik od razvoja miopatije može biti povišen. Varijacija gena može dovesti do smanjenog transporta atorvastatina u jetru, što može povećati koncentraciju atorvastatina u plazmi.</p> | <p>Ukoliko pacijent ima dodatne čimbenike rizika za razvoj statinima inducirane miopatije: 1. Izaberite alternativan statin (osim simvastatina). Na rosuvastatin i pravastatin utječu u sličnoj mjeri polimorfizmi <i>SLCO1B1</i>, ali na njih ne utječu inhibitori CYP3A4 poput amiodarona, verapamila i diltiazema. Varijacija gena <i>SLCO1B1</i> ili inhibitori CYP3A4 ne utječu značajno na fluvastatin. 2. Ukoliko alternativa nije moguća, savjetovati pacijentu da se javi liječniku u slučaju mišićnih ADR. Ako pacijent nema dodatnih rizičnih čimbenika za razvoj statinima inducirane miopatije, savjetovati pacijentu da se javi liječniku u slučaju mišićnih ADR.</p> |

### 1.10. OATP1B1 – supstrati, inhibitori i interakcije

OATP1B1 transporter uglavnom je eksprimiran na sinusoidnoj membrani humanih hepatocita, iako je *SLCO1B1* mRNA detektirana i u drugim tkivima, poput enterocita tankoga crijeva. Generalno su mu supstrati anionske amfipatske molekule, relativno velike molekulske mase (> 350) te visokog stupnja vezanja za albumin u fiziološkim uvjetima. *In vitro* se pokazalo da OATP1B1 transportira konjugirani i nekonjugirani bilirubin, a ostalim endogenim supstratima OATP1B1 pripadaju i žučne kiseline (kolat i taurokolat), konjugirani steroidi (estradiol-17 $\beta$ -glukuronid, estron-3-sulfat), eikozanoidi (leukotrien C4 i E4, prostaglandin E2, tromboksan B2) te tiroidni hormoni (tiroksin i trijodtironin). Primjeri *in vitro* OATP1B1 egzogenih supstrata lijekova uključuju nekoliko HMG–CoA reduktaza inhibitora, ACE inhibitore, angiotenzin II receptor antagoniste, antiinfektivne lijekove i citostatike (Tablica 7.) (Niemi i sur., 2011; Kalliokoski i Niemi, 2009).

**Tablica 7.** Lijekovi supstrati OATP1B1 (preuzeto i prilagođeno prema Niemi i sur., 2011)

|  |  |
|--|--|
| ANTIBAKTERIJSKI<br>LIJEKOVI            | benzilpenicilin<br>cefditoren<br>cefazolin<br>nafcilin<br>rifampicin               |
| ANTINEOPLASTICI                        | SN-38 (aktivni metabolit irinotekana)<br>gimatekan<br>pazopanib                    |
| ANTILIPIDEMICI                         | atorvastatin<br>cerivastatin<br>ezetimib glukuronid<br>pravastatin<br>rosuvastatin |
| LIJEKOVI S DJELOVANJEM<br>NA KV SUSTAV | bosentan<br>enalapril<br>valsartan<br>torasemid                                    |
| INHIBITORI HIV<br>PROTEAZE             | darunavir<br>lopinavir<br>sakvinavir   |
| OSTALI                                 | kaspofungin<br>feksofenadin<br>metotreksat<br>sirolimus                            |

Mnogi su lijekovi identificirani kao OATP1B1 *in vitro* inhibitori (Tablica 8.). Štoviše, upravo je OATP1B1 inhibicija jedan od važnih mehanizama *in vivo* lijek-lijek interakcija (DDI). Za ciklosporin je dokazano da višestruko povećava plazmatske koncentracije atorvastatina vjerojatno zbog OATP1B1 inhibicije. Također, ciklosporin povećava AUC (oko 2 puta) i ostalih OATP1B1 supstrata, poput bosentana, kaspofungina i metotreksata. Osim ciklosporina, gemfibrozil značajno povećava plazmatske koncentracije statina, poput atorvastatina i cerivastatina, zbog OATP1B1 inhibicije (Gessner i sur., 2019; Tamraz i sur., 2013; Hua i sur., 2012; Niemi i sur., 2011; Shitara, 2011; Kalliokoski i Niemi, 2009; Treiber i sur., 2006).

**Tablica 8.** OATP1B1 inhibitori (preuzeto i prilagođeno prema Kalliokoski i Niemi, 2009)

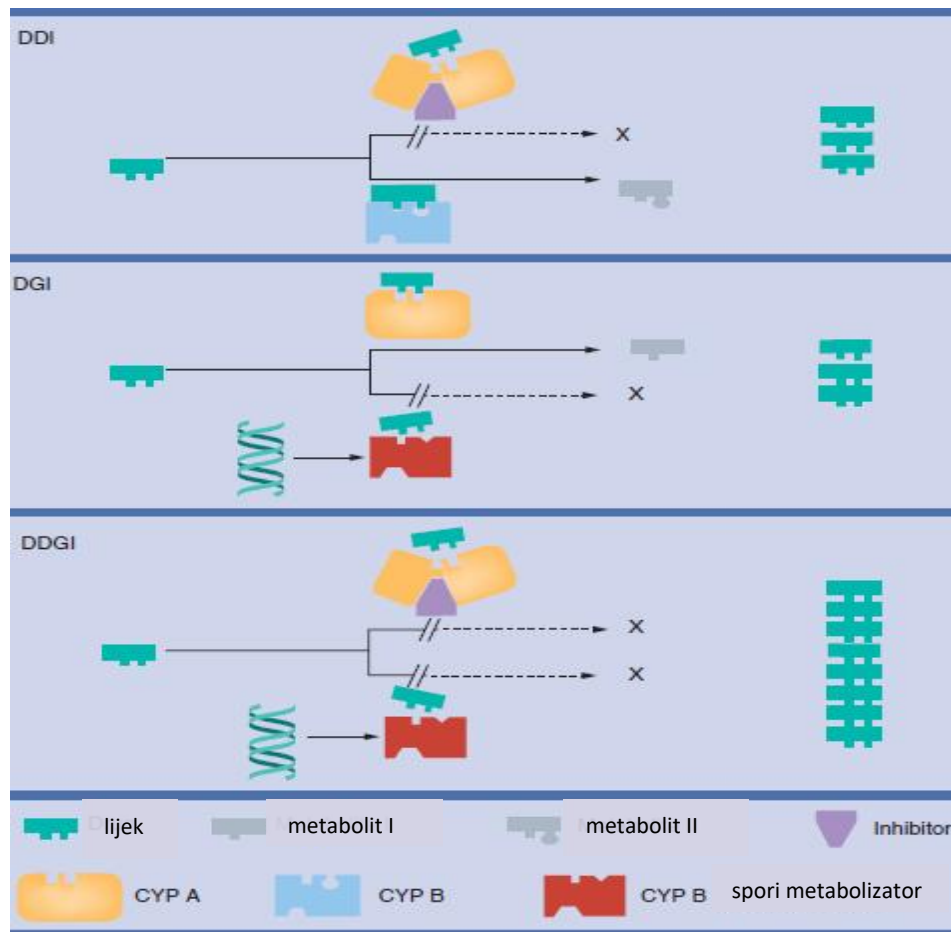
|              |              |               |              |
|--------------|--------------|---------------|--------------|
| atazanavir   | atorvastatin | beklometazon  | bromokriptin |
| karbamazepin | kaspofungin  | klaritromicin | klotrimazol  |
| ciklosporin  | digoksin     | eltrombopag   | eritromicin  |
| estradiol    | fenofibrat   | gemfibrozil   | irinotekan   |
| ketokonazol  | lopinavir    | mifepriston   | paklitaksel  |
| pantoprazol  | pazopanib    | fenitoin      | pioglitazon  |
| ramipril     | repaglinid   | rifampicin    | sakvinavir   |
| simvastatin  | sildenafil   | sirolimus     | telitromicin |
| SN-38        | tiroksin     | valsartan     | verapamil    |

Proces eliminacije bosentana (endotelin receptor antagonist) kod ljudi, u potpunosti je ovisan o metabolizmu putem CYP3A4 i CYP2C9 izoenzima. Stoga, većina se interakcija s istodobno primijenjenim lijekovima može racionalizirati u smislu CYP450 inhibicije. Međutim, povišene koncentracije bosentana prilikom istodobne primjene s ciklosporinom, rifampicinom i/ili sildenafilom inkompatibilne su s ovom paradigmom. Štoviše, zaključeno je da ključ mehanizma ove interakcije leži upravo u inhibiciji hepatičkog unosa bosentana, putem OATP1B1 inhibicije prethodno spomenutim ksenobioticima (Treiber i sur., 2006).

Lijek-lijek-gen interakcije (DDGI) predstavljaju noviji tip interakcija, izvedenih iz DDI i DGI. DDGI se može pojaviti kada pacijent koristi lijek koji se metabolizira putem dva metabolička puta, a istovremeno u komedikaciji uzima lijek koji je inhibitor ili induktor jednog od ta dva metabolička puta, dok njegova genetika utječe na drugi metabolički put.



Opseg takve DDGI biti će ovisan o udjelu supstrata koji se metabolizira putem oba metabolička puta (Verbeurgt i sur., 2014). Upravo je veliki broj DDGI opisan za OATP1B1 transporter. Primjerice, iako porast AUC pravastatina (OATP1B1 supstrat) nakon liječenja ritonaviro (OATP1B1 inhibitor) nije bio od statističkog značaja (porast od 21 % u AUC pravastatina), uočena je značajna interakcija u pacijenata nositelja haplotipova *SLCO1B1*\*15 ili \*17, s povišenjem AUC pravastatina za čak 113 % (Malki i Pearson, 2020).



**Slika 6.** Grafički prikaz primjera DDI, DGI i DDGI. DDI: metabolizam je lijeka inhibiran u CYP A metaboličkom putu komedikacijom koja djeluje kao CYP A inhibitor, što rezultira povećanom koncentracijom lijeka. DGI: metabolizam je inhibiran u CYP B metaboličkom putu genetičkim čimbenicima (fenotip CYP B sporog metabolizatora), što rezultira povećanom izloženosti lijeku. DDGI: metabolizam je inhibiran u oba metabolička puta, inhibicijskom komedikacijom i genetičkim čimbenicima – rezultat je povećana izloženost lijeku (preuzeto i prilagođeno prema Malki i Pearson, 2020).

### 1.11. Utjecaj polimorfizma BCRP na metabolizam statina

Protein rezistencije raka dojke (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*, BCRP) (kodiran genom *ABCG2*), prijenosnik izbacivač iz superporodice transportera ovisnih o ATP-u (engl. *ATP Binding Cassette*, ABC transporteri), nalazi se na apikalnim membranama epitelnih stanica bubrega, jetre i crijeva, kao i na endotelnim stanicama krvno-moždane barijere. BCRP može smanjiti intestinalnu apsorpciju i prijenos u tkiva te povećati izlučivanje svojih supstrata u jetri i bubrezima. Nedavna ispitivanja istaknula su varijantu smanjene funkcije gena *ABCG2* (c.421C>A SNP), koja kodira promjenu aminokiseline glutamina u lizin na položaju 141 proteina, p.Gln141Lys (rs2231142), kao determinantu farmakokinetike, učinkovitosti i toksičnosti nekoliko lijekova. Takva varijanta rezultira povećanim koncentracijama supstrata unutar hepatocita i miocita (Hirota i sur., 2020; Katzung i sur., 2018; Horsey i sur., 2016; Hirota i Ieiri, 2015; Mirosevic Skvrce i sur., 2015; Mirosevic Skvrce i sur., 2013).

Učestalost polimorfizma 421C>A u bjelačkoj populaciji jest 10 - 15 % (Robey, 2009). Površina pod krivuljom inaktivnog laktona simvastatina bila je za 111 % veća, a fluvastatina i atorvastatina za 72 % veća u ispitanika s genotipom *ABCG2* 421A/A u odnosu na koncentracije zabilježene u nositelja genotipa 421C/C (Hofman i sur., 2019). Ovo je povećanje najvjerojatnije posljedica povećane bioraspodivnosti oralno primjenjenog lijeka zbog smanjenje funkcije efluksnog prijenosnika BCRP povezane s genotipom 421A/A. Moguća je posljedica opaženih promjena u farmakokinetici povećani rizik za nastanak miotoksičnosti kod pojedinaca koji uzimaju atorvastatin i fluvastatin, dok je utjecaj na ADR simvastatina na osnovu farmakokinetičkih podataka teže predvidjeti (Hofman i sur., 2019; Mirosevic Skvrce, 2014; Keskitalo, Pasanen i sur., 2009; Keskitalo, Zolk i sur., 2009). Varijanta ima nisku učestalost u pojedinaca afričkog podrijetla, ali je ustanovljena učestalost od oko 30 % u populacija u Istočnoj Aziji, uključujući Kineze i Japance (Hirota i sur., 2020). Prije svega, varijanta je bila povezana s promjenama u odgovoru na inhibitor ksantin oksidaze alopurinol i statine rosuvastatin i fluvastatin. Osim toga, varijanta je povezana sa štetnim učincima različitih lijekova protiv raka. Zbog visoke učestalosti alela, osobito u azijskim populacijama, i činjenice da je transporter odrednica farmakokinetike mnogih lijekova, vrlo je

vjerojatno da će ova varijanta biti sve važnija u personaliziranoj medicini (Hirota i sur., 2020; Katzung i sur., 2018; Hirota i Ieiri, 2015; Mirosevic Skvrce i sur., 2015).

**Tablica 9.** Frekvencija alela *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) među rasama, prema Allele Frequency Aggregator ([www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/))

| POPULACIJA         | UZORAK | ALEL C (%) | ALEL A (%) |
|--------------------|--------|------------|------------|
| ukupno             | 246394 | 89,82      | 10,18      |
| Europljani         | 211802 | 89,74      | 10,26      |
| Latinoamerikanci 1 | 890    | 91,91      | 8,09       |
| Latinoamerikanci 2 | 1426   | 89,13      | 10,87      |
| Južnoazijati       | 5144   | 92,13      | 7,87       |
| Afrikanci          | 9120   | 97,45      | 2,55       |
| Azijati            | 3444   | 70,33      | 29,67      |
| drugi              | 14568  | 89,93      | 10,07      |

**Tablica 10.** Frekvencija alela *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) među rasama, prema 1000 Genomes projektu, faza III ([grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index))

| POPULACIJA   | UZORAK | ALEL C (%) | ALEL T (%) |
|--------------|--------|------------|------------|
| ukupno       | 5008   | 88,06      | 11,24      |
| Afrikanci    | 1322   | 98,71      | 1,29       |
| Amerikanci   | 694    | 85,88      | 14,12      |
| Azijati      | 1008   | 70,93      | 29,07      |
| Europljani   | 1006   | 90,56      | 9,44       |
| Južnoazijati | 978    | 90,29      | 9,71       |

## 1.12. BCRP – supstrati, inhibitori i interakcije

U ljudi se BCRP izražava u širokom rasponu različitih tkiva. Lokaliziran je na apikalnoj membrani svake od četiriju osnovnih fizioloških barijera, koje su od farmakološkog značaja: enterocita, hepatocita, proksimalnih stanica bubrežnih tubula i endotelne stanice krvno–moždane barijere. Nadalje, BCRP ima puno važnih fizioloških supstrata, uključujući urat, estron-3-sulfat i dehidroepiandrosteron-sulfat. Štoviše, upravo se BCRP smatra glavnim čimbenikom renalne i ekstrarenalne sekrecije urata te se stoga smatra da aktivnost BCRP štiti od razvoja gihta. Također, smatra se da je estron-3-sulfat, koji je BCRP supstrat, glavni izvor estradiola kod žena u postmenopauzi, a uz to igra glavnu ulogu u patofiziologiji hormonski ovisnog raka dojke. BCRP također transportira različite lijekove. U početku se smatralo da BCRP supstratima pripada široki niz citostatika, poput mitoksantrona, derivata kamptotecina, flavopiridola, irinotekana i metotreksata. Što je najznačajnije, nekoliko TKI (imatinib, gefitinib i nilotinib) su BCRP supstrati. Međutim, BCRP supstrati nisu ograničeni samo na kemoterapeutike, nego su supstrati i lijekovi iz drugih skupina, poput prazosina, cimetidina, sulfasalazina, rosuvastatina, apiksabana, rivaroksabana, ezetimiba, fibrata, 5-fluorouracila, itd. Nadalje, raznovrsni su fotosenzibilizatori, uključujući protoporfirin IX i srodne spojeve, također BCRP supstrati, što sugerira da je BCRP mogući uzrok stanične rezistencije na fototerapiju (Safar i sur., 2019; Toyoda i sur., 2019; Mao i Unadkat, 2015).

**Tablica 11.** BCRP supstrati (preuzeto i prilagođeno prema Mao i Unadkat, 2015)

|                       |              |                |
|-----------------------|--------------|----------------|
| ANTRACENI             | mitoksantron |                |
|                       | bisantren    |                |
| DERIVATI KAMPTOTECINA | topotekan    |                |
|                       | SN-38        |                |
| ANALOZI NUKLEOZIDA    | AZT          |                |
|                       | lamivudin    |                |
|                       | metotreksat  | cimetidin      |
|                       | prazosin     | sulfasalazin   |
|                       | flavopiridol | nitrofurantoin |
|                       | imatinib     | ezetimib       |
|                       | gefitinib    | rosuvastatin   |
| OSTALI                | nilotinib    | pantoprazol    |
|                       | eltrombopag  | apiksaban      |
|                       | fibrati      | rivaroksaban   |
|                       | dolutegravir | ciklosporin    |
|                       | dantrolen    | daidzein       |

Identificiran je veliki broj BCRP inhibitora različitih kemijskih struktura. Neki od njih navedeni su u Tablici 12. Prije svega, različiti inhibitori HIV proteaze, poput ritonavira, sakvinavira i nelfinavira, učinkoviti su BCRP inhibitori. Također, TKI i inhibitori drugih vrsta kinaza, poput serin/treonin Polo kinaza 1 inhibitora BI2536, koji je dualni P-gp/BCRP inhibitor. Ostali značajni BCRP inhibitori jesu novobiocin, tamoksifen, rezerpin, febuksostat, rolapitant, ciklosporin, fumitremorgin-C te flavonoidi, poput krizina (Safar i sur., 2019; Toyoda i sur., 2019; Mao i Unadkat, 2015).

**Tablica 12.** BCRP inhibitori (preuzeto i prilagođeno prema Mao i Unadkat, 2015)

|                             |               |             |
|-----------------------------|---------------|-------------|
|                             | gefitinib     | nilotinib   |
| TKI                         | erlotinib     | lapatinib   |
| INHIBITORI HIV PROTEAZE     | ritonavir     | nelfinavir  |
|                             | sakvinavir    | lopinavir   |
| BLOKATORI KALCIJEVIH KANALA | dipiridamol   | nimodipin   |
|                             | nikardipin    | nitrendipin |
| AZOLNI ANTIMIKOTICI         | ketokonazol   | flukonazol  |
|                             | itrakonazol   |             |
| IMUNOSUPRESIVI              | ciklosporin A | sirolimus   |
|                             | takrolimus    |             |
| OSTALI                      | novobiocin    | rezerpin    |
|                             | tamoksifen    | pantoprazol |

Zbog svoje iznimne važnosti u dispoziciji lijekova, FDA je prepoznala BCRP kao jednog od ključnih transportera uključenih u klinički značajne DDI. Naime, istodobna primjena BI2536 i topotekana, značajno povećava oralnu bioraspodjivost topotekana. Također, nedavno je dokazano kako nekoliko BCRP supstrata lijekova značajno interagiraju s drugim lijekovima inhibitorima BCRP, što implicira da BCRP može imati ključnu ulogu u takvoj vrsti DDI, koje uključuju interakcije između atorvastatina/rosuvastatina i ritonavira, rosuvastatina i ciklosporina, rosuvastatina i eltrombopaga, metotreksata i IPP, poput omeprazola i pantoprazola, itd. (Mao i Unadkat, 2015).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Dva najvažnija polimorfna transportera, povezana s razvojem nuspojava vezanih uz statine, jesu organski anionski transportni polipeptid 1B1 (OATP1B1), kodiran genom *SLCO1B1*, i protein rezistencije raka dojke (BCRP), kodiran genom *ABCG2*. Upravo genske varijante tih transportera mogu poslužiti kao genski biljezi u individualizaciji i optimizaciji farmakoterapije statinima te se stoga, u svrhu postizanja optimalnog terapijskog učinka, u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, provodi genotipizacija *SLCO1B1* i *ABCG2*.

Cilj je rada prikazati postupak farmakogenetičke analize *SLCO1B1* i *ABCG2*, utjecaj polimorfizama na učinkovitost i sigurnost terapije statinima u prikazu slučajeva iz kliničke prakse, te ukazati na važnost farmakogenetičke analize kao korisnog alata u svakodnevnoj kliničkoj praksi pri pravodobnom prepoznavanju rizika razvoja nuspojava prilikom farmakoterapije statinima te prilagodbi u režimu doziranja lijekova, ali i potencijal iste u personaliziranom pristupu svakom pacijentu radi postizanja željenih terapijskih ishoda i minimalizacije rizika nastanka nuspojava.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izdvajanje DNA metodom QIAamp®

##### 3.1.1. Oprema i reagensi

###### Potrebna oprema i potrošni materijal:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 100-1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikropruvete volumena 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica V-1 plus (BiosanSIA, Latvija)
- mikrocentrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Njemačka)
- termostat Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka)

###### Reagensi:

Komplet reagenasa za izdvajanje *QIAamp® DNA Blood Mini Kit* – *Qiagen* (Qiagen, Njemačka) pohranjuje se na sobnoj temperaturi 15-25 °C najmanje 12 mjeseci, a za čuvanje duže od 12 mjeseci liofiliziranu *QIAGEN Protease* treba pohraniti na 2-8 °C. Također je potreban 96-100 % etanol.

##### 3.1.2. Postupak

###### Priprema reagenasa:

Pripremiti *QIAGEN Protease* ovisno o vrsti kompleta reagenasa:

*QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)* – liofilizat *QIAGEN Protease* otopiti u 1,2 mL pufera AW2

*QIAamp DNA Blood Mini Kit (250)* – liofilizat *QIAGEN Protease* otopiti u 5,5 mL pufera AW2

Otopljena *QIAGEN Protease* stabilna je 12 mjeseci na 2-8 °C.

###### Priprema pufera:

AL pufer – dobro protresti prije upotrebe

AW1 i AW2 pufer – prije prve upotrebe u bočicu s koncentratom je potrebno dodati 96-100 % etanol prema uputi na bočici. Pufer je stabilan 12 mjeseci na sobnoj temperaturi 15-25 °C.

#### Postupak izdvajanja DNA iz pune krvi ili leukocitnog sloja

1. Pipetirati 20  $\mu$ L *QIAGEN Protease* u mikroepruvetu volumena 1,5 mL
2. Dodati 200  $\mu$ L uzorka pune krvi
3. Dodati 200  $\mu$ L pufera AL i protresti na vrtložnoj miješalici 15 s
4. Inkubirati 10 min na 56 °C (*Thermostat Eppendorf ThermoStat C*)
5. Kratko centrifugirati u mikrocentrifugi da se spuste kapljice s unutrašnjosti poklopca (*centrifuga Eppendorf 5424*)
6. Dodati 200  $\mu$ L 96-100 % etanola i kratko protresti na vrtložnoj miješalici
7. Kratko centrifugirati u mikrocentrifugi da se spuste kapljice s unutrašnjosti poklopca
8. Pripremiti QIAamp Mini spin kolonicu i koja se stavi u mikroepruvetu volumena 2 mL
9. Dodati lizat uzorka na kolonicu, zatvoriti
10. Centrifugirati 1 min pri 6000 g (8000 rpm)
11. Pažljivo otvoriti kolonicu i dodati 500  $\mu$ L pufera AW1 (paziti da se ne smoči poklopac)
12. Zatvoriti kolonicu i centrifugirati 1 min pri 6000 g (8000 rpm)
13. Baciti punu mikroepruvetu s filtratom i staviti kolonicu na čistu mikroepruvetu od 2 mL
14. Pažljivo otvoriti kolonicu i dodati 500  $\mu$ L pufera AW2 (paziti da se ne smoči poklopac)
15. Zatvoriti kolonicu i centrifugirati 1 min pri maksimalnoj brzini 20 000 g (14 000 rpm)
16. Baciti punu mikroepruvetu s filtratom i staviti kolonicu na čistu mikroepruvetu od 2 mL
17. Zatvoriti kolonicu i centrifugirati 1 min pri maksimalnoj brzini 20 000 g (14 000 rpm)
18. Baciti mikroepruvetu s filtratom i staviti kolonicu na čistu mikroepruvetu od 1,5-2 mL
19. Dodati 200  $\mu$ L pufera AE
20. Inkubirati 1 min na sobnoj temperaturi 15-25 °C
21. Zatvoriti kolonicu i centrifugirati 1 min pri 6000 g (8000 rpm)

#### Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Za određivanje koncentracije i čistoće DNA koristi se NanoDrop 2000 spektrofotometar (ThermoFischer Scientific, Njemačka).



Prema uputama proizvođača:

· izdvajanje DNA iz 200  $\mu\text{L}$  pune krvi ( $5 \times 10^6/\text{L}$  leukocita) daje prosječno 6  $\mu\text{g}$  DNA u 200  $\mu\text{L}$  eluata, odnosno prosječno 30  $\text{ng}/\mu\text{L}$

· izdvajanje DNA iz 200  $\mu\text{L}$  leukocitnog sloja ( $5 \times 10^6/\text{L}$  leukocita) daje prosječno do 50  $\mu\text{g}$  u 200  $\mu\text{L}$  eluata, odnosno prosječno do 250  $\text{ng}/\mu\text{L}$

Koncentracija DNA mjeri se na spektrofotometru te izračunava na osnovu optičke gustoće otopine (engl. *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):

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

Čistoća DNA određuje se mjerenjem optičke gustoće pri valnoj duljini od 260 i 280 nm.

Omjer očitavanja  $A_{260} / A_{280}$  od 1,7-1,9 ukazuje na visoku čistoću DNA bez proteina.

Prema uputama proizvođača, čistoća DNA prema omjeru  $A_{260} / A_{280}$  trebala bi iznositi > 1,7.

### 3.2. Lančana reakcija polimeraze

Lančana je reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) metoda kojom se *in vitro* može vrlo brzo umnožiti specifični fragment DNA molekule u milijune identičnih kopija ciljanog segmenta DNA. Budući da su za molekularne i genetičke analize potrebne značajne količine uzorka DNA, studije izoliranih dijelova DNA gotovo bi bile nemoguće bez PCR amplifikacije. Štoviše, PCR je revolucionizirao istraživanje DNA do te mjere da je njegov izumitelj, američki biokemičar Kary B. Mullis, 1993. nagrađen Nobelovom nagradom. PCR se može izvesti koristeći DNA iz različitih izvora, uključujući perifernu krv, kosu, kožu, slinu i mikroorganizme, poput bakterija i virusa. DNA amplificirana PCR-om, može se koristiti u mnogim različitim laboratorijskim postupcima, poput *DNA fingerprinting-a*, detekcije bakterija ili virusa (primjerice HIV-a) i dijagnosticiranja genetskih poremećaja. Svaka reakcijska smjesa za PCR mora sadržavati

izoliranu DNA kao kalup za reakciju, smjesu četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), dvije specifične početnice (engl. *primer*), termostabilnu DNA-polimerazu (*Taq*-polimerazu), katione  $Mg^{2+}$  ( $MgCl_2$ ) i pufer. DNA polimeraza ključni je enzim koji povezuje pojedine dNTP u željeni PCR produkt, odnosno sintetizira željeni DNA segment. Za PCR se koristi termostabilna *Taq*-polimeraza izolirana iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus* optimalnog djelovanja pri 72 °C. *Taq*-polimeraza je identificirana kao enzim koji može djelovati pri denuracijskim uvjetima neophodnim za izvedbu PCR, dok većina drugih DNA-polimeraza pri toliko visokoj temperaturi (94 – 96 °C) nepovratno gubi aktivnost zbog denaturacije. Ona sintetizira novi lanac DNA komplementaran kalupu krećući od 3' - kraja lanca kalupa. Početnice 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 ([www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet](http://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet); [www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr](http://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr); [www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr); Buben, 2018).

PCR se sastoji od 20-40 ponavljanih ciklusa 3 uzastopna koraka (denaturacija, povezivanje početnica i elongacija) koji zahtijevaju različite temperaturne uvjete, a postupak generalno zahtijeva 2-4 h, ovisno o duljini DNA fragmenta kojeg je potrebno amplificirati. Svaki je korak 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 zadanom programu ([www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr](http://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr); [www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr); Buben, 2018).

Faze PCR-a jesu:

- 1) Denaturacija molekule DNA (96 °C): razdvajanje lanaca dvolančane DNA (engl. *double-stranded DNA*, dsDNA) u dva jednolančana lanca (engl. *single stranded DNA*, ssDNA) zagrijavanjem reakcijske smjese na cca 96 °C.
- 2) Hibridizacija početnica (engl. *annealing*) (50 – 60 °C): reakcijska smjesa se hladi na 50 – 60 °C, čime je omogućeno specifično vezanje početnica na njima komplementarne sekvence ssDNA. Koncentracija početnica u reakcijskoj smjesi je prisutna u suvišku u odnosu na kalup DNA što sprječava ponovno sparivanje jednolančanih lanaca DNA kalupa.
- 3) Produljenje (elongacija) DNA lanca (72 °C; optimalna temperatura za aktivnost *Taq*-polimeraze): sinteza komplementarnog lanca ([www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr](http://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr); [www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/)).

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

Real-time PCR inačica je klasičnog PCR-a koja omogućava kontinuiranu kvantifikaciju novonastale DNA praćenjem fluorescencije tijekom svakog ciklusa umnažanja, u stvarnom vremenu. Razlikuju se dva principa kvantifikacije nastalog PCR produkta. Prvi princip podrazumijeva primjenu nespecifičnih boja koje emitiraju fluorescenciju tek nakon vezanja na dvostruku uzvojnici DNA. Primjer je takve boje SYBR Green I, kod koje je emisija fluorescencije prilikom vezanja na dsDNA 1000 puta veća nego kada se ona nalazi slobodna u otopini. Intenzitet se fluorescencije povećava proporcionalno količini umnožene dsDNA, omogućujući kvantitativnu analizu PCR produkta. Glavni nedostatak ovakvog pristupa jest što takve boje nisu specifične, odnosno vežu se na svu dsDNA prisutnu u uzorku (npr. na dimere početnica, nespecifične PCR produkte itd.). Drugi princip podrazumijeva primjenu specifičnih fluorescentno-obilježenih sonda (poznatog nukleotidnog slijeda) koje hibridiziraju na segment DNA od interesa (kalup), tijekom umnažanja ([www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf](http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf));

[www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx](http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx); Buben, 2018; Kubista i sur., 2006; Mortarino i sur., 2004).

Jedna izvedba metode jest *TaqMan*<sup>®</sup> metoda koja podrazumijeva primjenu dvostruko obilježenih hidrolizirajućih sonda (*TaqMan*<sup>®</sup> probe) koje na 5'-kraju sadrže kovalentno vezanu fluorescentnu reportersku boju (engl. *reporter*), a na 3'-kraju molekule prigušivač (engl. *quencher*). Dok je sonda netaknuta, prigušivač apsorbira fluorescenciju koju emitira reporter rezonantnim prijenosom fluorescentne energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET). Ako je u uzorku prisutan ciljani segment, fluorescentno obilježena sonda će se vezati na kalup nizvodno od početnice. Prilikom umnažanja specifičnog DNA fragmenta, tijekom faze elongacije *Taq*-polimeraza će zahvaljujući svojoj 5'→3' egzonukleaznoj aktivnosti razgraditi prethodno vezanu *TaqMan* sondu. Kada je reporterska boja odvojena od prigušivača, dolazi do emisije fluorescencije koja se detektira. Sa svakim se ciklusom oslobađa sve više fluorescencije te je povećanje intenziteta emitirane fluorescencije izravno proporcionalno količini amplificiranog PCR produkta. Upotrebom 22 različito obilježenih *TaqMan* sonda (obilježenih različitim fluorescentnim bojama) od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu, može se izvoditi analiza više alela istovremeno ([www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf](http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf); [www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx](http://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx); Kubista i sur., 2006; Mortarino i sur., 2004; Wilhelm i Pingoud, 2003).

Primjenom ove metode mogu se razlikovati homozigoti za određeni alel od heterozigota tako da se sonda specifična za wt alel obilježi jednom fluorescentnom bojom, dok se sonda specifična za određenu alelnu varijantu (mutirani alel, mut) obilježi drugom fluorescentnom bojom. Ukoliko uređaj detektira samo jednu od tih fluorescentnih boja, prisutan je homozigot za wt alel odnosno homozigot za mutirani alel (mut). U slučaju heterozigota, uređaj će detektirati dvije, odnosno obje fluorescentne boje (Kubista i sur., 2006; Arya i sur., 2005; Wilhelm i Pingoud, 2003).

### 3.4. Genotipizacija *ABCG2* c.421C>A i *SLCO1B1* c.521T>C

Mjerna metoda: TaqMan<sup>®</sup> metoda PCR u stvarnom vremenu

Načelo mjerenja: Otkrivanje i analiza polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) pomoću TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (TaqMan<sup>®</sup> DME) (specifične početnice i TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde) i stvaranja fluorescentnog signala zbog 5'-nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze.

#### 3.4.1. Uzorak

Primarni uzorak: puna krv (vrsta spremnika: epruveta s antikoagulansom K<sub>3</sub>EDTA)

Sekundarni uzorak: DNA (otopina DNA u TE puferu)

#### 3.4.2. Potrebna oprema i reagensi

Oprema:

- Uređaj za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (Applied Biosystems, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 100-1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2.0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom ili „strip“ mikroeprovete s poklopcima (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete (Applied Biosystems, SAD)
- vrtložna miješalica V-1 plus (BiosanSIA, Latvija)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Eppendorf 5804R / 5810R (Eppendorf, Njemačka)

### Reagensi:

Reagensi se čuvaju na temperaturi od 2-8 °C, i -15 °C do -25 °C. (Izbjegavati prečesto zamrzavanje i odmrzavanje (najviše 3 puta, ili napraviti alikvote) *TaqMan*<sup>®</sup> *DME Assay Mix*-a i gotove reakcijske smjese te izlaganje direktnoj svjetlosti!)

- *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix*
- *TaqMan*<sup>®</sup> *Drug Metabolism Genotyping Assay ABCG2 421C>A*
- *TaqMan*<sup>®</sup> *Drug Metabolism Genotyping Assay SLCO1B1 521T>C*

**Tablica 13.** Prikaz polimorfizama s odgovarajućim reagensom

| <b>GEN - ALEL</b>       | <b>db SNP*<br/>(rs#)</b> |             |          | <b><i>TaqMan</i><sup>®</sup> <i>DME</i><br/><i>Assay ID</i></b> |
|-------------------------|--------------------------|-------------|----------|---|
| <i>ABCG2</i> c.421C>A   | rs2231142                | p.Gln141Lys | c.421C>A | C__15854163_70  |
| <i>SLCO1B1</i> c.521T>C | rs4149056                | p.Val174Ala | c.521T>C | C__30633906_10  |

\* *Single Nucleotide Polymorphism Database* - National Center for Biotechnology Information

### Kontrole:

- pozitivna kontrola *wt*
- pozitivna kontrola *het* ili *mut*

### **3.4.3. Priprema reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu:**

- pripremiti razrjeđenja DNA
- pripremiti reagense (otopiti *DME Assay* na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetlosti)

**Tablica 14.** Sastojci pojedinačne reakcijske smjese

| SASTOJCI REAKCIJSKE SMJESE                   | volumen (µL) | koncentracija u reakcijskoj smjesi |
|--|--------------|------------------------------------|
| TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix | 12,5         | 1x                                 |
| TaqMan <sup>®</sup> DME Assay Mix *, 20x     | 1,25         | 1x                                 |
| DNA razrjeđenje                              | 11,25        | 1-20 ng                            |
| Ukupni volumen reakcijske smjese             | 25           |                                    |

\*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući TaqMan<sup>®</sup> DME Assay.

- lagano promiješati reagense na vrtložnoj miješalici
- centrifugirati u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se sadržaj bočica spustio na dno
- pipetirati *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix* i *TaqMan<sup>®</sup> DME Assay* u mikroeprevetu, lagano promiješati protresanjem mikroeprevete prstom i centrifugirati 3-5 s
- pipetirati reakcijske smjese u mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroeprevete
- dodati DNA, kontrolne uzorke i negativne kontrole
- zatvoriti mikrotitarsku pločicu pokrovnom folijom ili „strip“ mikroeprevete poklopcima
- centrifugirati mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroeprevete u centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s pri 3000 rpm
- staviti uzorke u uređaj ABI 7500 i pokrenuti odgovarajući program (alelnu diskriminaciju ili amplifikaciju)
- nakon završetka programa očitava se rezultat

**Tablica 15.** Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju

|                           | PCR (50 ciklusa)                |                           |                           |                           |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Pre-PCR<br>Read           | INICIJACIJA                     | DENATURACIJA              | AMPLIFIKACIJA             | Post-PCR<br>Read          |
| temperatura /<br>trajanje | temperatura /<br>trajanje       | temperatura /<br>trajanje | temperatura /<br>trajanje | temperatura /<br>trajanje |
| 60 °C / 1 min             | 50 °C / 2 min<br>95 °C / 10 min | 95 °C / 15 s              | 60 °C / 90 s              | 60 °C / 1 min             |

#### 3.4.4. Načelo postupka

Za amplifikaciju ciljnog slijeda DNA koriste se specifične početnice i dvije TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde za detekciju alela (jedna se sonda veže za divlji tip, a druga za mutirani tip alela):

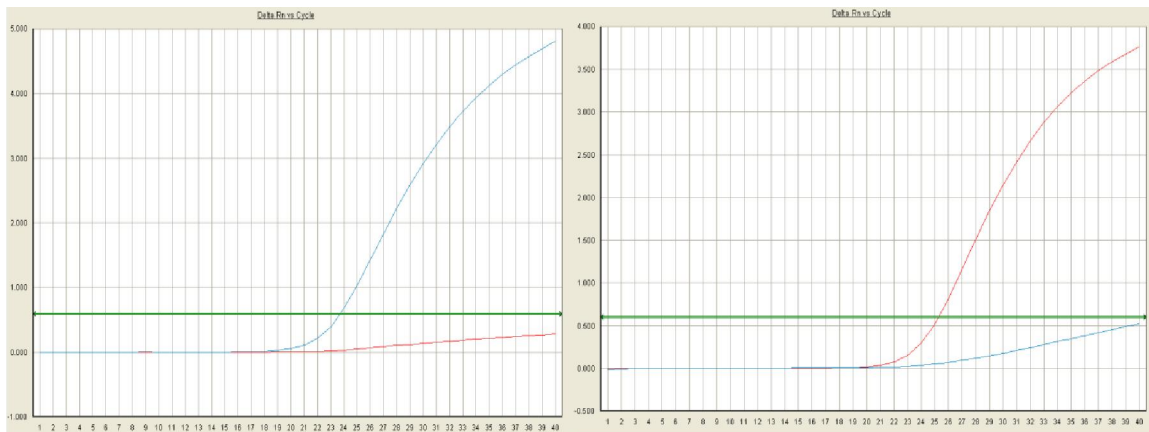
- reporterska boja VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup> na 5' kraju svake sonde
- ne-fluorescentni prigušivač na 3' kraju sonde.

Tijekom PCR reakcije početnice i TaqMan<sup>®</sup> sonde vežu se na ciljni slijed DNA. Taq DNA polimeraza produžuje početnice te svojom egzonukleaznom aktivnošću cijepa sonde koje su hibridizirane na ciljni slijed DNA. Cijepanje odvaja prigušivač i reportersku boju, pa dolazi do emisije fluorescencije reporterske boje.

Fluorescentni signal koji se stvara tijekom PCR amplifikacije detektira se i analizira pomoću računalnog programa *7500 Fast Software v.2.3*.

Prisutnost određenog fluorescentnog signala VIC<sup>®</sup> i/ili FAM<sup>®</sup> ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela i očitava se kako je navedeno na radnoj listi za odgovarajući polimorfizam:





**Slika 7.** Prisutnost samo jednog fluorescentnog signala, npr. samo VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup> - homozgotni alel



**Slika 8.** Prisutnost oba fluorescentna signala VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup> - heterozigotni alel

#### 4. REZULTATI

Skupina ispitanika prikupljena je tijekom 10 godina u populaciji Hrvatske, u svrhu određivanja učestalosti alela najvažnijih polimorfizama gena *SLCO1B1* (*SLCO1B1* c.521T>C) i gena *ABCG2* (*ABCG2* c.421C>A).

Skupinu je činio ukupno 761 ispitanik: 404 žene i 357 muškaraca, dobi od 2 do 98 godina (medijan 63 godine).

##### 4.1. Učestalost alela polimorfizma gena *SLCO1B1* c.521T>C

Od 761 ispitanika, 468 je osoba (61,50 %) homozigot wt alela za *SLCO1B1* c.521T>C (genotip 521T/T odnosno 521A/A), 264 su osobe (34,69 %) heterozigoti (genotip 521T/C odnosno 521A/G), a 29 je osoba (3,81 %) homozigot varijantnog alela (genotip 521C/C odnosno 521G/G) (Tablica 16.).

**Tablica 16.** Raspodjela genotipova *SLCO1B1* c.521T>C među ispitanicima

|                                   | <b>genotip 521T/T</b><br>(homozigot wt<br>alela) | <b>genotip 521T/C</b><br>(heterozigot) | <b>genotip 521C/C</b><br>(homozigot<br>varijantnih (mut)<br>alela) | <b>ukupan<br/>broj<br/>ispitanika<br/>(n=761)</b> |
|-----------------------------------|--|--|--|---|
| <b>broj ispitanika, N<br/>(%)</b> | <b>468 (61,50)</b>                               | <b>264 (34,69)</b>                     | <b>29 (3,81)</b>   | <b>761 (100)</b>                                  |

Ukupan je broj wt alela (T odnosno A) 1200, dok je ukupan broj varijantnih (mut) alela (C odnosno G) 322 (Tablica 17.).

**Tablica 17.** *SLCO1B1* c.521T>C ukupan broj alela T i C među genotipovima

|                           | <b>genotip 521T/T</b><br>(homozigot wt alela) | <b>genotip 521T/C</b><br>(heterozigot) | <b>genotip 521C/C</b><br>(homozigot varijantnih (mut) alela) | <b>ukupan broj alela među genotipovima</b> |
|---------------------------|---|--|--|--|
| <b>broj ispitanika, N</b> | <b>468</b>                                    | <b>264</b>                             | <b>29</b>  | <b>/</b>                                   |
| <b>broj alela T</b>       | <b>936</b>                                    | <b>264</b>                             | <b>0</b>   | <b>1200</b>                                |
| <b>broj alela C</b>       | <b>0</b>                                      | <b>264</b>                             | <b>58</b>  | <b>322</b>                                 |

Učestalost je wt alela (T odnosno A) 78,85 % (0,78846), dok frekvencija varijantnog (mut) alela (C odnosno G) iznosi 21,16 % (0,21156) (Tablica 18.).

**Tablica 18.** *SLCO1B1* c.521T>C učestalost pojedinih alela među ispitanicima

|                                |             | <b>učestalost pojedinog alela</b> | <b>učestalost pojedinog alela (%)</b> |
|--------------------------------|-------------|-----------------------------------|---------------------------------------|
| <b>broj alela T</b>            | <b>1200</b> | <b>0,78846</b>                    | <b>78,85</b>                          |
| <b>broj alela C</b>            | <b>322</b>  | <b>0,21156</b>                    | <b>21,16</b>                          |
| <b>ukupan broj alela T i C</b> | <b>1522</b> | <b>1</b>                          | <b>100</b>                            |

#### 4.2. Učestalost alela polimorfizma gena *ABCG2* c.421C>A

Od 761 ispitanika, 620 je osoba (81,47 %) homozigot wt alela za *ABCG2* c.421C>A (genotip 421C/C odnosno 421G/G), 134 su osobe (17,61 %) heterozigoti (genotip 421C/A odnosno 421G/T), a 7 je osoba (0,92 %) homozigot varijantnog (mut) alela (genotip 421A/A odnosno 421T/T) (Tablica 19.).

**Tablica 19.** Raspodjela genotipova *ABCG2* c.421C>A među ispitanicima

|                                   | <b>genotip 421C/C</b><br>(homozigot wt alela) | <b>genotip 421C/A</b><br>(heterozigot) | <b>genotip 421A/A</b><br>(homozigot<br>varijantnih (mut)<br>alela) | <b>ukupan<br/>broj<br/>ispitanika<br/>(n=761)</b> |
|-----------------------------------|---|--|--|---|
| <b>broj ispitanika, N<br/>(%)</b> | <b>620 (81,47)</b>                            | <b>134 (17,61)</b>                     | <b>7 (0,92)</b>  | <b>761 (100)</b>                                  |

Ukupan je broj wt alela (C odnosno G) 1374, dok je ukupan broj varijantnih (mut) alela (A odnosno T) 148 (Tablica 20.).

**Tablica 20.** *ABCG2* c.421C>A ukupan broj alela C i A među genotipovima

|                               | <b>genotip 421C/C</b><br>(homozigot wt<br>alela) | <b>genotip<br/>421C/A</b><br>(heterozigot) | <b>genotip 421A/A</b><br>(homozigot<br>varijantnih (mut)<br>alela) | <b>ukupan broj<br/>alela među<br/>genotipovima</b> |
|-------------------------------|--|--|--|--|
| <b>broj ispitanika,<br/>N</b> | <b>620</b>                                       | <b>134</b>                                 | <b>7</b>   | <b>/</b>   |
| <b>broj alela C</b>           | <b>1240</b>                                      | <b>134</b>                                 | <b>0</b>   | <b>1374</b>  |
| <b>broj alela A</b>           | <b>0</b>   | <b>134</b>                                 | <b>14</b>  | <b>148</b>   |

Učestalost wt alela (C odnosno G) je 90,28 % (0,9027595), dok frekvencija varijantnog (mut) alela (A odnosno T) iznosi 9,72 % (0,0972405) (Tablica 21.).

**Tablica 21.** *ABCG2* c.421C>A učestalost pojedinih alela među ispitanicima

|                            |      | učestalost<br>pojedinih alela | učestalost pojedinog<br>alela (%) |
|----------------------------|------|-------------------------------|-----------------------------------|
| broj alela C               | 1374 | 0,9027595                     | 90,28                             |
| broj alela A               | 148  | 0,0972405                     | 9,72                              |
| ukupan broj<br>alela C i A | 1522 | 1                             | 100                               |

Od pojedinih kombinacija genotipova *SLCO1B1* c.521T>C i *ABCG2* c.421C>A, najzastupljenija je *SLCO1B1* 521T/T i *ABCG2* 421C/C kombinacija (50,20 %), dok je *SLCO1B1* 521C/C i *ABCG2* 421A/A najmanje zastupljena (0,13 %) (Tablica 22.).

**Tablica 22.** Zastupljenost pojedinih kombinacija genotipova *SLCO1B1* c.521T>C i *ABCG2* c.421C>A među ispitanicima

| <i>SLCO1B1</i> c.521T>C<br>genotip | <i>ABCG2</i> c.421C>A<br>genotip | broj ispitanika<br>(N) | $\frac{\text{broj ispitanika (N)}}{\text{ukupan broj ispitanika}}$ |
|------------------------------------|----------------------------------|------------------------|--|
| TT                                 | CC                               | 382                    | 50,20 %  |
| TT                                 | CA                               | 84                     | 11,04 %  |
| TT                                 | AA                               | 2                      | 0,26 %   |
| TC                                 | CC                               | 216                    | 28,38 %  |
| TC                                 | CA                               | 44                     | 5,78 %   |
| TC                                 | AA                               | 4                      | 0,53 %   |
| CC                                 | CC                               | 22                     | 2,89 %   |
| CC                                 | CA                               | 6                      | 0,79 %   |
| CC                                 | AA                               | 1                      | 0,13 %   |

### 4.3. Prikaz slučaja pacijenta I

Prikazan je slučaj pacijenta (51 godina starosti) koji je nakon PCI (perkutana koronarna intervencija), zbog dislipidemije, liječen atorvastatinom (BCRP supstrat), nebivololom i acetilsalicilnom kiselinom. Zbog nedovoljne je djelotvornosti atorvastatin zamijenjen rosuvastatinom (BCRP supstrat) i ezetimibom (BCRP supstrat i inhibitor). Međutim, nakon godinu dana terapije nastaje jetrena lezija karakterizirana povišenjem jetrenih enzima (ALT 200 U/L, AST 100 U/L, GGT 190 U/L) te se rosuvastatin ukida iz terapije. Prema rezultatima genotipizacije metodom PCR-a u stvarnom vremenu, pacijent je imao intermedijarni metabolički fenotip *CYP2C19\*2/\*17*, intermedijarnu transportnu aktivnost OATP1B1 (*SLCO1B1* 521T/C) i nisku transportnu aktivnost BCRP, s obzirom na mut genotip (*ABCG2* 421A/A). Uzimajući u obzir činjenicu da su atorvastatin i rosuvastatin supstrati BCRP-a, dok je ezetimib istovremeno i supstrat i inhibitor BCRP-a, mogući je ključ pojave hepatotoksičnosti upravo pacijentova farmakogenetička predispozicija. Zbog niske je aktivnosti BCRP-a olakšan prijenos hipolipemika na membrani enterocita, ali je istovremeno usporen njihov prijenos na barijeri jetra – žuč, što rezultira značajno povećanom bioraspoloživosti hipolipemika. Štoviše, inhibitorni potencijal ezetimiba prema BCRP dodatno može povećati bioraspoloživost hipolipemika, a time i rizik razvoja ADR-a, prvenstveno u jetri jer se sva tri lijeka većim dijelom eliminiraju putem žuči. Osim toga, intermedijarna aktivnost *CYP2C19*, koji je manjim dijelom odgovoran za metabolizam rosuvastatina, također pridonosi povećanoj bioraspoloživosti lijeka.

Prikazani slučaj ukazuje na važnu ulogu farmakogenetičkog testiranja prvenstveno zbog smanjene transportne aktivnosti putem BCRP za razvoj hepatotoksičnosti kao jedne od najčešćih ADR-a tijekom primjene hipolipemika, s naglaskom na njihovu primjenu u politerapiji. Zaključno, genotipizacija *ABCG2* c.421C>A može uvelike pomoći u procjeni povećanog rizika razvoja nuspojava hipolipemika.

#### 4.4. Prikaz slučaja pacijenta II

Prikazan je slučaj pacijenta (75 godina starosti) s genetičkom predispozicijom za statinima induciranu miopatiju. U kolovozu 2011. godine pacijent je primljen na hitni prijem zbog umora i generalizirane boli i mišićne slabosti, koja je trajala proteklih 36 h. Sedam je godina ranije pacijent doživio srčani udar, praćen kroničnim psihoorganskim sindromom, dok mu je 3 tjedna prije prijema dijagnosticirana hiperkolesterolemija i GERB (gastroezofagealna refluksna bolest), te je započeta terapija statinom i inhibitorom protonske crpke. Na prijemu je pacijentova farmakoterapija uključivala acetilsalicilnu kiselinu (100 mg/dan), ramipril (2,5 mg/dan), atorvastatin (20 mg/dan), pantoprazol (20 mg/dan) i haloperidol (5 mg/dan). Laboratorijski su nalazi pokazali povišene vrijednosti serumskog mioglobina (52720 µg/L), CK (76000 IU/L), LDH (2075 IU/L), AST-a (1270 IU/L), ALT-a (680 IU/L), kreatinina (858 µmol/L) i kalija (6,9 mmol/L). Analizom je urina dokazana proteinurija i hematurija, dok je ultrazvuk abdomena pokazao normalnu veličinu bubrega i odsustvo potencijalne urinarnе opstrukcije.

Pacijentu je dijagnosticirana rabdomioliza i akutno renalno zatajenje. Ukinuti su mu svi lijekovi iz terapije te je liječen intravenskom hidracijom i alkalizacijom urina. Međutim, bubrežni su se parametri nastavili povećavati te je započeto liječenje hemodijalizom. Nakon 4 serije hemodijalize pacijentu se počela uspostavljati normalna bubrežna funkcija, a nakon 4 tjedna funkcijski su se bubrežni testovi i serumske razine mioglobina, CK, LDH, AST-a i ALT-a smanjile na normalnu razinu. Mišićna je slabost postupno nestajala te je pacijent otpušten nakon 6 tjedana na kućno liječenje, bez simptoma miopatije.

Posumnjalo se da je rabdomioliza nastala kao ADR prilikom terapije atorvastatinom te je učinjeno genotipiziranje na *SLCO1B1* c.521T>C, *ABCB1* c.3435C>T, *CYP2C19\*2* i *CYP2D6\*3* real-time PCR tehnikom. Rezultati su pokazali da je pacijent bio homozigot za varijantne alele *SLCO1B1* (521C/C genotip) i *ABCB1* (3435T/T genotip). Također je bio slabi metabolizator putem *CYP2C19* (homozigot za *CYP2C19\*2*) te brzi metabolizator putem *CYP2D6*.

Vremenski odnos između primjene atorvastatina i razvoja rabdomiolize, s regresijom znakova i simptoma bolesti nakon prestanka primjene terapije, podržava hipotezu da je rabdomioliza uzrokovana upravo terapijom atorvastatinom, dok su ostali mogući uzroci

rabdomiolize isključeni ostalim dijagnostičkim postupcima i kliničkim tijekom bolesti. Farmakogenetička je analiza pokazala da je pacijent homozigot za c.521C alel na *SLCO1B1* genu, što je dokazano u prethodnim studijama, najveći rizični čimbenik za razvoj statinima inducirane miopatije. Farmakogenetički je rizik dodatno povećala činjenica da je pacijent homozigot i za c.3435C alel na *ABCB1* genu, što je povezano, zbog produljene bioraspodivnosti s još većim rizikom za razvoj miopatije.

Farmakokinetičke DDI također su mogle doprinijeti razvoju rabdomiolize s obzirom na to da je pacijent u ovom slučaju atorvastatin primjenjivao istodobno s pantoprazolom. Glavni je metabolički put pantoprazola demetilacija pomoću enzima CYP2C19, s naknadnom sulfatacijom. Štoviše, nekoliko je SNP-a unutar gena za CYP2C19 enzim povezano sa smanjenom enzimskom aktivnošću, dok je *in vitro* dokazano da je pantoprazol i CYP3A4 inhibitor (Meyer, 1996). Budući da je ovaj pacijent bio spori metabolizator putem CYP2C19, povećana je plazmatska koncentracija pantoprazola mogla rezultirati CYP3A4 inhibicijom te posljedično povećanim rizikom od rabdomiolize inducirane atorvastatinom jer je atorvastatin supstrat CYP3A4. Stoga, slučaj ovoga pacijenta izvrsno ilustrira kako kombinacija farmakogenetičkih i farmakokinetičkih čimbenika može pridonijeti razvoju statinima inducirane miopatije.



## 5. RASPRAVA I ZAKLJUČAK

Postoje čvrsti znanstveni dokazi o važnosti membranskih prijenosnika OATP1B1 i BCRP u farmakokinetici statina. Oba transportera pokazuju značajnu genetičku varijabilnost, a učestalost polimorfizama *SLCO1B1* 521T>C i *ABCG2* 421C>A ima veliku i populacijsku i rasnu varijabilnost. Varijantni je alel *SLCO1B1* 521C najučestaliji u europskoj (16 %), azijskoj (12 %) i afričkoj populaciji (1 %). Varijantni alel *ABCG2* 421A je najučestaliji u Azijata (30 %), zatim u bjelačkoj populaciji (10-15 %), dok je najrjeđi u afričkoj populaciji (2 %) (Sakiyama i sur., 2014; Keskitalo i sur., 2009; Robey i sur., 2009). Rezultati ustanovljeni u populaciji Hrvatske u skladu su s rezultatima dobivenima za druge europske, bjelačke populacije. Polimorfizmi gena povezuju se s varijabilnom kinetikom, ali i podložnosti razvoja neželjenih učinaka lijekova supstrata, jer varijabilna aktivnost u prijenosu lijekova preko barijera u probavnom sustavu, na barijeri jetra-žuč te tubulima bubrega u slučaju BCRP/ABCG2, te unos lijeka u jetra putem OATP1B1 mogu značajno modulirati apsorpciju, distribuciju i izlučivanje lijekova-supstrata. Stoga analiza polimorfizama *SLCO1B1* i *ABCG2* može poslužiti u individualizaciji i optimizaciji liječenja statinima te minimalizaciji rizika razvoja nuspojava, prvenstveno miotoksičnosti i hepatotoksičnosti. S obzirom da su pojedini statini različito ovisni o transportu putem OATP1B1 i BCRP, prisutnost varijantnih inaktivirajućih alela upućuje na odabir lijeka koji je manje ovisan o određenom transporteru. Tako je simvastatin najviše, a fluvastatin najmanje ovisan o OATP1B1, dok je varijabilna farmakokinetika rosuvastatina pod značajnim utjecajem genetički determinirane aktivnosti BCRP/ABCG2. Nadalje, na razini ovih membranskih prijenosnika mogu se, u politerapiji, očekivati i značajne interakcije lijekova (lijelek-lijelek) koje dodatno mogu biti modulirane ako je pacijent nositelj alela smanjene aktivnosti, te se govori o interakcijama lijek-lijelek-gen. Stoga se varijante gena *SLCO1B1* i *ABCG2* mogu smatrati dobrim farmakogenetičkim biljezima i koristiti u personaliziranoj, preciznoj medicini odnosno farmakoterapiji. Za polimorfizam *SLCO1B1* 521T>C postoje smjernice o doziranju simvastatina i atorvastatina, dok se isto očekuje i za polimorfizam *ABCG2* 421C>A. Važno je naglasiti da su regulatorna tijela, Američka agencija za hranu i lijekove, *Food and drug administration* (FDA) i Europska agencija za lijekove, *European Medicines Agency* (EMA) upravo za transporter BCRP istakla potrebu da se u istraživanju novih potencijalnih lijekova

ispita jesu li oni supstrati ovog transportera i koje su potencijalno važne interakcije koje se mogu očekivati na razini BCRP prijenosnika ([http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf); <http://www.fda.gov/downloads>; <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>)

Nadalje, ako se utvrdi da je pacijent nositelj varijantnih oblika gena transportera BCRP i/ili OATP1B1, važno je zbog njihove slabije aktivnosti smanjiti broj lijekova-supstrata na minimum, zbog značajnog rizika interakcija lijek-lijek-gen s posljedicom razvoja nuspojava.

Prisustvo se varijantnih alela *ABCG2* osim s nuspojavama statina povezuje s većom sistemskom izloženosti sulfasalazinu (Elsby i sur., 2016; Giacomini i sur., 2013), s većim interakcijskim potencijalom između lamotrigina i valproata (Klarica Domjanović i sur., 2018), s modulatornom ulogom zajedno s CYP2D6 u dispoziciji i učinkovitosti risperidona (Ganoci i sur., 2020) i s povećanom incidencijom štetnih učinaka ne samo statina već i gefitiniba (Cusatis i sur., 2006) te sunitiniba (Low i sur., 2016). Uočeno je da, općenito, nositelji minornog alela 421A imaju bolji učinak antitumorskih lijekova, ali isto tako veći rizik razvoja nuspojava tijekom kemoterapije (Chen i sur., 2019). Česte varijante *ABCG2* se također povezuju s razvojem gihta, odnosno povećanim koncentracijama mokraćne kiseline (Sarkady i sur., 2020).

Personalizirani pristup liječenju i primjeni statina na temelju farmakogenetičke analize može poboljšati suradljivost pacijenata. Odabirom pravog lijeka i doze minimalizira se rizik razvoja nuspojava koje su glavni razlog prekida terapije i nesuradljivosti bolesnika, što može rezultirati pogoršanjem zdravstvenog stanja, odnosno povećanjem rizika za razvoj kardiovaskularnih incidenata (Scarpini i sur., 2012).

Zaključno, farmakogenetičke analize polimorfizama *SLCO1B1* 521T>C i *ABCG2* 421C>A predstavljaju optimalan pristup u personaliziranom liječenju i primjeni statina. Napredne tehnike molekularne dijagnostike temeljene na metodama PCR u stvarnom vremenu predstavljaju brze i učinkovite metode koje se primjenjuju u analizi navedenih polimorfizama.

## 6. LITERATURA

Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. *Expert Opin Drug Saf*, 2011, 10(3), 373-87.

Ahmadi M, Amiri S, Pecic S, Machaj F, Rosik J, Łos MJ, Alizadeh J, Mahdian R, da Silva Rosa SC, Schaafsma D, Shojaei S, Madrakian T, Zeki AA, Ghavami S. Pleiotropic effects of statins: A focus on cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(12), 165968.

ALFA: Allele Frequency Aggregator, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/>, pristupljeno 3.4.2021.

Alwi Z. B. The Use of SNPs in Pharmacogenomics Studies. *MJMS*, 2005, 12(2), 4–12.

Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet*, 2007, 370(9601), 1781-90.

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(2), 209-19.

Asberg A. Interactions between cyclosporin and lipid-lowering drugs: implications for organ transplant recipients. *Drugs*, 2003, 63(4), 367-78.

Atorvastatin, [www.go.drugbank.com/drugs/DB01076](http://www.go.drugbank.com/drugs/DB01076), pristupljeno 16.3.2021.

Bergman E, Forsell P, Tevell A, et al. Biliary secretion of rosuvastatin and bile acids in humans during the absorption phase. *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29, 205 -14.

Bottorff MB. Statin safety and drug interactions: clinical implications. *Am J Cardiol*, 2006, 97(8A), 27C–31C.

Božina, N, Macolić Šarinić, V. Farmakogenomika i farmakovigilancija - sprječavanje nuspojave u individualizaciji terapije – upute i smjernice. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 126.

Brown CDA, Windass A, Bleasby K, Lauffart B. Rosuvastatin is a high affinity substrate of hepatic organic anion transporter OATP-C. *Atheroscler Suppl*, 2001, 2, 90.

Buben, J. Farmakogenetska analiza CYP2D6 i značaj u kliničkoj praksi. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.

Cai A, Zhou Y, Li L. Rho-GTPase and Atherosclerosis: Pleiotropic Effects of Statins. *J Am Heart Assoc*, 2015, 4(7), e002113.

Calderon-Ospina CA, Hernández-Sómerson M, García AM, et al. A Pharmacogenomic Dissection of a Rosuvastatin-Induced Rhabdomyolysis Case Evokes the Polygenic Nature of Adverse Drug Reactions. *Pharmgenomics Pers Med*, 2020, 13, 59-70.

Chatzizisis YS, Koskinas KC, Misirli G, Vaklavas C, Hatzitolios A, Giannoglou GD, Risk Factors and Drug Interactions Predisposing to Statin-Induced Myopathy: Implications for Risk Assessment, Prevention and Treatment. *Drug Safety*, 2010, 33(3), 171-87.

CPIC kliničke smjernice za doziranje simvastatina, 2021.,  
[www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166105005](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166105005), pristupljeno 3.4.2021.

Crouse, J. R. An evaluation of rosuvastatin: pharmacokinetics, clinical efficacy and tolerability. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008, 4(3), 287–304.

Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, et al. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *J Natl Cancer Inst*, 2006, 98, 1739–42.

Davidson, M.H. Controversy surrounding the safety of cerivastatin. *Expert Opin Drug Saf*, 2002, 1, 207-12.

Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in

men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA*, 1998, 279(20), 1615-22.

DPWG: Dutch Pharmacogenetics Working Group, 2021., [www.pharmgkb.org/page/dpwg](http://www.pharmgkb.org/page/dpwg), pristupljeno 2.4.2021.

DPWG kliničke smjernice za doziranje atorvastatina, 2021., [www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182843](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182843), pristupljeno 3.4.2021.

DPWG kliničke smjernice za doziranje simvastatina, 2021., [www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182844](http://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166182844), pristupljeno 3.4.2021.

Elsby R, Martin P, Surry D, Sharma P, Fenner K. Solitary inhibition of the breast cancer protein efflux transporter results in a clinically significant drug-drug interaction with Rosuvastatin by causing up to a 2-fold increase in statin exposure. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44, 398–408.

European medicines agency, London, UK: guideline on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/ 95/rev. 1 Corr. 2\*\*, 2012., [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf), pristupljeno 10.4.2021.

FDA gov. US Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/downloads>, pristupljeno 9.4.2021.

FDA gov. US Food and Drug Administration: guidance for industry: drug interaction studies—study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations, 2017., <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM292362.pdf>, pristupljeno 10.4.2021.

Fischer V, Johanson L, Heitz F, Tullman R, Graham E, Baldeck JP, Robinson WT. The 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor fluvastatin: effect on human cytochrome P-450 and implications for metabolic drug interactions. *Drug Metab Dispos*, 1999, 27(3), 410-6.

Fluvastatin, [www.go.drugbank.com/drugs/DB01095](http://www.go.drugbank.com/drugs/DB01095), pristupljeno 17.3.2021.

Formica D, Sultana J, Cutroneo PM, Lucchesi S, Angelica R, Crisafulli S, Ingrasciotta Y, Salvo F, Spina E, Trifirò G. The economic burden of preventable adverse drug reactions: a systematic review of observational studies. *Expert Opin Drug Saf*, 2018, 17(7), 681-695.

Furberg, C.D., Pitt, B. Withdrawal of cerivastatin from the world market. *Curr Control Trials Cardiovasc Med*, 2001, 2, 205-7.

Ganoci L, Trkulja V, Živković M, Božina T, Šagud M, Lovrić M, Božina N. ABCB1, ABCG2 and CYP2D6 polymorphism effects on disposition and response to long-acting risperidone. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2021, 10, 104.

García MJ, Reinoso RF, Sánchez Navarro A, Prous JR. Clinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2003, 25(6), 457-81.

Genomes 1000, phase III, [http://grch37.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Info/Index](http://grch37.ensembl.org/Homo_sapiens/Info/Index), pristupljeno 3.4.2021.

Gessner A, König J, Fromm MF. Clinical Aspects of Transporter-Mediated Drug-Drug Interactions. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 105(6), 1386-1394.

Giacomini KM, Balimane PV, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, et al. International transporter consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94, 23–6.

Gibson DM, Bron NJ, Richens A, Hounslow NJ, Sedman AJ, Whitfield LR. J. Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *Clin Pharmacol*, 1996, 36(3), 242-6.

Golomb, B. A., Evans, M. A. Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2008, 8(6), 373–418.

Guan, Z., Wu, K., Li, R., Yin, Y., Li, X., Zhang, S., Li, Y. Pharmacogenetics of statins treatment: Efficacy and safety. *J Clin Pharm Ther*, 2019, 44, 858–867.

Graham, D.J. et al. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipidlowering drugs. *JAMA*, 2004, 292, 2585-90.

Gurwitz JH, Field TS, Avorn J, McCormick D, Jain S, Eckler M, Benser M, Edmondson AC, Bates DW. Incidence and preventability of adverse drug events in nursing homes. *Am J Med*, 2000, 109(2), 87-94.

Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1609(1), 1-18.

Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch*, 2004, 447(5), 653-65.

Haslinger-Löffler B. Multiple effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) besides their lipid-lowering function. *Kidney Int*, 2008, 74(5), 553-5.

Herd JA, Ballantyne CM, Farmer JA, Ferguson JJ 3rd, Jones PH, West MS, Gould KL, Gotto AM Jr. Effects of fluvastatin on coronary atherosclerosis in patients with mild to moderate cholesterol elevations (Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study [LCAS]). *Am J Cardiol*, 1997, 80(3), 278-86.

Hilal-Dandan R, Brunton L. Goodman and Gilman Manual of Pharmacology and Therapeutics, 2. izdanje. McGraw-Hill Education, 2013, 160.

Hirota T, Fujita Y, Ieiri I. An updated review of pharmacokinetic drug interactions and pharmacogenetics of statins. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2020, 16(9), 809-822.

Hirota T, Ieiri I. Drug-drug interactions that interfere with statin metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2015, 11(9), 1435-47.

Hofman J, Sorf A, Vagiannis D, Sucha S, Kammerer S, Küpper JH, Chen S, Guo L, Ceckova M, Staud F. Brivanib Exhibits Potential for Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions and the Modulation of Multidrug Resistance through the Inhibition of Human ABCG2 Drug Efflux Transporter and CYP450 Biotransformation Enzymes. *Mol Pharm*, 2019, 16(11), 4436-4450.

Holdaas H, Hagen E, Asberg A, Lund K, Hartman A, Vaidyanathan S, Prasad P, He YL, Yeh CM, Bigler H, Rouilly M, Denouel J. Evaluation of the pharmacokinetic interaction between fluvastatin XL and cyclosporine in renal transplant recipients. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2006, 44(4), 163-71.

Horseley AJ, Cox MH, Sarwat S, Kerr ID. The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem Soc Trans*, 2016, 44(3), 824-830.

Hua WJ, Hua WX, Fang HJ. The role of OATP1B1 and BCRP in pharmacokinetics and DDI of novel statins. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(5), 234-41.

Hubáček JA, Adámková V, Zídková K, Ceska R, Zlatohlávek L, Stulc T, Horínek A, Vrablík M. Farmakogenetika léčby statiny [Statin pharmacokinetics]. *Vnitr Lek*, 2008, 54(1), 62-7.

Jacobsen W, Kuhn B, Soldner A, et al. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metab Dispos*, 2000, 28(11), 1369-1378.

Jardine A, Holdaas H. Fluvastatin in combination with cyclosporin in renal transplant recipients: a review of clinical and safety experience. *J Clin Pharm Ther*, 1999, 24(6), 397-408.

Jokubaitis LA. Development and pharmacology of fluvastatin. *Br J Clin Pract Suppl*, 1996, 77A, 11-5.



Kalliokoski A, Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(3), 693-705.

Katara, P. Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. *Interdiscip Sci Comput Life Sci*, 2014, 6, 85–92.

Katzung Bertram G. Basic & Clinical Pharmacology, 14. izdanje. McGraw-Hill Education, 2018, 4-5, 56-86.

Keskitalo JE, Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of the ABCG2 c.421C>A single nucleotide polymorphism on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, and simvastatin. *Pharmacogenomics*, 2009, 10(10), 1617–1624.

Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 2009, 86(2), 197–203.

Khan DA. Pharmacogenomics and adverse drug reactions: Primetime and not ready for primetime tests. *J Allergy Clin Immunol*, 2016, 138(4), 943-955.

Klarica Domjanović I, Lovrić M, Trkulja V, Petelin-Gadže Ž, Ganoci L, Čajić I, Božina N. Interaction between ABCG2 421C>A polymorphism and valproate in their effects on steady-state disposition of lamotrigine in adults with epilepsy. *Br J Clin Pharmacol*, 2018, 84(9), 2106-2119.

König, J., Cui, Y., Nies, A.T., Keppler, D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278, 156–164.

Krivokapić, S. Implementacija podataka o farmakogenomici u informacije o lijeku. Završni specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(2-3), 95-125.

LaRosa, J.C. et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease. *N Engl J Med*, 2005, 352, 1425-35.

Launay-Vacher V, Izzedine H, Deray G. Statins' dosage in patients with renal failure and cyclosporine drug-drug interactions in transplant recipient patients. *Int J Cardiol*, 2005, 101, 9-17.

Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 1998, 279, 1200-05.

Lee E, Ryan S, Birmingham B, Zalikowski J, March R, Ambrose H, Moore R, Lee C, Chen Y, Schneck D. Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in white and Asian subjects residing in the same environment. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 78(4), 330-41.

Lennernäs H, Fager G. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. Similarities and differences. *Clin Pharmacokinet*, 1997, 32(5), 403-25.

Lesko LJ, Schmidt S. Individualization of drug therapy: history, present state, and opportunities for the future. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92(4), 458-66.

Li PK, Mak TW, Wang AY, Lee YT, Leung CB, Lui SF, Lam CW, Lai KN. The interaction of fluvastatin and cyclosporin A in renal transplant patients. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1995, 33(4), 246-8.

Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, Peeters PC, Dratwa M, Stolear JC, Lameire NH. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(5), 967-76.

Low SK, Fukunaga K, Takahashi A, Matsuda K, Hongo F, Nakanishi H, Kitamura H, Inoue T, Kato Y, Tomita Y, Fukasawa S, Tanaka T, Nishimura K, Uemura H, Hara I, Fujisawa M, Matsuyama H, Hashine K, Tatsugami K, Enokida H, Kubo M, Miki T, Mushiroda T.

Association Study of a Functional Variant on ABCG2 Gene with Sunitinib-Induced Severe Adverse Drug Reaction. *PLoS One*, 2016, 11(2), e0148177.

Lucas RA, Weathersby BB, Rocco VK, Pepper JM, Butler KL. Rhabdomyolysis associated with cerivastatin: six cases within 3 months at one hospital. *Pharmacotherapy*, 2002, 22(6), 771-4.

Ma, M. K., Woo, M. H., McLeod, H. L. Genetic basis of drug metabolism. *Am J Health Syst Pharm*, 2002, 59(21), 2061–2069.

Malki MA, Pearson ER. Drug-drug-gene interactions and adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J*, 2020, 20(3), 355-366.

Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J*, 2015, 17(1), 65-82.

Marciante, K.D. et al. Cerivastatin, genetic variants, and the risk of rhabdomyolysis. *Pharmacogenet Genomics*, 2011, 21, 280-8.

Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, et al. Metabolism, excretion, and pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy adult male volunteers. *Clin Ther*, 2003, 25, 2822 -35.

Martin PD, Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 2002, 54, 472 -7.

Marusic S, Lisicic A, Horvatic I, Bacic-Vrca V, Bozina N. Atorvastatin-related rhabdomyolysis and acute renal failure in a genetically predisposed patient with potential drug-drug interaction. *Int J Clin Pharm*, 2012, 34(6), 825-7.

Meyer UA. Interaction of proton pump inhibitors with cytochromes P450: consequences for drug interactions. *Yale J Biol Med*, 1996, 69(3), 203–9.

Mirosevic Skvrce N. Utjecaj farmakogenetičkih varijacija metaboličkih enzima i transportnih proteina na nastanak nuspojava inhibitora 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, 2014.

Mirosevic Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolić Šarinic V. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics*, 2013, 14(12), 1419-31.

Mirosević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Muačević Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(8), 803-15.

Mortarino M, Franceschi A, Mancianti F, Bazzocchi C, Genchi C, Bandi C. PCR quantitativa nella diagnosi di Leishmania [Quantitative PCR in the diagnosis of Leishmania]. *Parassitologia*, 2004, 46(1-2), 163-7.

Mukai Y, Narita M, Akiyama E, Ohashi K, Horiuchi Y, Kato Y, Toda T, Rane A, Inotsume N. Co-administration of Fluvastatin and CYP3A4 and CYP2C8 Inhibitors May Increase the Exposure to Fluvastatin in Carriers of CYP2C9 Genetic Variants. *Biol Pharm Bull*, 2017, 40(7), 1078-1085.

Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(1), 157-81.

Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y. Polymorphisms of OATP-C

(SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 73(6), 554-65.

Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 82(6), 726-733.

PCR Fact Sheet, [www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet](http://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet), pristupljeno 3.4.2021.

PharmGKB: About us, 2021., [www.pharmgkb.org/about](http://www.pharmgkb.org/about), pristupljeno 2.4.2021.

Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol*, 2001, 52(4), 345–347.

Plečko, A. Farmakogenetika klopidogrela. Završni specijalistički rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.

Polymerase Chain Reaction (PCR), [www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr](http://www.khanacademy.org/science/ap-biology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/polymerase-chain-reaction-pcr), pristupljeno 2.4.2021.

Polymerase Chain Reaction (PCR), [www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr), pristupljeno 2.4.2021.

Prueksaritanont T, Gorham LM, Breslin MJ, Hutchinson JH, Hartman GD, Vyas KP, Baillie TA. In vitro and in vivo evaluations of the metabolism, pharmacokinetics, and bioavailability of ester prodrugs of L-767,679, a potent fibrinogen receptor antagonist: an approach for the selection of a prodrug candidate. *Drug Metab Dispos*, 1997, 25(8), 978-84.

Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, 56(1), 120-4.

Real-time PCR Handbook, Life Technologies, [www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf](http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf), pristupljeno 3.4.2021.

Reinoso RF, Sánchez Navarro A, García MJ, Prous JR. Preclinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2002, 24(9), 593-613.

Riedmaier S, Klein K, Winter S, Hofmann U, Schwab M, Zanger UM. Paraoxonase (PON1 and PON3) polymorphisms: impact on liver expression and atorvastatin-lactone hydrolysis. *Front Pharmacol*, 2011, 2, 41.

Robey, R.W. et al. ABCG2: a perspective. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61, 3–13.

Ronaldson, K.J., O'Shea, J.M., Boyd, I.W. Risk factors for rhabdomyolysis with simvastatin and atorvastatin. *Drug Saf*, 2006, 29, 1061-7.

Rosuvastatin, [www.go.drugbank.com/drugs/DB01098](http://www.go.drugbank.com/drugs/DB01098), pristupljeno 17.3.2021.

Rowan, C. et al. Rhabdomyolysis reports show interaction between simvastatin and CYP3A4 inhibitors. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2009, 18, 301-9.

Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*, 1996, 335(14), 1001-9.

Safar Z, Kis E, Erdo F, Zolnerciks JK, Krajcsi P. ABCG2/BCRP: variants, transporter interaction profile of substrates and inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2019, 15(4), 313-328.

Saito M, Hirata-Koizumi M, Miyake S, Hasegawa R. Withdrawal of cerivastatin revealed a flaw of post-marketing surveillance system in the United States. *Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku*, 2005, 123, 41-5.

Sakiyama M, Matsuo H, Takada Y, Nakamura T, Nakayama A, Takada T, et al. Ethnic differences in ATP-binding cassette transporter, sub-family G, member 2 (ABCG2/BCRP): genotype combinations and estimated functions. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2014, 29, 490–2.

Sarkadi B, Homolya L, Hegedűs T. The ABCG2/BCRP transporter and its variants - from structure to pathology. *FEBS Lett*, 2020, 594(23), 4012-4034.

Scarpini F, Cappellone R, Auteri A, Puccetti L. Role of genetic factors in statins side-effects. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2012, 12(1), 35–43.

Schachter M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*, 2005, 19(1), 117-25.

Schech, S. et al. Risk factors for statin-associated rhabdomyolysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2007, 16, 352-8.

Schirris TJ, Ritschel T, Bilos A, Smeitink JA, Russel FG. Statin Lactonization by uridine 50-Diphospho-glucuronosyltransferases (UGTs). *Mol Pharm*, 2015, 12(11), 4048-4055.

Scripture CD, Pieper JA. Clinical pharmacokinetics of fluvastatin. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40(4), 263-81.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med*, 1995, 333(20), 1301-7.

Shitara Y. Clinical importance of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011, 26(3), 220-7.

Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(1), 71-105.

Simvastatin, [www.go.drugbank.com/drugs/DB00641](http://www.go.drugbank.com/drugs/DB00641), pristupljeno 15.3.2021.

Simvastatin, [www.medchemexpress.com/Simvastatin.html](http://www.medchemexpress.com/Simvastatin.html), pristupljeno 10.3.2021.

Sirtori, C. R. The pharmacology of statins. *Pharmacological Research*, 2014, 88, 3–11.

Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med*, 2002, 346(7), 539-40.

Stern RH, Yang BB, Horton M, Moore S, Abel RB, Olson SC. Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *J Clin Pharmacol*, 1997, 37(9), 816-9.

Tamraz B, Fukushima H, Wolfe AR, Kaspera R, Totah RA, Floyd JS, Ma B, Chu C, Marciante KD, Heckbert SR, Psaty BM, Kroetz DL, Kwok PY. OATP1B1-related drug-drug and drug-gene interactions as potential risk factors for cerivastatin-induced rhabdomyolysis. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(7), 355-64.

Taqman vs. SYBR Green Chemistries, <https://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx>, pristupljeno 3.4.2021.

Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA*, 2003, 289(13), 1681-90.

Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem*, 2001, 276(38), 35669-75.

Toyoda Y, Takada T, Suzuki H. Inhibitors of Human ABCG2: From Technical Background to Recent Updates With Clinical Implications. *Front Pharmacol*, 2019, 10, 208.



Transon C, Leemann T, Dayer P. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol*, 1996, 50(3), 209-15.

Treiber A, Schneider R, Häusler S, Stieger B. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(8), 1400-7.

Turner RM, Pirmohamed M. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *J Clin Med*, 2019, 9(1), 22.

Turner RM, Fontana V, FitzGerald R, Morris AP, Pirmohamed M. Investigating the clinical factors and comedications associated with circulating levels of atorvastatin and its major metabolites in secondary prevention. *Br J Clin Pharmacol*, 2020, 86(1), 62-74.

Turner RM, Radman I, Bozina N, Alfirovic A. Pharmacogenetics and statin-related myopathy: what do we know? *Pharmacogenomics*, 2020, 21(12), 821-825.

Verbeurgt P, Mamiya T, Oesterheld J. How common are drug and gene interactions? Prevalence in a sample of 1143 patients with CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 genotyping. *Pharmacogenomics*, 2014, 15(5), 655-65.

What is CPIC?, 2021., <https://cpicpgx.org/>, pristupljeno 27.3.2021.

Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, Maxwell WD, McLeod HL, Voora D, Krauss RM, Roden DM, Feng Q, Cooper-Dehoff RM, Gong L, Klein TE, Wadelius M, Niemi M. Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC). The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92(1), 112-7.

Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem*, 2003, 4(11), 1120-8.

Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet*, 2002, 41(5), 343-70.

Wooltorton, E. Bayer pulls cerivastatin (Baycol) from market. *CMAJ*, 2001, 165, 632.

Zeiser R. Immune modulatory effects of statins. *Immunology*, 2018, 154(1), 69-75.

## 7. SAŽETAK

Prema podacima WHO-a, koronarna arterijska bolest (CAD) postala je jednom od najvećih „ubojica“ suvremenog svijeta. Dislipidemija, odnosno povišene razine ukupnog kolesterola, lipoproteina niske gustoće (LDL), triglicerida (TG) ili snižene razine lipoproteina visoke gustoće (HDL), smatra se jednim od kritičnih čimbenika za razvoj CAD-a. U posljednje su vrijeme statini najšire propisivani lijekovi u prevenciji i terapiji CAD-a i ishemijskog inzulta. Štoviše, oni dokazano smanjuju morbiditet i mortalitet snižavanjem razine LDL - kolesterola u krvnoj plazmi. Međutim, statini uzrokuju mnoge ozbiljne nuspojave, poput miopatije i rabdomiolize. Štoviše, kako se statini koriste u dugotrajnoj terapiji kroničnih bolesti, velik je i rizik od nuspojava kao posljedice interakcija s drugim lijekovima u politerapiji. Također, utvrđene su velike interindividualne razlike u smanjenju razina LDL - kolesterola te u incidenciji ADR-a prilikom terapije statinima.

Postoje čvrsti znanstveni dokazi o važnosti membranskih prijenosnika OATP1B1 i BCRP u farmakokinetici statina. Oba transportera pokazuju značajnu genetičku varijabilnost, a učestalost polimorfizama *SLCO1B1* 521T>C i *ABCG2* 421C>A ima veliku i populacijsku i rasnu varijabilnost. Varijantni je alel *SLCO1B1* 521C najučestaliji u europskoj (16 %), azijskoj (12 %) i afričkoj populaciji (1 %). Varijantni alel *ABCG2* 421A je najučestaliji u Azijata (30 %), zatim u bjelačkoj populaciji (10-15 %), dok je najrjeđi u afričkoj populaciji (2 %). Rezultati ustanovljeni u populaciji Hrvatske u skladu su s rezultatima dobivenima za druge europske, bjelačke populacije. Polimorfizmi gena povezuju se s varijabilnom kinetikom, ali i podložnosti razvoja neželjenih učinaka lijekova supstrata, jer varijabilna aktivnost u prijenosu lijekova preko barijera u probavnom sustavu, na barijeri jetra-žuč te tubulima bubrega u slučaju BCRP, te unos lijeka u jetra putem OATP1B1 mogu značajno modulirati apsorpciju, distribuciju i izlučivanje lijekova-supstrata. Stoga analiza polimorfizama *SLCO1B1* i *ABCG2* može poslužiti u individualizaciji i optimizaciji liječenja statinima te minimalizaciji rizika razvoja nuspojava, prvenstveno miotoksičnosti i hepatotoksičnosti.

## 7. SUMMARY

According to the WHO, coronary artery disease (CAD) has become one of the greatest „killers“ of the modern world. Dyslipidemia, or elevated levels of total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), triglycerides (TG), or decreased levels of high density lipoprotein (HDL), is considered one of the critical factors for the development of CAD. Recently, statins have been the most widely prescribed drugs in the prevention and treatment of CAD and of ischemic stroke. Moreover, it is proved that they reduce morbidity and mortality by lowering LDL cholesterol levels in the blood plasma. On the other side, statins may cause many serious side effects, such as myopathy and rhabdomyolysis. Moreover, as statins are used in the long-term therapy of chronic diseases, there is a high risk of side effects as a consequence of interactions with other drugs in polytherapy. Also, great interindividual differences were found in the reduction of LDL-cholesterol levels and in the incidence of ADR during statin therapy.

There is a strong scientific evidence of the importance of OATP1B1 and BCRP membrane transporters in statin pharmacokinetics. Both transporters show significant genetic variability, and the frequency of polymorphisms *SLCO1B1* 521T>C and *ABCG2* 421C>A has great both population and racial variability. The variant allele *SLCO1B1* 521C is most common in the European (16 %), Asian (12 %) and African (1 %) population, while the *ABCG2* 421A variant allele is most common in Asians (30 %), followed by the white population (10 – 15 %), while it is the rarest in the African population (2 %). The results established in this study are accordant to the results obtained for other European, white populations. Gene polymorphisms are associated with variable kinetics, but also the susceptibility to the development of adverse drug reactions of the substrate, because variable activity in drug transport across barriers in the digestive system, liver-bile barrier, renal tubules in case of BCRP, and drug intake in the liver via OATP1B1 can significantly modulate the absorption, distribution and excretion of substrate drugs. Therefore, the analysis of *SLCO1B1* and *ABCG2* polymorphisms can serve to individualize and optimize statin treatment and minimize the risk of side effects, primarily myotoxicity and hepatotoxicity.

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## POLIMORFIZMI GENA *ABCG2* I *SLCO1B1* KAO RIZIČNI ČIMBENICI TERAPIJE STATINIMA

Ena Karačić

### SAŽETAK

Prema podacima WHO-a, koronarna arterijska bolest (CAD) postala je jednom od najvećih „ubojica“ suvremenog svijeta. Dislipidemija, odnosno povišene razine ukupnog kolesterola, lipoproteina niske gustoće (LDL), triglicerida (TG) ili snižene razine lipoproteina visoke gustoće (HDL), smatra se jednim od kritičnih čimbenika za razvoj CAD-a. U posljednje su vrijeme statini najšire propisivani lijekovi u prevenciji i terapiji CAD-a i ishemijskog infarkta. Štoviše, oni dokazano smanjuju morbiditet i mortalitet snižavanjem razine LDL - kolesterola u krvnoj plazmi. Međutim, statini uzrokuju mnoge ozbiljne nuspojave, poput miopatije i rhabdomiolize. Štoviše, kako se statini koriste u dugotrajnoj terapiji kroničnih bolesti, velik je i rizik od nuspojava kao posljedice interakcija s drugim lijekovima u politerapiji. Također, utvrđene su velike interindividualne razlike u smanjenju razina LDL - kolesterola te u incidenciji ADR-a prilikom terapije statinima.

Postoje čvrsti znanstveni dokazi o važnosti membranskih prijenosnika OATP1B1 i BCRP u farmakokinetici statina. Oba transportera pokazuju značajnu genetičku varijabilnost, a učestalost polimorfizama *SLCO1B1* 521T>C i *ABCG2* 421C>A ima veliku i populacijsku i rasnu varijabilnost. Varijantni je alel *SLCO1B1* 521C najučestaliji u europskoj (16 %), azijskoj (12 %) i afričkoj populaciji (1 %). Varijantni alel *ABCG2* 421A je najučestaliji u Azijata (30 %), zatim u bjelačkoj populaciji (10-15 %), dok je najrjeđi u afričkoj populaciji (2 %). Rezultati ustanovljeni u populaciji Hrvatske u skladu su s rezultatima dobivenima za druge europske, bjelačke populacije. Polimorfizmi gena povezuju se s varijabilnom kinetikom, ali i podložnosti razvoja neželjenih učinaka lijekova supstrata, jer varijabilna aktivnost u prijenosu lijekova preko barijera u probavnom sustavu, na barijeri jetra-žuč te tubulima bubrega u slučaju BCRP, te unos lijeka u jetra putem OATP1B1 mogu značajno modulirati apsorpciju, distribuciju i izlučivanje lijekova-supstrata. Stoga analiza polimorfizama *SLCO1B1* i *ABCG2* može poslužiti u individualizaciji i optimizaciji liječenja statinima te minimalizaciji rizika razvoja nuspojava, prvenstveno miotoksičnosti i hepatotoksičnosti.

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

Rad sadrži: 68 stranica, 8 grafičkih prikaza, 22 tablice i 143 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: statini, polimorfizam, OATP1B1, BCRP, genotipizacija, farmakogenomika, personalizirana medicina, nuspojave

Mentor: **Dr. sc. Nada Božina**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Božina**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Lana Ganoci**, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

Rad prihvaćen: lipanj 2021.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Master of Pharmacy  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### ***ABCG2* AND *SLCO1B1* GENE POLYMORPHISMS AS RISK FACTORS TO STATIN THERAPY**

**Ena Karačić**

#### **SUMMARY**

According to the WHO, coronary artery disease (CAD) has become one of the greatest „killers“ of the modern world. Dyslipidemia, or elevated levels of total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), triglycerides (TG), or decreased levels of high density lipoprotein (HDL), is considered one of the critical factors for the development of CAD. Recently, statins have been the most widely prescribed drugs in the prevention and treatment of CAD and of ischemic stroke. Moreover, it is proved that they reduce morbidity and mortality by lowering LDL cholesterol levels in the blood plasma. On the other side, statins may cause many serious side effects, such as myopathy and rhabdomyolysis. Moreover, as statins are used in the long-term therapy of chronic diseases, there is a high risk of side effects as a consequence of interactions with other drugs in polytherapy. Also, great interindividual differences were found in the reduction of LDL-cholesterol levels and in the incidence of ADR during statin therapy.

There is a strong scientific evidence of the importance of OATP1B1 and BCRP membrane transporters in statin pharmacokinetics. Both transporters show significant genetic variability, and the frequency of polymorphisms *SLCO1B1* 521T>C and *ABCG2* 421C>A has great both population and racial variability. The variant allele *SLCO1B1* 521C is most common in the European (16 %), Asian (12 %) and African (1 %) population, while the *ABCG2* 421A variant allele is most common in Asians (30 %), followed by the white population (10 – 15 %), while it is the rarest in the African population (2 %). The results established in this study are accordant to the results obtained for other European, white populations. Gene polymorphisms are associated with variable kinetics, but also the susceptibility to the development of adverse drug reactions of the substrate, because variable activity in drug transport across barriers in the digestive system, liver-bile barrier, renal tubules in case of BCRP, and drug intake in the liver via OATP1B1 can significantly modulate the absorption, distribution and excretion of substrate drugs. Therefore, the analysis of *SLCO1B1* and *ABCG2* polymorphisms can serve to individualize and optimize statin treatment and minimize the risk of side effects, primarily myotoxicity and hepatotoxicity.

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

Thesis includes: 68 pages, 8 figures, 22 tables and 143 references. Original is in Croatian language.

Keywords: statins, polymorphism, OATP1B1, BCRP, genotyping, pharmacogenomics, personalized medicine, adverse drug reactions

Mentor: **Nada Božina, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb School of Medicine  
**Karmela Barišić, Ph.D.**, *Full Professor with tenure*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Božina, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb School of Medicine  
**Karmela Barišić, Ph.D.**, *Full Professor with tenure*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Lana Ganoci, Ph.D.**, *Analytical Toxicology Specialist*, University Hospital Centre Zagreb

The thesis was accepted: June 2021.

