

# Implementacija farmakogenetike za 5-fluorouracil i irinotekan u Hrvatskoj

---

Begić, Ana

Professional thesis / Završni specijalistički

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:163:709553>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Begić

**IMPLEMENTACIJA FARMAKOGENETIKE ZA 5-FLUOROURACIL I IRINOTEKAN  
U HRVATSKOJ**

Specijalistički rad

Zagreb, 2021.

PSS studij: Molekularna dijagnostika

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nada Božina

Specijalistički rad obranjen je dana 29. rujna 2021. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Karmela Barišić
2. izv. prof. dr. sc. Nada Božina
3. izv. prof. dr. sc. Zrinka Rajić

Rad ima 41 stranicu.

## SAŽETAK

### CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj je ovoga specijalističkog rada prikupiti i kritički procijeniti relevantne podatke koji se odnose na utjecaj genskih varijanti na ishode terapije 5-fluorouracilom i irinotekanom, prikazati upute i smjernice izdane od međunarodnih tijela, te prisutne dileme u liječenju.

### MATERIJALI I METODE

Za potrebe istraživanja i pisanja rada od dostupnih baza podataka pretraživane su baze podataka Medline i PubMed prema ključnim riječima: 5-fluorouracil, dihidropirimidin-dehidrogenaza, farmakogenetika, genski polimorfizmi i irinotekan. Odabir znanstvenih članaka publiciranih u posljednjem desetljeću obuhvaća važnije članke iz područja farmakogenetike, farmakogenomike i farmakoterapije, starije i novije objave, originalne članke kao i preglede koji zadovoljavaju tematiku i ciljeve istraživanja postavljene u radu.

U radu su također prikazani i podatci o implementaciji testiranja *DPYD* i *UGT1A1* u Hrvatskoj dobiveni u okviru doktorske disertacije dr.sc. Ivana Bilića 'Uloga polimorfizama gena dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-glukuronil-transferaze u toksičnosti kemoterapije fluoropirimidinima i irinotekanom'. U tu svrhu prikazan je pregled rutinskih analiza pacijenata liječenih 5-fluorouracilom i irinotekanom tijekom tri godine (2013.-2016.) u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

## RASPRAVA

Bolesnici s toksičnim nuspojavama na fluoropirimidine i irinotekan češće su nositelji polimorfizama gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu, između ostalih to su *DPYD*\*2A (*c.1905+1G>A* ili *IVS 14+1 G>A*), *DPYD 496A>G* (*c.496A>G*), te polimorfizma *UGT1A1* (*UGT1A1*\*28), u odnosu na pacijente koji nisu iskusili nuspojave. Na temelju farmakogenetičkih analiza može se u značajnoj mjeri predvidjeti razvoj nuspojave, individualizirati, tj. prilagoditi doza lijeka i time minimalizirati rizik od nastanka štetnih učinaka.

## ZAKLJUČAK

Iako postoje jasni dokazi o vrijednosti farmakogenetičkih testiranja, njihova implementacija u svakodnevnu kliničku praksu zaostaje za tim spoznajama. Poznavanje genskih polimorfizama ne može apsolutno predvidjeti sve neočekivane reakcije pacijenta ali može značajno doprinijeti individualizaciji terapije te minimalizaciji rizika.

## SUMMARY

### OBJECTIVES

The purpose of this specialist thesis is to collect and critically evaluate relevant data related to the influence of 5-fluorouracil and irinotecan gene variants on the outcome of therapy, to present current guidelines issued by relevant international bodies, and dilemmas in the treatment.

### MATERIALS AND METHODS

For research and writing purposes, Medline and PubMed databases were searched for by following keywords: 5-fluorouracil, dihydropyrimidine-dehydrogenase, pharmacogenetics, gene polymorphisms and irinotecan. The selection of scientific articles published in the last decade includes the most important articles in the field of pharmacogenetics, pharmacogenomics and pharmacotherapy, older and newer releases, original articles and reviews that meet the topic and goals of the research set in this thesis.

This paper presents the latest data on the implementation of *DPYD* and *UGT1A1* testing in Croatia obtained within the doctoral dissertation of Ivan Bilić 'The role of dihydropyrimidine-dehydrogenase and UDP-glucuronyl-transferase polymorphisms in fluoropyrimidine and irinotecan toxicity'. For this purpose, the routine analyses of patients treated with 5-fluorouracil and irinotecan during the three years period (2013.-2016.), at the Clinical Institute for Laboratory Diagnosis at Zagreb Clinical Hospital Center have been presented.

## DISCUSSION

Patients with toxic side effects of fluoropyrimidines and irinotecan are more frequent carriers of dihydropyrimidine-dehydrogenase genomic polymorphisms, among others *DPYD\*2A* (*1905 + 1G > A or IVS 14+1G > A*), *DPYD 496A > G* (*c.496A > G*) and *UGT1A1* polymorphism (*UGT1A1\*28*), compared to patients who do not experience side effects. Based on pharmacogenetic analysis, it is possible to significantly anticipate the development of side effects, to individualize, i.e. to adjust the dose of the drug and minimize the risk of side effects.

## CONCLUSION

Although there is a clear evidence of pharmacogenetic testing values, the implementation in everyday clinical practice is lagging behind these findings. Knowledge of gene polymorphisms cannot predict all unexpected responses of the patient, but can significantly contribute to the individualization of the therapy and minimizing the risk.

# SADRŽAJ

1	UVOD	
	1.1 Farmakogenetika i farmakogenomika.....	1
	1.2 Fluoropirimidini.....	3
	1.3 Metabolizam 5-fluorouracila.....	4
	1.3.1 Anabolizam 5-fluorouracila.....	4
	1.3.2 Katabolizam 5-fluorouracila.....	6
	1.3.3 Mehanizam djelovanja 5-fluorouracila.....	6
	1.3.4 Farmakogenomika fluoropirimidina.....	7
	1.3.5 Nefunkcionalne inačice gena dihidropirimidin dehidrogenaze.....	9
	1.3.6 Nasljeđivanje smanjene DPD aktivnosti.....	13
	1.4 Metabolizam i toksičnost irinotekana.....	13
2	CILJ ISTRAŽIVANJA.....	17
3	MATERIJALI I METODE.....	18
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	21
	4.1 Smjernice za doziranje 5-fluorouracila.....	22
	4.1.1 Smjernice Nizozemske farmakogenetičke radne skupine.....	22
	4.1.2 Smjernice Konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC).....	25
	4.1.3 Dostupne mogućnosti genskog testiranja.....	26
	4.1.4 Preporuke doziranja.....	27
	4.1.5 Potencijalne prednosti i rizici za pacijente.....	29
	4.1.6 Prikladna primjena i/ili potencijalna zlouporaba genskih testova.....	29
	4.1.7 Razlike u preporukama DPWG i CPIC.....	30
	4.2 Smjernice za Irinotekan i <i>UGT1A1</i> .....	30
	4.2.1 RNPGx preporuke.....	30
	4.2.2 DPWG smjernice za irinotekan.....	31
	4.2.3 Izjava američke Agencije za hranu i lijekove (FDA).....	32
	4.2.4 Trenutne preporuke za genotipizaciju <i>UGT1A1</i> u svakodnevnoj praksi.....	32
	4.2.5 Gensko testiranje za doziranje irinotekana.....	34
4	ZAKLJUČAK.....	35
6	LITERATURA.....	36
7	ŽIVOTOPIS.....	42



# **1. UVOD**

## 1.1 Farmakogenetika i farmakogenomika

Farmakogenetika je znanstvena disciplina i grana kliničke farmakologije koja obuhvaća istraživanje odnosa lijeka i genskog nasljeđa pojedinca ili skupine te opisuje interakcije između karakteristika lijeka i pojedinaca, koje u većoj ili manjoj mjeri mogu biti povezane s urođenim osobinama. Temelji se na opažanjima kliničke učinkovitosti i/ili profilu sigurnosti i podnošljivosti lijeka kod pojedinaca (fenotip) i promatranja moguće povezanosti interindividualnih varijabilnosti u promatranom odgovoru sa prisutnošću ili odsutnošću pojedinačnih bioloških biljega (1). Cilj je poboljšati terapiju maksimizirajući učinak lijeka temeljem sekvenci određenih gena pacijenta, kako bi se lijekovi ciljano davali pacijentima koji će na njih pozitivno reagirati ili kako bi se izbjegle neželjene reakcije na lijek. Jedno od prvih velikih opažanja o genskim varijacijama koje utječu na odgovor na lijekove datira iz 1950.-ih, a uključuje miorelaksans suksametonij klorid i lijekove koji su metabolizirani N-acetiltransferazom (2). Jedan od 3500 ispitanika bjelačke populacije imao je manje učinkovitu varijantu enzima (butirilkinolinesteraza) koji metabolizira suksametonij klorid. Kao posljedica toga fenotipa učinak lijeka je produljen uz sporiji oporavak ispitanika od kirurške paralize. Pacijenti koji imaju normalnu aktivnost N-acetiltransferaze definirani su kao „brzi acetilatori“, a oni smanjene aktivnosti „spori acetilatori“.

Dok se farmakogenetika bavi odnosom polimorfizama pojedinih gena i učinka lijeka tj. strukturnim varijacijama gena, farmakogenomika je mnogo širi pojam i uključuje istraživanje cjelokupnog genoma kako bi se procijenilo više determinanti odgovora na lijekove. Ovi se pojmovi često koriste naizmjenično, no razvoj farmakogenetike u farmakogenomiku odraz je tehničkih napredaka kao što su razvoj metoda za visoko propusni genski probir što je omogućilo procjenjivanje varijantnih struktura u mnogim genima istovremeno.

Farmakogenomika također uključuje primjenu genomske tehnologije za identificiranje genskih varijanti koje utječu na djelotvornost i toksičnost lijeka, za utvrđivanje novih terapijskih meta i optimiziranje postojećih farmakoterapijskih protokola.

Farmakogenetička ispitivanja korisna su u različitim fazama razvoja lijeka jer mogu identificirati ulogu polimorfizama ciljnih molekula lijekova na učinkovitost farmakoterapije. Mnogi režimi liječenja kao što su kemoterapija i liječenje oralnim antikoagulantima vođeni su farmakogenetičkim statusom pacijenta u svrhu izbjegavanja toksičnosti i neuspješnog liječenja.

U kliničkim ispitivanjima, farmakogenetički testovi mogu se koristiti za stratifikaciju pacijenata prema njihovom genotipu povezanom sa sposobnošću unosa, djelovanja na ciljnu metu i metaboliziranja lijekova. Time se mogu minimalizirati pojave teških nuspojava i poboljšati ishodi liječenja.

Farmakogenomika se također može koristiti za identifikaciju ciljane populacije koja bi imala najviše koristi od lijeka. Tipičan primjer je povezanost polimorfizama u apolipoproteinu E (APOE), kolesterol ester transfer proteinu CETP, stromelizin-1 i  $\beta$ -fibrinogenu s progresijom ateroskleroze, kardiovaskularnih događaja i smrti. Dokazano je da ljudi s takvim polimorfizmima imaju najveću korist od HMG-CoA inhibitora, za razliku od onih bez polimorfizama (3).

Prije pojave farmakogenetike i farmakogenomike, djelotvornost i sigurnost kliničkih ispitivanja bili su slabo predvidljivi, a kao najčešći razlog prestanka kliničkog ispitivanja navodi se upravo taj nedostatak. Posebice je kritična faza III kliničkih ispitivanja koja se provodi na većoj populaciji ispitanika te koristi vrlo veliki udio resursa. Budući da su predvidljivost sigurnosti i učinkovitosti lijeka pod utjecajem genetičkog statusa pojedinca, farmakogenetičkim istraživanjima ti parametri dovedeni su na značajnu razinu.

Farmakogenomika posljedično može dovesti do ukupnog smanjenja troškova zdravstvene zaštite zbog smanjenja: broja nuspojava, broja neuspjelih ispitivanja lijekova, vremena potrebnog za dobivanje odobrenja za lijek, trajanja terapije i bržeg pronalaska učinkovite terapije (4).

## 1.2 Fluoropirimidini

Fluoropirimidini pripadaju skupini antimetabolitnih lijekova koji se naširoko upotrebljavaju u liječenju raka uključujući karcinom debelog crijeva, rak dojke i karcinom dišnih puteva (5). Antimetaboliti su među prvim otkrivenim učinkovitim kemoterapijskim lijekovima, a u njih ubrajamo analoge folne kiseline (metotreksat), pirimidina (5-fluorouracil, 5-fluorodeoksiuridin, citarabin) i purina (merkaptopurin, tiogvanin, pentostatin, kladribin).

Fluoropirimidini imaju sličnu kemijsku strukturu kao molekule koje ljudski organizam koristi u sintezi nukleinskih kiselina (DNA i RNA), ali se i dovoljno razlikuju što dovodi do ometanja uobičajenog funkcioniranja stanica. Kao i ostali antimetaboliti, induciraju staničnu smrt tijekom S faze rasta stanica ako su ugrađeni u DNA i RNA ili inhibiraju enzime potrebne za proizvodnju nukleinske kiseline. Kako se stanice raka dijele brže u usporedbi s normalnim stanicama, antimetaboliti utječu na sintezu nukleinskih kiselina, a time i na umnožavanje stanica raka više nego što utječu na umnožavanje normalnih stanica.

Fluoropirimidini su otkriveni 1954. godine kada su Abraham Cantarow i Karl Paschkis uočili da tumori jetre apsorbiraju radioaktivni uracil lakše nego zdrave stanice jetre što je navelo Charlesa Heidelberga na zaključak da bi antimetabolit koji nalikuje uracilu pokazao selektivnost u inhibiranju rasta tumora. Charles Heidelberger, Robert Duschinsky i Edward Plevin 1957. godine sintetizirali su analog uracila s atomom fluora na položaju C-5 i nazvali ga 5-fluorouracil (5-FU) (6). Kemoterapeutski lijek 5-FU djeluje na nekoliko načina, ali primarno blokira enzim koji prevodi nukleotid citozin u deoksi derivat. Uz to, sinteza DNA je dodatno inhibirana jer 5-FU blokira ugradnju timidinskog nukleotida u lanac DNA.

Od njihovog otkrića, fluoropirimidini, a posebice 5-FU, imaju značajnu ulogu u standardnim kemoterapeutskim režimima za liječenje velikog broja solidnih tumora. U kliničkoj primjeni osim 5-FU-a trenutno se koriste i kapecitabin i tegafur, aktivni prolijekovi fluorouracila. Između 10-40 % pacijenata razvija ozbiljnu i potencijalno životno opasnu toksičnost tijekom liječenja fluoropirimidinom (7) koja obično dovodi do prekida potencijalno učinkovite antitumorske terapije te često zahtijeva hospitalizaciju. Interindividualne varijabilnosti u pojavi i ozbiljnosti nuspojava kod pacijenata liječenim fluoropirimidinima mogu se djelomično objasniti kliničkim čimbenicima, kao što su dob i spol, no velika varijabilnost nuspojava ostaje neobjašnjena (8).

### 1.3 Metabolizam 5-fluorouracila

5-FU se obično primjenjuje intravenozno pri čemu se više od 80 % lijeka metabolizira u jetri. Ima usku terapijsku širinu što rezultira malom razlikom između minimalne djelotvorne i maksimalne podnošljive doze.

Dokazano je da se 80 % do 85 % 5-FU-a katabolizira u neaktivne metabolite u jetri gdje je enzim dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) najviše eksprimiran, a samo 1 % do 3 % izvorne doze 5-FU-a ostvaruje citotoksične učinke na tumorske stanice i normalna tkiva inhibicijom sinteze DNA i funkcije RNA (9). Iako 5-FU u kombinaciji s drugim kemoterapijskim sredstvima poboljšava stopu preživljavanja oboljelih od raka dojke, glave i vrata, najveći utjecaj ima u liječenju kolorektalnog karcinoma.

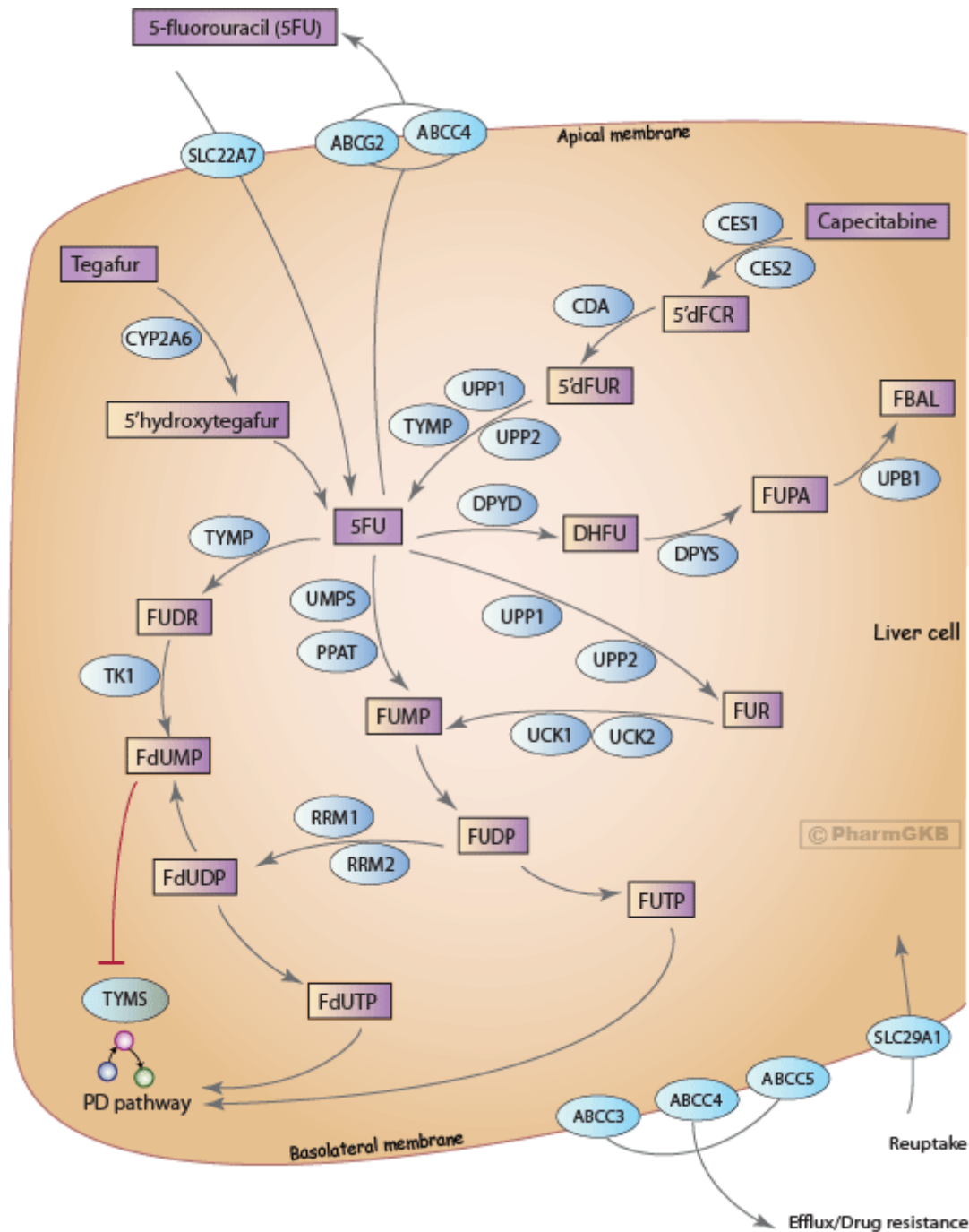
#### 1.3.1 Anabolizam 5-fluorouracila

Nakon intravenske primjene 5-FU brzo ulazi u stanice koristeći isti transportni mehanizam kao uracil (9) i prevodi se u sljedeće biološki aktivne produkte: 1) fluorouridin-trifosfat (FUTP), koji se ugrađuje u RNA umjesto uridin-trifosfata (UTP); 2) fluorodeoksiuridin-trifosfat (FdUTP), koji se ugrađuje u DNA umjesto deoksitimidin-trifosfata (dTTP); i 3) fluorodeoksiuridin-monofosfat (FdUMP) koji tvori terciarni kompleks s timidilat-sintazom (TS) i reduciranim 5,10-metil-tetrahidrofolatom ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ). FUTP uzrokuje promjene u obradi i funkciji RNA, a FdUTP i FdUMP uzrokuju oštećenje DNA; oba procesa utječu na RNA i DNA te dovode do stanične smrti.

Glavni mehanizam aktivacije 5-FU-a je pretvorba u fluoruridin-monofosfat (FUMP), bilo izravno orotat-fosforibozil-transferazom (OPRT) uz kofaktor fosforibozil-pirofosfat (PRPP) ili posredno preko intermedijera fluorouridina (FUR) uz sudjelovanje uridin-fosforilaze (UPP) i uridin-kinaze (UK) (9). Drugi put aktivacije 5-FU-a uključuje timidin-fosforilazu (TYMP), koja katalizira konverziju 5-FU-a u fluorodeoksiuridin (FUDR) koji daljnjom fosforilacijom timidin-kinazom (TK) daje aktivni metabolit FdUMP. U ovoj seriji reakcija, reakcija fosforilacije uridin-fosforilazom zahtijeva kofaktor ribozu-1-fosfat, što dovodi do sinteze FUMP. Suprotno tome, reakcija fosforilacije posredovana timidin-fosforilazom zahtijeva deoksiribozu-1-fosfat kao kofaktor, što dovodi do sinteze FdUMP.

FUMP je dalje fosforiliran u fluoruridin-difosfat (FUDP), koji je ili dalje fosforiliran u aktivni metabolit FUTP ili se prevodi u fluorodeoksiuridin-difosfat (FdUDP) djelovanjem

ribonukleotid-reduktaze (9). FdUDP se zatim dalje fosforilira u FdUTP ili se defosforilira do FdUMP, a oba spoja uzrokuju oštećenje DNA.



**Slika 1.** Biokemijski putevi aktivacije i razgradnje fluoropirimidina

Preuzeto: Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE i sur. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. Pharmacogenet Genomics. 2011;21:237-242.

### 1.3.2 Katabolizam 5-fluorouracila

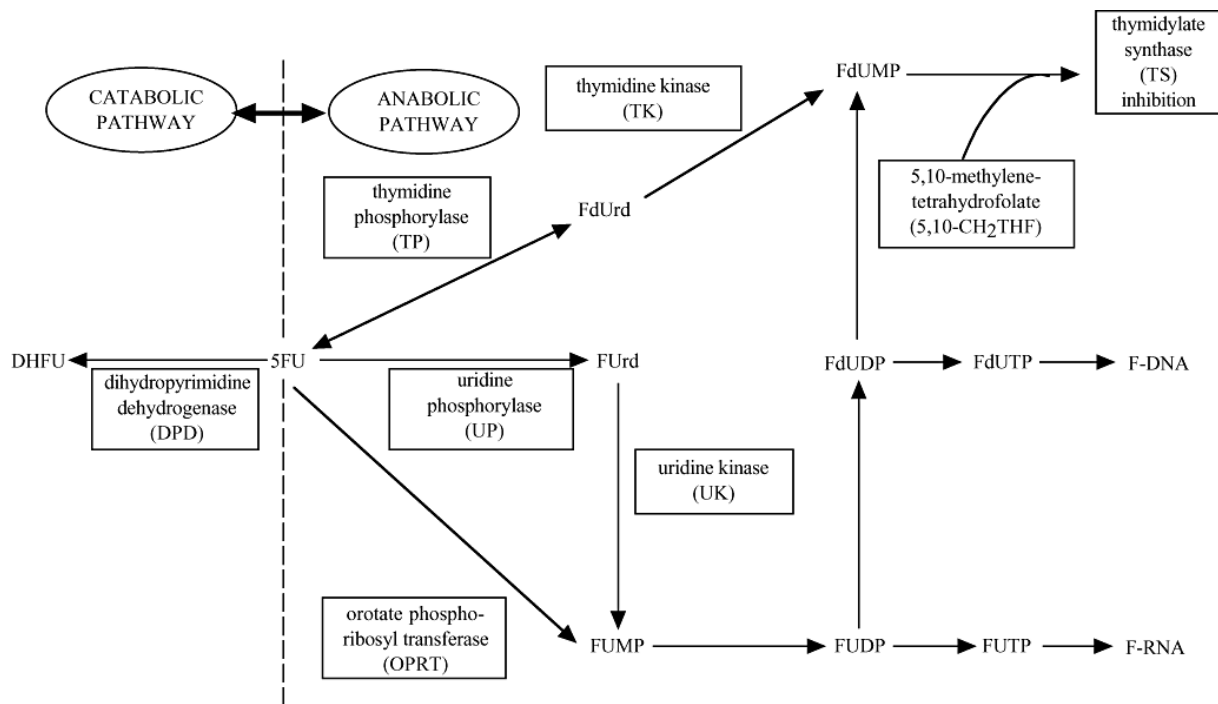
Nakon intravenozne primjene, prva faza degradacije događa se vrlo brzo. Djelovanjem dihidropirimidin-dehidrogenaze (DPD), 5-FU se reducira do 5,6-dihidro-5-fluorouracila (5-FUH<sub>2</sub>). 5-FUH<sub>2</sub> se zatim razlaže do fluoro-β-ureidopropionata (FUPA).

Treća faza dovodi do formiranja fluoro-β-alanina (FBAL), glavnog katabolita 5-FU-a. Neka istraživanja su sofisticiranim analitičkim metodama identificirala i druge 5-FU katabolite kao što su fluoridni ion (F<sup>-</sup>), N-karboksi-α-fluor-β-alanin (CFBAL), tri FBAL konjugata sa žučnim kiselinama te dva FBAL metabolita nastala transaminacijom 2-fluoro-3-hidroksipropanske kiseline (FHPA) i fluoroacetata (FAC) (9).

### 1.3.3 Mehanizam djelovanja 5-fluorouracila

Iz gornjega prikaza razvidno je da jedan od puteva metabolizma 5-FU-a daje 5-FUTP. Atom fluora koji zamjenjuje vodik na položaju 5-uracila slične je veličine, te tijekom transkripcije ovaj fluoronukleotid oponaša UTP i RNA polimeraza ga prepoznaje što dovodi do ugrađivanja 5-FU-a u RNA.

Glavni mehanizam aktivacije 5-FU-a jest konverzija u FdUMP koji inhibira enzim TS-u, uključen u sintezu DNA (10). TS je ciljna molekula za citotoksične lijekove s obzirom da je timidin jedini nukleotidni prekursor specifičan za DNA. U prisustvu kofaktora 5,10-metil-tetrahidrofolata (MTHF) koji služi kao metilni donor, TS i 2'-deoksiuridin-5'-monofosfat (dUMP) tvore tercijski kompleks koji omogućuje prijenos metilne skupine na peti ugljikov atom dUMP-a te nastaje deoksitimidin-monofosfat (dTMP). Nakon formiranja 5-FdUMP-a, metilni prijenos se ne odvija jer je atom fluora na C5 položaju 5-FdUMP-a mnogo čvršće vezan od vodika. Enzim je zatim zarobljen u reverzibilnom tercijskom kompleksu, a nastanak dTMP-a je blokiran, čime se smanjuje dostupnost dTTP-a za replikaciju i popravak DNA.



**Slika 2.** Pojednostavljeni prikaz metaboličkog puta 5-FU

Preuzeto: Shimoyama S. Pharmacogenetics of fluoropyrimidine and cisplatin. A future application to gastric cancer treatment. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009;24(6):970-81.

### 1.3.4 Farmakogenomika fluoropirimidina

Najčešće ispitivani geni u kontekstu farmakogenomike fluoropirimidina jesu dihidropirimidin-dehidrogenaza (*DPYD*), timidilat-sintaza (*TYMS*) i metilentetrahidrofolat-reduktaza (*MTHFR*).

Neke od najtežih toksičnosti fluoropirimidina uočene su zbog izostanka funkcije DPD-a (10). Najčešća *DPYD* varijanta povezana s toksičnošću fluoropirimidina je *DPYD\*2A*, G>A polimorfizam jednog nukleotida na granici 14. introna na mjestu za izrezivanje (engl. *splice recognition site*). Iako se ova mutacija javlja pri učestalosti manjoj od 1 % u bjelačkoj populaciji, *DPYD\*2A* je najčešća varijanta povezana s toksičnošću fluoropirimidina.

Genski polimorfizam *TYMS-a* također može utjecati na klinički ishod kemoterapije s 5-FU-om (11). Visoke razine TS-a u uznapredovaloj bolesti predviđaju slabiji odgovor na 5-FU terapiju i lošiju prognozu, dok je niža aktivnost TS-a povezana s boljim antitumorskim odgovorom na liječenje 5-FU-om.



Ekspresija TS-a regulirana je polimorfizmom koji je karakteriziran varijabilnim brojem tandemskih ponavljanja (dva ili tri ponavljanja) u promotorskoj regiji gena *TYMS*.

Najčešće proučavane inačice jesu ponavljanja 28 bp u 5' netranslatiranoj regiji (5'-UTR), također poznata kao TS pojačivač regija (TSER), delecija 6bp u 3'-UTR i G> C polimorfizam jednog nukleotida unutar trećeg ponavljanja TSER-a.

Veći broj ponavljanja povećava razinu ekspresije TS-a; pacijenti koji imaju homozigotni genotip s tri tandemna ponavljanja imaju višu aktivnost TS-a i manju vjerojatnost odgovora na terapiju 5-FU-om u usporedbi s pacijentima koji imaju dva tandemna ponavljanja.

Unatoč mnogim istraživanjima koja ispituju učinke tih varijanti, kontradiktorni rezultati nekoliko istraživanja pokazali su da nije razvijena jasna strategija za kliničku upotrebu.

Postoji nekoliko manjih istraživanja o farmakogenomici *MTHFR-a* i fluoropirimidina, uglavnom kod pacijenata s rakom debelog crijeva, s rasponom broja pacijenata od 43 do 331 i s vrlo oprečnim rezultatima. Najčešće proučavane varijante su *MTHFR 677C> T* i *MTHFR1298C> A*. *MTHFR677C> T* povezan je s lošijim odgovorom na terapiju ili kraćim preživljavanjem, u nekim studijama s boljim odgovorom na terapiju, dok u nekim studijama nije dokazana povezanost s utjecajem na terapiju ili preživljavanje. Slično tome, *MTHFR1298C> A*, alel A je povezan s kraćim preživljavanjem i nije imao utjecaja na terapiju u drugim studijama, a haplotip TA u obje varijante bio je povezan s lošijim odgovorom na terapiju. Ovi rezultati pokazuju da je teško uspostaviti vezu između *MTHFR* polimorfizama i kliničkih ishoda na bazi kemoterapije fluoropirimidinima.

### 1.3.5 Nefunkcionalne inačice gena dihidropirimidin-dehidrogenaze

DPD je početni enzim u razgradnji 5-FU-a i enzim koji kontrolira brzinu njegove razgradnje, te svaka promjena enzimske aktivnosti može dovesti do toksičnih učinaka 5-FU-a (12). Više od 80 % primijenjenog 5-FU-a katabolizirano je DPD-om u jetri te je stoga aktivnost DPD-a vrlo važna za određivanje učinkovitosti i toksičnosti 5-FU-a (12).

Gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu (*DPYD*) koji kodira DPD sadrži 4.399 nukleotida u 23 kodirajuća egzona koji obuhvaćaju 950 pb na kromosomu 1p22.6. Nedostatak aktivnosti DPD-a javlja se u 4–5 % populacije i rezultira smanjenjem inaktivacije 5-FU-a što može dovesti do povećanja broja aktivnih metabolita 5-FU-a te posljedično do rizika od teške pa čak i smrtonosne toksičnosti (13).

Opisano je više od 30 genskih polimorfizama u *DPYD*-u među kojima nekoliko može dovesti do smanjene funkcije ili nefunkcionalnosti DPD-a. Polimorfizmi se mogu pojaviti u heterozigotnom obliku - jedan jednonukleotidni polimorfizam (engl. *single nucleotide polymorphism, SNP*) na jednom alelu, homozigotnom obliku (dva identična SNP-a na dva alela) ili dvostruko heterozigotnom obliku (dva različita SNP-a na jednom ili dva alela). Dva različita SNP-a na dva alela rezultiraju većim smanjenjem aktivnosti DPD-a u usporedbi s heterozigotnim oblikom (13). Neki od tih polimorfizama, na temelju trenutnih saznanja, ne utječu na aktivnost DPD-a na klinički relevantan način (npr. c.85T> C, \*9A, rs 1801265, p.C29R; c.1627A> G, \*5, rs 1801159, p .I543V; c.2194G> A, \*6, rs 1801160, p.V732I), dok drugi rezultiraju smanjenom funkcijom enzima.

U kontekstu 5-FU-a, četiri polimorfizma *DPYD*-a su od primarne važnosti zbog njihove učestalosti u populaciji i utvrđenog utjecaja na funkciju enzima i rizik od toksičnosti.

Najproučavaniji polimorfizam je *DPYD*\*2A (također poznat kao rs 3918290, c.1905+1G>A ili IVS14+1G>A). To je polimorfizam jednog nukleotida koji rezultira pogreškom spajanja, preskakanju cijelog egzona i u konačnici nefunkcionalnim enzimom (12). Ovaj se alel smatra relativno rijetkim, iako je češći od većine drugih poznatih inaktivacijskih varijanti u *DPYD*-u.

Osim *DPYD*\*2A, do smanjenja enzimske aktivnosti DPD-a dovode i *DPYD*\*13 (rs 55886062, c.1679T>G, I560S), c.2846A> T (rs 67376798, D949V) i c.1236G> A (haplotip B3, rs 75017182, c.1129-5923C>G). Međutim, ne rezultiraju svi ovi SNP-ovi sličnim smanjenjem enzimske aktivnosti DPD-a kao *DPYD*\*2A te je stoga potrebna različita prilagodba doziranja (13); c.1905 + 1G> A i c.1679T> G imaju najštetniji učinak na DPD aktivnost, dok c.2846A> T i c.1129–5923C> G rezultiraju umjereno smanjenom aktivnošću DPD-a.

Kod Europljana, HapB3 s c.1129–5923C> G najčešća je varijanta *DPYD*-a sa smanjenom funkcijom s učestalosti od 4,1–4,8 %, a slijedi c.1905 + 1G> A (učestalost: 1–1,2 %) i c.2846A> T (učestalost: 0,8–1,4 %). Uzimajući u obzir sve četiri varijante zajedno, u prosjeku oko 7 % Europljana ima barem jednu varijantu *DPYD* sa smanjenom funkcijom.

### ***DPYD\*2A* (rs 3918290, c.1905+1G>A ili IVS14+1G>A)**

*DPYD\*2A* je najrašireniji polimorfizam u *DPYD*-u kojeg su prvi opisali Vreken i suradnici na slučaju dva nepovezana pacijenta (14), a McLeod i suradnici su ga nazvali *DPYD\*2A* u radu u kojem je definirana nomenklatura za niz *DPYD* SNP-ova (15). Frekvencija alela *DPYD\*2A* varira između 0,1 i 1,0 % u afričko-američkoj i bjelačkoj populaciji (16). Ovaj SNP dovodi do gubitka cijeloga egzona 14 i delecije 165 parova baza što rezultira skraćenim, katalitički neaktivnim proteinom. Isto je potvrđeno i istraživanjem koje su proveli Offer i suradnici (17) gdje su u *in vitro* modelu praćene aktivnosti DPD-a nekoliko *DPYD* varijanti koje su bile kao homozigotne unesene u stanice sisavaca. Enzimska aktivnost odgovarajućega proteina bila je potpuno odsutna. To ukazuje da heterozigotni nositelji ove varijante, koji imaju jedan disfunkcionalni alel i jedan funkcionalni alel, imaju 50 % normalne enzimske aktivnosti DPD-a.

Povezanost između prisutnosti alela *DPYD\*2A* i povećanoga rizika od toksičnosti u vezi s liječenjem fluoropirimidinom potvrđena je brojnim istraživanjima (16,18-20). U meta-analizi Terrazzina i suradnika pronađena je jaka korelacija između alela *DPYD\*2A* i toksičnosti stupnja > 3 (omjer vjerojatnosti 5,42,  $p < 0,001$ ) (19). Deenen i suradnici opisali su reduciranje doze kapecitabina od 50 % prema kliničkoj toksičnosti u heterozigota za *DPYD\*2A*, u usporedbi sa srednjom redukcijom doze od 10 % u pacijenata divljega tipa (20).

Također, početno smanjenje doze kapecitabina ili 5-FU-a od 50 % standardne doze dokazano smanjuje rizik od teške toksičnosti u nositelja *DPYD\*2A* varijante (21). Nadalje, povezanost između *DPYD\*2A* varijante i smanjenja enzimske aktivnosti u mononuklearnim stanicama periferne krvi pronađena je u nekoliko *ex vivo* istraživanja koja su potvrdila smanjenu funkciju *DPYD\*2A*, a posljedično je potvrđena u pacijenata i povezanost varijante *DPYD\*2A* i smanjenoga klirensa fluoropirimidina (18).

Gore spomenuta *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* istraživanja pružaju čvrste dokaze nefunkcionalnosti *DPYD\*2A* i 50 %-tne smanjene funkcije u bolesnika heterozigotnih za *DPYD\*2A*.

### **c.2846A> T (rs 67376798, D949V)**

Alelu varijantu c.2846A> T prvi je opisao van Kuilenburg 2000. godine (22). Polimorfizam c.2846A> T dovodi do strukturne promjene u DPD-u koja ometa vezivanje kofaktora odnosno prijenos elektrona (23). Opisana učestalost alela c.2846A> T varira od 0,1 do 1,1 % u Afroamerikanaca i bijelaca (24). *In vitro* podaci pokazuju da homozigotna ekspresija varijante c.2846A> T rezultira aktivnošću od 59 % u usporedbi s divljim tipom ( $p=0.0031$ ) (24). Iako je aktivnost enzima c.2846A> T značajno oslabljena, ona nije usporediva s *DPYD\*2A* inačicom, gdje je ekspresija homozigota rezultirala potpuno nefunkcionalnim enzimom (17).

Ekspresija homozigota za c.2846A> T rezultira redukcijom od 50 % aktivnosti što sugerira da bi heterozigotni nositelj imao za oko 25 % smanjenu aktivnost DPD-a. U kliničkoj praksi također postoji razlika između učinka varijante *DPYD\*2A* i varijante c.2846A> T. Deenen i suradnici opisali su smanjenje doze zbog fluoropirimidinske toksičnosti od 25 % za c.2846A>T heterozigotne pacijente u usporedbi s 50 % za *DPYD\*2A* heterozigotne pacijente (20).

Iako postoji manje publikacija za varijantu c.2846A> T nego za *DPYD\*2A*, nekoliko istraživanja i dvije meta-analize otkrile su povezanost između varijante c.2846A> T i povećanog rizika od teške fluoropirimidinske toksičnosti, što ukazuje da je smanjenje doze opravdano (16, 19, 20, 25).

U istraživanju Rosmarin i sur. otkriven je omjer vjerojatnosti od 9,35 ( $p=0,0043$ ) između c.2846A> T i teške toksičnosti (> stupanj 3) povezane s kapecitabinom (25). Gore opisani dokazi pokazuju da je potrebno smanjenje doze kako bi se spriječila toksičnost koja bi se pojavila upotrebom pune doze fluoropirimidina te se na temelju dostupnih dokaza može pretpostaviti da je smanjenje doze od 25 % najracionalnije.

### ***DPYD\*13* (rs 55886062, c.1679T>G, I560S)**

Ovaj polimorfizam prvi su opisali Collie-Duguid i suradnici kao "T1679G" (26), a učestalost alela varira od 0,07 do 0,1 % kod bjelačke populacije (16). Prisutnost *DPYD\*13* pronađena je u pacijenata snižene aktivnosti enzima, dok nije pronađena u pacijenata koji pokazuju normalnu enzimsku aktivnost DPD-a (27). Precizne funkcionalne posljedice varijante *DPYD\*13* još nisu otkrivene, ali se smatra da su povezane s destabilizacijom strukturno važne domene proteina (16).

Prema rezultatima *in vitro* istraživanja Offer-a i suradnika (17), u slučaju homozigotne varijante dolazi do smanjenja enzimske aktivnosti DPD-a za 75 % u usporedbi s divljim tipom što sugerira da ova varijanta gotovo potpuno inaktivira protein.

Pacijenti s *DPYD\*13* pokazali su ozbiljne toksične nuspojave u nekoliko istraživanja (16, 26, 27, 28), a prilagodba doze je opisana u dva istraživanja (16, 28). Morel i suradnici opisali su heterozigotnog pacijenta koji je doživio ozbiljnu toksičnost 4. stupnja. Nakon 6-tjednog prekida liječenja, 5-FU je ponovno uveden uz individualnu farmakokinetičku prilagodbu, baziranu prema 5-FU razinama u plazmi (28). Ova istraživanja pokazuju da *DPYD\*13* polimorfizam rezultira gotovo nefunkcionalnim enzimom te posljedično niskom razinom enzimske aktivnosti, a bez prilagodbe doze vjerojatno će se razviti toksičnost u pacijenta.

### **c.1236G> A / HapB3 (rs 56038477)**

Varijantu c.1236G> A prvi su opisali Seck i suradnici kao tihu mutaciju koja ispoljava normalnu enzimsku aktivnost DPD-a (29). Polimorfizam c.1236G> A pojavljuje se u egzonu 11 i predstavlja sinonimnu varijantu koja je povezana s još tri SNP-a: c.483 + 18G> A, c.680 + 139G> A, c.959-51T> G i c.1129- 5923C> G; ovi polimorfizmi nazvani su haplotip B3 (30). c.1129-5923C> G intronski polimorfizam (rs 75017182) rezultira aberantnim spajanjem i vjerojatno je odgovoran za učinak na enzimsku aktivnost DPD-a (30).

Utvrđeno je da učestalost ovoga polimorfizma u europskoj bjelačkoj populaciji varira između 2,6 i 6,3 %, što ga čini nešto učestalijim od ostalih opisanih polimorfizama (30, 31).

Enzimska aktivnost DPD-a za nositelje c.1236G> A izmjerena je u citosolu perifernih mononuklearnih stanica u dva istraživanja (29, 30). Enzimske aktivnosti bile su 2,9, 4,2, 6,2 i 1,6 nmol/(mg\*h) (normalna vrijednost =  $9,6 \pm 2,6$  nmol/[mg\*h]) za jedan homozigotni i tri heterozigotna nositelja c.1236G> A (29, 30).

Osim toga, utvrđeno je da heterozigotni pacijenti u drugom istraživanju imaju aktivnost enzima od 10,2 nmol/(mg\*h), što je prijavljeno kao 'normalna aktivnost' budući da se aktivnost enzima u populaciji kretala od 4,8 do 15 nmol/(mg\*h) (29). Homozigotni pacijenti su i dalje imali 30 % aktivnosti DPD-a (32).

Varijanta c.1236G> A/HapB3 povezana je s teškom i smrtonosnom toksičnošću (20, 30, 33). Froehlich i suradnici utvrdili su relativni rizik od 3,74 ( $p = 2 \times 10^{-5}$ ) u c.1236G> A/HapB3 nositelja za tešku toksičnost (stupanj 3–5) (33). Suprotno tome, u preostala dva provedena istraživanja (34, 35) nije bilo značajnog učinka varijante c.1236G> A/HapB3.

Smanjenje doze u svrhu sprječavanja toksičnosti može biti korisno budući da su višestruka ispitivanja otkrila korelaciju s teškom toksičnošću; međutim, stupanj smanjenja doze ne može se lako odrediti prema aktivnosti enzima iz samo dva objavljena istraživanja i konfliktnih rezultata u kliničkim ispitivanjima. Kod heterozigotnih pacijenata smanjenje doze od 50 % bilo bi preveliko jer c.1236G> A/HapB3 ne rezultira potpuno nefunkcionalnim enzimom. Stoga bi smanjenje doze od 25 % bilo prikladnije kako bi se izbjegli povećani rizik od toksičnosti te spriječilo poddoziranje (36).

### **1.3.6 Nasljeđivanje smanjene aktivnosti DPD-a**

Nedostatak aktivnosti DPD-a nasljeđuje se autosomno recesivno, što znači da obje kopije *DPYD* gena u svakoj stanici (jedna od svakog roditelja) oboljelih pojedinaca imaju mutacije. Mutacije koje uzrokuju nedostatak aktivnosti DPD-a variraju u velikoj mjeri; neki pojedinci s 2 mutirane kopije gena mogu imati znakove i simptome toksičnosti, dok drugi mogu biti asimptomatski. Međutim, svi pojedinci s 2 mutacije izloženi su riziku od toksičnih reakcija na fluoropirimidine (37).

Pojedinci koji nose jednu mutiranu kopiju gena koji uzrokuje bolest, uključujući većinu roditelja pogođenih osoba, nazivaju se nositelji i oni obično nemaju znakove i simptome stanja. Međutim, osobe s jednom mutiranom kopijom *DPYD* gena mogu i dalje imati toksične reakcije na fluoropirimidine (37).

Dijete roditelja koji su oboje nositelji autosomnoga recesivnog stanja ima 25 % rizik nasljeđivanja stanja, 50 % rizik da bude nositelj kao i svaki roditelj, a 25 % vjerojatnosti da nema bolest niti bude nositelj. Dijete jednog roditelja nositelja ima 50 % rizik da bude nositelj (37).

## 1.4 Metabolizam i toksičnost irinotekana

Irinotekan (CPT-11) je analog kamptotekina koji se koristi kao prva linija terapije metastatskoga kolorektalnog karcinoma sam ili u kombinaciji s 5-FU-om i/ili leukovorinom. Također se koristi za liječenje drugih solidnih tumora kao što su rak jajnika i karcinom pluća nemalih stanica.

Kamptotekin je prvi put opisan i izoliran iz kore i stabljike kineskog drveta *Camptotheca acuminata* 1966. godine te je razvijen kao lijek protiv raka početkom sedamdesetih godina 20. stoljeća. Njegov mehanizam djelovanja uključuje vezanje na kompleks DNA/topoizomeraza I tijekom replikacije DNA, sprječavajući ponovno zatvaranje jednolančanih prekida te posljedično destrukciju DNA. S obzirom da je kamptotekin netopljiv, što smanjuje učinkovitost i povećava toksičnost lijeka, tijekom devedesetih godina 20. stoljeća razvijeni su njegovi analozi, a među njima i irinotekan.

Irinotekan se uglavnom uklanja nepromijenjen jetrom, a u manjoj mjeri bubrezima. To je prolijek koji prati 2 metabolička puta u jetri; putem ljudskih karboksilesteraza CES1 i CES2 metabolizira se u aktivni oblik SN-38 (7-etil-10-hidroksi-kamptotekin) ili preko citokroma CYP3A4 u inaktivni metabolit, APC. Aktivni oblik SN-38 može se naknadno inaktivirati glukuronidacijom putem enzima iz obitelji UDP-glukuronil-transferaze (UGT) (38).

UDP-glukuronil-transferaze (UGT) čine superobitelj enzima odgovornih za glukuronidaciju brojnih endobiotika, ksenobiotika i lijekova. Superobitelj UGT podijeljena je u četiri obitelji: UGT1A, UGT2, UGT3 i UGT8.

Poznato je više od 16 ljudskih UGT-ova i podijeljeni su u dvije obitelji - UGT1 i UGT2. Nekoliko UGT1A enzima, uključujući UGT1A1, kodirano je genskim kompleksom UGT1A na kromosomu 2q37.

Iako više gena može igrati ulogu u aktivnosti irinotekana, većina dostupnih dokaza ukazuje da je varijacija u ekspresiji *UGT1A1* uzrokovana zajedničkim promotorskim polimorfizmom (*UGT1A1*\*28) snažno povezana s toksičnošću, ovisno o primijenjenoj dozi. Pojedinačne varijacije u ekspresiji nekoliko enzima koji metaboliziraju putem faze I i faze II te ABC-transportera uključenih u metabolizam i izlučivanje irinotekana, djelomično objašnjavaju ustanovljenu farmakokinetičku varijabilnost među pacijentima.

Diareja i neutropenija glavni su ograničavajući čimbenici za primjenu irinotekana, pri čemu do 36 % pacijenata doživi teške, potencijalno opasne toksičnosti (39).

Ovi štetni učinci narušavaju terapijsku učinkovitost i dovode to prestanka inače učinkovitog antitumorskog liječenja.

### **Karboksilesteraza 2 (CES 2)**

Karboksilesteraza 2 je ključni enzim za hidrolizu CPT-11 u aktivni SN-38 oblik. Ekspresija ovoga enzima vrlo je varijabilna među pojedincima, a *in vitro* istraživanja upućuju na to da povećana ekspresija CES2 dovodi do povećanoga metabolizma irinotekana (40). Međutim, opsežna procjena *CES2* gena nije potvrdila nikakve funkcionalne polimorfizme (41), a karakterizacijom promotorske varijante u 5'-UTR CES2 (nazvana 830C> G, na -171C> G) nije dokazana nikakva povezanost s ekspresijom ili katalitičkom aktivnošću CES2, toksičnosti ili ishodom liječenja irinotekanom (42).

Međutim, CES2 je kontroliran preko tri različite promotorske regije (43), te je moguće da kontrola izbora promotora može objasniti neke pojedinačne razlike u ekspresiji CES2. Karboksilesteraza 1 (CES1) ima malu ulogu u metabolizmu irinotekana, a opsežnim resekvencioniranjem CES1 također nisu utvrđeni nikakvi funkcionalni polimorfizmi (41).

### **CYP3A4**

Enzim CYP3A4 inaktivira irinotekan konverzijom u inaktivni metabolit APC, a iako nema dokaza o varijantama u *CYP3A4* genu značajnih za konverziju u APC, interindividualne varijabilnosti u aktivnosti CYP3A4 mogu se iskoristiti za doziranje irinotekana.

### ***UGT1A1***

Najopsežnije proučavani genetički marker povezan s toksičnosti irinotekana nalazi se u UDP-glukuronil-transferaza genu, *UGT1A1*. Enzim UGT1A1 je izražen dominantno u jetri, ali nalazi se i u želucu te debelom i tankom crijevu. UGT1A1 ima glavnu ulogu u glukuronidaciji bilirubina i ne postoje alternativni metabolički putevi za efikasnu detoksikaciju i eliminaciju bilirubina. Enzim UGT1A1 odgovoran je za hepatičku bilirubinsku glukuronidaciju, a njegova smanjena ekspresija dovodi do pojave Gilbertovog sindroma (44), nekonjugirane hiperbilirubinemije. *UGT1A* gen kod ljudi smješten je na dugom kraku kromosoma 2 (2q37) i prostire se kroz približno 160 kb.



Ekspresija *UGT1A1* djelomično je kontrolirana TA-ponavljanjem unutar *UGT1A1* promotorske regije TATA-slijeda (engl. *TATA-box*) koji se sastoji od pet do osam kopija TA ponavljanja ( $(TA)_nTAA$ ). Divlji tip *UGT1A1* sadrži šest TA ponavljanja  $(TA)_6TAA$  u svom promotorskom području, dok je  $(TA)_7TAA$  najčešća zabilježena alelna varijanta i označena je kao *UGT1A1\*28* (45).

Transkripcijska aktivnost gena *UGT1A1* i posljedično enzimsko aktivnost UGT1A1 ovise o broju ponavljanja TA. Povećanjem broja TA ponavljanja smanjuje se genska ekspresija *UGT1A1*, a prisutnost više od šest TA ponavljanja u promotorskoj regiji *UGT1A1* dovodi do smanjene glukuronidacije u mikrosomima jetre čovjeka, uključujući i smanjeno stvaranje SN-38 glukuronida. Posljedično, pacijenti koji nose  $(TA)_7TAA$  i  $(TA)_8TAA$  alele imaju značajno nižu ekspresiju *UGT1A1*.

Heterozigotni status *UGT1A1\*28* rezultira u 25 % smanjenoj enzimskoj aktivnosti, a homozigotni status ove varijante smanjuje aktivnost transkripcije za 70 % (46) što dovodi do Gilbertovog sindroma. Stoga se šest TA ponavljanja u promotorskoj regiji gena *UGT1A1* smatra nerizičnim alelom za Gilbertov sindrom, a sedam ili osam ponavljanja TA odgovornim za razvoj Gilbertovog sindroma.

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj ovoga specijalističkog rada jest prikupiti i kritički procijeniti relevantne podatke koji se odnose na utjecaj genskih varijanti na ishod terapije 5-FU-om i irinotekanom, prikazati upute i smjernice izdane od međunarodnih tijela, te prisutne dileme u liječenju.

Bolesnici s toksičnim nuspojavama fluoropirimidina i irinotekana češće su nositelji polimorfizama gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu, između ostalih to su *DPYD\*2A* (*c.1905+1G>A* ili *IVS 14+1 G>A*) i *DPYD 496A>G* (*c.496A>G*), te polimorfizma *UGT1A1* (*UGT1A1\*28*), u odnosu na pacijente bez nuspojava. Na temelju farmakogenetičkih analiza može se u značajnoj mjeri predvidjeti razvoj nuspojava, individualizirati, tj. prilagoditi doza lijeka i time minimalizirati rizik od nastanka štetnih učinaka.

Prikazom analiza *DPYD* i *UGT1A1* koje se provode u Hrvatskoj u svrhu individualizacije liječenja 5-fluorouracilom i irinotekanom, te raspravom o prisutnim dilemama, predočit će se trenutno stanje u Hrvatskoj i usporediti sa situacijom u Europi i drugdje u svijetu.

### **3. MATERIJALI I METODE**

Za potrebe istraživanja i pisanja rada od dostupnih baza podataka pretraživane su baze podataka Medline i PubMed prema ključnim riječima: 5-fluorouracil, dihidropirimidin-dehidrogenaza, farmakogenetika, genski polimorfizmi i irinotekan. Pregledana je najvažnija literatura vezana uz farmakogenetiku 5-FU-a i irinotekana u razdoblju posljednjeg desetljeća (2010.-2020.).

### **Istraživanje provedeno u Hrvatskoj**

U Hrvatskoj je provedeno istraživanje farmakogenetike 5-FU i irinotekana u okviru doktorske disertacije dr.sc.Ivana Bilića (47).

Istraživanje je provedeno u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u periodu od 2013. do 2016. godine te je obuhvatilo 305 ispitanika liječenih fluoropirimidinskom kemoterapijom; 147 žena i 158 muškaraca, prosječne dobi 65 godina (raspon od 29 do 88 godina). Većina ispitanika primala je kemoterapiju zbog kolorektalnog karcinoma (79,4 %), ali su u istraživanje bili uključeni i bolesnici na terapiji s fluoropirimidinima zbog drugih indikacija (karcinom želuca, dojke, gušterače, jednjaka, žučnjaka, apendiksa, penisa, glave i vrata, žučnih puteva). Podjednako su bili zastupljeni ispitanici liječeni adjuvantno (48,5 %) i zbog metastatske bolesti (51,5 %). Konkomitantnom radioterapijom (istovremenom primjenom zračenja i kemoterapije) ukupno je bilo liječeno 37 ispitanika (12,1 %) (47).

Za izdvajanje DNA uzorkovano je 3 mL periferne krvi u epruvete s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Za genotipizaciju korištena je DNA izdvojena pomoću reagensa BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Njemačka) na uređaju KingFisher mL (Thermo Labsystems, Finska), prema uputama proizvođača.

Za određivanje polimorfizama *DPYD* koristila se metoda TaqMan<sup>®</sup> lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) koja se koristi pri određivanju SNP-ova. U genotipizaciji svakoga SNP-a korištene su specifične početnice i dvije TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu te je obilježena s fluoroformima VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>™</sup>. Stvaranje fluorescentnog signala s jednom ili obje sonde ukazuje na njihovo vezanje tijekom PCR reakcije te pokazuje prisutnost odgovarajućih alela. Detekcija umnoženih alela provodila se metodom alelne diskriminacije pomoću računalnog programa *7500 Software* verzija 2.3 (Applied Biosystems, SAD), sukladno uputama proizvođača (47).

Za određivanje polimorfizama *UGT1A1*\*28 (TA6/7) korištena je metoda LightCycler® lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Genotipizacija se provodila na temelju temperature taljenja (engl. *melting temperature*, T<sub>m</sub>) koja se očitava mjerenjem fluorescencije nastale vezanjem hibridizacijskih fluorescentnih sonda i umnoženih alela po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom FRET (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) (47).

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Svi uključeni ispitanici primali su kemoterapijski protokol koji je sadržavao fluoropirimidine. Kombinacijskim protokolom dvodnevne kontinuirane infuzije 5-FU-a s irinotekanom (protokol FOLFIRI, aplikacija svaka dva tjedna, N=114) liječeno je 37,6 % bolesnika; njih 26,9 % primalo je bolusni 5-FU (Mayo protokol, aplikacija 1. do 5. dan, svaka 4 tjedna, N=82), a 20,7 % liječeno je kapecitabinom (peroralna aplikacija dvaput dnevno od 1. do 14. dana, potom tjedan dana pauze, ponavljanje ciklusa svaka tri tjedna, N=63).

Ukupno 9,2 % ispitanika liječeno je kombinacijskim protokolom sa oksaliplatinom (47). Od toga je veći broj bolesnika primao infuzijski protokol FOLFOX (dvodnevna kontinuirana infuzija 5-FU-a svaka dva tjedna, N=18), a manji broj liječen je kapecitabinom uz oksaliplatinu (protokol XELOX; aplikacija oksaliplatine prvi dan nakon čega počinje dvotjedni period uzimanja kapecitabina pa tjedan dana pauze, N=10).

Svega 4 bolesnika (1,3 %) obuhvaćena istraživanjem primala su monoterapiju s 5-FU-om u kontinuiranoj infuziji (dvodnevna infuzija 5-FU-om, de Gramontov protokol). Preostalih 14 bolesnika (4,6 %) primalo je druge kombinacijske protokole koji su sadržavali 5-FU (47).

Od nuspojava češće su zabilježene sljedeće: neutropenija, proljev, mučnina/povraćanje, mukozitis, sindrom šaka-stopalo (palmoplantarni dermatitis), infekcija, umor i bol u trbuhu.

Osim glavnih nuspojava, zabilježeni su i drugi oblici toksičnih reakcija kao što su periferna polineuropatija (12 slučajeva), inapetencija (10 slučajeva), hiperbilirubinemija (6 slučajeva), trombocitopenija (5 slučajeva) te osip (5 slučajeva). Kod svih primijenjenih kemoterapijskih protokola zabilježene su toksične nuspojave. Prema prosječnom broju izazvanih nuspojava po ispitaniku, kao i prema udjelu jakih nuspojava 3. i 4. stupnja, najtoksičniji je bio protokol Mayo (47).

Genotipiziranjem *DPYD\*2A* (c.1905 + 1G> A) od ukupno 305 ispitanika pronađeno je 11 nositelja mutacije (učestalost 3,9 %), od čega 10 heterozigota i jedan homozigot. Svi nositelji SNP-a *\*2A* razvili su nuspojave 3. i 4. stupnja nakon primjene fluoropirimidinske kemoterapije, što je kod jednog homozigotnog nositelja rezultiralo smrtnim ishodom zbog toksičnosti (mukozitis, proljev, refraktorna neutropenija, septički šok s višesustavnim zatajenjem organa) (47).

Polimorfizam gena za *UGT1A1* analiziran je u podskupini ispitanika koji su liječeni kombinacijskim protokolom FOLFIRI.



Genotipiziranjem *UGT1A1*\*28 pronađeno je kod 114 testiranih ispitanika ukupno 66 nositelja mutacije (učestalost 57,89 %), od čega 43 heterozigota i 23 homozigota (47).

Heterozigoti (*UGT1A1*\*1/\*28) su zastupljeni u obje skupine, pri čemu je veći broj heterozigotnih nositelja razvio 3. i 4. stupanj toksičnosti. Učestalost homozigota (*UGT1A1*\*28/\*28) pokazuje još uvjerljiviju razdiobu prema toksičnosti: 19 homozigota prisutno je u skupini sa značajnom toksičnošću u usporedbu s 4 homozigota u kontrolnoj skupini.

Razlika distribucije genotipova bila je statistički značajna ( $\chi^2=28,46$ ;  $P<0,001$ ). Dokazan je također statistički značaj utjecaj heterozigotnog odnosno homozigotnog statusa na nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja univarijantnom logističkom regresijom (heterozigoti: OR=5,47; IP=2,13-14,04;  $P<0,001$ , homozigoti: OR=20,58; IP=5,6-75,46;  $P<0,001$ ). Drugim riječima heterozigoti za *UGT1A1*\*28 imaju oko 5 puta, a homozigoti oko 20 puta veći rizik za nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja nakon primjene kemoterapije po protokolu FOLFIRI (47).

#### **4.1 Smjernice za doziranje 5-fluorouracila**

##### **4.1.1 Smjernice Nizozemske farmakogenetičke radne skupine**

Trenutno je i dalje vrlo malo smjernica koje povezuju rezultate farmakogenetičkih testova s konkretnim terapijskim preporukama. Nizozemska farmakogenetička radna grupa (engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group* - DPWG) osnovana je 2005. s ciljem razvoja terapijskih preporuka utemeljenih na farmakogenetici.

U studenom 2018. radna skupina za farmakogenetiku ažurirala je preporuke iz 2011. za terapijske doze fluorouracila i kapecitabina na temelju genotipa *DPYD*-a.

Zamjenski lijek ili smanjenje doze preporučuje se pacijentima s *DPYD* indeksom aktivnosti 0, 0,5, 1 i 1,5. Tegafur nije preporuka kao alternativni lijek jer se također metabolizira preko DPD-a. Zamjena za fluorouracil preporučuje se pacijentima s *DPYD* indeksom aktivnosti 0; ako zamjenski lijek nije moguć, treba utvrditi aktivnost DPD-a i početnu dozu u skladu s tim.

Za pacijente s ocjenom *DPYD* aktivnosti od 0,5, 1 i 1,5 počinje se s 25 %, 50 % ili 75 % standardne doze ili treba odabrati zamjenski lijek.

<b>Alel/Genotip/ Fenotip</b>	<b>Lijek/ primjena</b>	<b>Opis</b>	<b>Preporuka</b>
Indeks aktivnosti 0	Fluorouracil, subkutano	Genske varijante povećavaju rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Smanjena pretvorba fluorouracila/ kapecitabina u neaktivne metabolite znači da standardna doza vodi do predoziranja.	Odabрати други lijek. NAPOMENA: Ako pacijent ima dvije različite genske varijante koje dovode do nefunkcionalnog enzima DPD-a (npr. *2A i *13), ova se preporuka primjenjuje samo ako su varijante na različitim alelima. Ako su obje varijante na istom alelu, ovaj pacijent ima ocjenu genske aktivnosti 1, za koju prilikom subkutane primjene nije utvrđen povećani rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Ove dvije situacije mogu se razlikovati samo određivanjem enzimске aktivnosti (fenotipizacijom).
Indeks aktivnosti 0	Fluorouracil/ kapecitabin, sistemska primjena	Genske varijante povećavaju rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Smanjena pretvorba fluorouracila/ kapecitabina u neaktivne metabolite znači da je standardna doza jača 100 puta od doze koja vodi do predoziranja.	1. Odabрати други lijek. Tegafur nije dobra zamjena jer se metabolizira preko DPD.  2. Ako zamjena nije moguća: treba utvrditi preostalu aktivnost DPD-a u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi i prema tome prilagoditi početnu dozu. Pacijent s 0,5 % normalne DPD aktivnosti tolerirao je 0,8 % standardne doze (150 mg kapecitabina svakih 5 dana). Pacijent s nemjerljivom aktivnošću DPD-a tolerirao je 0,43 % standardne doze (150 mg kapecitabina svakih 5 dana uz preskakanje svake treće doze). Prosječna aktivnost DPD-a bjelačke populacije je 9,9 nmol/sat po mg proteina.  NAPOMENA: Ako pacijent ima dvije različite genske varijante koje dovode do nefunkcionalnog enzima DPD-a (npr. *2A i *13), ova se preporuka primjenjuje samo ako su varijante na različitim alelima. Ako su obje varijante na istom alelu, ovaj pacijent ima indeks aktivnosti 1 i trebaju se pratiti preporuke za tu gensku aktivnost. Ove dvije situacije mogu se razlikovati samo određivanjem enzimске aktivnosti (fenotipizacijom).
Indeks aktivnosti 0,5	Fluorouracil/ kapecitabin	Genske varijante povećavaju rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Smanjena pretvorba fluorouracila/ kapecitabina u neaktivne metabolite znači da primjena standardne doze dovodi do predoziranja.	Početi liječenje s 25 % standardne doze ili odabрати zamjenski lijek. Tegafur nije pogodna zamjena jer se također metabolizira preko DPD-a.  NAPOMENA: Ova se preporuka primjenjuje samo ako su dvije genske varijante na različitim alelima. Ako su obje varijante na istom alelu, ovaj pacijent ima ocjenu genske aktivnosti 1 i treba se pridržavati preporuka za taj rezultat genske aktivnosti. Ove dvije situacije mogu se razlikovati samo određivanjem enzimске aktivnosti (fenotipizacijom).

Indeks aktivnosti 1	Fluorouracil/ kapecitabin	Genske varijante povećavaju rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Smanjena pretvorba fluorouracila/ kapecitabina u neaktivne metabolite znači da primjena standardne doze vodi do predoziranja	Početi liječenje s 50 % standardne doze ili odabrati zamjenski lijek. Tegafur nije pogodna zamjena, jer se također metabolizira preko DPD. NAPOMENA 1: Ovo smanjenje doze dobro je potkrijepljeno za *1/*2A i 1236A/1236A. Smanjenje doze za pacijente s 2846T (2846T/2846T ili 1236A/2846T) temelji se, između ostalog, na smanjenju doze identificiranoj za *1/2846T. NAPOMENA 2: Ako pacijent ima dvije različite genske varijante koje rezultiraju djelomično funkcionalnim DPD-om enzimom (npr. 2846T i 1236A), ova se preporuka primjenjuje ako su varijante na različitim alelima. Ako su obje varijante na istom alelu, genska aktivnost je između 1 i 1,5, ovisno o tome utječu li i kako dvije varijante gena jedna na drugu i na ostale čimbenike koji utječu na aktivnost DPD-a. U slučaju dvije različite genske varijante, ocjena genske aktivnosti (1 ili 1,5) može se utvrditi samo mjerenjem aktivnosti enzima (fenotipizacijom).
Indeks aktivnosti 1,5	Fluorouracil/ kapecitabin	Genske varijante povećavaju rizik od teške, potencijalno fatalne toksičnosti. Smanjena pretvorba fluorouracila/ kapecitabina u neaktivne metabolite znači da primjena standardne doze dovodi do predoziranja.	Početi liječenje sa 75 % standardne doze ili odabrati zamjenski lijek. Tegafur nije prikladna zamjena, jer se metabolizira preko DPD.

**Tablica 1.** Preporuke Nizozemske farmakogenetičke radne grupe za doziranje fluorouracila i kapecitabina na temelju genotipa *DPYD*

Preuzeto i prilagođeno: Annotation of DPWG Guideline for capecitabine and DPYD.

<https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166104963>, pristupljeno 01.03.2020.

U kolovozu 2019. preporuke su ažurirane te je za indeks aktivnosti 0 prethodna opaska 'Odabrati drugi lijek' preformulirana u 'Izbjegavati 5-FU'. Za pacijente s indeksom aktivnosti 1,5 prema najnovijim preporukama liječenje treba početi s 50 % standardne doze ili izbjegavati 5-FU i kapecitabin. U studiji koja je uključivala 17 pacijenata s genotipom 1/2846T, prosječna doza nakon titracije bila je 64 % standardne doze. Za 51 pacijenta s genotipom 1/1236A, prosječna doza nakon titracije bila je 74 % standardne doze.

Pacijentima s genotipovima definiranim prema FENO skupini trebalo bi odrediti enzimsku aktivnost DPD-a u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi ili treba izbjegavati primjenu 5-FU-a/kapecitabina, a tegafur nije adekvatna zamjena jer se metabolizira preko DPD-a.

#### **4.1.2 Smjernice Konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC)**

Svrha CPIC (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) smjernica je pružiti informacije za tumačenje nalaza genotipizacije *DPYD* s mogućnosti primjene u kliničkoj praksi za usmjeravanje doziranja fluoropirimidina (5-FU, kapecitabin i tegafur).

U Tablici 2. sažeti su mogući fenotipovi DPD-a na temelju genotipa. Fenotip DPD-a dodijeljen je prema ocjeni (engl. *score*) genske aktivnosti (*DPYD*-OA), izračunat kao zbroj rezultata genske aktivnosti dviju *DPYD* varijanti s varijantom najniže ocjene aktivnosti.

Ukratko, nositelji dviju nefunkcionalnih varijanti klasificiraju se kao slabi *DPYD* metabolizatori (*DPYD*-OA: 0); nositelji jedne nefunkcionalne varijante ili varijante smanjene aktivnosti smatraju se *DPYD* srednje brzim metabolizatorima (*DPYD*-OA: 1 ili 1,5), a oni s varijantama normalnih funkcija klasificirani su kao normalni metabolizatori *DPYD* (*DPYD*-OA: 2). Ako su prisutne dvije različite varijante smanjenih/nikakvih funkcija, pretpostavlja se da su na različitim genskim kopijama.

Bez obzira na prisutnost varijanti smanjene ili bez funkcije, pacijenti mogu nositi i nekoliko varijanti normalne funkcije. Varijante normalnih funkcija mogu se nalaziti na istoj genskoj kopiji kao i druge varijante normalnih funkcija ili varijante smanjenih funkcija tj. bez funkcija.

Mogući fenotip	Ocjena aktivnosti	Genotipovi	Primjeri genotipova
<i>DPYD</i> normalni metabolizator	2	Pojedinac koji nosi 2 alela normalne funkcije.	c.[=];[=], c.[85T>C];[=], c.[1627A>G];[=]
<i>DPYD</i> srednje brzi metabolizator	1 ili 1,5	Pojedinac koji nosi jedan alel normalne funkcije i jedan alel bez funkcije/smanjene funkcije ili pojedinac koji nosi dva alela smanjene funkcije.	.[1905+1G>A];[=], c.[1679T>G];[=], c.[2846A>T];[=]; c.[1129–5923C>G];[=]d; c.[1129–5923C>G];[1129–5923C>G]d; c.[2846A>T];[2846A>T]
<i>DPYD</i> slabi metabolizator	0 ili 0,5	Pojedinac koji nosi dva alela bez funkcije ili pojedinac koji nosi jedan alel bez funkcije i jedan smanjene funkcije.	c.[1905+1G>A];[1905+1G>A], c.[1679T>G];[1679T>G], c.[1905+1G>A];[2846A>T] c.[1905+1G>A]; [1129–5923C>G]

**Tablica 2.** Prikaz mogućih DPD fenotipova na temelju genotipa

Preuzeto i prilagođeno: Amstutz U. i sur. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. Clin Pharmacol Ther. 2018;103:210–216.

#### 4.1.3 Dostupne mogućnosti genskog testiranja

Opcije testiranja za *DPYD* genotip uključuju ciljane analize odabranih varijanti do resekvencioniranja kompletnih kodirajućih područja. U kontekstu toksičnosti 5-FU-a, trenutno je većina testova usmjerena na četiri najčešće i dobro utvrđene rizične varijante (c.1905 + 1G> A, c.1679T> G, c.2846A> T, c.1129 –5923C> G) (48).

Neke od mogućnosti ispitivanja toksičnosti za 5-FU uključuju i testiranje drugih genskih varijanti u genima *TYMS* i *MTHFR* no klinička korisnost ovih analiza genotipova još nije dovoljno istražena. Postoje alternativni ili komplementarni testovi za genotipizaciju *DPYD*-a koji procjenjuju aktivnost DPD-a izravno u perifernim mononuklearnim stanicama ili neizravno preko omjera endogenog dihidrouracila/uracila (UH<sub>2</sub>/U) u plazmi ili korištenjem testa opterećenja uracila (31). Primjenom kombiniranog genotip/fenotip pristupa, uključujući odabrane *DPYD* rizične varijante dokazano je da se smanjuje učestalost toksičnosti 5-FU-a (49), međutim takvi testovi nisu široko dostupni. Nadalje, srednja vrijednost i raspon predterapijskog endogenog UH<sub>2</sub>/U omjera uvelike su varirali između studija, limitirajući njegovu praktičnu upotrebu, dok nekoliko studija nije ustanovilo jaku povezanost između UH<sub>2</sub>/U omjera i koncentracije 5-FU-a u plazmi (31).

#### 4.1.4 Preporuke doziranja

U Tablici 3. prikazane su na genotipu temeljene preporuke doziranja za fluoropirimidine prema ocjeni aktivnosti *DPYD* (*DPYD-OA*). Snaga preporuka doziranja temelji se na poznatom utjecaju nekih varijanti (c.1905 + 1G> A, c.1679T> G, c.2846A> T, c.1129–5923C> G) na aktivnost DPD-a, dokazanom odnosu između aktivnosti DPD-a i klirensa 5-FU-a, te povezanosti izloženosti 5-FU-a i njegovih toksičnih učinaka (48). Pacijenti koji su heterozigotni za *DPYD* varijantu smanjene funkcije ili varijantu bez funkcije pokazuju djelomični nedostatak DPD-a i trebali bi primati snižene početne doze fluoropirimidina (48). Prospektivno genotipiziranje c.1905 + 1G> A praćeno smanjenjem doze za 50 % u heterozigotnih nositelja rezultiralo je visokim stupnjem smanjenja toksičnosti (50). Ovo je istraživanje pokazalo da *DPYD* gensko testiranje može smanjiti pojavu teške toksičnosti povezane s fluoropirimidinima te da je smanjenje doze za 50 % pogodno za heterozigotne nositelje varijanti bez aktivnosti enzima (*DPYD-OA*: 1).

Za varijante smanjenih aktivnosti enzima nema dovoljno dokaza oko stupnja smanjenja doze. Za c.2846A> T, u maloj retrospektivnoj studiji primijećeno je da je prosječna doza kapecitabina u heterozigotnim nositeljima smanjena za 25 % u usporedbi s nenositeljima (51). U drugoj maloj prospektivnoj studiji, pet pacijenata nositelji c.1236G> A (c.1129–5923C> G) varijante sigurno su liječeni s 25 % smanjenom početnom dozom kapecitabina (52). Ova saznanja sugeriraju da heterozigotni nositelji varijanti smanjene funkcije (*DPYD-OA*: 1,5) mogu tolerirati više doze u usporedbi s nositeljima varijanti bez funkcija (*DPYD-OA*: 1).

Kod pacijenata s *DPYD-OA* 1,5 trebalo bi razmotriti individualne okolnosti kako bi se utvrdilo je li prihvatljiviji oprezniji pristup (primjena 50 % početne doze praćeno titracijom doze) ili pristup koji maksimizira potencijalnu učinkovitost s potencijalno većim rizikom toksičnosti (smanjenje doze za 25 %). U obje studije koje ukazuju na prikladnost smanjenja doze za 25 % kod nositelja varijante smanjene funkcije uključeni su samo pacijenti koji su primali kapecitabin i trenutno nema podataka o intravenoznom 5-FU-u (48).

S obzirom na to da neki pacijenti koji nose varijantu smanjene funkcije ili varijantu bez funkcije dobro podnose normalne doze 5-FU-a, da bi održali učinkovitost, doze bi se trebale povećati u sljedećim ciklusima kod onih pacijenata koji nisu doživjeli toksične nuspojave (ili su bile klinički podnošljive) u prva dva ciklusa kemoterapije. Shodno tome, doze bi trebale biti smanjene u bolesnika koji dobro ne podnose početnu dozu.

Kod slabih *DPYD* metabolizatora (*DPYD*-OA: 0,5 ili 0), preporučuje se izbjegavanje upotrebe režima koji sadrže 5-FU. Međutim, ako se nijedan režim bez fluoropirimidina ne smatra prikladnom terapijskom opcijom, primjena 5-FU-a u izrazito sniženoj dozi u kombinaciji s pomnim terapijskim nadzorom može se razmotriti kao opcija za pacijente s *DPYD*-OA od 0,5. Do sada nisu dostupna izvješća o uspješnoj primjeni 5-FU-a u niskim dozama kod slabih metabolizatora *DPYD*.

Fenotip	Implikacije fenotipskih mjera	Preporuke doziranja	Klasifikacija preporuka
<i>DPYD</i> normalni metabolizator	Normalna DPD aktivnost i „normalan“ rizik za toksičnost fluoropirimidina.	Na temelju genotipa, nema naznaka za promjenu doze ili terapije. Koristiti preporučeno doziranje i primjenu.	Snažna
<i>DPYD</i> Srednje brzi metabolizator	Smanjena DPD aktivnost (aktivnost leukocitne DPD 30 % do 70 % od aktivnosti normalne populacije) i povećani rizik od teške ili fatalne toksičnosti tijekom liječenja fluoropirimidinima.	Smanjiti početnu dozu na temelju ocjene aktivnosti praćeno titracijom doze prema toksičnosti <sup>b</sup> ili terapijsko praćenje. OA 1: Smanjiti dozu za 50 % OA 1,5: Smanjiti dozu za 25 % do 50 %	Ocjena aktivnosti 1: Snažna  Ocjena aktivnosti 1,5: Umjerena
<i>DPYD</i> slabi metabolizator	Potpuni nedostatak DPD-a i povećani rizik od teške ili fatalne toksičnosti pri liječenju fluoropirimidinima.	OA 0,5: Izbjegavati uporabu 5-FU-a ili njegovih prolijejkova. U slučaju da nema klinički prihvatljivije terapijske opcije, 5-FU treba davati u značajno smanjenoj dozi <sup>c</sup> s ranim terapijskim nadzorom <sup>d</sup> . OA 0: Izbjegavati uporabu 5-FU-a ili njegovih prolijejkova.	Snažna

**Tablica 3.** CPIC Preporuke doziranja fluoropirimidina<sup>a</sup> prema DPD fenotipu

Preuzeto i prilagođeno: Amstutz U. i sur. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. Clin Pharmacol Ther. 2018;103:210–216.

<sup>a</sup> 5-fluorouracil ili kapecitabin

<sup>b</sup> Povećati dozu kod pacijenata koji ne iskuse toksičnost ili je ona klinički podnošljiva u prva dva ciklusa, za održavanje učinkovitosti; kod pacijenata koji ne podnose početnu dozu treba smanjiti dozu kako bi umanjili toksičnost.

<sup>c</sup> Ako je dostupan, za procjenu početne doze treba razmotriti fenotipizacijski test. U nedostatku fenotipskih podataka, preporuča se doza < 25% normalne početne doze.

<sup>d</sup> Terapijsko praćenje treba započeti što je ranije moguće kako bi se odmah prekinula terapija ako je razina lijeka previsoka.

#### 4.1.5 Potencijalne prednosti i rizici genotipizacije za pacijente

Prednosti *DPYD* genotipizacije dokazane su u prospektivnom istraživanju koje je pokazalo smanjenu pojavu teške toksičnosti izazvane 5-FU-om i odsutnost smrtnih posljedica povezanih s toksičnošću kod nositelja c.1905 + 1G> A nakon smanjenja doze prema genotipu (50).

Suprotno tome, ne razviju svi nositelji *DPYD* varijante smanjene funkcije ili varijante bez funkcije jaku toksičnost pri standardnim dozama (53), dok neki nositelji ovih varijanti možda neće u potpunosti iskoristiti potencijal terapije fluoropirimidinom s preporučenim smanjenjem doza.

Kako bi se održala učinkovitost, važno je povisiti dozu u pacijenata kod kojih se ne razvije toksičnost ili onih koji iskuse klinički podnošljivu toksičnost.

Pacijenti koji nastave terapiju 5-FU-om još uvijek mogu iskusiti prihvatljivu toksičnost nižeg stupnja koja je čak i potrebna za postizanje učinkovitosti. Mogući rizik je pogrešno izvještavanje ili pogrešna interpretacija rezultata genskih testova.

#### 4.1.6 Prikladna primjena i/ili potencijalna zlouporaba genskih testova

Prisutnost varijanti smanjene funkcije ili bez funkcije ne rezultira uvijek toksičnošću.

Otprilike 50 % nositelja *DPYD* varijante sa smanjenom funkcijom razvija ozbiljnu toksičnost vezanu za 5-FU pri standardnim dozama (28, 53), a procjene se razlikuju ovisno o ukupnoj učestalosti toksičnosti za određeni režim liječenja i broju ciklusa liječenja (7, 16, 28, 33).

Istodobno, pacijenti bez smanjene ili nefunkcionalne *DPYD* varijante mogu doživjeti jaku toksičnost zbog genskih, okolišnih ili nekih drugih čimbenika.

Osjetljivost *DPYD* genskog ispitivanja ovisi o broju ispitivanih inačica. Kombinacijom *DPYD* varijanti c.1905 + 1G> A, c.2846A> T, c.1679T> G, c.1129–5923C> G može se objasniti 20–30 % ranih pojava toksičnosti izazvane 5-FU-om (33).

Međutim, test koji uključuje samo podskup tih *DPYD* varijanti (npr. samo c.1905 + 1G> A) ima smanjenu osjetljivost. S obzirom na postojanje mnogih dodatnih rijetkih štetnih *DPYD* varijanti, genski test koji istražuje samo odabrane varijante smanjene funkcije ili varijante bez funkcije ne isključuje u potpunosti nefunkcionalnost DPD-a.



#### 4.1.7 Razlike u preporukama DPWG i CPIC

Trenutne smjernice DPWG i CPIC za *DPYD*/fluoropirimidine razlikuju se u odnosu na terapijske preporuke. DPWG smjernice razlikuju 5-FU/kapecitabin i tegafur u okviru terapijskih preporuka za fluoropirimidine, dok CPIC smjernice ne daju preporuke doziranja za tegafur zbog ograničenih dostupnih dokaza. DPWG također razlikuje sistemsku primjenu i primjenu putem kože unutar preporuka za 5-FU/kapecitabin.

Terapijske preporuke za 5-FU/ kapecitabin također se razlikuju u sljedećem:

- (1) Za pacijente s ocjenom genske aktivnosti 0: DPWG preporučuje fenotipizaciju, dok ju CPIC ne preporučuje ako ne postoji zamjenska terapija.
- (2) Za pacijente s ocjenom genske aktivnosti 0,5 DPWG preporučuje fenotipizaciju radi određivanja početne doze ili odabira zamjenske terapije, dok CPIC preporučuje zamjensku terapiju ili značajno smanjenu dozu uz terapijsko praćenje.
- (3) DPWG preporučuje fenotipizaciju svih homozigotnih nositelja bilo koje varijante, dok CPIC preporučuje prilagodbu doze za homozigotnog nositelja c.2846A> T za više od 50 %.

## 4.2 Smjernice za irinotekan i *UGT1A1*

### 4.2.1 RNPGx preporuke

Francuska udružena radna skupina koju čine Nacionalna mreža za farmakogenetiku (RNPGx) i Grupa za kliničku onko-farmakologiju (GPCO-*Unicancer*) objavila je smjernice za doziranje irinotekana u časopisu *Fundamental & Clinical Pharmacology* (54). Ove smjernice preporučuju smanjenje doze irinotekana u pacijenata s genotipom *UGT1A1*\*28/\*28 te primjenu visokih doza irinotekana (>240 mg/m<sup>2</sup>) samo kod pacijenata s genotipom *UGT1A1*\*1/\*1.

Za niske doze irinotekana (<180 mg/m<sup>2</sup> /tjedan) alel *UGT1A1*\*28 nije glavni faktor rizika i *UGT1A1* genotipizacija nije indicirana jer je rizik od hematoloških i gastrointestinalnih toksičnosti prilično sličan bez obzira na genotip.

Za primjenu početnih doza od 180 do 230 mg/m<sup>2</sup> svaka 2-3 tjedna, pacijenti koji su homozigotni za alel *UGT1A1*\*28 imaju veći rizik od hematološke i/ili gastrointestinalne toksičnosti nego pacijenti koji su heterozigoti ili nenasitelji. Preporuča se smanjenje doze od 25-30 % u prvom ciklusu, osobito u slučajevima prisutnosti i drugih čimbenika rizika. Doza se može prilagoditi u sljedećim ciklusima, ovisno o toleranciji.

Za početno planirane doze >240 mg/m<sup>2</sup> svaka 2-3 tjedna, homozigotni *UGT1A1*\*28 pacijenti imaju značajno veći rizik od hematološke toksičnosti (neutropenija) u usporedbi s drugim genotipovima, stoga se ne preporuča primjena povišene doze kod pacijenata s genotipom \*28/\*28.

Primjena povišene doze (240 mg/m<sup>2</sup>) moguća je samo kod pacijenata s genotipom \*/\*1, ili kod \*/\*28 pacijenata, u odsustvu dodatnih čimbenika rizika i pod strogim medicinskim nadzorom.

Za sve pacijente za koje se planira primjena doze irinotekana >80 mg/m<sup>2</sup> preporučuje se *UGT1A1* genotipiziranje TATA-slijeda (\*28,\*36,\*37) prije početka liječenja.

Prva namjera ove strategije za analizu statusa *UGT1A1* koju treba provesti prije započinjanja liječenja je otkriti varijantu \*28, najčešću deficitarnu varijantu u bjelačkoj populaciji.

Individualizirano se liječenje može predložiti na temelju genotipa *UGT1A1*; smanjenjem doze za \*28/\*28 homozigote ili s mogućim povećanjem doze za nenasitelje alela \*28.

Za ostale *UGT1A1* alele, genotipizaciju provodi ograničen broj laboratorija i smatra se testom druge namjere.

#### **4.2.2 DPWG smjernice za irinotekan**

Nizozemska farmakogenetička radna skupina u studenom 2018. evaluirala je preporuke terapijskih doza za irinotekan bazirane na genotipu *UGT1A1* te preporučuju započeti liječenje sa 70 % standardne doze za homozigotne nositelje alela *UGT1A1*\*28.

Ako pacijent tolerira ovu početnu dozu, doza se može povećati ovisno o broju neutrofila. Ove smjernice navode da nije potrebno djelovati u slučaju heterozigotnih nositelja alela *UGT1A1*\*28 (npr. *UGT1A1* \*/\*28).

<b>Alel/Fenotip/Genotip</b>	<b>Opis</b>	<b>Preporuka</b>
<i>UGT1A1</i> *1/*28	Ova genska varijanta (*1/*28) češća je u zapadnoj populaciji nego divlji tip (*1/*1) što znači da je liječenje u velikoj mjeri usmjereno na pacijente s ovom genskom varijantom.	Nije potrebna nikakva intervencija u ovom slučaju.
<i>UGT1A1</i> *28/*28	Ozbiljne, po život opasne štetne nuspojave javljaju se češće kod pacijenata s ovom genskom varijantom kod koje je smanjena pretvorba irinotekana u neaktivne metabolite.	Liječenje treba početi sa 70 % standardne doze. Ako pacijent tolerira ovu početnu dozu ona se može povećati vodeći se brojem neutrofila.
<i>UGT1A1</i> srednje brzi metabolizator	Ova genska varijanta češća je u zapadnoj populaciji nego divlji tip (*1/*1) što znači da je liječenje u velikoj mjeri usmjereno na pacijente s ovom genskom varijantom.	Nije potrebna nikakva intervencija u ovom slučaju.
<i>UGT1A1</i> slabi metabolizator	Ozbiljne, po život opasne štetne nuspojave javljaju se češće kod pacijenata s ovom genskom varijantom kod koje je smanjena pretvorba irinotekana u neaktivne metabolite.	Liječenje treba početi sa 70 % standardne doze. Ako pacijent tolerira ovu početnu dozu ona se može povećati vodeći se brojem neutrofila.

**Tablica 4.** DPWG smjernice za irinotekan i *UGT1A1* genotip

Preuzeto i prilagođeno: Annotation of DPWG Guideline for irinotecan and UGT1A1.

<https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotation/PA166104951>, pristupljeno 17.03.2020.

#### 4.2.3 Izjava američke Agencije za hranu i lijekove (FDA)

Prema izjavi američke Agencije za hranu i lijekove iz 2017. godine, pojedinci koji su homozigotni za alel *UGT1A1*\*28 (genotip *UGT1A1* 7/7) izloženi su povećanom riziku od neutropenije nakon početka liječenja irinotekan hidrokloridom (55).

U studiji na 66 pacijenata koji su primali injekciju irinotekana (350 mg/m<sup>2</sup> jednom u 3 tjedna), učestalost neutropenije 4. stupnja kod bolesnika homozigotnih za alel *UGT1A1*\*28 bila je 50 %, a kod pacijenata koji su heterozigotni za ovaj alel (*UGT1A1* 6/7 genotip) incidencija je bila 12,5 %. Nije uočena neutropenija 4. stupnja u bolesnika homozigotnih za divlji tip alela (genotip *UGT1A1* 6/6).

Kada se primjenjuje samostalno, treba razmotriti smanjenje početne doze irinotekan hidroklorida za najmanje jednu razinu kod pacijenata za koje se zna da su homozigotni za alel *UGT1A1*\*28. Međutim, precizno smanjenje doze u ovoj populaciji pacijenata nije poznato, a daljnje prilagodbe doze trebalo bi razmotriti na temelju individualne tolerancije pacijenta na liječenje (55).

#### **4.2.4 Trenutne preporuke za genotipizaciju *UGT1A1* u svakodnevnoj praksi**

Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) preporučuje u uputama za irinotekan (Camptosar) da pacijenti s genotipom \*28/\*28 trebaju primiti nižu početnu dozu irinotekana te da precizno smanjenje doze u ovoj populaciji pacijenata nije poznato, a naknadne prilagodbe doziranja bi se morale razmotriti na temelju individualne tolerancije pacijenta na liječenje.

Prema smjernicama Europskog društva za medicinsku onkologiju (ESMO), ispitivanje polimorfizama na *UGT1A1* trebalo bi razmotriti samo ako dođe do teške toksičnosti koja je potencijalno povezana s liječenjem irinotekanom. ESMO smjernice napominju da je testiranje na *UGT1A1* posebno važno kada se irinotekan koristi u visokim dozama (300–350 mg/m<sup>2</sup>), a manje je važno kada se primjenjuje u nižim dozama (125–180 mg/m<sup>2</sup>) (56).

Smjernice Japanske udruge za rak debelog crijeva i rektuma (JSCCR) navode da je posebno poželjno testirati se na genski polimorfizam *UGT1A1* prije primjene irinotekana kod pacijenata s visokom razinom bilirubina u serumu, starijih pacijenata, kod pacijenata čije je opće stanje loše i pacijenata kod kojih se nakon prethodne primjene irinotekana razvila teška toksičnost (posebno neutropenija) (57).

U smjernicama je također navedeno da se toksičnost irinotekana ne može sa sigurnošću predvidjeti na temelju same prisutnosti genskog polimorfizma *UGT1A1*, te da je neophodno nadzirati opće stanje pacijenata tijekom liječenja bez obzira na to je li otkriven genski polimorfizam.

#### 4.2.5 Gensko testiranje za doziranje irinotekana

Gensko testiranje može se koristiti za optimizaciju doziranja irinotekana. Uporaba genotipizacije u određenim slučajevima može omogućiti sljedeće odluke pacijenta:

- Ako pacijent preferira agresivno liječenje, genotipizacija može omogućiti više doziranje za genotipove *\*1/\*1* i *\*1/\*28* (58);
- Ako pacijent preferira maksimiziranje kvalitete života: genotipizacija može omogućiti niže doziranje za genotip *\*28/\*28* (54).

Genotipizacija također može omogućiti dodavanje irinotekana u liječenju drugih tumora probavnog sustava bez rizika od hematološke toksičnosti (59), kao i kod upravljanja Gilbertovim sindromom (60).

Rutinski probir ne isključuje ostale *UGT1A1* polimorfizme koji su češći kod specifičnih populacija i ne identificira poddozirane pacijente koji bi potencijalno mogli tolerirati puno višu dozu irinotekana.

Usvajanje preventivnog genotipiziranja *UGT1A1*\*28, radi povećanja sigurnosti i učinkovitosti irinotekana u kliničkoj praksi još uvijek je ograničeno i često nije pokriveno zdravstvenim osiguranjem, unatoč značajnim troškovima liječenja toksičnosti povezanih s irinotekanom (61).

## **5. ZAKLJUČAK**

Farmakogenetika i farmakogenomika predstavljaju novi pristup u svijetu personalizirane medicine koji ima velik utjecaj na uspjeh razvoja lijekova i prilagodbu terapije.

Farmakogenetičke metode trenutno se koriste prvenstveno za procjenu sigurnosnog profila lijekova. Farmakogenomika je jedno od područja koje se najbrže razvija u biomedicinskoj znanosti i postaje sastavni dio otkrivanja, dizajniranja i razvoja lijekova. Farmakogenomika kao znanstvena disciplina predstavlja sjedinjenje tri područja genetike; molekularne, populacijske i kvantitativne. Iako još nije jasno hoće li ova farmakogenomska revolucija imati široku kliničku važnost, nema sumnje da će ubuduće zdravstvenim djelatnicima općenito, a posebno farmaceutima biti potrebno razumijevanje genetike i genomike.

Pojedinci oduvijek različito reagiraju na određeni lijek i taj odgovor je prečesto nepredvidiv. Nedostatak predvidljivosti u reakciji pacijenta rezultira znatnim troškovima za zdravstveni sustav.

Enzim DPD odgovoran je za razgradnju fluoropirimidina, a njegova smanjena aktivnost povezana je s većim rizikom od ozbiljne ili fatalne toksičnosti pri primjeni standardnih doza 5-FU-a. Istraživanje provedeno u Hrvatskoj u razdoblju od 2013.-2016.godine, te pregled dostupne literature prikazani u ovom radu pokazuju utjecaj testiranih polimorfizama *DPYD* na nastanak toksičnosti kemoterapije s fluoropirimidinima kao i utjecaj polimorfizma *UGT1A1*\*28 na toksičnost kemoterapije irinotekanom. Opisano je više od 30 genskih polimorfizama u *DPYD*-u među kojima nekoliko može dovesti do smanjene funkcije ili nefunkcionalnosti DPD-a.

Najproučavaniji polimorfizam je *DPYD*\*2A (također poznat kao rs 3918290, c.1905+1G>A ili IVS14+1G>A), a osim njega do smanjenja aktivnosti DPD-a dovode i *DPYD*\*13 (rs 55886062, c.1679T>G, I560S), c.2846A> T (rs 67376798, D949V) i c.1236G> A (haplotip B3, rs 75017182, c.1129-5923C>G).

Daljnja genska testiranja *DPYD*-a u kombinaciji s metaboličkim profiliranjem pacijenata bit će presudna za daljnja saznanja o relativnom doprinosu pojedinih varijanti *DPYD*-a riziku od teške toksičnosti povezane s 5-FU-om.

Kod irinotekana više gena može igrati ulogu u njegovoj aktivnosti no većina dostupnih dokaza ukazuje na značajnu povezanost alela *UGT1A1*\*28 i toksičnosti irinotekana, a stupanj toksičnosti ovisi o primijenjenoj dozi.

## **6. LITERATURA**



1. Lindpaintner K. Pharmacogenetics and the future of medical practice. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;54(2):221–230.
2. DAE N-acetyltransferase. *Pharmacology & Therapeutics.* 1989;42(2):157–234.
3. Gerdes LU, Gerdes C, Kervinen K i sur. The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: A substudy of the Scandinavian simvastatin survival study. *Circulation.* 2000;101:1366–71.
4. Lu AY. Drug-metabolism research challenges in the new millennium: individual variability in drug therapy and drug safety. *Drug Metab Dispos.* 1998;26(12):1217–1222.
5. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer.* 2003;3:330–338.
6. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P i sur. Fluorinated pyrimidines, A new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature.* 1957;179:663-666.
7. Amstutz U, Farese S, Aebi S, Largiader CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene variation and severe 5-fluorouracil toxicity: a haplotype assessment. *Pharmacogenomics.* 2009;10(6):931–44.
8. Boige V, Vincent M, Alexandre P i sur. *DPYD* genotyping to predict adverse events following treatment with fluorouracil-based adjuvant chemotherapy in patients with stage III colon cancer: A secondary analysis of the PETACC-8 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2016.
9. Miura K, Kinouchi M, Ishida K i sur. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers (Basel)* 2010;2:1717–30.
10. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renee N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer.* 1999;79:627–630.
11. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW i sur. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21:237-242.
12. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(6):640–645.

13. Henricks LM, Lunenburg CA, Meulendijks D i sur. Translating *DPYD* genotype into DPD phenotype: using the *DPYD* gene activity score. *Pharmacogenomics*. 2015;16(11):1277-86.
14. Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R i sur. A point mutation in an invariant splice donor site leads to exon skipping in two unrelated Dutch patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 1996;19(5):645–654.
15. McLeod HL, Collie-Duguid ESR, Vreken P i sur. Nomenclature for human *DPYD* alleles. *Pharmacogenetics*. 1998;8(6):455-9.
16. Lee AM i sur. *DPYD* variants as predictors of 5-fluorouracil toxicity in adjuvant colon cancer treatment (NCCTG N0147). *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(12).
17. Offer SM, Wegner NJ, Fossum C, Wang K, Diasio RB. Phenotypic profiling of *DPYD* variations relevant to 5-fluorouracil sensitivity using real-time cellular analysis and in vitro measurement of enzyme activity. *Cancer Res*. 2013;73(6):1958–1968.
18. Van Kuilenburg AB, Häusler P, Schalhorn A i sur. Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetics in cancer patients with a c.1905+1G>A mutation in *DPYD* by means of a Bayesian limited sampling strategy. *Clin Pharmacokinet*. 2012;51(3):163–174.
19. Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, Danesi R, Canonico PL, Genazzani AA. *DPYD* IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013;14(11):1255–1272.
20. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM i sur. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in *DPYD* and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2011;17(10):3455–3468.
21. Deenen MJ, Cats A, Mandigers CM i sur. Prevention of severe toxicity from capecitabine, 5-fluorouracil and tegafur by screening for DPD-deficiency. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156(48):A4934.
22. Van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ i sur. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res*. 2000;6(12):4705–4712.
23. van Kuilenburg AB, Dobritzsch D, Meinsma R i sur. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J*. 2002; 364:157-63.

24. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of *DPYD* variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 2014;74(9):2545–2554.
25. Rosmarin D, Palles C, Church D i sur. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2014;32(10):1031-9.
26. Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL. Known variant *DPYD* alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics.* 2000;10(3):217-23.
27. Ezzeldin HH, Lee AM, Mattison LK, Diasio RB. Methylation of the *DPYD* promoter: an alternative mechanism for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11(24):8699–8705.
28. Morel A i sur. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(11):2895-904.
29. Seck K, Riemer S, Kates R i sur. Analysis of the *DPYD* gene implicated in 5-fluorouracil catabolism in a cohort of Caucasian individuals. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(16):5886–5892.
30. Van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN i sur. Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet.* 2010;128(5):529–538.
31. Sistonen J i sur. Predicting 5-fluorouracil toxicity: DPD genotype and 5,6-dihydrouracil:uracil ratio. *Pharmacogenomics.* 2014;15(13):1653–1666.
32. US Food and Drug Administration. Pharmacogenomic information capecitabine/fluorouracil (2015).
33. Froehlich TK, Amstutz U, Aebi S, Joerger M, Largiader CR. Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity. *Int J Cancer.* 2015;136(3):730-739.
34. Loganayagam A, Arenas Hernandez M, Corrigan A i sur. Pharmacogenetic variants in the *DPYD*, *TYMS*, *CDA* and *MTHFR* genes are clinically significant predictors of fluoropyrimidine toxicity. *Br J Cancer.* 2013;108(12):2505–2515.

35. Rosmarin D, Palles C, Church D i sur. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1031–1039.
36. Henricks LM, Lunenburg CA, Meulendijks D i sur. Translating *DPYD* genotype into DPD phenotype: using the *DPYD* gene activity score. *Pharmacogenomics*. 2015;16(11):1277-86.
37. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Genetics Home Reference. November 2011; <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/dihydropyrimidine-dehydrogenase-deficiency>. Pristupljeno 01.05.2021.
38. Marsh S, McLeod HL. Pharmacogenetics of irinotecan toxicity. *Pharmacogenomics*. 2004;5(7):835-43.
39. Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(5):807-14.
40. Yano H, Kayukawa S, Iida S i sur. Overexpression of carboxylesterase-2 results in enhanced efficacy of topoisomerase I inhibitor, irinotecan (CPT-11), for multiple myeloma. *Cancer Sci*. 2008;99(11):2309–2314.
41. Marsh S, Xiao M, Yu J, Ahluwalia R, Minton M, Freimuth RR, Kwok PY, McLeod HL. Pharmacogenomic assessment of carboxylesterases 1 and 2. *Genomics*. 2004; 84(4):661-8.
42. Bellott R, Le Morvan V, Charasson V i sur. Functional study of the 830C>G polymorphism of the human carboxylesterase 2 gene. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2008;61(3):481–488.
43. Wu MH, Chen P, Remo BF, Cook EH, Jr, Das S, Dolan ME. Characterization of multiple promoters in the human carboxylesterase 2 gene. *Pharmacogenetics*. 2003;13(7):425–435.
44. Innocenti F, Ratain MJ. Irinotecan treatment in cancer patients with *UGT1A1* polymorphisms. *Oncology*. 2003;17:52–55.
45. Beutler E, Gelbart T, Demina A. Racial variability in the UDP-glucuronosyltransferase 1 (*UGT1A1*) promoter: a balanced polymorphism for regulation of bilirubin metabolism? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8170–8174.

46. Marques SC, Ikediobi ON. The clinical application of *UGT1A1* pharmacogenetic testing: Gene-environment interactions. *Hum Genomics*. 2010;4(4):238. –.
47. Ivan Bilić. Uloga polimorfizama gena dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-glukuronil-transferaze u toksičnosti kemoterapije fluoropirimidinima i irinotekanom. Disertacija. Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu. 2016.
48. Amstutz U. i sur. Clinical pharmacogenetics implementation consortium (CPIC) guideline for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing: 2017 update. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103:210–216.
49. Boisdron-Celle, M i sur. Prevention of 5-fluorouracil-induced early severe toxicity by pre-therapeutic dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency screening: Assessment of a multiparametric approach. *Semin Oncol*. 2017;44:13–23.
50. Deenen MJ i sur. Upfront Genotyping of *DPYD*\*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *J Clin Oncol*. 2016;34:227–34.
51. Deenen MJ i sur. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in *DPYD* and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17:3455–68.
52. Lunenburg CA, van Staveren MC, Gelderblom H, Guchelaar HJ, Swen JJ. Evaluation of clinical implementation of prospective *DPYD* genotyping in 5-fluorouracil- or capecitabine-treated patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17:721–9.
53. Meulendijks D i sur. Clinical relevance of *DPYD* variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015;16:1639–50.
54. Etienne-Grimaldi MC, Boyer JC, Thomas F i sur. *UGT1A1* genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29:219–37.
55. Dean L. Irinotecan Therapy and *UGT1A1* Genotype. *Medical Genetics Summaries*. 2015 May 27 [Updated 2018 Apr 4].
56. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A i sur. ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*. 2012;23(10):2479–2516.

57. Watanabe T, Itabashi M, Shimada Y i sur. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2014 for treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 2015;20(2):207–239.
58. Toffoli G, Sharma MR, Marangon E, Posocco B i sur. Genotype-Guided Dosing Study of FOLFIRI plus Bevacizumab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Cancer Res.* 2017;23(4):918–924.
59. McWilliams RR, Foster NR, Mahoney MR i sur. North Central Cancer Treatment Group N0543 (Alliance): A phase 2 trial of pharmacogenetic-based dosing of irinotecan, oxaliplatin, and capecitabine as first-line therapy for patients with advanced small bowel adenocarcinoma. *Cancer.* 2017;123(18):3494–3501.
60. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD i sur. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2000;355(9209):1041–7.
61. Roncato R, Cecchin E, Montico M i sur. Cost vvaluation of irinotecan-related toxicities associated with the *UGT1A1*\*28 patient genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(1):123-130.