

Uloga farmakogenetike i polimorfizma gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu (DPYD) u personaliziranom liječenju 5-fluorouracilom

Jovanović, Ana

Professional thesis / Završni specijalistički

2022

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:993754>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-30**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Ana Jovanović

**ULOGA FARMAKOGENETIKE I POLIMORFIZMA GENA ZA
DIHIDROPIRIMIDIN-DEHIDROGENAZU (*DPYD*) U PERSONALIZIRANOM LIJEČENJU
5-FLUOROURACILOM**

Specijalistički rad

Zagreb, 2022.

Poslijediplomski specijalistički studij: Klinička farmacija

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Nada Božina, dr. med., spec. lab. med.

Specijalistički rad obranjen je dana 06. listopada 2022. na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Vesna Bačić Vrca

2. izv. prof. dr. sc. Nada Božina

3. prof. dr. sc. Karmela Barišić

Rad ima 78 listova.

Rad je izrađen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u sklopu poslijediplomskog specijalističkog studija Klinička farmacija pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Božine, dr. med., spec. lab. med.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Nadi Božini na mentorstvu i pomoći pri izradi ovog specijalističkog rada.

Zahvaljujem svojim kolegicama iz ljekarne na razumijevanju i kolegijalnosti tijekom cijelog trajanja studija.

Zahvaljujem svojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, strpljenju i razumijevanju.

SAŽETAK

Cilj istraživanja: Cilj ovog rada jest sistematično i pregledno prikazati farmakogenetiku 5-fluorouracila (5-FU-a) i polimorfizme gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu (*DPYD*) koji utječu na učinkovitost i sigurnost terapije 5-FU-om. Time bi se zdravstvenim djelatnicima olakšala odluka o odbacivanju ili odabiru i individualizaciji terapije 5-FU-om prema određenom genotipu onkološkog pacijenta kojem je potrebno liječenje 5-FU-om, a sve u svrhu sigurnog liječenja i prevencije teških nuspojava i smrti.

Materijali i metode: Pretražena je znanstvena literatura objavljena u bazama podataka Medline i PubMed u posljednjih 10 godina. Također su pretražene publikacije stručnih udruga i institucija, baze lijekova te ostali znanstveni izvori. Komentirane su terapijske smjernice za primjenu i individualizaciju terapije 5-FU-om (polimorfizmi gena *DPYD*-a c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A). Opisana je i moguća važnost drugih polimorfizama *DPYD*-a (c.496A>G, c.85T>C i c.2194G>A) te su navedene i međuetničke i međurasne razlike u učestalosti nekih polimorfizama *DPYD*-a. Izneseni su i podaci o mogućnostima individualizacije terapije 5-FU-om u Hrvatskoj, tj. informacije o laboratorijima koji provode genotipizaciju *DPYD*-a.

Rezultati: Aktivnost enzima dihidropirimidin-dehidrogenaze (DPD) ograničavajući je faktor brzine metabolizma 5-FU-a i podliježe velikoj varijabilnosti stoga su bolesnici s nedostatkom DPD-a pod povećanim rizikom od toksičnosti povezane s fluoropirimidinima. Smjernice za genotipizaciju *DPYD*-a i doziranje fluoropirimidina izdane od strane CPIC-a (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) uključuju 4 varijante gena *DPYD* za koje je dokazano da smanjuju aktivnost DPD-a (c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A). Proučavani su i drugi polimorfizmi (c.496A>G, c.85T>C i c.2194G>A) te većina rezultata govori u prilog smanjene aktivnosti enzima DPD-a uslijed njihove prisutnosti. U talijanskoj randomiziranoj studiji *Three or six colon adjuvant* (TOSCA) ozbiljne i

teške nuspojave zabilježene su u 38,2 % ispitanika (nositelji mutacija c.2194G>A, c.1905+1G>A i c.496A>G). Kliničko ispitivanje *Pan-European Trials in an Alimentary Tract Cancer* (PETACC-8) također potvrđuje gore navedeno jer je u istom utvrđeno da su se ozbiljne nuspojave javljale u 85,7 % nositelja mutacije c.2846A>T i 60,8 % nositelja mutacije c.2194G>A. Božina i suradnici su zabilježili ozbiljne nuspojave u čak 56,3 % ispitanika (nositelji varijanti c.496A>G ili c.2194G>A) dok mutacija c.85T>C nije bila povezana s razvojem ozbiljnih nuspojava. U radu Henricks i suradnika pokazano je da je predterapijsko testiranje isplativo ili barem ne predstavlja dodatni trošak za zdravstveni sustav.

Zaključak: Nositelji inaktivirajućih alela *DPYD*-a imaju značajno veći rizik ozbiljnih nuspojava. Zbog toga su izdane preporuke za obavljanje genetičkog testiranja *DPYD*-a ili mjerenja aktivnosti DPD-a prije primjene lijeka. Time se olakšava odluka o odabiru 5-FU-a i doze prema pacijentovom genetičkom profilu te se smanjuju troškovi zdravstvene zaštite jer se poboljšava liječenje i smanjuju rizici koji, osim što predstavljaju teško stanje i patnju za pacijenta, za zdravstveni sustav predstavljaju i trošak u zbrinjavanju nuspojava liječenja.

Ključne riječi: dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD), farmakogenetika, genski polimorfizam *DPYD*, nuspojave 5-FU, 5-fluorouracil

SUMMARY

Objectives: This thesis aim is to systematically and clearly present the pharmacogenetics of 5-fluorouracil (5-FU) and *DPYD* gene polymorphisms that affects the efficacy and safety of 5-FU therapy. Healthcare professionals would find it easier to decide whether to reject or select and individualize 5-FU therapy according to the specific genotype of an oncology patient in need of 5-FU treatment, thus providing the safe treatment and prevention of severe side effects and death.

Materials and methods: The scientific literature in databases Medline and PubMed in the last 10 years has been searched. Publications of professional associations and institutions, drug databases and other scientific sources also were searched. Therapeutic guidelines for the application and individualization of 5-FU therapy are commented (the most important polymorphisms of the *DPYD* gene c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T and c.1236G>A). The possible importance of other *DPYD* polymorphisms (c.496A>G, c.85T>C and c.2194G>A) is also described, and interethnic and interracial differences in the frequency of some *DPYD* polymorphisms are listed. Information on laboratories that perform *DPYD* genotyping and the possibilities of individualization of 5-FU therapy in Croatia are also presented.

Results: DPD activity is a limiting factor in the rate of 5-FU metabolism and is subject to high variability, therefore patients with DPD deficiency are at increased risk of toxicity related to fluoropyrimidines. Guidelines for *DPYD* genotyping and fluoropyrimidine dosing were published by CPIC (*Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*), which include 4 variants that have been shown to reduce DPD activity (c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T and c.1236G A). Other polymorphisms (c.496A>G, c.85T>C and c.2194G>A) have been studied in various studies and most of the results speak in favor of reduced activity of DPD enzymes due to their presence. In the Italian randomized study *Three or six colon adjuvant* (TOSCA), serious and severe side effects were reported in 38.2 % of subjects (carriers of mutations c.2194G>A, c.1905+1G>A and c.496A>G). Clinical trial *Pan-European Trials in an Alimentary*

Tract Cancer (PETACC-8) also confirms the above mentioned as it was found that serious side effects occurred in 85.7 % of carriers of mutation c.2846A>T and 60.8 % of carriers of mutation c.2194G>A. Božina and co-workers reported serious side effects in 56.3 % of subjects (carriers of c.496A>G or c.2194G>A) while c.85T>C mutation was not associated with the development of serious side effects. The work of Henricks and co-workers has shown that pre-therapy testing is cost-effective or at least does not represent an additional cost to the health care system.

Conclusion: Carriers of *DPYD* inactivating alleles have a significantly higher risk of serious side effects. Therefore, recommendations have been issued to perform genetic testing for *DPYD* or to measure DPD activity prior to drug administration. This facilitates the decision on the choice of 5-FU and dose individualization according to the patient's genetic profile and reduces health care costs because it improves treatment and reduces risks that represents suffering for the patient and cost the health system.

Keywords: dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), pharmacogenetics, *DPYD* gene polymorphism, 5-fluorouracil, 5-FU side effects

SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini.....	1
1.1.1. Povezanost genotipa i fenotipa.....	2
1.2. Farmakogenetika u onkologiji.....	4
1.3. Fluoropirimidini.....	5
1.4. 5-fluorouracil (5-FU) i protokoli.....	7
1.4.1. Doziranje 5-FU-a.....	7
1.4.2. Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi 5-FU-a.....	8
1.4.3. Protokoli.....	9
1.4.4. Farmakodinamika 5-FU-a.....	10
1.4.5. Farmakokinetika 5-FU-a.....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	15
3. MATERIJALI I METODE – SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI.....	16
3.1. Gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu (<i>DPYD</i>) i uloga u metabolizmu 5-FU-a.....	16
3.1.1. Preporuke za testiranje radi utvrđivanja nedostatka DPD-a.....	17
3.1.2. Genotipizacija <i>DPYD</i> -a.....	17
3.1.3. Fenotipizacija DPD-a.....	19
3.1.4. Istraživanje varijanti i uvrštavanje u smjernice.....	21

3.2. Smjernice regulatornih tijela i stručnih društava o primjeni farmakogenetičkog testiranja u liječenju fluoropirimidinima.....	23
3.2.1. CPIC-ove smjernice.....	23
3.2.1.1. Interpretacija genetskog testa i preporuke za doziranje fluoropirimidina prema zbroju aktivnosti za gen <i>DPYD</i>	25
3.2.1.2. Preporuke za doziranje fluoropirimidina prema <i>DPYD</i> genotipu.....	27
3.2.2. DPWG-ove smjernice.....	30
3.2.3. Preporuke SPT-a.....	33
3.3. Ostali potencijalno klinički važni polimorfizmi <i>DPYD</i> -a.....	35
3.4. Terapijsko praćenje lijeka (engl. <i>Therapeutic Drug Monitoring</i> , TDM).....	40
3.5. Etničke razlike u učestalosti pojedinih <i>DPYD</i> polimorfizama u populaciji.....	45
3.6. Isplativost genotipizacije u individualizaciji terapije fluoropirimidinima.....	50
3.7. Mogućnosti individualizacije terapije 5-FU-om u Republici Hrvatskoj.....	52
4. RASPRAVA.....	55
5. ZAKLJUČAK.....	60
6. LITERATURA.....	61
7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA.....	67
8. ŽIVOTOPIS.....	70

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

1.1. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini

Farmakogenetika/farmakogenomika proučava gensku podlogu razlika u učinku i nuspojavama lijekova među pojedincima. Farmakogenetika proučava interakcije jednog gena i lijeka, dok farmakogenomika proučava interakciju više gena (ili čak cijelog genoma) i lijeka. Genetička varijabilnost može biti odgovorna za nastanak od 25-50 % neočekivanih reakcija na lijek koje nastaju kao posljedica promijenjene farmakokinetike i farmakodinamike samog lijeka. Uz važne kliničke čimbenike, kao što su dob, spol, komorbiditeti, funkcija jetre i bubrega te okolišni čimbenici, u stvaranje preporuka za odabir najprikladnijeg lijeka i doze za svakog pojedinog bolesnika sve više se uključuju i nasljedne farmakogenetičke varijacije. Farmakogenetičkim analizama radi se probir, odnosno otkrivaju se pojedinci s povećanim rizikom za nastanak neželjenih nuspojava i prije uvođenja terapije. Taj proces prilagođavanja terapije svakom pacijentu, kojim se postiže maksimalni terapijski učinak i sigurnost liječenja, predstavlja koncept "personalizirane medicine" te je sve prisutniji u medicini. Stoga su osnovana stručna društva, poput *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)* i *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy - Pharmacogenetics Working Group (DPWG)*, koja sva nova saznanja prevode u upute i smjernice za lakši odabir lijeka i doze prema genetičkom profilu pacijenta. Raste i broj lijekova na tržištu čiji sažetci opisa svojstava lijeka sadržavaju informacije o farmakogenomici.

Većina se lijekova metabolizira procesima biotransformacije u jetri koji mogu biti pod značajnim genetičkim utjecajem. Biotransformacija može dovesti do detoksikacije i eliminacije lijeka, konverzije iz predlijeka u aktivni oblik ili stvaranja toksičnih metabolita, stoga je za sigurnu i učinkovitu primjenu lijekova potrebno znati koji enzimi i transporter sudjeluju u njihovoj biotransformaciji.

Metabolizam lijekova dijeli se u reakcije faze I (oksidacija, redukcija i hidroliza) i faze II (konjugacijske reakcije). U fazi I izvorni se lijek prevodi u polarniji metabolit te se, ako je dovoljno polaran, može brzo izlučiti iz organizma. Enzimi koji kataliziraju ove reakcije obuhvaćaju porodicu citokroma P450

(CYP) i dihidropirimidin-dehidrogenazu (DPD). Ipak, mnogi metaboliti u fazi I nisu dovoljno polarni pa se reakcijama konjugacije u fazi II dodatno polariziraju djelovanjem N-acetiltransferaze (NAT), tiopurin-S-metiltransferaze (TPMT), glutation-S-transferaze, uridin-difosfat glukuronil-transferaze (UGT) i ostalih enzima. Enzimi obje faze pokazuju značajnu polimorfnost te su veoma bitni za učinak lijeka i njegovu koncentraciju u krvi. Enzimi faze I sudjeluju u biotransformaciji više od 75 % propisivanih lijekova te time čine većinu istraživanih polimorfizama. Polimorfizmi mogu uzrokovati (1):

- produljeni i pojačani učinak lijeka
- toksičnost i razvoj nuspojava
- izostanak aktivacije predlijeka
- izostanak učinkovitosti pri primjeni preporučenih doza lijeka te potrebu za višim dozama
- aktivaciju štetnih i alternativnih puteva metabolizma
- interakcije lijekova

Uz polimorfizme gena koji kodiraju enzime bitne za metabolizam lijeka, za učinak i nuspojave veoma su bitni i polimorfizmi gena koji kodiraju za transportere lijekova, lokuse sustava ljudskog leukocitnog antigena (HLA), citokine i mnoge druge proteine (1). Sami polimorfizmi mogu biti u obliku heterozigota (jedan SNP (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*) na jednom alelu), homozigota (dva identična SNP-a na dva alela) ili složenog heterozigota (dva različita SNP-a na bilo kojem od dva alela) (2).

1.1.1. Povezanost genotipa i fenotipa

Genotip predstavlja gensku strukturu organizma dok fenotip podrazumijeva značajke organizma nastale interakcijom genotipa i okoliša. Brzina metabolizma (fenotip) određena je diplotipovima, odnosno kombinacijom dvaju haplotipova. Diplotipovi su sastavljeni od po jednog majčinog i očevog alela (jedan ili više alternativnih oblika gena nastalih mutacijom koji se nalaze na istom lokusu). Označavaju se zvjezdicom (*) koja predstavlja određenu varijaciju sekvence u genskom lokusu. Geni mogu biti izbrisani

ili udvostručeni/umnogostručeni (oznaka *1xN, *2xN, gdje je N broj kopija). Alelima se može dodijeliti zbroj funkcionalne aktivnosti (engl. *Activity Score*, AS) na način da se nefunkcionalnosti dodjeljuje 0, smanjenoj funkciji 0,5 te normalnoj funkciji 1,0. Zbroj alelnih aktivnosti općenito se kreće između 0 i $\geq 3,0$ te se prema njoj definiraju fenotipovi:

- 0 = PM (slabi/spori metabolizator)
- 0,5 = IM (intermedijarni metabolizator)
- 1,0-2,0 = RM (brzi metabolizator)
- $\geq 2,0$ = UM (ultrabrzi metabolizator)

Ipak, pri procjeni ukupne aktivnosti enzima/transportera, uz poznavanje genotipa/fenotipa, vrlo je bitno znati koji lijekovi su istovremeno i induktori ili inhibitori enzima/transportera. Godine 2017. CPIC je objavio standardiziranu terminologiju nalaza genetičkih varijanti i povezanog fenotipa zbog potrebe za ujednačavanjem naziva na međunarodnoj razini (1).

Tablica 1. Standardizirana terminologija nalaza genetičkih varijanti i povezanog fenotipa (1)

Kategorija izraza/gena	Izraz za funkcionalnost	Definicija funkcije	Definicija gena	Primjeri
Funkcionalni status alela/ svi geni	povećana funkcija	funkcija veća od normalne	-	CYP2C19*17
	normalna funkcija	potpuna (normalna) funkcija/ „wild type“ tj. divlji tip	-	CYP2C19*1
	smanjena funkcija	funkcija manja od normalne	-	CYP2C19*9
	bez funkcije	nema funkcije	-	CYP2C19*2
	nepoznata funkcija	nema literarnih podataka o funkciji ili je novootkriveni alel	-	CYP2C19*29
	nesigurna funkcija	literarni podaci o funkciji su nedovoljni ili su proturječni	-	CYP2C19*12
Fenotip aktivnosti enzima (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5, DPYD, TPMT, UGT1A1)	vrlo brzi metabolizator UM	aktivnost enzima je povećana u usporedbi s RM	2 alela s povećanom funkcijom ili više od 2 alela s normalnom funkcijom	CYP2C19*17/*17 CYP2D6*1/*1xN
	brzi metabolizator RM	aktivnost enzima je povećana u usporedbi s NM, ali je manja u usporedbi s UM	kombinacija alela s normalnom funkcijom i alela s povećanom funkcijom	CYP2C19*1/*17
	normalan metabolizator NM	aktivnost enzima je potpuna (normalna)	kombinacija alela s normalnom funkcijom i alela sa smanjenom funkcijom	CYP2C19*1/*1
	srednje brzi - intermedijarni metabolizator IM	smanjena aktivnost enzima (aktivnost je između NM i PM)	kombinacija alela s normalnom funkcijom, alela sa smanjenom funkcijom i/ili alela bez funkcije	CYP2C19*1/*2
	slabi (spori) metabolizator PM	niska ili dokinuta aktivnost enzima	kombinacija alela bez funkcije i/ili alela sa smanjenom funkcijom	CYP2C19*2/*2

1.2. Farmakogenetika u onkologiji

Početak 21. stoljeća razvijen je velik broj novih onkoloških lijekova koji su unaprijedili liječenje onkoloških bolesti. Prvenstveno je riječ o biološkim lijekovima (tzv. "pametni" lijekovi) koji bi zbog selektivnijeg djelovanja na tumorske stanice trebali biti sigurniji za pacijente, no primjenom u praksi utvrđeno je da se nuspojave nisu smanjile niti nestale već se samo promijenio njihov profil. Naime, antitumorski lijek ne interferira samo s procesima tumorigeneze već i s fiziološkim signalnim putovima u stanicama (u pitanju su isti procesi) što dovodi do oštećenja zdravih stanica i posljedičnog nastanka nuspojava, slično kao i kod terapije citostaticima.

Prvi je korak u liječenju karcinoma odabir lijeka ili lijekova koji će biti najučinkovitiji. Određivanje potrebne doze temelji se na pacijentovoj površini tijela (engl. *Body Surface Area*, BSA). Ovaj način određivanja doze nije idealan budući da postoje značajne razlike između samih pacijenata prema dobi, spolu, funkciji jetre i bubrega, komorbiditetima, konkomitantnoj terapiji i aktivnosti metaboličkih enzima, a sve to može značajno utjecati na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka (3). U posljednje vrijeme sve se više spominje i učinak crijevne mikrobiote na učinkovitost i toksičnost lijekova putem metabolizma, imunomodulacije i smanjenja mikrobiološke raznolikosti (4). Stoga je jako bitno personalizirati dozu lijeka kako bi se spriječile neželjene reakcije na lijek ili izostanak učinka (3).

Visoka smrtnost zbog samog malignog oboljenja dovodi do prihvaćanja visoke stope nuspojava onkološke terapije i od strane pacijenata i regulatornih tijela, što ni u jednoj drugoj grani medicine ne bi bio slučaj. Te nuspojave nekada mogu biti vrlo teške, pa čak i smrtonosne te je utvrđeno da njihov nastanak može biti uvjetovan genetičkom predispozicijom. One također mogu ograničavati učinkovitost liječenja jer dovode do prekida liječenja ili promjene učestalosti doziranja lijeka. Onkološka farmakogenomika proučava varijabilnost naslijeđenog (engl. *germline*) i nenaslijeđenog, somatskog (tumorskog) genoma. Sam odgovor na onkološku terapiju može biti uvjetovan i naslijeđenim i tumorskim genomom. Naslijeđeni genotip utječe na toksičnost onkološke terapije i tumorski odgovor, a tumorski genotip na terapijsku učinkovitost.

Danas se u kliničkoj onkološkoj praksi rutinski određuju polimorfizmi manjeg broja gena (Tablica 2) za koje je dokazan utjecaj na učinkovitost i sigurnost liječenja. Veliki broj polimorfizama se istražuje, rezultati su oprječni, no sigurno je da je farmakogenetika budućnost onkologije u smislu otkrivanja novih biljega na temelju kojih će se svakom pacijentu dati individualizirana doza uravnotežena između učinkovitosti i toksičnosti (5).

Tablica 2. Farmakogenetički biljezi u rutinskoj onkološkoj primjeni (5)

Gen genotip/ biomarker	Lijek	Indikacija	Odgovor na lijek (fenotip)
<i>UGT1A1</i>	irinotekan	rak crijeva	neutropenija
<i>DPYD</i>	fluoropirimidini	rak crijeva	nuspojave
Estrogenski receptor	tamoksifen	rak dojke ovisan o hormonu	učinkovitost
Estrogenski receptor i progesteronski receptor	anastrozol letrozol egzemestan	rak dojke ovisan o hormonu	učinkovitost
<i>HER2</i>	trastuzumab lapatinib	HER2 pozitivan rak dojke	učinkovitost
<i>KRAS</i>	cetuksimab panitumumab	rak crijeva	učinkovitost
<i>EGFR</i>	cetuksimab/ panitumumab gefitinib/erlotinib	rak crijeva NSCLC	učinkovitost
<i>EML4-ALK</i>	krizotinib	NSCLC	učinkovitost
<i>BRAF</i>	vemurafenib	melanom	učinkovitost
<i>KIT (c-KIT)</i>	imatinib	GIST	učinkovitost

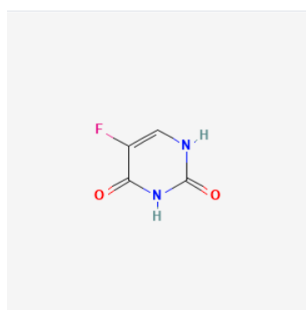
NSCLC (engl. *Non-Small Cell Lung Cancer*) = karcinom nemalih stanica pluća

GIST = gastrointestinalni stromalni tumori

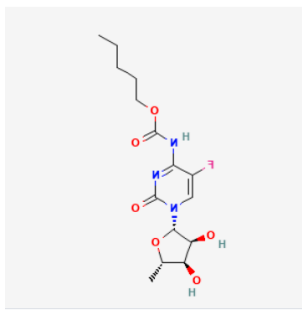
1.3. Fluoropirimidini

Fluoropirimidini su skupina lijekova koja je temelj liječenja kolorektalnog karcinoma i drugih solidnih tumora poput karcinoma dojke, vrata i glave. Svake se godine njima liječi oko 2 milijuna

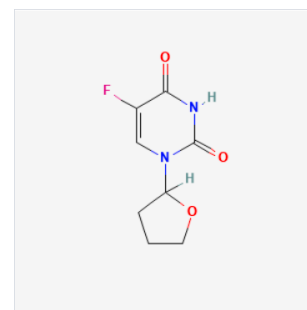
novooboljelih diljem svijeta (6). Kao antimetaboliti inhibiraju sintezu deoksiribonukleinske kiselice (DNA) u stanicama te posljedično zaustavljaju rast tumorskih stanica. U tu skupinu ubrajaju se 5-fluorouracil (5-FU) i njegovi predlijekovi kapecitabin i tegafur (Slika 1). Primijene li se doze koje pacijent ne može tolerirati, uz maligne, oštećuju se i zdrave stanice. Izloženost prevelikim dozama fluoropirimidina može se manifestirati u obliku ozbiljnih nuspojava poput mukozitisa, dijareje, mijelosupresije, sindroma šakastopalo, neurotoksičnosti (encefalopatija, koma) ili akutne kardijalne toksičnosti (aritmije, zastoj srca) koje mogu biti smrtonosne (7). Ovakve teške nuspojave razvije 10-40 % pacijenata na terapiji fluoropirimidinima (6).



5-fluorouracil (5-FU)



kapecitabin



tegafur

Slika 1. Kemijske strukture fluoropirimidina (8, 9, 10)

Predoziranje može biti posljedica kvara na infuzijskoj pumpi, greške u izračunu doze, pretjerane ili slučajne ingestije oralnog fluoropirimidina (npr. kapecitabina), konkomitantne terapije koja inhibira metabolizam fluoropirimidina ili pak nedostatka enzima dihidropirimidin-dehidrogenaze (DPD) koji metabolizira fluoropirimidine. Trenutno u Europskoj uniji nema zadovoljavajućeg tretmana predoziranja fluoropirimidinima. Ovisno o ozbiljnosti stanja, pacijentima se pruža sva moguća suportivna njega (nadoknada tekućine, antibiotici u slučaju infekcije, faktori rasta s ciljem stvaranja obrambenih leukocita, održavanje krvnog tlaka i primjena analgetika) te takvi pacijenti moraju biti pod medicinskim nadzorom još 4 tjedna nakon predoziranja. Uridin-triacetat mogao bi biti učinkoviti antidot fluoropirimidinima jer kao

pirimidinski analog, nakon ingestije, podliježe deacetilaciji do uridina koji potom kompetitivno inhibira stanična oštećenja i smrt. Europska agencija za lijekove (EMA) ovaj lijek navodi kao "orphan drug", odnosno lijek namijenjen primjeni u rijetkim situacijama (7, 11, 12).

1.4. 5-fluorouracil (5-FU) i protokoli

5-FU indiciran je u adjuvantnom ili palijativnom liječenju uznapredovalih stadija kolorektalnog karcinoma, karcinoma želuca, gušterače, cerviksa, tumora u području glave i vrata te uznapredovalog i/ili metastatskog karcinoma dojke u odraslih osoba, kao monoterapija ili kombinirana kemoterapija (tzv. protokoli). Liječenje je potrebno započeti u bolnici zbog praćenja stanja pacijenta. Aplikacija se vrši intravenskom injekcijom te intravenskom ili intraarterijskom infuzijom (7, 13).

1.4.1. Doziranje 5-FU-a

5-FU lijek je s uskom terapijskom širinom što znači da je vrlo mala razlika između minimalne učinkovite i maksimalno podnošljive doze (6). Doziranje ovisi, osim o tjelesnoj masi ili BSA, i o načinu primjene i liječenja (7, 13):

a) inicijalna terapija pri dnevnoj primjeni:

- i. v. infuzija: 15 mg/kg ili 600 mg/m² tijekom 4 sata dnevno (stopa infuzije 40 kapi/min) sve do pojave nuspojava ili ukupno primijenjene doze u cijelom ciklusu od 12-15g
- i. v. injekcija (potrebno sporije injektirati kroz 2-3 minute):
 - 1., 2. i 3. dan: 12 mg/kg ili 480 mg/m²
 - 5., 7. i 9. dan: 6 mg/kg ili 240 mg/m² (ako nema znakova toksičnosti nakon prva 3 dana)
- intra-arterijska infuzija: 5 ili 7,5 mg/kg dnevno (kontinuirana infuzija tijekom 24 sata)

Infuzijska primjena ima prednost zbog manje toksičnosti.

b) inicijalna terapija pri tjednoj primjeni:

- polagana i. v. injekcija: 15 mg/kg ili 600 mg/m² jednom tjedno

c) terapija održavanja:

- 5-10 mg/kg ili 200-400 mg/m² i. v. jednom tjedno (nakon povlačenja nuspojava i daljnjeg povećanja broja leukocita do 3000 - 4000/μl i broja trombocita do 80 000 - 100 000/μl)

Maksimalna dnevna doza je 1 gram 5-FU-a, a navedene doze odnose se na normalnu tjelesnu masu.

d) kombinacija 5-FU-a s drugim citostaticima ili s radioterapijom:

Dozu je potrebno odgovarajuće smanjiti, a primjena se može provesti u obliku 24-satne kontinuirane intravenske drip infuzije (kap po kap). U slučaju kombiniranja 5-FU-a i radioterapije primjenjuju se standardne doze 5-FU-a.

U pojedinih skupina bolesnika preporučene doze potrebno je smanjiti. U pretilih pacijenata te onih s ascitesom ili edemima dozu treba računati prema idealnoj tjelesnoj težini. U slučaju mijelosupresije (broj leukocita <4000/μl, broj trombocita <100 000/μl), teškog oštećenja funkcije bubrega i jetre, nakon velikih kirurških zahvata unazad 30 dana ili loše uhranjenih pojedinaca preporučene doze moraju se smanjiti za jednu trećinu do jednu polovinu (13). Doze je potrebno reducirati prema važećim smjernicama i kod nositelja pojedinih mutacija gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu (*DPYD*).

1.4.2. Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi 5-FU-a

Prije i tijekom liječenja 5-FU-om preporučuje se:

- svakodnevni pregled usne šupljine i ždrijela radi promjena na sluznici
- provjera krvne slike prije svake primjene 5-FU-a te svaka 2-3 dana na početku liječenja
- provoditi testove funkcije jetre u redovitim razmacima
- testirati stolicu na okultno krvarenje

Svi pacijenti trebaju biti dobro informirani o nuspojavama te znati da na prvi znak istih trebaju obavijestiti liječnika. Liječenje hitno treba prekinuti kod jakih gastrointestinalnih nuspojava (stomatitis, mukozitis, teška dijareja, jako povraćanje, ulkusi, krvarenje), broja leukocita <3000/μl, broja trombocita <80 000/μl te centralnih (ataksija i tremor) i srčanih nuspojava, a smije se nastaviti nakon potpunog povlačenja nuspojava

i ako stanje pacijenta to omogućava, iako se kod teških gastrointestinalnih, srčanih ili neuroloških simptoma toksičnosti nastavak liječenja ne preporučuje.

Pri istovremenoj primjeni metotreksata i 5-FU-a, metotreksat se ne smije primijeniti 24 sata prije 5-FU-a (ne obrnuto) kako bi se postigao optimalni učinak.

Tijekom liječenja 5-FU-om ne smije se vršiti imunizacija živim cjepivima i potrebno je izbjegavati svaki kontakt s cjepivima protiv poliomijelitisa zbog imunosupresivnog djelovanja 5-FU-a i povećanog rizika od infekcija.

Antivirotik brivudin ne smije se primijeniti kod pacijenata koji su nedavno primili, trenutno primaju ili će u iduća 4 tjedna primiti 5-FU, uključujući i topikalni oblik ili njegove predlijekove kapecitabin i tegafur. Naime, interakcija između brivudina i 5-FU-a potencijalno je fatalna te mora proći barem 4 tjedna između završetka liječenja brivudinom i početka liječenja 5-FU-om. Ukoliko ipak dođe do slučajne primjene brivudina u osoba koje su nedavno primile ili primaju 5-FU, obvezan je prekid primjene svih lijekova, hospitalizacija i pružanje suportivne njege.

Zbog mutagenog djelovanja 5-FU-a, muškarcima se ne preporučuje začinjati dijete za vrijeme trajanja i 6 mjeseci nakon liječenja te se preporučuje zatražiti liječnički savjet o pohrani sperme zbog mogućnosti teškog oštećenja spermatogeneze tijekom liječenja ovim lijekom. Žene ne smiju zatrudnjati tijekom liječenja i moraju koristiti učinkovite mjere kontracepcije. U svakom slučaju, planira li bolesnik imati dijete nakon prekida terapije, preporučuje se genetičko savjetovanje (7, 13).

1.4.3. Protokoli

Kao što je već spomenuto, 5-FU može se koristiti kao monoterapija ili u kombinaciji s drugim lijekovima, odnosno u sklopu raznih protokola za liječenje malignih bolesti. Odgovor pacijenta na prvu liniju, odnosno monoterapiju 5-FU-om iznosi svega 10-15 % u uznapredovalom kolorektalnom karcinomu pa se zbog boljeg odgovora na terapiju kombinira s drugim lijekovima, čime se odgovor povećava na 40-50 % (13). Postoji veliki broj protokola, a neki najčešći navedeni su u Tablici 3. Odabir protokola ovisi o vrsti i raširenosti bolesti te osobinama pacijenta.

Tablica 3. Neki od protokola koji sadržavaju 5-FU (14, 15)

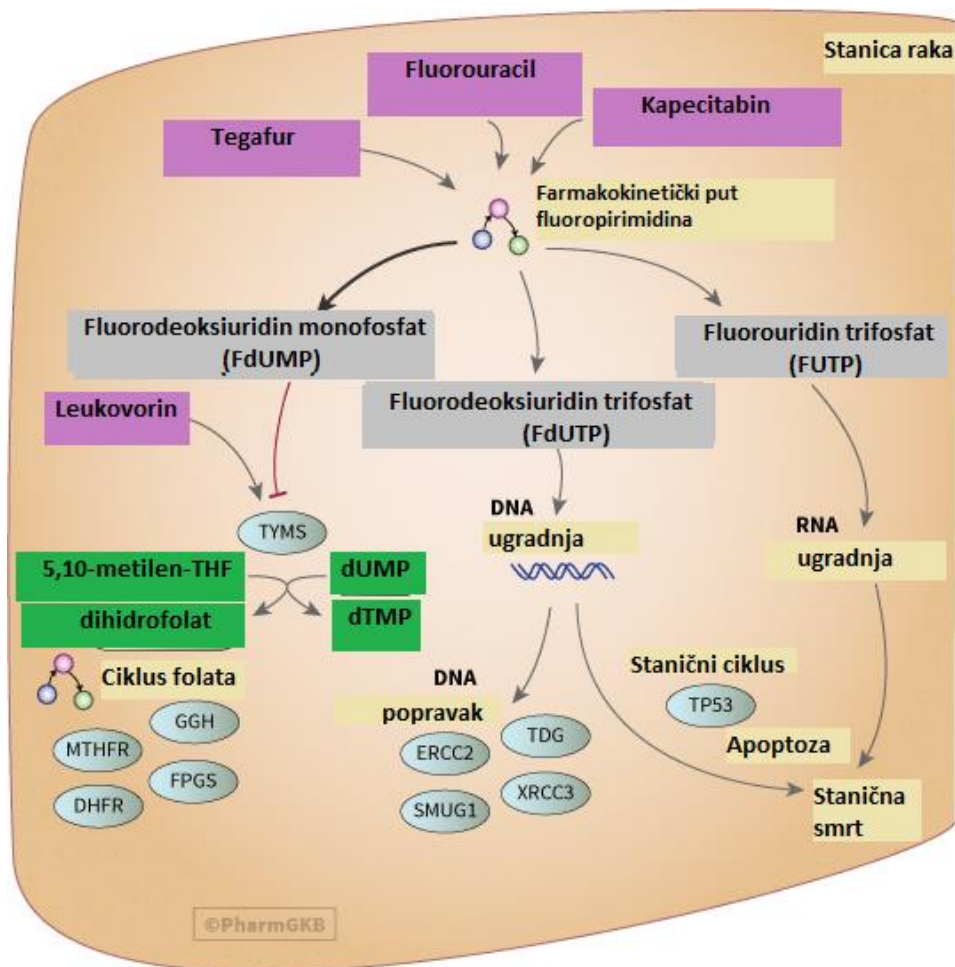
NAZIV	LIJEKOVI	PRIMJENA
BRAJCMFPO	ciklofosfamid + metotreksat + 5-FU	adjuvantna terapija karcinoma dojke
BRAJFEC	5-FU + epirubicin + ciklofosfamid	
BRAJFECD	5-FU + epirubicin + ciklofosfamid + docetaksel	(neo)adjuvantna terapija karcinoma dojke
BRAJFECDT	5-FU + epirubicin + ciklofosfamid; potom docetaksel + trastuzumab	
BRAVCMF	ciklofosfamid + metotreksat + 5-FU	palijativna terapija karcinoma dojke
FOLFIRI	folna kiselina (leukovorin) + 5-FU + irinotekan	palijativna terapija metastatskog gastrointestinalnog i ezofagealnog karcinoma
FOLFOX	folna kiselina (leukovorin) + 5-FU + oksaliplatin	palijativna terapija metastatskog kolorektalnog karcinoma
FOLFOXIRI	folna kiselina (leukovorin) + 5-FU + oksaliplatin + irinotekan	

5-FU - 5-fluorouracil

1.4.4. Farmakodinamika 5-FU-a

Glavni mehanizam djelovanja fluoropirimidina je inhibicija timidilat-sintaze (TYMS), no postoje i alternativni mehanizmi djelovanja preko ugradnje metabolita u DNA i RNA (Slika 2). Metaboliziraju se u tri farmakodinamički aktivna metabolita: fluorodeoksiuridin-monofosfat (FdUMP), fluorodeoksiuridin-trifosfat (FdUTP) i fluorouridin-trifosfat (FUTP). FdUMP stvara kompleks s TYMS-om te inhibira metilaciju i pretvorbu deoksiuridin-monofosfata (dUMP) u deoksitimidin-monofosfat (dTMP) koji je potreban za sintezu pirimidina i DNA. Posljedično dolazi do inhibicije pretvorbe 5,10-metilen-tetrahidrofolata (5,10-metilen-THF) u dihidrofolat koji je ključan za recikliranje metilne skupine u metabolizmu folata i sintezu metionina. Zbog navedenog ravnoteža se pomiče na stranu nastanka

FdUTP-a i FUTP-a, čime se povećavaju stanično oštećenje i smrt, odnosno dolazi do fazno-specifične inhibicije sinteze DNA, posebice u S-fazi staničnog ciklusa (16). Upravo je povišena koncentracija FdUMP-a, do koje dolazi zbog smanjene aktivnosti DPD-a i pomicanja ravnoteže na stranu stvaranja toksičnih metabolita, glavni čimbenik nastanka toksičnosti kod primjene 5-FU-a (17).



Slika 2. Farmakodinamički put fluoropirimidina (16). DHFR= dihidrofolat-reduktaza; dTMP= deoksitimidin-monofosfat; dUMP= deoksiuridin-monofosfat; FPGS= folipoliglutamat-sintetaza; GGH= gama-glutamil-hidrolaza; MTHFR= metilentetrahidrofolat-reduktaza; TDG= timin-DNA-glikozilaza; THF= tetrahidrofolat; TP53= tumorski protein 53; TYMS= timidilat-sintaza. Preuzeto i modificirano prema PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165291507>).

1.4.5. Farmakokinetika 5-FU-a

Apsorpcija oralno primijenjenog 5-FU-a djelomična je (0-80 %) te je to jedan od glavnih razloga zbog kojih se ne primjenjuje na taj način. Nakon i. v. primjene ulazi u tjelesne tekućine i nestaje iz cirkulacije unutar 3 sata (9, 10).

Nakon primjene doze od 15 mg/kg i. v. lijek pokazuje raspodjelu od 0,12 L/kg i posebice se akumulira u brzo proliferirajućem tkivu kao što su koštana srž, sluznica crijeva i neoplazije. Prolazi krvno-moždanu barijeru, a maksimalna koncentracija u likvoru postiže se nakon 1,5 - 2 sata te čini otprilike 50 % plazmatske koncentracije (7, 13).

Metabolizam se odvija u jetri i sličan je metabolizmu uracila. 5-FU metabolizira se preko nekoliko puteva te neki od njih vode u aktivaciju i učinak lijeka (Slika 3). Limitirajući korak u metabolizmu 5-FU-a je pretvorba 5-FU-a u dihidrofluorouracil (DHFU) pomoću enzima DPD kodirane genom *DPYD*. DHFU ima puno dulji poluvijek eliminacije nego 5-FU te se pomoću dihidropirimidinaze (DPYS) metabolizira u fluoro-beta-ureidopropionat (FUPA), koji se dalje metabolizira u fluoro-beta-alanin (FBAL) te se izlučuje urinom djelovanjem beta-ureidopropionaze (UPB1). Nedostatak enzima ili njihove aktivnosti na ovom metaboličkom putu može rezultirati ozbiljnim, ponekad i fatalnim, nuspojavama 5-FU-a. Metabolizmom nastaju i netoksični metaboliti ugljikov dioksid i urea (7, 13, 18).

Kao što je prethodno objašnjeno, glavni mehanizam aktivacije 5-FU-a je pretvorba u FdUMP koji inhibira TYMS. Direktni put uključuje djelovanje timidilat-fosforilaze (TYMP) kojom iz 5-FU-a nastaje fluorodeoksiuridin (FUDR) iz kojeg djelovanjem timidin-kinaze (TK1) nastaje FdUMP. Indirektni način pretvorbe uključuje pretvorbu 5-FU-a u fluorouridin-monofosfat (FUMP) iz kojeg nastaje fluorouridin-difosfat (FUDP) ili fluorouridina (FUR) koji se pretvara u FUDP. FUDP se potom metabolizira u fluorodeoksiuridin-difosfat (FdUDP) i u konačnici u FdUMP djelovanjem ribonukleotidnih-reduktaza. FUDP i FdUDP mogu biti metabolizirani i u FUTP i FdUTP te potom ugrađeni u DNA i RNA, čime doprinose farmakodinamskom učinku 5-FU-a (18).

Eliminacija 5-FU-a odvija se u dvije faze nazvane alfa i beta. Poluvrijeme eliminacije u alfa fazi iznosi 8 - 22 minute, dok u beta fazi iznosi približno 20 sati zbog aktivnih metabolita u tkivu, te ovisi o dozi. Većina 5-FU-a (60-80 %) izdiše se plućima kao ugljikov dioksid, a 7-20 % izlučuje se nepromijenjeno bubrezima (gotovo 90 % unutar prvog sata). Bubrežni klirens je oko 170-180 ml/min (7, 13).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog specijalističkog rada jest sistematično i pregledno prikazati farmakogenetiku 5-FU-a i polimorfizme gena *DPYD*-a koji utječu na učinkovitost i sigurnost terapije 5-FU-om. Prema određenom genotipu onkološkog pacijenta kojem je potrebno liječenje 5-FU-om, zdravstvenim djelatnicima bi se olakšala odluka o odbacivanju ili odabiru i individualizaciji terapije 5-FU-om, a sve u svrhu sigurnog liječenja i prevencije teških nuspojava i smrti.

Hipoteza: Uslijed terapije 5-FU-om teške i vrlo teške nuspojave javljaju se u otprilike 16 % pacijenata kao posljedica mutacija *DPYD* u tih pacijenata koje dovode do smanjene aktivnosti DPD-a i povećane toksičnosti i učinka lijeka. Temeljem predterapijskog farmakogenetičkog testiranja mogu se procijeniti odgovor na terapiju i razvoj nuspojava, čime se pravovremeno identificiraju pojedinci s povećanim rizikom za teške i vrlo teške nuspojave. Time bi se povećala sigurnost i uspješnost liječenja te se smanjili troškovi zdravstvene zaštite. Naime, smanjio bi se rizik od nastanka nuspojava koje, osim što predstavljaju teško stanje i patnju za pacijenta, za zdravstveni sustav predstavljaju dodatni trošak zbog njihovog zbrinjavanja. Ovim radom doprinijelo bi se širenju znanja iz područja farmakogenetike s naglaskom na individualizaciju terapije 5-FU-om.

3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNANJA O TEMI

U svrhu pisanja ovog specijalističkog rada pretražena je znanstvena literatura u bazama podataka Medline i PubMed prema ključnim riječima 5-fluorouracil (5-FU), dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD), farmakogenetika, genski polimorfizam i nuspojave 5-FU-a u razdoblju od posljednjih 10 godina. Također su pretražene i publikacije stručnih udruga i institucija (CPIC i PharmGKB), baze lijekova Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), Europske agencije za lijekove (EMA) i ostali znanstveni izvori.

Posebno su komentirane terapijske smjernice za primjenu i individualizaciju terapije 5-FU-om u kojima su opisani najvažniji polimorfizmi gena *DPYD*-a: c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A. Opisana je i moguća važnost drugih polimorfizama *DPYD*-a, koji još uvijek nisu u smjernicama, a mogli bi biti klinički značajni poput c.496A>G, c.85T>C i c.2194G>A. Navedene su i komentirane međuetničke i međurasne razlike u učestalosti nekih polimorfizama *DPYD*-a, što može biti relevantno za uključivanje istih u dijagnostički panel. Također su izneseni i podaci o mogućnostima individualizacije terapije 5-FU-om u Hrvatskoj, tj. informacije o laboratorijima koji provode genotipizaciju *DPYD*-a.

3.1. Gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu (*DPYD*) i uloga u metabolizmu 5-FU-a

Gen *DPYD* nalazi se na kromosomu 1p22 s 4399 nukleotida na 23 kodirajuća egzona (6) te kodira za sintezu dihidropirimidin-dehidrogenaze (DPD). Fiziološka je uloga enzima razgradnja suviška timina i uracila do uglavnom neaktivnih metabolita koji se izlučuju urinom (5), kao i metabolizam endogenog uracila (U) u dihidrouracil (DHU) (19). Enzim se većinom nalazi u jetri, ali prisutan je i u intestinalnoj mukozii, leukocitima i tumorskim stanicama (17). U slučaju potpuno izraženog nasljednog nedostatka DPD-a, kada je enzimska aktivnost <1 %, nastaje tzv. timin-uracilurija, odnosno poremećaj koji se manifestira neurotoksičnošću uz konvulzije i/ili zastoje u mentalnom i fizičkom rastu i razvoju. U rjeđim se slučajevima isti nedostatak može povezati i s autizmom (5). Enzim DPD ima ključnu ulogu u

metabolizmu fluoropirimidina kao limitirajući faktor brzine metabolizma te u normalnim uvjetima metabolizira približno 80-90 % primijenjene doze 5-FU-a u netoksični DHFU (4). Od ukupno primijenjene doze svega se 1-3 % metabolizira u citotoksične metabolite, dok se ostatak izlučuje urinom (6).

3.1.1. Preporuke za testiranje radi utvrđivanja nedostatka DPD-a

Europska medicinska agencija (EMA) u travnju 2020. godine objavila je preporuku za testiranje na nedostatak enzima DPD-a prije liječenja 5-FU-om, kapecitabinom, tegafurom i flucitozinom oslanjajući se na CPIC-ove i DPWG-ove smjernice. Testiranje je moguće provesti mjerenjem koncentracije uracila (fenotipizacija) ili provjerom prisutnosti mutacija *DPYD*-a (genotipizacija). Te preporuke NE ODRNOSE se na topikalni 5-FU za liječenje keratoza i bradavica jer je sistemska apsorpcija kroz kožu zanemariva. Budući da 7-9 % bijelaca ima hipofunkcionalni enzim DPD, a do 0,5 % ima nefunkcionalni enzim DPD, bolesnicima s potpunim nedostatkom enzima preporučeno je izabrati drugi lijek i ne primjenjivati 5-FU, a onima s djelomičnim nedostatkom dati reduciranu dozu. U bolesnika koji primaju kontinuirane infuzije 5-FU-a preporučuje se i terapijsko praćenje lijeka (TDM, engl. *therapeutic drug monitoring*) kao dodatna metoda sprječavanja toksičnih učinaka (20), pri čemu bi ciljana koncentracija, izražena kao površina ispod krivulje koncentracija u odnosu na vrijeme AUC (engl. *Area Under the Curve*) trebala iznositi 20-30 mg x h/L (7, 13). Sukladno navedenome, sažetci opisa svojstava lijeka za 5-FU sadrže preporuku o testiranju aktivnosti DPD-a prije početka terapije (7, 13).

3.1.2. Genotipizacija *DPYD*-a

Gen *DPYD* jedan je od visokopolimorfnih gena s preko 160 različitih varijanti (17). Većina tih varijanti je funkcionalna dok je njih preko 50 hipofunkcionalno ili u potpunosti nefunkcionalno. Budući da

je, kao što je već spomenuto, DPD prvi i limitirajući enzim u metabolizmu fluoropirimidina koji inaktivira 80-90 % primijenjenog 5-FU-a, izdane su smjernice za doziranje fluoropirimidina prema genotipu temeljene na hipofunkcionalnim i nefunkcionalnim varijantama. Veliki broj varijanti još se istražuje i smatra potencijalno veoma bitnima u razvoju toksičnih učinaka fluoropirimidina, ali se zbog dosadašnjih oprječnih rezultata ne nalaze u smjernicama za doziranje. Upravo je taj veliki broj varijanti nesigurnog značaja (VUS, engl. *Variant of Unknown Significance*) jedan od razloga nedovoljnog probira prije primjene lijeka u većini država svijeta (5). Drugi razlog je potreba da rutinsko DPD testiranje bude vremenski i financijski isplativo te praktično i jednostavno, kao i da testovi budu specifični i osjetljivi na validirane biljege. Ipak, genske varijante objašnjavaju svega 30 % ranih nuspojava povezanih s fluoropirimidinima (4). Osloniti se isključivo na genotipizaciju najčešćih varijanti nije dovoljno već je potrebno u test-panele uključiti i druge varijante za koje se potvrdi povezanost s nuspojavama, kao i provoditi druge metode probira poput fenotipizacije (21). Današnji testovi za predterapijsku genotipizaciju *DPYD*-a usmjereni su na četiri dobro utvrđene varijante koje su u smjernicama, dok se na ostale ne provodi testiranje (6). Prednost genotipizacije je u tome što uzorci ne zahtijevaju stroge uvjete čuvanja prije analize koja je jednostavna, rezultati su pouzdani i jednoznačni te jasno određuju divlji tip, heterozigota ili homozigota (21). Nedostatak genotipizacije, uz spomenutu malu osjetljivost, je i bojazan od poddoziranja pacijenata uslijed korištenja reduciranih početnih doza, čime se umanjuje učinak terapije. Prisutan je i strah od odgađanja tretmana zbog čekanja rezultata genotipizacije, no imajući na umu da se rezultati najčešće dobiju unutar nekoliko dana, a da se 5-FU ne koristi za hitna onkološka stanja, to je vrijeme odgode prihvatljivo (22). No upravo želja za stvaranjem savršenog testa, kojim bi se provodio idealni probir, onemogućava implementaciju u praksu. Dosadašnje spoznaje nisu potpune i potrebna su daljnja istraživanja, no većom primjenom dosadašnjih spoznaja i svega što je na raspolaganju povećala bi se sigurnost i učinkovitost liječenja te bi se smanjili troškovi u zdravstvenim sustavima (21).

Pacijenti s niskom aktivnošću DPD-a uslijed primjene 5-FU-a mogu razviti brojne nuspojave zbog nedovoljnog metabolizma u DHFU i akumuliranja toksičnih metabolita. Teške (stupnja III) i vrlo teške

(stupnja IV) nuspojave (klasificirane prema *Common Terminology Criteria for Adverse Events*, CTCAE) javljaju se u otprilike 16 % pacijenata kao posljedica mutacija *DPYD*-a u tih pacijenata koje dovode do smanjene aktivnosti DPD-a. Smanjena aktivnost DPD-a dovodi do nakupljanja aktivnog metabolita FUDR-a i povećane toksičnosti i učinka lijeka koje se manifestiraju kao stomatitis, neutropenija, dijareja, mučnina, neurološki i kardiološki simptomi, pa čak i smrt. Toksičnost se obično javlja već u prvom ciklusu liječenja ili nakon povećanja doze (5, 7, 13).

3.1.3. Fenotipizacija DPD-a

Još jedan način probira rizičnih pacijenata prije primjene 5-FU je i fenotipizacija DPD-a. Fenotipizacija jest jeftinija i osjetljivija, ali je vremenski dulja analiza te se uzorci prije analize moraju držati u strogo kontroliranim uvjetima kako ne bi došlo do utjecaja na rezultate. Naime, nakon uzimanja uzorka uridin se metabolizira u uracil (U) *ex vivo* koji se djelovanjem DPD-a metabolizira u dihidrouracil (DHU), što utječe na rezultate (21). Fenotipizacija može identificirati ultra brze metabolizatore koji će biti poddozirani i bez zadovoljavajućeg učinka, kao i spore metabolizatore koji će biti predozirani (21). Vrijednost serumske koncentracije U-a može poslužiti kao biljeg koji predviđa ozbiljne i smrtonosne nuspojave fluoropirimidina jer DPD metabolizira U u DHU (19). Provodi se mjerenje koncentracija U-a (endogenog supstrata za DPD) i DHU-a u serumu ili plazmi. Potom se računa omjer dihidrouracil/uracil (DHU/U) koji se izražava kao rezultat aktivnosti AS-a. U provedenim studijama fenotipizacije izmjerena visoka koncentracija endogenog uracila prije primjene lijeka bila je pokazatelj smanjene aktivnosti DPD-a i povećanog rizika za nastanak teških i vrlo teških nuspojava (5). Nije točno definirano koje vrijednosti U-a ukazuju na potpuni, a koje na djelomičan nedostatak DPD-a. Smatra se da $U \geq 16$ ng/ml i < 150 ng/ml ukazuje na djelomičan, a $U \geq 150$ ng/ml na potpuni nedostatak DPD-a. Djelomičan nedostatak povezan je s povećanim rizikom od toksičnosti dok je potpuni povezan s rizikom od po život opasne ili smrtonosne toksičnosti 5-FU-a (7, 13). Nedostatak jasno definiranih preterapijskih vrijednosti U-a, kao i nedostupnost

takvih testova u nekim dijelovima svijeta, još su jedan od razloga nedovoljne implementacije u praksi (6), kao i zahtjevni logistički i radni uvjeti te komplicirana standardizacija fenotipskih testova između laboratorija (22).

Meulendijks i suradnici proveli su ispitivanje na 550 pacijenata liječenih fluoropirimidinima. Primarni cilj istraživanja bio je pojava fluoropirimidinskih nuspojava stupnja III ili višeg tijekom prvog ciklusa liječenja. Uspoređivane su vrijednosti U-a i omjera DHU/U kao prediktora fluoropirimidinske toksičnosti te su uzete u obzir varijante gena *DPYD* c.2846A>T, c.1679T>G, c.1236G>A i c.1601G>A. Rezultati su pokazivali da je vrijednost U-a superiorniji prediktor toksičnosti negoli DHU/U omjer. Vrijednosti ≥ 16 ng/ml, kao i vrijednosti $U \geq 13,9-16$ ng/ml, bile su snažno povezane s toksičnim učincima i gastrointestinalnim nuspojavama, hospitalizacijom zbog nuspojava te fatalnim ishodima, ali ne i hematološkim nuspojavama. Nijedna od pojedinih ispitivanih varijanti nije bila povezana s općim toksičnim učincima. Pronađena je veza između c.1236G>A i hospitalizacije zbog nuspojava, c.1601G>A i gastrointestinalne toksičnosti i hospitalizacije te c.1679T>G i hematološke toksičnosti. Što se povezanosti s koncentracijom U-a tiče, varijante c.2846A>T i c.1679T>G bile su povezane s povišenim koncentracijama U-a, dok isto za varijante c.1236G>A i c.1601G>A nije opaženo. Pokazalo se i da je osjetljivost identificiranja pacijenata s rizikom od nastanka ranih toksičnih učinaka čak 3 puta veća uz fenotipizaciju nego uz genotipizaciju kad su u pitanju ove varijante. Naime, poznavanje *DPYD* genotipa, u ovom slučaju, imalo je umjereni prediktivni učinak u ispitivanoj populaciji. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da serumske koncentracije $U > 16$ ng/ml predviđaju povećan rizik, a veliki oprez je potreban u pacijenata s koncentracijama $U \geq 13,9-16$ ng/ml jer su i oni u povišenom riziku. Kod takvih pacijenata potrebno je reducirati početne doze fluoropirimidina te je veoma važno da istraživanja na temu smanjenja početnih doza prema izmjerenim serumskim koncentracijama U-a budu među prioritetima daljnjih istraživanja (19).

Postoji i mogućnost fenotipizacije pomoću uracil izdisajnog testa. Riječ je o neinvazivnoj metodi koja mjeri $^{13}\text{CO}_2$ pomoću infracrvene (IR) spektroskopije. Temelji se na spoznaji da pacijenti s deficijencijom DPD-a izdišu manje količine $^{13}\text{CO}_2$ nakon ingestije 2- (^{13}C) -uracila te metoda pokazuje

visoku specifičnost i osjetljivost. Nedostatak metode je što nije preporučljiva za kliničku praksu te ne preporučuje redukciju početne doze prema dobivenim rezultatima (23).

3.1.4. Istraživanje varijanti i uvrštavanje u smjernice

Jedan od prvih poznatih polimorfizama *DPYD*, jasno povezan s ozbiljnim i letalnim nuspojavama, je c.1905+1G>A (*DPYD**2A). Homozigoti s ovom mutacijom imaju potpuno nefunkcionalni enzim DPD, dok heterozigoti imaju za 50 % smanjenu enzimsku aktivnost DPD-a. Ipak, ovaj polimorfizam je relativno rijedak u populaciji te je pronađen u svega 1-2 % populacije (24).

Godine 2011. Deenen i suradnici proveli su istraživanje na 568 pacijenata s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom s ciljem određivanja utjecaja polimorfizama na ishode liječenja kapecitabinom. U osoba koje su ispoljile toksične učinke detektirano je 29 polimorfizama od kojih je potom 8 analizirano u svih 568 pacijenata. Dijareja stupnja III ili IV razvila se u 71 % nositelja varijante c.1905+1G>A, 63 % nositelja varijante c.2846A>T, 50 % nositelja varijante c.1236G>A i 41 % nositelja varijante c.2194G>A, u usporedbi sa svega 24 % slučajeva u ukupnoj populaciji. Za varijantu c.496A>G pronađena je slaba povezanost s dijarejom stupnja III ili IV i šaka-stopalo sindromom stupnja II ili III. Svi nositelji varijante c.1905+1G>A imali su nuspojave stupnja III ili IV, uključujući i jednu potencijalnu smrt zbog primjene kapecitabina. Kao zaključak ovog istraživanja proizlazi da navedene varijante predviđaju teške nuspojave i toksične učinke kapecitabina u nositelja istih te je potrebno smanjenje doze (25).

Već 2015. sa sigurnošću se znalo da, uz varijantu c.1905+1G>A, i varijanta c.2846A>T uzrokuje nedostatak aktivnosti DPD-a. Mnogobrojni drugi polimorfizmi istraživani su kako bi se utvrdila njihova uloga. Meulendijks i suradnici proveli su meta-analizu sistematičnim pregledom literature objavljene do kraja 2014. godine kako bi utvrdili ulogu varijanti c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3 i c.1601G>A na aktivnost DPD-a zbog neujednačenih rezultata dotadašnjih ispitivanja. U tu meta-analizu uključeno je 8

studija koje su zadovoljavale kriterije uključivanja te su obuhvaćale 7365 pacijenata iz Europe, Sjedinjenih Američkih Država i Australije koji su pretežno bili bijele rase. Najčešće su bolovali od kolorektalnog karcinoma te je većina primala kombinaciju 5-FU-a s oksaliplatinom, a kao cilj istraživanja svih studija bio je ispitivanje toksičnosti stupnja III ili višeg povezane s fluoropirimidinima u nositelja heterozigotnih ili homozigotnih mutacija, u usporedbi s pacijentima bez mutacija. Rezultati su pokazali da, uz nositelje c.1905+1G>A i c.2846A>T, i nositelji c.1679T>G i c.1236G>A/HapB3 varijanti podliježu značajno povišenom riziku nastanka ozbiljnih i teških nuspojava povezanih s fluoropirimidinima. Učinak mutacije c.1679T>G podjednak je učinku mutacije c.1905+1G>A te se nositeljima iste preporučuje primjena 50 % preporučene doze. Varijanta c.1236G>A/HapB3 imala je manji utjecaj na toksičnost te je zahtijevala redukciju preporučene doze za 25 %. Za c.1601G>A nije utvrđena značajna povezanost sa smanjenom funkcijom DPD-a, dapače, neke studije su ukazivale na povišenje aktivnosti DPD-a, iako meta-analizom isto nije utvrđeno (26). Genetska povezanost utvrđena je za hematološke (rizik viši 9,8 puta) i gastrointestinalne (rizik viši 5,7 puta) nuspojave, ali nije utvrđena za sindrom šaka-stopalo. To bi moglo ukazivati na manju povezanost između *DPYD* varijanti i pojavnosti sindroma, ali se može objasniti i činjenicom da se teški oblik navedenog sindroma javlja u kasnijim ciklusima liječenja fluoropirimidinima te nije mogao biti zabilježen budući da su navedene studije proučavale ranu toksičnost. Također, prilagodba doze uslijed pojave ranih hematoloških i gastrointestinalnih nuspojava mogla je utjecati na rizik pojave sindroma šaka-stopalo u kasnijim ciklusima. Ovim radom pokazano je da bi se varijante c.1679T>G i c.1236G>A/HapB3 trebale uvrstiti u smjernice, što se 2017. godine i dogodilo te su objavljene nove, ažurirane CPIC-ove smjernice za doziranje fluoropirimidina. Razumljivo je da je za uspješnu implementaciju farmakogenomike u onkološku praksu najznačajnije postojanje usklađenih i ažuriranih smjernica prema kojima će se odlučivati o terapiji 5-FU-om. CPIC-ove i DPWG-ove smjernice nude veliki izvor informacija o doziranju fluoropirimidina prema genotipu, no između njih postoje određene razlike koje mogu dovoditi terapeuta u nedoumicu oko ispravne primjene lijeka (4). Još jedna prepreka implementaciji farmakogenetskih testiranja je mala frekvencija/učestalost polimorfizama u populaciji kao i različita distribucija istih prema etničkoj pripadnosti (27). Idealno bi bilo kada bi se postojeće smjernice

usuglasile i davale jednoznačne informacije, no kao što je već rečeno, bolje je koristiti dostupne spoznaje i smanjiti neželjene ishode liječenja fluoropirimidinima nego čekati idealne uvjete kako bi se iste implementirale u praksu.

3.2. Smjernice regulatornih tijela i stručnih društava o primjeni farmakogenetičkog testiranja u liječenju fluoropirimidinima

Smjernice za doziranje fluoropirimidina prema *DPYD* genotipu izdane su od strane 4 stručna udruženja, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)*, *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy - Pharmacogenetics Working Group (DPWG)*, *French National Network of Pharmacogenetics (Réseau national de pharmacogénétique (RNPGx))* i *Spanish Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Society (SEFF) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM)*, a najznačajnije su CPIC-ove i DPWG-ove. Izdane su i preporuke švicarskog udruženja za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju *Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalized Therapy (SPT)*.

3.2.1. CPIC-ove smjernice

Kao što je već spomenuto, *DPYD* je viskopolimorfan gen s brojnim mutacijama koje mogu smanjiti funkciju enzima DPD. Jasna povezanost s toksičnim učincima fluoropirimidina dokazana je za četiri varijante koje su, zbog učinka na aktivnost enzima i zastupljenosti u populaciji, uvrštene u smjernice: c.1905+1G>A (sinonimi *2A, *DPYD* IVS14+1G>A ili rs3918290), c.1679T>G (sinonimi *13 ili rs55886062), c.2846A>T (rs67376798) i c.1236G>A (c.1129-923C>G, HapB3 ili rs75017182). Najštetniji učinak na DPD aktivnost imaju c.1905+1G>A i c.1679T>G jer se mutacija c.1905+1G>A nalazi u intronu i uzrokuje izostanak cijelog egzona 14 te rezultira stvaranjem nefunkcionalnog proteina dok c.1679T>G nastaje zbog mutacije koja utječe na funkcionalnost proteina. c.2846A>T i c.1236G>A umjereno smanjuju funkciju DPD-a. c.2846A>T također nastaje zbog mutacije koja utječe na funkcionalnost proteina, dok je

c.1129-923C>G locirana duboko u intronu 10 i uzrokuje stvaranje djelomično funkcionalnog proteina. Varijanta c.1236G>A je u savršenoj neravnotežnoj vezi s c.1129-923C>G (6). Najistraživanija varijanta c.1905+1G>A prisutna je u oko 1,6 % bijelaca, dok učestalost varijante c.496A>G, jedne od ostalih varijanti koja je potencijalno vrlo bitna, a nije u smjernicama, iznosi čak 12 % u bijelaca, što predstavlja veliki postotak osoba s potencijalnim rizikom od nastanka teških nuspojava (5).

Tablica 4. Klinički najvažniji polimorfizmi *DPYD*-a prema CPIC-u (5)

Haplotip	rsSNP	Nukleotidna promjena / promjena proteina	Funkcionalni status alela	Aktivnost DPD
*2A	rs3918290	c.1905+1G>A (N/A)	bez funkcije	0
*13	rs55886062	c.1679T>G (p.I560S)	bez funkcije	0
	rs67376798	c.2846A>T (p.D949V)	smanjena	0,5
HapB3	rs75017182, rs56038477	c.1129-5923C>G c.1236G>A , (p.E412E)	smanjena	0,5
	rs2297595	c.496A>G (p.M166V)	smanjena/ normalna	(?)

rsSNP= referentni broj polimorfizma jednog nukleotida (engl. *reference single-nucleotide polymorphism*, SNP); DPD= dihidropirimidin-dehidrogenaza

3.2.1.1. Interpretacija genskog testa i preporuke za doziranje fluoropirimidina prema zbroju aktivnosti za gen *DPYD*

Za većinu varijanti učinak na funkcionalnost enzima određen je samo u *in vitro* uvjetima dok je jasna povezanost između *DPYD* genotipa i fenotipa potvrđena za svega nekoliko varijanti (Tablica 5). Svakoj varijanti dodijeljen je zbroj funkcionalne aktivnosti tako da su zbrojene aktivnosti dvaju *DPYD* alela s najnižom aktivnošću te zbroj predstavlja AS koji određuje fenotip. Normalna funkcija označena s 1, smanjena funkcija s 0,5, a nefunkcionalnost s 0 (6). Primjerice, u heterozigotnog nositelja hipofunkcionalnog alela c.1236G>A i dva alela normalne funkcije (pr. c.85T>C i c.1627A>G), AS će iznositi 1,5 jer je aktivnost c.1236G>A 0,5 dok je za normalnu funkciju aktivnost 1 (28).

Tablica 5. Vjerojatni (prediktivni) fenotip enzima DPD na osnovi genotipa *DPYD* prema CPIC-u (5)

Vjerojatni fenotip	Aktivnost* (engl. activity score)	Genotip	Primjeri genotipova**
<i>DPYD</i> normalni metabolizator	> 2	Nositelj dvaju alela normalne funkcije	c.[=];[=] c.[85T>C];[=] c.[1627A>G];[=]
<i>DPYD</i> intermedijarni metabolizator	1 ili 1,5	a) nositelj jednog alela normalne funkcije i jednog nefunkcionalnog alela b) nositelj jednog alela normalne funkcije i jednog alela smanjene funkcije c) nositelj dvaju alela smanjene funkcije	c.[1905+1G>A];[=] c.[1679T>G];[=] c.[2846A>T];[=] c.[1129-5923C>G];[=] c.[1129-5923C>G];[1129-5923C>G] c.[2846A>T];[2846A>T]
<i>DPYD</i> spori / slabi metabolizator	0 ili 0,5	a) nositelj dvaju nefunkcionalnih alela b) nositelj jednog nefunkcionalnog alela i jednog alela 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]

* izračunava se kao zbroj dviju najnižih pojedinačnih varijantnih aktivnosti

** opisani prema HGVS nomenklaturi na osnovi referentne sekvence NM_000110.3

Dakle, nositelji dva nefunkcionalna ili jednog nefunkcionalnog i jednog hipofunkcionalnog alela smatraju se sporim ili slabim metabolizatorima s AS-om 0-0,5. Intermedijarnim metabolizatorima smatraju se osobe s AS-om 1-1,5 koji su nositelji jednog normalnog i jednog nefunkcionalnog, jednog normalnog i jednog hipofunkcionalnog ili oba hipofunkcionalna alela. Normalni metabolizatori su oni koji imaju oba alela normalne funkcije i $AS > 2$.

Henricks i suradnici su 2015. godine objavili rad na temu prevođenja *DPYD* genotipa u DPD fenotip koristeći zbroj aktivnosti gena *DPYD*. Princip ove metode temelji se na činjenici da se varijante razlikuju po opsegu utjecaja na aktivnost enzima. Uzimajući u obzir različite funkcionalnosti SNP-ova, moguće je standardizirati postupak individualizacije i prilagodbe doze fluoropirimidina te se u postupak individualizacije doze mogu uključiti i novi SNP-ovi koji će tek biti identificirani. Tablica 6 prikazuje preporuke za početne doze fluoropirimidina prema zbroju aktivnosti za gen *DPYD*. Sve to pridonosi optimalnoj sigurnosti i učinkovitosti terapije (2).

Tablica 6. Preporuke za početne doze prema zbroju aktivnosti za gen *DPYD* (2)

Zbroj aktivnosti (<i>activity score</i> - AS)	% standardne doze
0	Drugi lijek
0,5	25
1	50
1,5	75
2	100

3.2.1.2. Preporuke za doziranje fluoropirimidina prema *DPYD* genotipu

U dodatnoj tablici S1, koja je dio CPIC-ovih smjernica (6), sažeto i jasno su objedinjeni dokazi koji potvrđuju povezanost *DPYD* genotipa s aktivnošću enzima DPD te klirensom i toksičnošću 5-FU-a. Meta-analizom je, kao što je već objašnjeno, potvrđena jasna veza između četiri varijante (c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A) i ozbiljnih i teških nuspojava fluoropirimidina (26). Najsnažniji učinak na aktivnost DPD-a imaju varijante gena *DPYD* c.1905+1G>A i c.1679T>G koje u heterozigotnih nositelja smanjuju aktivnost enzima za 50 %, odnosno 68 % te se klirens 5-FU-a smanjuje za 40-80 % u odnosu na nenasitelje (6). U heterozigotnih nositelja c.2846A>T i c.1236G>A potvrđeno je umjereno smanjenje aktivnosti za 30 %, odnosno 35 %. Kod homozigotnih nositelja smanjenje je, očekivano, još veće te je za c.1236G>A pokazana 41-55 % manja aktivnost enzima. U *in vitro* uvjetima homozigotna ekspresija varijantnih oblika gena *DPYD* rezultirala je sa značajno smanjenom aktivnošću enzima DPD-a te je za c.1905+1G>A i c.1679T>G aktivnost bila < 25 % normalne aktivnosti, a za c.2846A>T svega 35-59 % normalne aktivnosti (6). Temeljem ovih dokaza objavljene su preporuke za doziranje fluoropirimidina prema *DPYD* genotipu (Tablica 7) kako bi se u nositelja polimorfizama spriječile ozbiljne i fatalne nuspojave (5).

Kod normalnih metabolizatora nije potrebna prilagodba doze te se primjenjuju standardne doze 5-FU-a.

Intermedijarni metabolizatori koji imaju smanjenu aktivnost, odnosno samo 30-70 % aktivnosti DPD-a te shodno tome povećan rizik za ozbiljne i fatalne nuspojave, po prijašnjim preporukama počinjali su 50-75 % standardne doze, ovisno o aktivnosti enzima. Godine 2018. smjernice su ažurirane zbog novih dokaza dobivenih u prospektivnoj analizi Henricks i suradnika koji su išli u prilog smanjenju doze za 50 % u heterozigotnih nositelja alela smanjene funkcije c.2846A>T i c.1236G>A. Analiza je pokazala da smanjenje početne doze za 25 % nije bilo dovoljno da smanji rizik od toksičnosti u nositelja navedenih alela već je bilo potrebno veće smanjenje, pogotovo u nositelja c.1236G>A kod kojih su utvrđene velike

razlike u aktivnosti DPD-a. Analizom je potvrđeno da je doziranje fluoropirimidina temeljeno na *DPYD* genotipu izvedivo u kliničkoj praksi i da značajno povećava sigurnost pacijenata te da je smanjenje početne doze za 50 % u nositelja mutacija c.1905+1G>A i c.1679T>G dovoljno da se izbjegnu toksični učinci i zadrži učinkovitost (29).

Tablica 7. CPIC-ove preporuke za doziranje fluoropirimidina prema *DPYD* genotipu (5)

Vjerojatni fenotip	Implikacije na fenotip	Terapijske preporuke	Klasifikacija preporuke
DPYD normalni metabolizator	Normalna aktivnost DPD enzima i „normalan“ rizik za toksičnost fluoropirimidina	Na osnovi genotipa nema indikacije za promjenu doze ili terapije. Primjena standardnih doza i administracije lijeka.	Snažna
DPYD intermedijarni metabolizator	Smanjena aktivnost enzima DPD (leukocitna aktivnost DPD od 30 do 70 % od one u normalnoj populaciji) i povećan rizik za ozbiljnu ili čak smrtonosnu toksičnost kod primjene fluoropirimidinskih lijekova.	Smanjiti početnu dozu na osnovi aktivnosti (activity score) i titirati dozu prema toksičnosti* ili ako je moguće koristeći terapijsko praćenje. Aktivnost = 1: smanjiti dozu za 50 % Aktivnost = 1,5: smanjiti dozu za 50%	Aktivnost = 1: Snažna Aktivnost = 1,5: Umjeren
DPYD spori / slabi metabolizator	Potpuni izostanak aktivnosti DPD-a i povećan rizik za ozbiljnu ili čak smrtonosnu toksičnost kod primjene fluoropirimidinskih lijekova.	Aktivnost = 0,5: Izbjegavati primjenu terapija koje uključuju 5-fluorouracil ili predlijekove 5-fluorouracila. U slučaju kliničkog savjeta da alternativni lijekovi nisu primjerena terapije, 5-fluorouracil treba primijeniti u jako smanjenoj dozi** uz rano terapijsko praćenje*** Aktivnost = 0: Izbjegavati primjenu terapija koje uključuju 5-fluorouracil ili predlijekove 5-fluorouracila.	Snažna

* Povećati dozu u pacijenata koji nisu iskusili toksičnost ili su imali klinički podnošljivu toksičnost u prva dva ciklusa kako bi se održala učinkovitost terapije; smanjiti dozu u pacijenata koji ne podnose početnu dozu kako bi se minimalizirala toksičnost.

** Ako je moguće, treba primijeniti test za fenotipizaciju za procjenu početne doze. U slučaju da nema podataka o fenotipizaciji doza manja od 25 % od normalne početne doze procijenjena je uz pretpostavku aditivnih učinaka alela na klirens 5-FU.

*** Terapijsko praćenje lijeka treba se obaviti u najranijoj mogućoj vremenskoj točki (npr. minimalna vremenska točka u ravnotežnom stanju - steady state) kako bi se odmah prekinula terapija ako je razina lijeka previsoka.

Dakle, po novim ažuriranim preporukama svi intermedijarni metabolizatori s AS-om 1-1,5 trebaju primiti 50 %, a ne 75 % standardne doze, nakon čega se doza titrira prema podnošljivosti. Naime, neki nositelji ovih mutacija podnose i standardne doze 5-FU-a pa se stoga, nakon prva dva ciklusa liječenja, doza titrira i ukoliko se ne razviju nuspojave i dobro se podnosi, dozu se dalje povisuje kako bi se očuvala učinkovitost. Ukoliko je takvim pacijentima početna doza izazivala nuspojave, dozu treba dodatno smanjiti ili primijeniti TDM.

U sporih metabolizatora, zbog potpune nefunkcionalnosti DPD-a i visokog rizika za teške i fatalne nuspojave, preporuka je izbjegavati 5-FU i njegove predlijekove te odabrati alternativnu terapiju. Ukoliko alternativna terapija nije primjerena treba primijeniti izrazito smanjenu dozu 5-FU-a (<25 % standardne doze) te provesti rani TDM. U takvim slučajevima je također poželjno provesti test fenotipizacije kako bi se što točnije procijenila početna doza i izbjeglo poddoziranje ili predoziranje takvih pacijenata (5, 6).

Za nekoliko drugih varijanti je također pronađena povezanost sa smanjenom aktivnošću DPD-a i toksičnošću fluoropirimidina iako dokazi za to nisu toliko snažni kao u prethodne četiri varijante. Većina tih varijanti je rijetka u populaciji, osim c.557T>C koja je poprilično zastupljena u Afrikanaca te je utvrđena u pacijenata koji su imali toksične reakcije povezane s 5-FU-om (28).

Neke relativno česte varijante, poput c.1627A>G i c.85T>C, imaju relativno čvrste ili umjerene dokaze da ne utječu na funkcionalnost DPD-a u značajnoj mjeri. Neke pak, poput c.2194G>A, c.496T>C i c.1601G>A, u nekim studijama pokazuju povezanost s toksičnošću dok se u većim studijama takvi rezultati ne mogu replicirati. Uzevši sve to u obzir, za ove varijante koje nemaju čvrsto dokazanu povezanost s toksičnim učincima, prilagodba doze nije potrebna (28).

Veliki je broj varijanti za koje je utvrđena povezanost sa smanjenom ili izostalom funkcijom DPD-a samo u *in vitro* uvjetima ili ograničenim kliničkim ili *ex vivo* studijama. Učinak na funkciju je određen usporedbom s *in vitro* aktivnošću poznatih *DPYD* varijanti povezanih s toksičnošću te su sve varijante s aktivnošću sličnom varijantama c.1905+1G>A i c.1679T>G označene kao nefunkcionalne varijante, a one s aktivnošću većom od nefunkcionalne, ali jednakom ili nižom od aktivnosti c.2846A>T su označene kao varijante sa smanjenom funkcijom. Njihova učestalost u populaciji je < 0,5 % te na temelju dosadašnjih spoznaja nema studija koje ove varijante povezuju s fluoropirimidinskom toksičnošću (28).

Postoji i grupa varijanti s nejasnim i dvosmislenim podacima o funkcionalnosti. Takvim varijantama *in vitro* je izmjerena značajno smanjena aktivnost u odnosu na normalnu, no to smanjenje ipak nije bilo ni blizu smanjenju koje je zabilježeno u varijantama koje se dokazano povezuju s toksičnošću. Još

nije poznato imaju li te varijante i kliničku značajnost, no u svakom slučaju, zbog nejasnih podataka, ne zahtijevaju prilagodbu primjenjene doze (28).

3.2.2. DPWG-ove smjernice

Još jedno udruženje izdalo je svoje smjernice za doziranje fluoropirimidina, točnije 5-FU-a, kapecitabina i tegafura, na temelju *DPYD* genotipa. Riječ je o *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy - Pharmacogenetics Working Group (DPWG)* čiji je cilj također olakšati implementaciju farmakogenomskih spoznaja objavljivanjem smjernica temeljenih na dokazima te pomoći liječnicima i ljekarnicima pri propisivanju i izdavanju lijekova razvojem programskih rješenja s integriranim smjernicama koje bi olakšavale svakodnevni rad.

U ovim smjernicama opisane su preporučene početne doze za 5-FU, kapecitabin i, za razliku CPIC-ovih smjernica i za tegafur. Kao i u CPIC-ovim smjernicama, i u ovima je naglašeno da varijante *DPYD* samo djelomično određuju aktivnost DPD-a te da odsutnost ispitivane varijante ne znači da osoba nije u riziku od toksičnih učinaka.

Kao što je u Tablici 8 vidljivo, i ovdje su navedene iste četiri varijante kao u CPIC-ovim smjernicama zbog dovoljno snažnih dokaza da se implementiraju u praksu. Za njih su date preporuke za doziranje, dok za ostale nisu zbog nedovoljno dokaza o utjecaju na aktivnost DPD-a. Na isti način se, na temelju genotipa, određuje AS kako bi se procijenila aktivnost enzima i fenotip pacijenta, a označavanje aktivnosti je identično kao i u CPIC-ovim smjernicama. U Tablici 9 prikazano je DPWG-ovo doziranje 5-FU-a i kapecitabina prema genotipu i fenotipu.

Tablica 8. Poznate *DPYD* varijante prema razini dokaza o povezanosti s toksičnošću i pretpostavljenoj DPD aktivnosti prema DPWG-u (17)

Razina dokaza	Dovoljno dokaza	Nedovoljno dokaza
Aktivnost DPD-a		
Potpuno funkcionalna	c.1627A>G (<i>DPYD</i> *5) c.85T>C (<i>DPYD</i> *9A)	c.1601G>A (<i>DPYD</i> *4) c.2194G>A (<i>DPYD</i> *6) c.85T>C (2657G>A; <i>DPYD</i> *9B) c.1003 G > T (<i>DPYD</i> *11) c.496A>G c.1896T>C c.1129-15T>C (IVS10-15T>C)
Smanjenja funkcionalnost	c.2846A>T c.1236G>A (c.1129–5923C>G ili HapB3)	
Potpuno nefunkcionalna	c.1905+1G>A (<i>DPYD</i> *2A) c.1679T>G (<i>DPYD</i> *13)	<i>DPYD</i> *3 = c.1898del <i>DPYD</i> *7 = c.299_302del <i>DPYD</i> *8 = c.703C>T <i>DPYD</i> *10 = c.2983G>T <i>DPYD</i> *12 = c.[62 G > A;1156 G > T] c.1651G>A c.300 C>A ^a c.1024 G>A ^a c.1025 A>G ^a c.1475 C>T ^a c.1774C>T ^a c.(2058+1_2059-1)_(2299+1_2300-1) dup c.257C>T ^a

^a Ovim varijantama je niska enzimaska aktivnost određena u *in vitro* uvjetima

U Tablici 9 nije prikazano, no ove smjernice daju preporuke i za doziranje tegafura prema genotipu *DPYD*-a. Za one s aktivnošću DPD-a 0, 1 i 1,5 preporučuje se izbjegavati primjenu tegafura i izabrati alternativnu terapiju, a ukoliko to nije moguće potrebno je primijeniti vrlo niske doze te potom titrirati do maksimalne podnošljivosti. Za PHENO vrijedi isto kao i za 5-FU i kapecitabin, kao i za normalnu aktivnost DPD-a gdje nije potrebna prilagodba doze.

Još jedna prednost ovih smjernica je što razlikuju sistemsku i kutanu primjenu 5-FU-a i daju preporuke prema načinu primjene lijeka, što CPIC-ove ne daju. Također, za aktivnost 0, u slučaju neprikladnosti alternativne terapije, daju mogućnost fenotipizacije kako bi se odredila početna doza (17).

Tablica 9. DPWG procjena fenotipa prema aktivnosti određena temeljem genotipa i preporučeno doziranje 5-FU-a i kapecitabina (17)

Genotip	Aktivnost (AS)	Preporučeno doziranje
Divlji tip, nema smanjene funkcije niti izostanka iste (*1/*1)	2	Primijeniti standardne doze.
Nositelj jedne varijante povezane sa smanjenom funkcijom DPD-a (*1/c.1236G>A ili *1/c.2846A>T)	1,5	Kao početnu dozu primijeniti 50 % standardne doze 5-FU-a ili kapecitabina te potom titrirati dozu po mogućnostima.
Nositelj jedne varijante povezane s potpunim izostankom funkcije DPD-a (*1/*2A or *1/*13)	1	
Nositelj dviju varijanti povezanih sa smanjenom funkcijom DPD-a (npr. c.1236G>A/c.2846A>T) ili nositelj jedne varijante povezane sa smanjenom funkcijom i jedne s izostankom funkcije DPD-a (kombinacije c.2846A>T ili c.1236G>A s *2A or *13)	0,5 (PHENO) ^a	Izbjegavati sistemsku i kutanu primjenu 5-FU-a i kapecitabina, izabrati alternativnu terapiju (tegafur nije opcija). Ako alternativna terapija nije primjerena fenotipizacijom odrediti aktivnost DPD-a te prilagoditi dozu.
Nositelj dviju varijanti povezanih s potpunim izostankom DPD aktivnosti (*2A/*2A ili *13/*13 ili *2A/*13)	0	Izbjegavati sistemsku i kutanu primjenu 5-FU-a i kapecitabina, izabrati alternativnu terapiju (tegafur nije opcija). Ako alternativna terapija nije primjerena fenotipizacijom odrediti aktivnost DPD-a te prilagoditi dozu (za 0,5 % normalne DPD aktivnosti dati

		0,8 % standardne doze; za one bez detektibilne aktivnosti dati 0,43 % standardne doze).
--	--	---

^a PHENO= Aktivnost 0,5 može se procijeniti na temelju genotipa, ali enzimaska aktivnost se ne može pouzdano procijeniti samo na osnovu genotipa. Potrebno je napraviti dodatne testove fenotipizacije za pouzdano određivanje aktivnosti DPD-a.

3.2.3. Preporuke SPT-a

Švicarsko društvo za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju izdalo je 2020. svoje preporuke za *DPYD* genotipizaciju i terapijsko praćenje lijeka kako bi se olakšala implementacija u Švicarskoj. Osobama kojima je preporučeno liječenje fluoropirimidinima preporučeno je predterapijsko testiranje na četiri varijante (kao i CPIC-ove DPWG-ove smjernice): c.1905+G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A. Također su preporučeni TDM i infuzijska primjena 5-FU-a kako bi se doza mogla korigirati temeljem TDM-a. I testiranje i TDM su pokriveni zdravstvenim osiguranjem.

Kao što je već spomenuto, u kliničkoj praksi doziranje fluoropirimidina temelji se na pacijentovoj površini tijela (BSA) pri čemu se ne uzimaju u obzir interindividualne razlike. To dovodi do različitih sistemskih koncentracija 5-FU-a (varijacija čak do 40 %) (23) što osobe sa smanjenom aktivnošću DPD-a izlaže velikom riziku od previsokih doza lijeka te teških i ponekad fatalnih nuspojava. Utvrđeno je da se sistemske koncentracije 5-FU-a razlikuju za čak 10 puta između pacijenata koji su primili doze određene prema BSA. Koncentracija 5-FU-a u terapijskom rasponu postignuta je u svega 15-20 % pacijenata prilikom takvog doziranja (22).

Nekoliko je studija pokazalo da se ciljane koncentracije 5-FU-a mogu postići prilagodbom doze prema izmjerenim koncentracijama 5-FU-a u plazmi, odnosno prema TDM-u, no iako se TDM preporučuje u liječenju 5-FU-om, u rutinskoj praksi ipak još nije zaživjelo iako su Beumer i suradnici objavili smjernice o TDM-u za 5-FU (22).

Razlike u smjernicama za doziranje fluoropirimidina pregledno su prikazane u Tablici 10 gdje je jasno vidljivo da se za heterozigotne nositelje rizičnih alela (>98 %) u svim smjernicama predlaže smanjenje početne doze za 50 %. Za rjeđe homozigotne i heterozigotne nositelje s jednim nefunkcionalnim i jednim alelom smanjene funkcije, preporuke se razlikuju pa tako SPT, za nositelje dvaju alela smanjene funkcije, predlaže redukciju početne doze za svega 25 %, a ne 50 % kao CPIC i DPWG (22).

Tablica 10. Razlike u smjernicama za doziranje fluoropirimidina prema *DPYD* genotipu (22)

<i>DPYD</i> genotip		Preporučena početna doza u %		
		CPIC	DPWG	SPT
Heterozigot s jednim nefunkcionalnim i jednim normalnim alelom	npr. c.2846A>T/= ili c.1905+1G>A/=	50 %	50 %	50 % [±]
Dva alela smanjene funkcije	npr. c.2846A>T/c.2846A>T ili c.1129- 5923C>G/c.2846A>T	50 %	PHENO*	25 % [±]
Jedan alel smanjene funkcije i jedan nefunkcionalni alel	npr. c.1905+1G>A/c.1129- 5923C>G ili c.2846A>T/c.1679T>G	0 %	PHENO*	0 %
Dva nefunkcionalna alela	npr. c.1905+1G>A/c.1905+1G>A ili c.1679T>G/c.1905+1G>A	0 %	0 %	0 %

5-FU= 5-fluorouracil; CPIC= Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium; DPWG= Dutch Pharmacogenetics Working Group; SPT= Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy; TDM= therapeutic drug monitoring * Potrebno daljnje određivanje DPD fenotipa; ± primjena infuzijskog 5-FU-a praćenog titracijom temeljenom na TDM-u

3.3. Ostali potencijalno klinički važni polimorfizmi *DPYD*-a

Danas je poznat velik broj ostalih polimorfizama *DPYD* koji se intenzivno istražuju kako bi se utvrdila njihova značajnost i utjecaj na aktivnost DPD-a. Rezultati dosadašnjih ispitivanja su kontradiktorni te se ne može sa sigurnošću reći koji polimorfizam u kojoj mjeri i na koji način utječe na aktivnost DPD-a. Zbog toga se provode daljnja istraživanja kako bi se sa sigurnošću otkrilo koliko su bitni te na koji način se nositeljima tih mutacija treba prilagoditi doza fluoropirimidina. Od ostalih istraživanih varijanti, koje bi mogle biti klinički značajne, u ovom radu obrađene su varijante c.2194G>A, c.496A>G i c.85T>C.

Varijanta c.2194G>A označava se i kao *DPYD**6 ili rs1801160. U nekim studijama prisutnost ove varijante nije pokazala značajan učinak na aktivnost DPD-a, dok je u nekima, poput ispitivanja na 94 dragovoljca crne rase, pokazala značajan učinak na smanjenje aktivnosti DPD-a (30).

Randomizirano kliničko ispitivanje faze 3 *Pan-European Trials in an Alimentary Tract Cancer* (PETACC)-8, provedeno između 2005. i 2009. godine na 1545 pacijenata sa stadijem III kolorektalnog karcinoma, potvrđuje važnost predterapijskog određivanja genotipa *DPYD*-a i svrstava mutaciju c.2194G>A u varijante koje pokazuju značajan učinak na aktivnost DPD-a. Pacijenti su bili na protokolu FOLFOX4 (5-FU+folna kiselina+oksaliptin) ili su uz FOLFOX4 imali dodatno i cetuksimab. Praćeni su 6 mjeseci te je genotipizacija rađena za 25 *DPYD* varijanti. Tražila se povezanost s nuspojavama 5-FU-a stupnja III ili višeg. Rezultati su pokazali da su se ozbiljne nuspojave javljale u 85,7 % nositelja mutacije c.2846A>T (u smjernicama) i 60,8 % nositelja mutacije c.2194G>A. Statistički značajna povezanost s teškim i vrlo teškim nuspojavama je utvrđena za obje varijante. Hematološke nuspojave su se javljale u nositelja c.2194G>A i c.2846A>T, dok je neutropenija bila povezana s varijantom c.2194G>A (31). Naknadno je, u neovisnoj grupi od 339 pacijenata s metastatskim kolorektalnim karcinomom na protokolu FOLFOX4, potvrđena povezanost varijante c.2194G>A s pojavom hematoloških i drugih nuspojava 5-FU-a stupnja III ili višeg (31). PETACC-8 studija uključivala je i varijantu c.496A>G, no nije potvrđena povezanost s nastankom toksičnih učinaka (32).

Offer i suradnici u radu iz 2014. godine navode oprječne rezultate utjecaja varijante c.496A>G na aktivnost DPD-a, gdje se u pojedinim radovima navodi da smanjuje, a u pojedinim, dapače, povećava

aktivnost enzima. Ispitali su utjecaj 128 ostalih varijanti te su pomoću računalnog programa predviđali njihov učinak na aktivnost DPD-a. Posebno su se osvrnuli na poprilično zapostavljene neeuropske populacije koje se nedovoljno ispituju u velikim studijama. Od 128 varijanti, za 63 je pretpostavljeno da su vjerojatno štetne, za 15 da su potencijalno štetne, a za njih 50 se smatra da nemaju utjecaja na učinak DPD-a. U grupu vjerojatno štetnih ubrajaju se varijante c.2872A>G, c.601A>C, c.2983G>T, c.1777G>A, c.2639G>T, c.2933A>G i c.1774C>T te su klasificirane kao varijante nalik varijanti *2A (c.1905+1G>A). Drastično smanjenje aktivnosti na svega 12,5-25 % normalne aktivnosti DPD-a zabilježeno je za varijante c.703C>T, c.632A>G, c.1484A>G, c.1679T>G, c.1024G>A i c.1475C>T. Svega 59 % normalne aktivnosti pokazivala je varijanta c.2846A>T, a smanjenu aktivnost, ali ipak veću od 25 % normalne aktivnosti pokazivale su varijante c.2279C>T, c.274C>G, c.910T>C i c.557A>G. U ovoj studiji za varijantu c.496A>G pokazana je čak 120 % veća aktivnost u odnosu na normalnu. Potencijalno štetne varijante pokazivale su 47-80 % normalne aktivnosti (c.1314T>G, c.868A>G, c.2948C>T, c.1054C>G i c.2678A>G) (33).

Gentile i suradnici su 2015. godine svojim radom ispitali povezanost *DPYD* polimorfizama sa stopom razgradnje 5-FU-a (engl. *5-fluorouracil Degradation Rate*, 5-FUDR) smatravši da je nužno polimorfizam povezati s parametrom koji nije pod utjecajem karcinoma ili kemoterapije, kao što je to slučaj sa stupnjevima toksičnosti. Analizirano je 15 polimorfizama pri čemu c.1679T>G nije pronađen. Utvrđena je povezanost varijanti c.2194G>A, c.85T>C, c.496A>G i c.1905+1G>A sa značajnim smanjenjem 5-FUDR-a, pri čemu je c.1905+1G>A uzrokovao najveće smanjenje, dok je učinak ostalih varijanti bio nešto manji. Iz takvih rezultata zaključuje se da bi i varijante c.2194G>A, c.85T>C i c.496A>G, koje nisu u smjernicama, trebale biti zastupljene u predterapijskom testiranju kako bi se smanjio rizik od toksičnih učinaka i povećala sigurnost pacijenata (27).

Talijanska randomizirana studija *Three or six colon adjuvant* (TOSCA) iz 2016. godine pratila je 508 pacijenata na protokolima FOLFOX (folna kiselina+5-FU+oksaliplatin) ili XELOX (kapecitabin+oksaliplatin) kroz 3 ili 6 mjeseci. Pacijenti uključeni u studiju imali su kolorektalni karcinom stadija III ili visokorizičnog stadija II te im je kirurški odstranjen karcinom. Genotipizacija je rađena za

deset različitih *DPYD* varijanti, uključujući četiri varijante iz smjernica te ostale poput c.2194G>A, c.496A>G i c.1601G>A. Ozbiljne i teške nuspojave zabilježene su u 38,2 % ispitanika. Pretežno su se javljale neutropenija (28,5 %) i dijareja (6,5 %), pri čemu su se češće ispoljavale u nositelja mutacije c.2194G>A (31). U TOSCA studiji ispitivano je i vrijeme do pojave toksičnosti (engl. *Time to Toxicity*, TTT). Smatra se da pojava toksičnosti nakon nekoliko ciklusa kemoterapije nastaje kao posljedica kumulativnog učinka lijeka i stresa nastalog u organizmu, dok je pojava rane toksičnosti najvjerojatnije povezana s urođenim defektima koji su najčešće povezani s metaboličkim putevima, odnosno deficitom enzima (32). Na vrijeme potrebno da se pojavi toksičnost značajno je utjecala prisutnost mutacija c.1905+1G>A, c.2194G>A i c.496A>G. Mutacije c.1905+1G>A i c.2194G>A bile su značajno povezane s kraćim vremenom potrebnim da razvoj neutropenije. Prosječno vrijeme potrebno da se toksičnost pojavi bilo je 7 mjeseci kod homozigotnih nositelja, no značajno kraće (0,9-2,1 mjesec) kod homozigotnih nositelja c.2194G>A i c.496A>G te kod heterozigotnih nositelja mutacije c.1905+1G>A (31).

U drugim studijama (QUASAR2, CAIRO-2, NCCTG, TRIBE) povezanost c.2194G>A i c.496A>G mutacija sa smanjenom aktivnošću DPD-a je u nekima potvrđena, a u nekima nije (32).

Godine 2018. Del Re i suradnici objavili su još jedan rad koji je utvrdio povezanost između c.2194G>A i nastanka toksičnih učinaka fluoropirimidina na uzorku od 1254 pacijenta. U njih 982 koji su doživjeli gastrointestinalne nuspojave stupnja II ili višeg i/ili hematološke stupnja III ili višeg (ispitivana grupa) pronađene su varijante c.496A>G, c.1601G>A, c.1627A>G, c.1896T>C i c.2194G>A, iako su iste pronađene i u 272 pacijenta koji nisu zahtijevali smanjenje doze ili prekid liječenja (kontrolna grupa). Mutacije iz smjernica c.1905+1G>A i c.2846A>T pronađene su samo u ispitivanoj grupi pacijenata, što potvrđuje njihovu snažnu vezu s nastankom nuspojava (34), dok c.1679T>G i c.1236G>A nisu pronađene. c.1905+1G>A, c.2846A>T te c.2194G>A bile su povezane s gastrointestinalnim i hematološkim nuspojavama, a c.496A>G s neutropenijom (31). Iz navedenih rezultata se zaključuje da je varijanta c.2194G>A, iako nije u smjernicama, vrlo važna za smanjenje rizika od nastanka nuspojava fluoropirimidina te bi se i ona trebala uključiti u predterapijsko ispitivanje uz standardne 4 varijante. Isto je potvrđeno meta-analizom provedenom na 946 pacijenata s kolorektalnim karcinomom u kojoj je utvrđena

značajna povezanost varijante c.2194G>A te gastrointestinalnih nuspojava i supresije koštane srži (34). Ukoliko je utvrđena prisutnost ove varijante u pacijenta, preporučeno je smanjenje početne doze za 20 % u homozigotnih nositelja te pomno praćenje na pojavu nuspojava i veliki oprez u heterozigotnih nositelja (34).

2019. Iachetta i suradnici su proveli studiju na 1827 pacijenata koje su testirali na prisutnost c.1905+1G>A, c.2846A>T, c.1679T>G i c.2194G>A. Primarni cilj njihovog istraživanja bio je analizirati prisutnost varijanti c.2846A>T, c.1679T>G i c.2194G>A u pacijenata koji su imali nuspojave, ali nisu bili nositelji varijante c.1905+1G>A, te tako utvrditi važnost navedenih varijanti (24). U svega 31 ispitanika (1,7 %) detektirana je varijanta c.1905+1G>A. 53 ispitanika imalo je i jednu od drugih ispitivanih varijanti, pri čemu ih je 66 % razvilo teške, a 34 % blage ili su bili bez nuspojava. Najčešće nuspojave bile su neutropenija i gastrointestinalni poremećaji (24). Najučestalija varijanta bila je c.2194G>A (12,5 %) koja je snažno povezana s neutropenijom koja se javljala u 50 % nositelja ove mutacije. Varijante uključene u smjernice, c.2846A>T i c.1679T>G, bile su povezane s nastankom nuspojava, no samo je za c.2846A>T (1,37 %) utvrđena statistička značajnost te je povezana s nastankom neutropenije. Za c.1679T>G (0,55 %), povezanom samo s gastrointestinalnim nuspojavama, to nije bio slučaj, što se objašnjava malim brojem ispitanika (samo su dva ispitanika imala ovu mutaciju). U nositelja c.2846A>T i c.1679T>G nuspojave su se javljale vrlo rano, već u drugom ili trećem ciklusu liječenja, dok su nositelji c.2194G>A nuspojave iskusili u prosjeku u šestom ciklusu. Kasnija pojava nuspojava u nositelja c.2194G>A mogla bi se objasniti umjereno smanjenom aktivnošću DPD-a (smanjena za 15-20 %) (31), pri čemu nuspojave nastaju, osim zbog smanjene aktivnosti DPD-a i zbog kumulativnog učinka lijeka u kasnijim ciklusima (24). Ovim radom potvrđena je važnost predterapijskog testiranja na varijante c.2846A>T i c.1679T>G, dok se za varijantu c.2194G>A potvrdilo da ima veliku važnost i da bi također trebala biti uključena u testiranje, posebice ukoliko se provodi liječenje protokolima gdje kombinacije kemoterapeutika s 5-FU-om, hipotetski, ovaj deficit funkcije DPD-a čini očitijim i opasnijim (24).

Španjolci García-González i suradnici su između 2013. i 2019. godine proveli studiju s ciljem otkrivanja rijetkih *DPYD* varijanti u 28 pacijenata koji su imali nuspojave na terapiju fluoropirimidinima, a predterapijskim testiranjem nije pronađena nijedna od četiri varijante iz smjernica. Provedena je *in silico* analiza cijele *DPYD* kodirajuće sekvence te je, u slučajevima gdje varijanta pokazuje značajnu povezanost s toksičnošću, dodatno provedena fenotipizacija određivanjem omjera DHU/U kako bi se rezultati potvrdili. Utvrđeno je 15 različitih polimorfizama koji su se povezali sa smanjenim učinkom DPD-a. Dvije varijante, c.2087G>A i c.2324T>G, vrlo su rijetke te nisu nikada dotada bile povezane s toksičnim učincima fluoropirimidina. Otkrivene su i brojne druge varijante u osoba s nuspojavama, poput c.2324T>G, c.1129-15T>C, c.496A>G, c.2087G>A, c.257C>T i c.1627A>G, no potrebna su istraživanja istih na većem broju ljudi i u drugim uvjetima. Također je detektirana i već spominjana varijanta c.2194G>A i to u čak 32 % ispitanika koji su iskusili nuspojave u prva 3 ciklusa liječenja (35).

Utjecajem varijanti c.85T>C i c.496A>G na aktivnost DPD-a bavili su se Hamzić i suradnici u radu objavljenom 2021. godine. Ispitivanje je provedeno na 1382 pacijenta određivanjem omjera DHU/U. Za četiri varijante iz smjernica dobiveni su značajno niži omjeri nego što je to slučaj u općoj populaciji te se time dokazala njihova uloga u smanjenju aktivnosti DPD-a. Varijanta c.496A>G također je bila povezana s niskim DHU/U omjerom te je smanjenje aktivnosti DPD-a bilo usporedivo sa smanjenjem uzrokovanim varijantom c.1236G>A. Suprotno, za c.85T>C je zabilježen povećan DHU/U omjer, iako on nije bio statistički značajan. Rezultati ovog rada pokazuju da je utjecaj ovih varijanti na aktivnost DPD-a određen strukturom haplotipa (kombinacija alela i pripadajućih gena na lokusu kromosoma koja se nasljeđuje kao cjelina). Varijanta c.85T>C je u savršenoj neravnotežnoj vezi s varijantama c.496A>G i c.1236G>A koje smanjuju aktivnost DPD-a te se zato zabilježeni, potencijalno protektivni učinak c.85T>C, ne ispoljava u praksi, no ta povezanost se mora imati na umu u daljnjim istraživanjima koja su neophodna kako bi se nedvojbeno utvrdio utjecaj ovih varijanti i haplotipova koje ih sadrže na aktivnost DPD-a (36).

Utjecajem varijanti c.2194G>A, c.85T>C i c.496A>G na pojavu nuspojava u pacijenata liječenih fluoropirimidinima bavili su se i Božina i suradnici. 2021. godine objavljen je rad proveden na 503 pacijenta

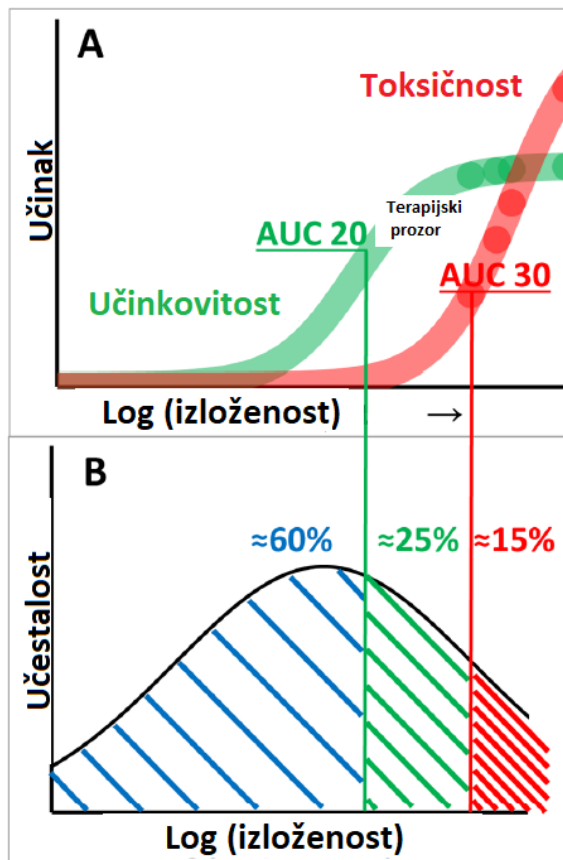
bijele rase, od kojih je čak 56,3 % razvilo dijareju ili neutropeniju stupnja III ili IV. Najčešće su se javljale u nositelja varijante c.496A>G koja je snažno povezana s čak 5 puta većim izgledom za nastanak nuspojava. Incidencija nuspojava u nositelja ove mutacije bila je 78,7 % dok su nuspojave u divljeg tipa bile izražene u 48,7 %. Polimorfizam c.2194G>A pokazao je umjerenu povezanost, a incidencija nuspojava u ovoj varijanti iznosila je 67,2 %, za razliku od divljeg tipa gdje je iznosila 54,6 %. U nositelja varijante c.85T>C nije pronađena značajna veza, iako je pronađen mali protektivni učinak koji se ne smije u potpunosti zanemariti. Učestalost nuspojava u nositelja ovog polimorfizma bila je 50,6 % u odnosu na 57,6 % u nositelja divljeg tipa. I ovaj rad dovodi do zaključka da bi se varijante c.2194G>A i c.496A>G trebale uključiti u test panele za preterapijsku *DPYD* genotipizaciju (37).

3.4. Terapijsko praćenje lijeka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring, TDM*)

Pojam TDM-a podrazumijeva mjerenje koncentracije lijeka u biološkom uzorku, najčešće plazmi, kako bi se mogla individualizirati doza te povećati korist i smanjti rizik liječenja određenim lijekom. Već je spomenuto da se 5-FU, kao i mnogi drugi kemoterapeutici, dozira prema površini tijela, pri čemu se interindividualne razlike ne mogu uzeti u obzir. Iz tog razloga Internacionalno društvo za terapijsko praćenje lijeka i kliničku toksikologiju (engl. *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, IATDMCT*) na temelju dostupnih dokaza, preporučuje TDM kako bi se liječenje provodilo sigurnije i uspješnije sa što manje toksičnih učinaka. Preporuke se odnose isključivo na primjenu 5-FU-a kontinuiranom infuzijom budući da za ostale načine primjene i druge fluoropirimidine nema dovoljno podataka te se preporuke ne mogu primijeniti. U onkološkoj praksi TDM nije u potpunosti zaživio kao u nekim drugim granama medicine zbog nedovoljnog broja studija kojima bi se utvrdili optimalni rasponi koncentracija kemoterapeutika u plazmi, kao i zbog nedostatka širom dostupnih rutinskih laboratorijskih testova, nedovoljne edukacije na temu TDM-a, zakonskih i financijskih aspekata te logističkih zahtjeva poput prikupljanja i obrade uzoraka.

Brzina infuzije 5-FU-a igra veliku ulogu u postizanju ravnotežnog stanja 5-FU-a u plazmi te će se pri različitim brzinama postizati i različite koncentracije 5-FU-a u ravnotežnom stanju. Bitno je imati na umu da je sam 5-FU nestabilan nakon uzimanja uzorka te će se u uzorku, na sobnoj temperaturi, nastaviti metabolizirati djelovanjem čak i malih koncentracija DPD-a prisutne u krvi, a posebice u trombocitno-leukocitnom međusloju. Stoga je veoma bitno pravilno odvajanje plazme i/ili dodatak DPD inhibitora (gimeracila) te čuvanje uzorka na ledu odmah nakon uzimanja. Dodatkom DPD inhibitora dobiva se na vremenu jer je uzorak moguće centrifugirati kroz 24 sata od uzimanja uzorka bez utjecaja na rezultate. Nepravilno rukovanje uzorkom može dovesti do predoziranja pacijenta jer dolazi do razgradnje 5-FU-a te posljedično izmjerenih nižih koncentracija lijeka (23). Ukoliko postoji sumnja u lažno snižene koncentracije 5-FU-a poželjno je, u idućem ciklusu, ponoviti mjerenje prije ikakvih korekcija doze (22). Eliminacija 5-FU-a pokazuje velike interindividualne razlike te je pod utjecajem doziranja. Utvrđeno je da je eliminacija veća pri dugoj kontinuiranoj infuziji u usporedbi s intravenoznim bolusom 5-FU-a, što se može objasniti zasićenjem DPD-a prilikom primjene bolusa. Također je zabilježeno da muškarci imaju 26 % veće izlučivanje u odnosu na žene. Dok je za većinu lijekova, u pravilu, za postizanje ravnotežnog stanja potrebno 5 vremena polueliminacije ($5 t_{1/2}$), to ne vrijedi za 5-FU. Naime, vrijeme polueliminacije 5-FU-a je kratko i iznosi svega 10-15 minuta. Ukoliko se uzorak uzme unutar 1 sata od početka infuzije (kada se očekuje uspostava ravnotežnog stanja računanjem prema $t_{1/2}$), koncentracija neće odražavati stvarno ravnotežno stanje. Istraživanja su pokazala da je puno ispravnije uzorak uzimati barem 18 sati nakon početka infuzije, koliko je potrebno da se uspostavi ravnoteža. Uzorak se ne smije uzimati ukoliko je infuzijska pumpa u zadnjih 30 minuta pražnjenja ili ako je već prazna, već najkasnije 4 sata prije očekivanog kraja infuzije. Krv je potrebno vaditi iz periferne vene udaljene od mjesta primjene infuzije kako bi se izbjegle lažno povišene koncentracije 5-FU-a i kontaminacija. Izloženost lijeku izražava se površinom ispod krivulje (AUC). Ciljne vrijednosti AUC-a za TDM 5-FU-a iznose od 20-30 mg x h/L za uobičajeno trajanje infuzije koje iznosi 46 sati. Navedeno ne vrijedi za bolus 5-FU-a te infuziju u trajanju od 120 sati.

Već je spomenuto da je 5-FU lijek s uskom terapijskom širinom. Problem je činjenica da se, čak i uz redukciju doze prema opisanim smjernicama, ne može garantirati postizanje terapijskih koncentracija lijeka u krvi. Upravo zato TDM ima veliki značaj u uspješnoj terapiji 5-FU-om, što je potkrijepljeno i nekolicinom kliničkih studija koje dokazuju smanjenu varijabilnost u izloženosti 5-FU-u uz primjenu TDM-a, a time i manju pojavu nuspojava i veću učinkovitost. Slika 4 prikazuje terapijski indeks s AUC 20-30 mg x h/L (A) te koncentracije lijeka postignute doziranjem na temelju BSA (B). Doziranje prema BSA-u većina pacijenata (oko 60 %) bude poddozirana, oko 15 % predozirana, a svega 25 % postiže ciljne terapijske vrijednosti 5-FU-a, što jasno pokazuje da je taj način doziranja nedovoljno precizan.



Slika 4. Shematski prikaz terapijskog indeksa s AUC 20-30 mg x h/L (A) te koncentracije lijeka postignute doziranjem na temelju BSA (B) (23)

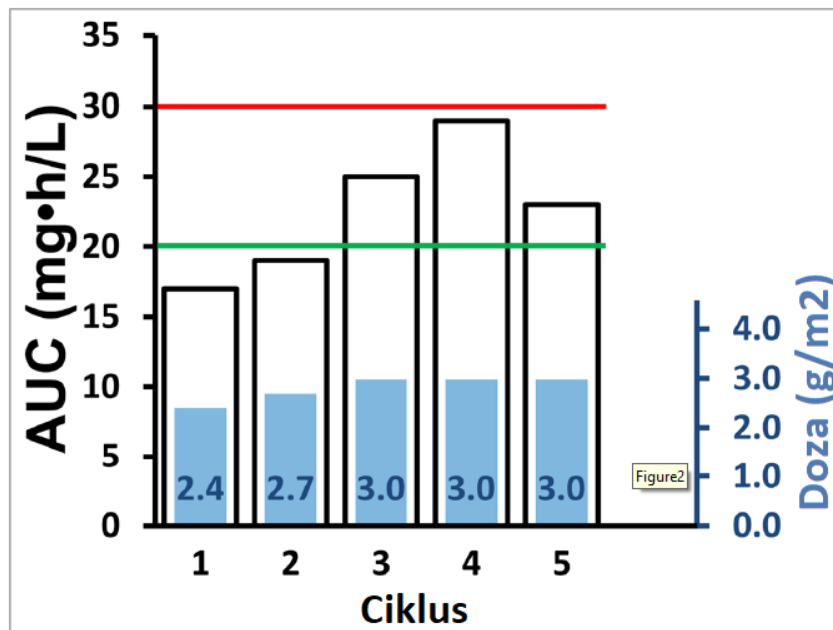
Postoje dva algoritma za prilagodbu doze 5-FU-a prema TDM-u. Prvi je vezan za ciljnu AUC 20-25 mg x h/L te noviji za ciljnu AUC 20-30 mg x h/L koji se odnosi na najčešće korištenu primjenu 5-FU-a kao 46-satnu kontinuiranu infuziju (Tablica 11). Prvi algoritam podrazumijeva prilagodbu doze za određene AUC < 4 mg x h/L do > 31 mg x h/L, dok drugi preporučuje prilagodbu za AUC 8-10 mg x h/L do \geq 40 mg x h/L. Preporuka je koristiti noviji algoritam kojeg su izradili Kaldate i suradnici (Tablica 11) jer je njegovim korištenjem dokazano povećan udio pacijenata koji postižu terapijske koncentracije 5-FU-a.

Tablica 11. Doziranje 5-FU-a prema TDM-u (22)

5-FU AUC (mg x h/L)	Prilagodba doze u idućem ciklusu (%)
>40	30 % manja
37-39	25 % manja
34-36	20 % manja
31-33	10 % manja
20-30	Nije potrebna prilagodba
17-19	10 % viša
14-16	20 % viša
8-13	25 % viša
<8	Ponoviti mjerenje kako bi se isključila mogućnost pogreške. Ukoliko se rezultat ponovi, dozu povećati 30 %.

5-FU= 5-fluorouracil; AUC= površina ispod krivulje; TDM= terapijsko praćenje lijeka

Ipak, prilagoda doze treba se provoditi pažljivo u više ciklusa kako bi se postigle terapijske vrijednosti te izbjegli toksični učinci. Na Slici 5. prikazano je postepeno povećavanje doze s 2,4 g/m² u prvom, 2,7 g/m² u drugom na 3 g/m² u trećem ciklusu, kada se postiže ciljani AUC. Daljna prilagodba nije bila potrebna jer je postignut ciljani AUC, a razlike u AUC-ima u trećem, četvrtom i petom ciklusu posljedica su intraindividualnih varijabilnih čimbenika.



Slika 5. Primjer primjene algoritma za prilagodbu doze 5-FU-a do postizanja ciljnog AUC-a (23); AUC= površina ispod krivulje (engl. *Area Under the Curve*)

Temeljem svih dosadašnjih literaturnih dokaza, Beumer i suradnici snažno preporučuju TDM prilikom terapije 5-FU-om i brojnim protokolima koji ga sadrže, budući je dokazano da smanjuje varijabilnost u izloženosti lijeku i učestalost pojave toksičnih učinaka (23). Preporuka je provoditi TDM u nositelja rizičnih alela *DPYD*-a te u pacijenata kojima je reducirana početna doza kako ne bi bili poddozirani i primali neučinkovitu terapiju (22). Naravno, TDM ne bi smio biti alternativa genotipizaciji i fenotipizaciji već komplementarna metoda kojom bi se pružila najbolja moguća skrb onkološkom pacijentu na terapiji

5-FU-om. Predterapijskom genotipizacijom i/ili fenotipizacijom identificirao bi se dio pacijenata s visokim rizikom od toksičnih učinaka te bi im se izabrala alternativna terapija ili prilagodila početna doza kako bi imali učinkovito, ali sigurno liječenje. Genotipizacijom se ipak neće identificirati svi pacijenti s deficijencijom DPD-a jer još nisu otkrivene sve varijante niti su sve već poznate zastupljene u testiranjima, no takve rizične pacijente može se identificirati fenotipizacijom. Potom bi se korištenjem TDM-a osiguravalo postizanje terapijskih doza lijeka čime bi se pružilo najbolje moguće liječenje te izbjeglo, osim predoziranja, i poddoziranje (23).

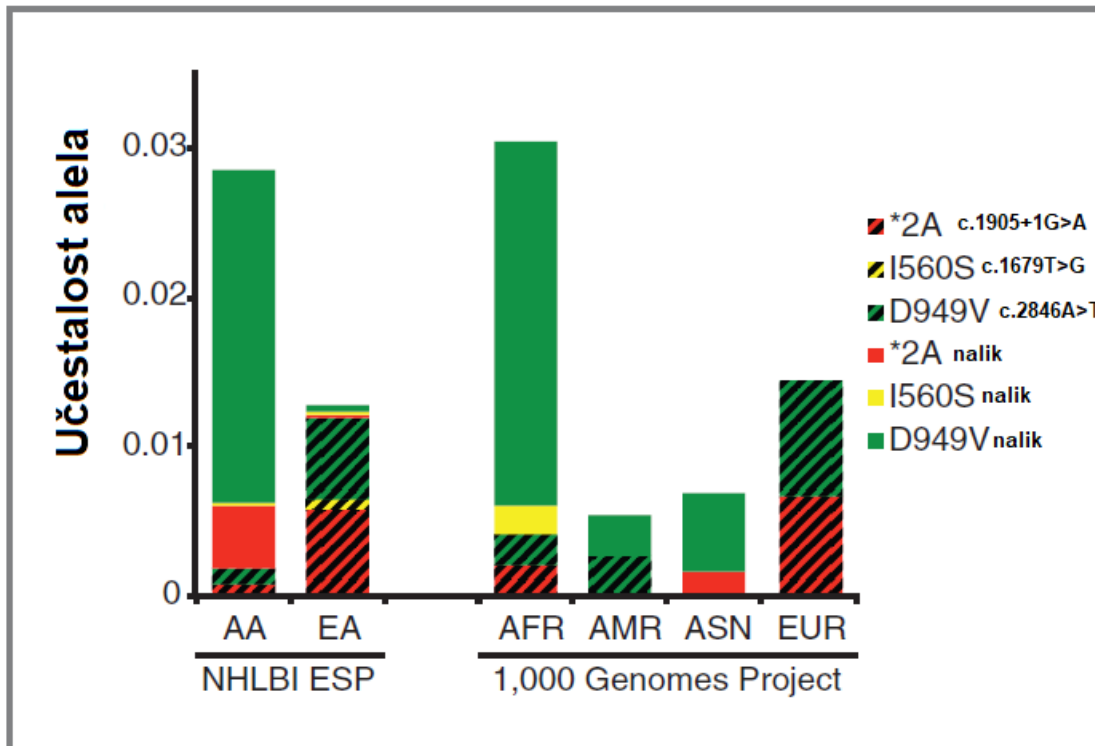
Kako bi TDM bio što jednostavnije implementiran u praksu potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se povećala baza dokaza. Samo uzorkovanje trebalo bi se dodatno pojednostaviti te je nepohodna veća dostupnost laboratorija koji bi provodili ovu analizu. Potrebno je utvrditi i financijsku isplativost same pretrage, iako sva dosadašnja istraživanja potvrđuju isplativost ove analize (3).

3.5. Etnografske razlike u učestalosti pojedinih *DPYD* polimorfizama u populaciji

Učestalost pojedinih *DPYD* varijanti značajno varira među etničkim grupama i rasama. Djelomično smanjenje aktivnosti DPD-a ima oko 3-7 % (17, 37) dok potpuni gubitak enzimske funkcije ima 0,01-0,2 % bijele rase (17, 37). Kad se zbroje sve 4 varijante koje smanjuju aktivnost DPD-a, oko 7-9 % bijele rase nosi barem jednu varijantu koja utječe na aktivnost DPD-a (37). U europskoj populaciji najčešća varijanta je c.496A>G (nije u smjernicama) s učestalošću od čak 12 % u bijelaca (5). Slijedi c.1236G>A s učestalošću 1-4 % (4), odnosno 4,1-4,8 % (31) te potom c.1905+1G>A s 1-1,2 % i c.2846A>T s 0,8-1,4 % (31). Približno 8 % Afroamerikanaca ima djelomičan nedostatak enzimske funkcije (4, 17). Varijanti c.2194G>A učestalost varira od 1-9 %, ovisno o populaciji (4), a varijanta c.1679T>G zastupljena je u svega 0,2 % bijele rase (26).

Još 2014. Offer i suradnici su u svom radu opisali učestalost pojedinih polimorfizama u različitim populacijama prema podacima iz baza NHLBI ESP i 1000 Genomes Project. Prema NHLBI ESP bazi

varijanta c.1905+1G>A prisutna je u 0,09 %, c.1679T>G u 0 % i c.2846A>T u 0,09 % Afroamerikanaca. Sveukupno su varijante nalik varijanti c.1905+1G>A (*2A), s manje od 12,5 % normalne aktivnosti, bile zastupljene u 0,43 % Afroamerikanaca. Učestalost novih varijanti nalik na c.1679T>G i nalik na c.2846A>T u Afroamerikanaca bile su 0,02 % i 2,22 %, na temelju čega se zaključuje da potencijalno važne varijante mogu biti vrlo značajne za nedostatak aktivnosti DPD-a u Afroamerikanaca. U Amerikanaca europskog podrijetla ukupna učestalost novih varijanti koje uzrokuju smanjenu aktivnost DPD-a iznosila je 0,08 %, dok je u istoj populaciji varijanta c.1905+1G>A bila prisutna u 0,58 %, c.1679T>G u 0,06 % i c.2846A>T u 0,54 %. Baza podataka 1000 Genomes Project ima manje individualnih podataka, no obuhvaća veći broj rasa. Prema ovim podacima, u Afrikanaca uzimanje u obzir novih varijanti povećava učestalost štetnih varijanti na 2,64 %, u odnosu na svega 0,41 % ukoliko se uzimaju u obzir samo c.1905+1G>A, c.1679T>G i c.2846A>T. Udvostručenje se primjećuje i u Amerikanaca (s 0,28 % na 0,56 %). U Azijata c.1905+1G>A, c.1679T>G i c.2846A>T nisu pronađene, ali ubrajanjem novih varijanti učestalost varijanti nalik na *2A iznosi 0,17 % te onih nalik na c.2846A>T 0,56 %. U Europljana nove varijante nisu pronađene, ali su varijante c.1905+1G>A, c.1679T>G i c.2846A>T učestalo prisutne. Sve je sumarno prikazano na Slici 6 (33).



Slika 6. Učestalost štetnih varijanti u javno dostupnim populacijskim podacima (33). AA= Afroamerikanci; EA= Amerikanci europskog podrijetla; AFR= Afrikanci; AMR= Amerikanci; ASN= Azijati; EUR= Europljani

Zhou i suradnici su proveli analizu kojom su predvidjeli učestalost pojedinih *DPYD* polimorfizama u populaciji pomoću računalnog programa. Prema bazama podataka GnomAD i SWEgene, u obradu su uzete učestalosti varijanti na uzorku 138 842 pojedinca u osam različitih populacija (12 487 Afrikanaca, 17 720 Latino pripadnika, 5185 Židova, 9977 Istočnih Azijata, 64 603 Europljana (bez Finaca), 12 562 Finaca, 15 308 Južnih Azijata i 1000 Šveđana). Svakoj varijanti određivan je AS te su aktivnosti enzima izražene kako je navedeno u poglavlju 3.2.1.1.. Rezultatima ove analize je pokazano da su pojedine varijante *DPYD*-a smanjene aktivnosti specifično vezane za pojedinu populaciju kao što je prikazano u Tablici 12 (38).

Tablica 12. Etničke razlike u učestalosti varijanti koje smanjuju funkciju DPD-a (38)

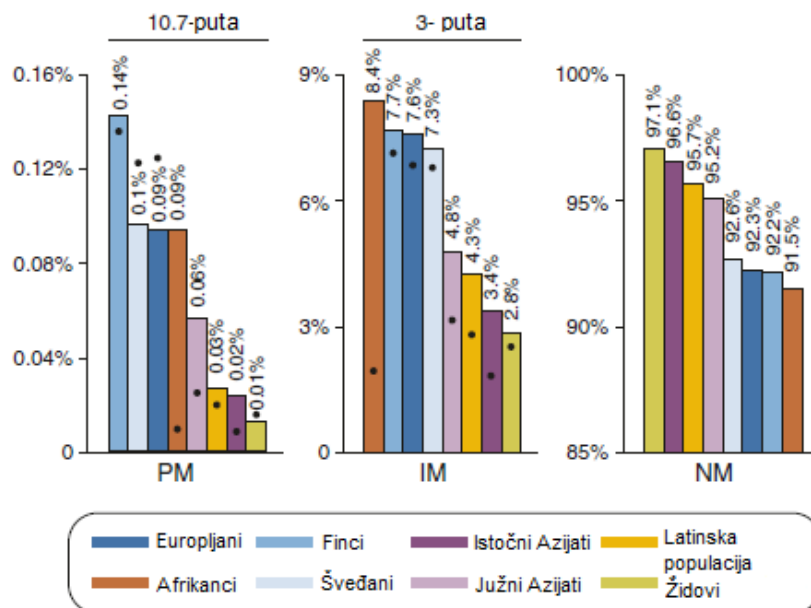
Gene	RSID	Star allele	MAF (%)								
			Global	EUR	AFR	FIN	SWE	EAS	SAS	LAT	AJ
<i>DPYD</i>											
	rs75017182 (c.1236G>A)	HapB3	1.3	2.1	0.2	1.2	1.9	0.2	N.A.	0.8	0.7
	rs3918290 (c.1905+1G>A)	*2A	0.6	0.6	0.1	2.4	0.8	0	0.4	0.1	0.5
	rs115232898 (c.557A>G)		0.2	<0.1	2.2	0	0	<0.1	<0.1	<0.1	0
	rs67376798 (c.2846A>T)		0.3	0.5	<0.1	<0.1	0.5	<0.1	<0.1	0.3	<0.1
	rs112766203 (c.2279C>T)		<0.1	0	0	0	0	0	0.5	0	0
	rs72975710 (c.1349C>T)		<0.1	<0.1	0.3	0	0	0	0	<0.1	0
	rs60511679 (c.2195T>G)		<0.1	<0.1	0.2	0	0	0	0	<0.1	0
	rs59086055 (c.1774C>T)		<0.1	<0.1	<0.1	0	0	0.2	<0.1	0	0
	rs769167857		<0.1	0	0	0	0	0	0.1	0	0
	rs189768576		<0.1	0	0	0	0	0.2	<0.1	<0.1	0

EUR= Europljani; AFR= Afrikanci; FIN= Finci; SWE= Šveđani; EA= Istočni Azijati; SA= Južni Azijati; LAT= Latino pripadnici; AJ= Židovi, MAF= frekvencija alela manje učestalosti (engl. *Minor Allele Frequency*); *DPYD*= gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu; Prikazane su varijante s učestalošću iznad 0,1 % u barem jednoj populaciji.

Izuzevši varijantu c.496A>G, koja u ovom ispitivanju nije pronađena, varijanta c.1236G>A (HapB3) općenito je najčešća varijanta te je u Europljana prisutna u 2,1 % populacije, dok je c.1905+1G>A najučestalija u sjevernoj Europi, točnije u 2,4 % Finaca i 0,8 % Šveđana, a vrlo rijetka u Afrikanaca, Latinskoj populaciji i u istočnih Azijata. U Afrikanaca su najzastupljenije varijante c.557A>G s 2,2 % (u novijim istraživanjima zabilježeno 1-4 % (4)), c.1349C>T (0,3 %), c.2195T>G (0,2 %) te c.1236G>A (0,2 %). Varijanta c.2279C>T zastupljena je s učestalošću od 0,5 % u pripadnika populacije južne Azije te nije zastupljena u drugim populacijama, pa ni u istočnih Azijata. U Europljana je s učestalošću od 0,5 % zastupljena varijanta c.2846A>T.

Na Slici 7. jasno je vidljivo da Finci imaju najveći postotak DPD slabih metabolizatora (0,14 %) što se objašnjava visokim udjelom varijante c.1905+1G>A u toj populaciji, dok u Afrikanaca prevladavaju

intermedijarni metabolizatori s 8,4 %. Slabi i intermedijarni metabolizatori su u europskoj populaciji zastupljeni sa svega 0,09 % (PM) i 7,6 % (IM), dok takvih metabolizatora ima znatno manje u Židova (0,01 % PM-a i 2,8 % IM-a). Ovi podaci se podudaraju s podacima u Tablici 12 u kojoj je vidljivo da varijanta c.2846A>T nije zastupljena u Židova. Veoma je zanimljiva i razlika između Azijata s područja Južne i Istočne Azije. Naime, PM-a u Južnih Azijata ima 3 puta više negoli je to slučaj u Istočnih Azijata (38).



Slika 7. Etničke razlike u aktivnosti DPD-a (38). PM= spori metabolizator; IM= intermedijarni metabolizator; NM= normalni metabolizator

Cocca i suradnici opisali su učestalost biljega povezanih s odgovorom na liječenje karcinoma dojke u Italiji u populaciji regije Friuli Venezia Giulia (FVG) koja graniči s Austrijom i Slovenijom te ima 1,2 milijuna stanovnika. Uspoređivali su učestalost određenih polimorfizama *DPYD*-a u talijanskoj regiji u odnosu na učestalost zabilježenu u bazama podataka 1000G Project data (europska populacija) te ExAC (Europljani bez Finaca). Za varijantu c.496A>G, koja kodira za nefunkcionalni protein, u regiji FVG utvrđena je učestalost od 7 %, dok je učestalost iste u bazama podataka bila 10-12 %. Za razliku od toga,

varijanta c.1905+1G>A je veoma rijetka sa svega 0,063 %, dok je u bazama podataka bila zastupljena sa 0,6-1 %. Varijanta c.1627A>G u regiji je imala učestalost 21,7 %, a u bazama podataka 17-20 %, dok je c.775A>G bila rijetka s 0,4 % u FVG te 1-1,5 % u bazama podataka. Iz dobivenih rezultata vidljivo je da u populaciji regije FVG polimorfizmi *DPYD*-a nisu veoma učestali, a posebice je bitna činjenica da je varijanta c.1905+1G>A, koja uzrokuje stvaranje nefunkcionalnog enzima, veoma slabo zastupljena u populaciji FVG regije. Temeljem ovih rezultata može se zaključiti da bi većina oboljelih u regiji FVG imala veću korist od primjene standardnih doza fluoropirimidina negoli reduciranih doza. Ova studija upućuje na činjenicu da bi svaka pojedina regija profitirala analizirajući farmakogenetski profil svog stanovništva te prema tome određivala na koje varijante testirati oboljele prije primjene fluoropirimidina (39).

3.6. Isplativost genotipizacije u individualizaciji terapije fluoropirimidinima

Jedan od kriterija za uspješnu implementaciju genotipizacije u rutinsku primjenu jest i isplativost pretrage, odnosno povoljan omjer troška i koristi. Objavljeni su mnogi radovi na tu temu koji pokazuju isplativost predterapijskog testiranja, no rad Henricks i suradnika iz 2018. dokazao je da je predterapijska *DPYD* genotipizacija, prema kojoj će se individualizirati doza fluoropirimidina, isplativa ili barem ne predstavlja dodatni trošak za zdravstveni sustav. Pacijenti su (njih 1103), prije primjene fluoropirimidinske terapije, testirani na *DPYD* varijante c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A. U skupinu divljeg tipa pripadalo je 92,3 % dok je svega 7,7 % bilo heterozigotnih nositelja alela. Nositelja c.1236G>A bilo je 60 %, c.2846A>T 20 %, c.1905+1G>A 19 % te c.1679T>G svega 1 %. Svi heterozigotni nositelji alela c.2846A>T i c.1236G>A primili su za 25 % nižu početnu dozu, dok je heterozigotnim nositeljima alela c.1905+1G>A i c.1679T>G početna doza smanjena za 50 %. Doze su se mogle povećavati tek nakon dva ciklusa pod uvjetom da pacijent dobro podnosi terapiju. Homozigoti i složeni heterozigoti nisu bili uključeni u studiju, dok su svi pacijenti koji nisu nositelji jednog od četiri spomenuta alela smatrani divljim tipom te su im primijenjivane standardne doze fluoropirimidina. Potom su prikupljeni podaci o toksičnosti,

hospitalizaciji i drugim intervencijama zbog toksičnih učinaka te su uspoređivani s istim parametrima dobivenima bez provedene genotipizacije.

Primarni cilj ispitivanja bio je zabilježiti učestalost ozbiljnih fluoropirimidinskih nuspojava tijekom cijelog trajanja liječenja. U skupini nositelja *DPYD* varijantnih alela (ispitivana skupina) čak 39 % je razvilo nuspojave stupnja III ili višeg, dok je u skupini divljeg tipa (kontrolna skupina) taj postotak bio znatno niži te je iznosio svega 23 %. Usporedbom ispitivane skupine sa skupinom nositelja *DPYD* varijanti tretiranih standardnom dozom fluoropirimidina, genotipizacija i redukcija doze značajno su smanjili rizik nastanka ozbiljnih nuspojava u ispitivanoj skupini za tri varijante: c.2846A>T, c.1905+1G>A i c.1679T>G. Za varijantu c.1236G>A smanjenje rizika nije utvrđeno (40).

Sekundarni cilj ispitivanja bio je odrediti isplativost predterapijske *DPYD* genotipizacije prema kojoj se individualizira doza fluoropirimidina. U troškove su se računavali isključivo medicinski troškovi (troškovi genotipizacije, cijena fluoropirimidina uključujući posjete liječniku, njega te troškovi zbrinjavanja nuspojava i/ili posljedičnih hospitalizacija). Očekivani ukupni trošak po pacijentu uz provođenje predterapijskog testiranja iznosio je 2599 €. Troškovi po pacijentu bez provođenja testiranja iznosili su 2650 €. Provođenjem testiranja novac se štedio u iznosu od 51 € po pacijentu, odnosno smanjenje troškova povezanih s toksičnim učincima nadmašilo je troškove testiranja. Dobiveni iznos uštede od 51 € po pacijentu relativno je malen, a razlog tome može se pronaći u činjenici da je rizik nastanka toksičnih učinaka u ispitivanoj bio viši (39 %) nego u kontrolnoj skupini (23 %). Naime, taj povišeni rizik bio je prisutan zbog velikog udjela nositelja mutacija c.1236G>A i c.2846A>T kojima je početna doza smanjena za samo 25 %, što, kako je kasnije i pokazano u radu iste autorice (29), nije bilo dovoljno za smanjenje rizika već je bila potrebna redukcija početne doze za 50 % (40). Zaključno, ovim radom dokazano je da je predterapijska *DPYD* genotipizacija za spomenute četiri varijante isplativa, odnosno u najgorem slučaju ne stvara trošak zdravstvenom sustavu. Taj dokaz olakšava implementaciju *DPYD* genotipizacije u kliničku praksu kako bi se individualizirala doza fluoropirimidina i povećala sigurnost pacijenata i uspješnost liječenja (40).

3.7. Mogućnosti individualizacije terapije 5-FU-om u Republici Hrvatskoj

U Republici Hrvatskoj (RH) postoji mogućnost individualizacije terapije fluoropirimidinima te je moguće provesti predterapijsku *DPYD* genotipizaciju na teret Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje (HZZO) ili na vlastiti trošak. Jedini ovlašteni laboratorij u RH djeluje u sklopu Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb na Rebru, točnije na Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije. U laboratoriju se provodi testiranje na brojne farmakogenetičke varijacije koje mogu utjecati na učinkovitost i nuspojave niza lijekova. Najčešće se testiraju polimorfizmi navedeni u Tablici 13, no uz navedeno moguće je testiranje i na brojne druge genske polimorfizme.

Tablica 13. Najčešće testirani genski polimorfizmi u laboratoriju Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije KBC-a Zagreb (41)

metabolički enzimi faze I	CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5, CYP2D6, DPYD
metabolički enzimi faze II	TPMT, NAT2, UGT1, UGT2
transportni proteini	ABCB1, ABCC2, ABCG2, SLCO1B1, SERT, DAT
ciljna mjesta djelovanja lijeka	VKORC1, 5-HTR, DRD2, AGTR1

CYP= citokrom P450; *DPYD*= gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu; TPMT= tiopurin-metiltransferaza; NAT2= N-acetiltransferaza 2; UGT= UDP-glukuronoziltransferaza; ABCB1= ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1; ABCC2= ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2; ABCG2= ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2; SLCO1B1= solute carrier organic anion transporter family member 1B1; SERT= serotoniniski transporter; DAT= dopaminski transporter; VKORC1= vitamin K epoksid-reduktaza kompleks podjedinica 1; 5-HTR= 5-hidroksitriptamin (serotoniniski) receptor; DRD2= dopaminski receptor D2; AGTR1= angiotenzin II receptor tipa 1

Za samo testiranje nije potrebno naručivanje (Slika 8) već se uzorci krvi uzimaju ili osobno u laboratoriju ili se, ukoliko je riječ o pacijentima koji nisu u Zagrebu, u laboratorij mogu dostaviti preko ekspresnih službi (HP Express, DHL, FedEx i dr.). Slanje standardnom poštom nije prihvatljivo jer uzorak neće pristići u laboratorij u istom danu te se tako dostavljeni uzorci neće laboratorijski obrađivati. Uzorak je potrebno zapakirati odvojeno od uputnica u zaštitne spremnike kako bi se spriječilo istjecanje uzorka i kontaminacija ljudi i okoline (42).

Odjel	Pretrage	Naruđba		Napomena	Rok izrade nalaza
		da	ne		
Odjel za farmakogenomiku i individualizaciju terapije	antiaritmiци, antihipertenzivi: (CYP2D6, MDR1, AGTR1);		✓		4 tjedna
	antidepresivi: (CYP2D6, CYP2C19, SERT);		✓		
	antipsihotici: (CYP2D6, CYP3A4, MDR1); kodein, tramadol (CYP2D6, UGT2B7); tamoksifen (CYP2D6, ABCG2); azatioprin – Imuran (TPMT);		✓		
	antiepileptici: (CYP2C9, CYP2C19, MDR1, UGT2B7); dabigatran (MDR1); 5 FU, kapecitabin: (DPYD, SLCO1B1); Folfiri - 5 FU,irinotekan,folna kiselina: (DPYD, SLCO1B1, UGT1A1); imunosupresivi: (CYP3A4/5, MDR1, MRP2, SLCO1B1); irinotekan (UGT1A1); klopidogrel (CYP2C19, MDR1); metotreksat: (MDR1, MRP2, SLCO1B1, ABCG2); nesteroidni antireumatici: (CYP2C9, CYP2C19, MRP2, UGT2B7); paklitaksel, oksaliplatin, cisplatin (ABCG2, MRP2, SLCO1B1); rivaroksaban (CYP3A4, MDR1); statini: (CYP2C9, CYP2C19, SLCO1B1, ABCG2);		✓		3 tjedna

Slika 8. Pretrage i naručivanje na Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije (43)

Uzorci moraju biti ispravno označeni čitko ispisanim podacima o pacijentu (ime, prezime i godina rođenja) te se dostavljaju u Kliničku jedinicu za prijem i obradu materijala Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku (KZLD) uz odgovarajuću uputnicu i to isti dan u najkraćem mogućem roku. Nužno je držati se odgovarajućih predanalitičkih uvjeta pa je poželjno, za točne upute oko uzimanja uzoraka te njihovog čuvanja i transporta, konzultirati laboratorij na broj telefona 01 2376 310 svakim radnim danom

od 13 do 14 sati kako bi dobili detaljne upute (42). Rezultati testa gotovi su kroz 3 tjedna od primitka uzorka te se potom izdaje farmakogenetički nalaz koji sadrži tumačenje rezultata i preporuke za doziranje prema međunarodno usvojenim smjernicama. Sam nalaz dostavlja se standardnom, e-poštom ili telefaksom uz popunjen i potpisan „Zahtjev za slanje nalaza“ koji se može pronaći na mrežnim stranicama KBC-a Zagreb (41, 42).

Na području Republike Hrvatske djeluje još nekoliko privatnih laboratorija koji pružaju usluge u vidu uzimanja uzoraka za farmakogenetičke analize koje se provode u inozemnim institucijama.

4. RASPRAVA

U novije vrijeme razvijen je velik broj novih onkoloških lijekova koji su unaprijedili liječenje onkoloških bolesti. Vrlo bitan korak u liječenju karcinoma je odabir lijeka ili lijekova koji će biti najučinkovitiji u liječenju određene maligne bolesti te je jako bitno personalizirati dozu lijeka kako bi se spriječile nuspojave ili izostanak učinka (3). Visoka smrtnost zbog samog malignog oboljenja dovodi do prihvatanja visoke stope nuspojava onkološke terapije i od strane pacijenata i regulatornih tijela. One ponekad mogu biti vrlo teške, pa čak i smrtonosne, a njihov nastanak može biti uvjetovan genetičkom predispozicijom. U kliničkoj onkološkoj praksi rutinski se određuju polimorfizmi manjeg broja gena za koje je dokazan utjecaj na učinkovitost i sigurnost liječenja. Fluoropirimidini su skupina lijekova koja je temelj liječenja kolorektalnog karcinoma i drugih solidnih tumora i svake godine se njima liječi oko 2 milijuna novooboljelih diljem svijeta (6). Prevelike doze fluoropirimidina mogu uzrokovati ozbiljne nuspojave koje mogu biti i smrtonosne (7), a razvije ih 10-40 % pacijenata na terapiji fluoropirimidinima (6). 5-FU primjenjuje se kao monoterapija ili kombinirana kemoterapija (tzv. protokoli), a liječenje je potrebno započeti u bolnici zbog praćenja stanja pacijenta. Lijek ima uski terapijski indeks te u slučaju jakih gastrointestinalnih nuspojava liječenje hitno treba prekinuti. Nastaviti se smije tek nakon potpunog povlačenja nuspojava i ukoliko stanje pacijenta to omogućava, iako se kod teških gastrointestinalnih, srčanih ili neuroloških simptoma toksičnosti nastavak liječenja ne preporučuje. Teške i vrlo teške nuspojave javljaju se u otprilike 16 % pacijenata, kao posljedica mutacija u genu *DPYD* koje dovode do smanjene aktivnosti enzima DPD i povećane toksičnosti i učinka lijeka. Predterapijskim farmakogenetičkim testiranjem moguće je procijentirati odgovor na terapiju i razvoj nuspojava te bi se na vrijeme identificirali pojedinci s povećanim rizikom za teške i vrlo teške nuspojave. Uz povećanje sigurnosti i uspješnosti liječenja smanjili bi se i troškovi zdravstvene zaštite.

Gen *DPYD* jedan je od visokopolimorfnih gena s preko 160 različitih varijanti (17) koji kodira za sintezu enzima DPD koji ima ključnu ulogu u metabolizmu fluoropirimidina kao limitirajući faktor brzine metabolizma. U normalnim uvjetima metabolizira približno 80-90 % primijenjene doze 5-FU (4). Europska

medicinska agencija (EMA) je u travnju 2020. godine objavila preporuku za testiranje na nedostatak enzima DPD-a prije liječenja 5-FU-om koje je moguće provesti mjerenjem koncentracije uracila (fenotipizacija) ili provjerom prisutnosti mutacija *DPYD*-a (genotipizacija).

Unatoč dosadašnjim spoznajama, farmakogenetičko predterapijsko testiranje je nedovoljno korišteno u svakodnevnom radu. Veliki broj varijanti je potencijalno važan za razvoj toksičnih učinaka 5-FU-a, no nije im jednoznačno dokazan štetan utjecaj na aktivnost DPD-a. Drugi razlog je potreba da DPD testiranje bude vremenski i financijski isplativo te praktično i jednostavno, kao i da testovi budu specifični i osjetljivi na validirane biljege. Današnji testovi za predterapijsku genotipizaciju *DPYD*-a usmjereni su na četiri dobro utvrđene varijante koje su u smjernicama, dok se na ostale ne provodi testiranje (6). To nije dovoljno jer postoji niz drugih varijanti koje nisu zastupljene u testovima, a koje dovode do nepodnošenja 5-FU-a. Fenotipizacija također ima svoje nedostatke. Naime, manjak jasno definiranih predterapijskih vrijednosti uracila, kao i nedostupnost takvih testova u nekim dijelovima svijeta, još su jedan od razloga nedovoljne implementacije u praksi (6), kao i zahtjevni logistički i radni uvjeti te komplicirana standardizacija fenotipskih testova između laboratorija (22). Idealno bi bilo provesti genotipizaciju *DPYD*-a i fenotipizaciju DPD-a temeljem čega bi se odredila početna doza 5-FU-a, a potom pratiti koncentraciju 5-FU-a u krvi TDM-om. Time bi se napravio najidealniji probir na pacijente s povišenim rizikom od nuspojava i osigurala sigurna terapija.

Za uspješnu implementaciju farmakogenomike u onkološku praksu najbitnije je postojanje usklađenih i ažuriranih smjernica prema kojima će se odlučivati o terapiji 5-FU-om. CPIC-ove i DPWG-ove smjernice nude veliki izvor informacija o doziranju fluoropirimidina prema genotipu, no između njih postoje određene razlike (4). Jasna povezanost s toksičnim učincima fluoropirimidina dokazana je za četiri varijante koje su, zbog učinka na aktivnost enzima i zastupljenosti u populaciji, uvrštene u sve smjernice: c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A. Najštetniji učinak na DPD aktivnost imaju varijante c.1905+1G>A i c.1679T>G te je u nositelja potrebno izbjegavati primjenu 5-FU-a i ostalih fluoropirimidina.

Prema CPIC-ovim smjernicama u normalnih metabolizatora nije potrebna prilagodba doze te se primjenjuju standardne doze 5-FU-a. Intermedijarni metabolizatori po prijašnjim preporukama počinjali su s 50-75 % standardne doze, ovisno o aktivnosti enzima, no 2018. su smjernice ažurirane te se dozu smanjuje za 50 % u heterozigotnih nositelja alela smanjene funkcije c.2846A>T i c.1236G>A. Nakon prva dva ciklusa liječenja dozu je moguće titrirati i dalje povisivati kako bi se očuvala učinkovitost. U sporih metabolizatora preporuka je izbjegavati 5-FU i njegove predlijekove te odabrati alternativnu terapiju. Ukoliko alternativna terapija nije primjerena treba primijeniti izrazito smanjenu dozu 5-FU-a (<25 % standardne doze) te provesti rani TDM. U takvim slučajevima je također poželjno provesti test fenotipizacije kako bi se što točnije procijenila početna doza i izbjeglo poddoziranje ili predoziranje takvih pacijenata (5, 6).

DPWG-ove smjernice opisuju preporučene početne doze za 5-FU, kapecitabin i tegafur za koji CPIC ne daje preporuke. Još jedna prednost ovih smjernica je što razlikuju sistemsku i kutanu primjenu 5-FU-a i daju preporuke prema načinu primjene lijeka, što CPIC-ove smjernice ne daju. Također, za aktivnost 0, u slučaju neprikladnosti alternativne terapije, daju mogućnost fenotipizacije kako bi se odredila početna doza (17).

SPT preporučuje, uz smanjenje početnih doza za pojedine genotipove, i TDM kako bi se doza mogla korigirati temeljem TDM-a.

Sve navedene smjernice za heterozigotne nositelje rizičnih alela predlažu smanjenje početne doze za 50 %. Za rjeđe homozigotne i heterozigotne nositelje s jednim nefunkcionalnim i jednim hipofunkcionalnim alelom, preporuke se razlikuju. SPT za nositelje dvaju hipofunkcionalnih alela predlaže redukciju početne doze za svega 25 %, a ne 50 % kao CPIC i DPWG (22).

Od ostalih istraživanih varijanti, koje bi mogle biti klinički značajne, obrađene su varijante c.2194G>A, c.496A>G i c.85T>C. Varijanta c.2194G>A u nekim studijama nije pokazala značajan učinak na aktivnost DPD-a, dok je u nekima imala značajan utjecaj na smanjenje aktivnosti DPD-a (30). Većina

studija ipak je pokazala značajan utjecaj ove varijante na smanjenje aktivnost DPD-a (24, 27, 30, 32, 34, 35, 37). Učinak varijante c.496A>G na smanjenje aktivnosti DPD-a također je potvrđen u brojnim studijama (27, 32, 34, 36, 37). Za varijantu c.85T>C dokazi su i dalje dvosmisleni, u pojedinim studijama pokazuje povećanu aktivnost enzima (36) dok u pojedinim studijama ne pokazuje značajnu povezanost s utjecajem na aktivnost DPD-a (37).

U onkološkoj praksi TDM nije u potpunosti zaživio zbog nedovoljnog broja studija kojima bi se utvrdili optimalni rasponi koncentracija kemoterapeutika u plazmi, kao i zbog nedostatka širom dostupnih rutinskih laboratorijskih testova, nedovoljne edukacije na temu TDM-a, zakonskih i financijskih aspekata te logističkih zahtjeva poput prikupljanja i obrade uzoraka. Ima veliki značaj u uspješnoj terapiji 5-FU-om jer se pomoću ove metode može individualno prilagođavati doza kako bi se postigle ciljne vrijednosti lijeka u krvi, što bi dovelo do uspješnijeg i sigurnijeg liječenja, posebno u nositelja rizičnih alela *DPYD*-a te u pacijenata kojima je reducirana početna doza.

Učestalost pojedinih *DPYD* varijanti značajno varira među etničkim grupama i rasama. Kad se zbroje sve četiri varijante koje smanjuju aktivnost DPD-a, oko 7-9 % bijele rase nosi barem jednu mutaciju koja utječe na aktivnost DPD-a (37), dok je u Afroamerikanaca to 8 % (4, 17). U europskoj populaciji najčešća varijanta je c.496A>G (nije u smjernicama) (5), a slijede je c.1236G>A, c.1905+1G>A i c.2846A>T (31). Potencijalno važne nove varijante mogu biti veoma značajne za nedostatak aktivnosti DPD-a u Afroamerikanaca budući da se nedovoljno istražuju i jer je u studijama najčešće zastupljena bijela rasa. U Europljana nove varijante nisu pronađene, ali su varijante c.1905+1G>A, c.1679T>G i c.2846A>T učestalo prisutne. Slabi i intermedijarni metabolizatori prisutniji su u europskoj populaciji, dok takvih metabolizatora ima znatno manje u Židova. Čak niti u Azijata stvar nije jednostavna jer slabih metabolizatora u južnoj Aziji ima 3 puta više nego i istočnim dijelovima (38).

Što se Hrvatske tiče, mogla bi se povući paralela s podacima iz talijanske regije FVG. U populaciji regije FVG polimorfizmi *DPYD*-a nisu učestali, a posebno je bitna činjenica da je varijanta c.1905+1G>A, koja uzrokuje stvaranje nefunkcionalnog enzima, vrlo slabo zastupljena. Imajući to na umu može se

zaključiti da bi većina oboljelih imala veću korist od primjene standardnih doza fluoropirimidina negoli reduciranih doza. Ipak, poželjno bi bilo da se provedu farmakogenetička testiranja kako bi se utvrdio profil prevladavajućih genotipova u populaciji na lokalnoj razini. Prema tome bi bilo moguće odrediti varijante na koje je potrebno testiranje prije primjene fluoropirimidina u svakoj pojedinoj regiji (39).

Za uspješnu implementaciju genotipizacije u rutinsku primjenu nužno je da pretraga bude isplativa, odnosno da ne stvara dodatni trošak sustavu. Henricks i suradnici su dokazali je da je predterapijska *DPYD* genotipizacija, prema kojoj se individualizira doza fluoropirimidina, isplativa ili barem ne predstavlja dodatni trošak za zdravstveni sustav. To uvelike olakšava implementaciju *DPYD* genotipizacije u kliničku praksu (40).

U Republici Hrvatskoj (RH) postoji mogućnost individualizacije terapije fluoropirimidinima te je moguće provesti predterapijsku *DPYD* genotipizaciju na teret HZZO-a ili na vlastiti trošak. Jedini ovlašteni laboratorij u RH djeluje u sklopu Kliničkog bolničkog centra (KBC) Zagreb na Rebru, točnije na Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije. Postoje i privatni laboratoriji koji nude usluge genotipizacije na vlastiti trošak.

5. ZAKLJUČAK

Aktivnost enzima DPD-a ograničavajući je faktor brzine metabolizma 5-FU-a i podliježe velikoj varijabilnosti pa su bolesnici s nedostatkom DPD-a pod povećanim rizikom od toksičnosti. Smjernice za genotipizaciju *DPYD*-a i doziranje fluoropirimidina uključuju 4 varijante za koje je dokazano da smanjuju aktivnost DPD-a (c.1905+1G>A, c.1679T>G, c.2846A>T i c.1236G>A). Proučavani su i drugi polimorfizmi (c.496A>G, c.85T>C i c.2194G>A) te većina rezultata govori u prilog smanjene aktivnosti enzima DPD-a uslijed njihove prisutnosti.

Nositelji inaktivirajućih alela *DPYD*-a imaju značajno veći rizik ozbiljnih nuspojava koje mogu biti vrlo teške te ugroziti liječenje, ali i život pacijenta. Zbog toga su izdane preporuke za obavljanje genetičkog testiranja *DPYD*-a ili mjerenja aktivnosti DPD-a prije primjene lijeka. Time se olakšava odluka o odabiru 5-FU-a i doze prema pacijentovom genetičkom profilu te se smanjuju troškovi zdravstvene zaštite jer se poboljšava liječenje i smanjuju rizici nuspojava i troškova njihovog zbrinjavanja.

Činjenica da u RH postoji ovlašteni laboratorij u kojem je moguće provesti *DPYD* testiranje prije uvođenja terapije 5-FU-om uvelike olakšava implementaciju opisanih spoznaja i smjernica u kliničku praksu. Time se mogu postići velike dobrobiti i za pacijenta i za zdravstveni sustav osiguravanjem sigurnog liječenja i prevencije teških nuspojava i smrti te posljedično i manjih troškova.

6. LITERATURA

1. Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogentika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. ur. Božina N. Medicinska naklada, Zagreb, 2019:1-35.
2. 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.
3. Martin JH, Olver I. Precision medicine-based drug treatment individualization in oncology. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87(2):223-226.
4. Carr DF, Turner RM, Pirmohamed M. Pharmacogenomics of anticancer drugs: Personalising the choice and dose to manage drug response. *Br J Clin Pharmacol*. 2021;87:237-255.
5. Ganoci L, Bilić I, Božina N. Farmakogenomika u onkologiji. U: Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. ur. Božina N. Medicinska naklada, Zagreb, 2019:191-211.
6. Amstutz U, Henricks LM, Offer SM i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*. 2018;103(2):210-216.
7. Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Sažetak opisa svojstava lijeka za Fluorouracil Pliva 50 mg/ml otopina za injekciju/infuziju. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Fluorouracil-Pliva-50-mg-ml-otopina-za-injekciju-infuziju/11855/>. Pristupljeno 25.03.2022.
8. Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): fluorouracil. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA128406956>. Pristupljeno 24.03.2022.
9. Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): capecitabine. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA448771>. Pristupljeno 24.03.2022.
10. Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): tegafur. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/chemical/PA452620>. Pristupljeno 24.03.2022.

- 11.** Cancer Treatments Online (eviQ): Management of fluoropyrimidine overdose or overexposure. Dostupno na: <https://www.eviq.org.au/clinical-resources/side-effect-and-toxicity-management/prophylaxis-and-treatment/738-management-of-fluoropyrimidine-overdose-or-overexposure>. Pristupljeno 24.03.2022.
- 12.** European Medicine Agency (EMA): EU/3/09/637: Orphan designation for the treatment of 5-fluorouracil overdose. Dostupno na: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/orphan-designations/eu309637>. Pristupljeno 24.03.2022.
- 13.** Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED): Sažetak opisa svojstava lijeka za Fluorouracil Sandoz 50 mg/ml otopina za injekciju/infuziju. Dostupno na: <https://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Fluorouracil-Sandoz-50-mg-ml-otopina-za-injekciju-infuziju/11921/> Pristupljeno 25.03.2022.
- 14.** Vrdoljak E i sur. Smjernice za dijagnosticiranje, liječenje i praćenje bolesnika oboljelih od raka debelog crijeva. Liječnički vjesnik. 2018;140:9-10.
- 15.** British Columbia Cancer (BCCancer): Chemotherapy Protocols. Dostupno na: <http://www.bccancer.bc.ca/health-professionals/clinical-resources/chemotherapy-protocols>. Pristupljeno 25.03.2022.
- 16.** Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): fluorouracil. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165291507>. Pristupljeno 25.03.2022.
- 17.** Lunenburg CATC, van der Wouden CH, Nijenhuis M i sur. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of *DPYD* and fluoropyrimidines. Eur J Hum Genet. 2020;28:508-517.
- 18.** Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): fluorouracil. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA150653776>. Pristupljeno 26.03.2022.
- 19.** Meulendijks D, Henricks LM, Jacobs BAW i sur. Pretreatment serum uracil concentration as a predictor of severe and fatal fluoropyrimidine-associated toxicity. Br J Cancer. 2017;116(11):1415-1424.

- 20.** European Medicine Agency (EMA): Preporuke EMA-e za testiranje na DPD prije liječenja fluorouracilom, kapecitabinom, tegafurom i flucitozinom. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/fluorouracil-fluorouracil-related-substances-article-31-referral-ema-recommendations-dpd-testing_hr.pdf. Pristupljeno 26.03.2022.
- 21.** Ciccolini J, Milano G, Guchelaar HJ. Detecting DPD deficiency: when perfect is the enemy of good. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2021;87(5):717-719.
- 22.** Hamzic S, Aebi S, Joerger M i sur. Fluoropyrimidine chemotherapy: recommendations for *DPYD* genotyping and therapeutic drug monitoring of the Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy. *Swiss Med Wkly.* 2020;150:w20375.
- 23.** Beumer JH, Chu E, Allegra C i sur. Therapeutic Drug Monitoring in Oncology: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology Recommendations for 5-Fluorouracil Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;105(3):598-613.
- 24.** Iachetta F, Bonelli C, Romagnani A i sur. The clinical relevance of multiple *DPYD* polymorphisms on patients candidate for fluoropyrimidine based-chemotherapy. An Italian case-control study. *Br J Cancer.* 2019;120(8):834-839.
- 25.** 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):3455-68.
- 26.** Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS 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(16):1639-50.
- 27.** Gentile G, Botticelli A, Lionetto L i sur. Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate *DPYD* haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J.* 2016;16(4):320-325.
- 28.** Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB): Supplement to: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and

Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. Dostupno na:

<https://files.cpicpgx.org/data/guideline/publication/fluoropyrimidines/2017/29152729-supplement.pdf>.

Pristupljeno 12.04.2022.

29. Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM i sur. *DPYD* genotype-guided dose individualisation of fluoropyrimidine therapy in patients with cancer: a prospective safety analysis. *Lancet Oncol.*

2018;19(11):1459-1467.

30. 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;2(5):655-662.

31. Bruera G, Ricevuto E. Pharmacogenomic Assessment of Patients with Colorectal Cancer and Potential Treatments. *Pharmacogenomics Pers Med.* 2020;13:601-617.

32. Ruzzo A, Graziano F, Galli F i sur. Dihydropyrimidine dehydrogenase pharmacogenetics for predicting fluoropyrimidine-related toxicity in the randomised, phase III adjuvant TOSCA trial in high-risk colon cancer patients. *Br J Cancer.* 2017;117:1269-1277.

33. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflessen AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of *DPYD* variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 2014;74(9):2545-54.

34. Del Re M, Cinieri S, Michelucci A i sur. *DPYD**6 plays an important role in fluoropyrimidine toxicity in addition to *DPYD**2A and c.2846A>T: a comprehensive analysis in 1254 patients. *Pharmacogenomics J.* 2019;19:556-563.

35. García-González X, Kaczmarczyk B, Abarca-Zabalía J i sur. New *DPYD* variants causing DPD deficiency in patients treated with fluoropyrimidine. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020;86(1):45-54.

36. Hamzic S, Schärer D, Offer SM i sur. Haplotype structure defines effects of common *DPYD* variants c.85T > C (rs1801265) and c.496A > G (rs2297595) on dihydropyrimidine dehydrogenase activity: Implication for 5-fluorouracil toxicity. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;87(8):3234-3243.

- 37.** Božina N, Bilić I, Ganoci L i sur. *DPYD* polymorphisms c.496A>G, c.2194G>A and c.85T>C and risk of severe adverse drug reactions in patients treated with fluoropyrimidine-based protocols. *Br J Clin Pharmacol.* 2021;1-13.
- 38.** Zhou Y, Dagli Hernandez C i Lauschke VM. Population-scale predictions of DPD and TPMT phenotypes using a quantitative pharmacogene-specific ensemble classifier. *Br J Cancer.* 2020;123:1782-1789.
- 39.** Cocca M, Bedognetti D, La Bianca M i sur. Pharmacogenetics driving personalized medicine: analysis of genetic polymorphisms related to breast cancer medications in Italian isolated populations. *J Transl Med.* 2016;14:22.
- 40.** Henricks LM, Lunenburg CATC, de Man FM i sur. A cost analysis of upfront *DPYD* genotype-guided dose individualisation in fluoropyrimidine-based anticancer therapy. *Eur J Cancer.* 2019;107:60-67.
- 41.** Klinički bolnički centar Zagreb (KBC Zagreb): Odjel za farmakogenomiku i individualizaciju terapije. Dostupno na: <https://www.kbc-zagreb.hr/odjel-za-farmakogenomiku-i-individualizaciju-terapije.aspx>. Pristupljeno 14.05.2022.
- 42.** Klinički bolnički centar Zagreb (KBC Zagreb): Slanje uzoraka. Dostupno na: <https://www.kbc-zagreb.hr/slanje-uzoraka.aspx> Pristupljeno 14.05.2022.
- 43.** Klinički bolnički centar Zagreb (KBC Zagreb): Dodatne informacije o naručivanju. Dostupno na: <https://www.kbc-zagreb.hr/EasyEdit/UserFiles/lab/obavijesti-o-narucivanju-2242022.pdf> Pristupljeno 14.05.2022.

7. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

5-FU = 5-fluorouracil

5-FUDR = stopa razgradnje 5-FU-a (engl. *5-fluorouracil Degradation Rate*)

AUC = površina ispod krivulje (engl. *Area Under the curve*)

AS = zbroj aktivnosti (engl. *Activity Score*)

BSA = tjelesna površina (engl. *Body Surface Area*)

CPIC = *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CTCAE = Common Terminology Criteria for Adverse Events

CYP = citokrom P450

dTMP = deoksitimidin-monofosfat

dUMP = deoksiuridin-monofosfat

DHFR = dihidrofolat-reduktaza

DHFU = dihidrofluorouracil

DHU = dihidrouracil

DNA = deoksiribonukleinska kiselina

DPD = dihidropirimidin-dehidrogenaza

DPWG = *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy - Pharmacogenetics Working Group*

DPYD = gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu

DPYS = dihidropirimidinaza

EMA = Europska agencija za lijekove

FBAL = fluoro-beta-alanin

FdUDP = fluorodeoksiuridin-difosfat

FdUMP = fluorodeoksiuridin-monofosfat

FdUTP = fluorodeoksiuridin-trifosfat

FPGS = folipoliglutamat-sintetaza

FUDP = fluorouridin-difosfat

FUDR = fluorodeoksiuridin

FUMP = fluorouridin-monofosfat

FUPA = fluoro-beta-ureidopropionat

FUR = fluorouridin

FUTP = fluorouridin-trifosfat

FVG = talijanska regija Friuli Venezia Giulia

GGH = gama-glutamil-hidrolaza

HALMED = Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HLA = ljudski leukocitni antigen

HZZO = Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

IATDMCT = *International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*

IM = intermedijarni metabolizator

IR = infracrveno

KBC = klinički bolnički centar

KZLD = Klinički zavoda za laboratorijsku dijagnostiku

MTHFR = metilentetrahidrofolat-reduktaza

NAT = N-acetiltransferaza

PETACC = *Pan-European Trials in an Alimentary Tract Cancer*

PharmGKB = The Pharmacogenomics Knowledge Base

PM = slabi metabolizator (engl. *Poor Metaboliser*)

RH = Republika Hrvatska

RM = brzi metabolizator (engl. *Rapid Metaboliser*)

RNA = ribonukleinska kiselina

RNPGx = *French National Network of Pharmacogenetics (Réseau national de pharmacogénétique)*

SEFF = *Spanish Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Society*

SEOM = *Spanish Society of Medical Oncology*

SNP = polimorfizam jednog nukleotida (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*)

SPT = *Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalized Therapy*

TDG = timin-DNA-glikozilaza

TDM = terapijsko praćenje lijeka (engl. *Therapeutic Drug Monitoring*)

THF = tetrahidrofolat

TK1 = timidin-kinaza

TOSCA = *Three or six colon adjuvant*

TP53 = tumorski protein 53

TPMT = tiopurin-S-metiltransferaza

TYMP = timidilat-fosforilaza

TYMS = timidilat-sintaza

U = uracil

UGT = uridin-difosfat-glukuronil-transferaza

UM = ultrabrzi metabolizator

UPB1 = beta-ureidopropionaza

VUS = varijanta nesigurnog značaja (engl. *Variant of Unknown Significance*)

8. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Jovanović Ana

Rizzijeva 28, Pula, Republika Hrvatska

0981650588

anajovanovic13@gmail.com

Datum rođenja: 16. listopada 1987.

RADNO ISKUSTVO

2012. – danas Ljekarna Ornela Majetić, Pula (mag.pharm.)

OBRAZOVANJE I DODATNE EDUKACIJE

2020. – 2022. Sveučilišni poslijediplomski specijalistički studij Klinička farmacija
Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb

2006. – 2012. Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, smjer farmacija
(mag.pharm.)

ČLANSTVA

2022. - danas Hrvatsko društvo za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju
(HDFPT)

2012. - danas Hrvatska ljekarnička komora (HLJK)