

# Povezanost polimorfizma ABCG2 c.421C>A (rs2231142) s nuspojavama atorvastatina

---

Galešić, Marina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:386631>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**Marina Galešić**

**Povezanost polimorfizma *ABCG2* c.421C>A  
(rs2231142) s nuspojavama atorvastatina**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju, kolegiju Farmakogenetika, a izrađen u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb pod stručnim voditeljstvom doc. dr. sc. Tamare Božina i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić. Rad je izrađen u okviru Uspostavnog istraživačkog projekta "Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova", Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-UIP-2020-02-8189), voditeljica doc. dr. sc. Tamara Božina.

*Mojoj baki Mari.*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1 Membranski prijenosnik ABCG2 .....	1
1.1.1. Struktura i fiziološka uloga .....	1
1.1.2. Supstrati i inhibitori prijenosnika ABCG2 .....	3
1.1.3. Polimorfizmi jednog nukleotida gena <i>ABCG2</i> .....	7
1.2. Inhibitori HMG-CoA reduktaze-statini.....	9
1.2.1. Farmakodinamika statina .....	9
1.2.2. Farmakokinetika statina .....	11
1.2.3. Atorvastatin .....	12
1.2.4. Indikacije za terapiju statinima .....	13
1.2.5. Neželjeni učinci terapije statinima.....	15
1.3. Utjecaj polimorfizama <i>ABCG2</i> gena na ishode liječenja statinima .....	20
1.4. CPIC smjernice .....	21
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	23
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1 Ispitanici i uzorci .....	24
3.2 Izdvajanje genomske DNA iz uzorka pune krvi metodom <i>QIAamp</i> ® .....	24
3.2.1. Načelo metode.....	24
3.2.2. Potrebna oprema .....	25
3.2.3. Reagensi.....	25
3.2.4. Postupak izdvajanja DNA iz pune krvi ili leukocitnog sloja.....	26
3.3. Mjerenje koncentracije i čistoće izdvojene DNA .....	27
3.3.1. Oprema.....	27
3.3.2. Postupak mjerenja koncentracije i čistoće DNA .....	27
3.4. Genotipizacija <i>ABCG2</i> c.421C>A metodom <i>TaqMan</i> ® <i>DME</i> .....	28
3.4.1. Lančana reakcija polimeraze.....	28
3.4.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	29
3.4.3. <i>TaqMan</i> ® lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu .....	30
3.4.4. Načelo metode za genotipizaciju .....	31
3.4.5. Potrebna oprema .....	32
3.4.6. Reagensi.....	32
3.4.7. Priprema reakcijske smjese .....	34

3.5. Statistička analiza podataka .....	35
4. REZULTATI.....	35
5. RASPRAVA.....	39
6. ZAKLJUČCI.....	44
7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	47
8. LITERATURA .....	51
9. SAŽETAK/SUMMARY .....	61
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD .....	63

## 1. UVOD

### 1.1 Membranski prijenosnik ABCG2

#### 1.1.1. Struktura i fiziološka uloga

Membranski prijenosnik ABCG2 (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (Junior Blood Group)*) ili BCRP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*) (EC:7.6.2.2) (<https://www.uniprot.org/>; <https://www.proteinatlas.org/>) pripada nadporodici ubikvitarnih integralnih membranskih proteina ABC (engl. *ATP Binding Cassette*). ABC prijenosnici, uz SLC (engl. *Solute Carrier*) nadporodicu, imaju središnju ulogu u metaboličkim putevima mnogih lijekova (Božina, 2019.). Gen koji kodira za ABCG2 prijenosnik lociran je u kromosomskoj regiji 4q22.1. (<https://www.genecards.org/>). Gen *ABCG2* čini ukupno 16 eksona i 66 kilobaza, i kodira protein od 655 aminokiselina s molekulskom masom od 72 kDa (Jung i sur., 2011.).

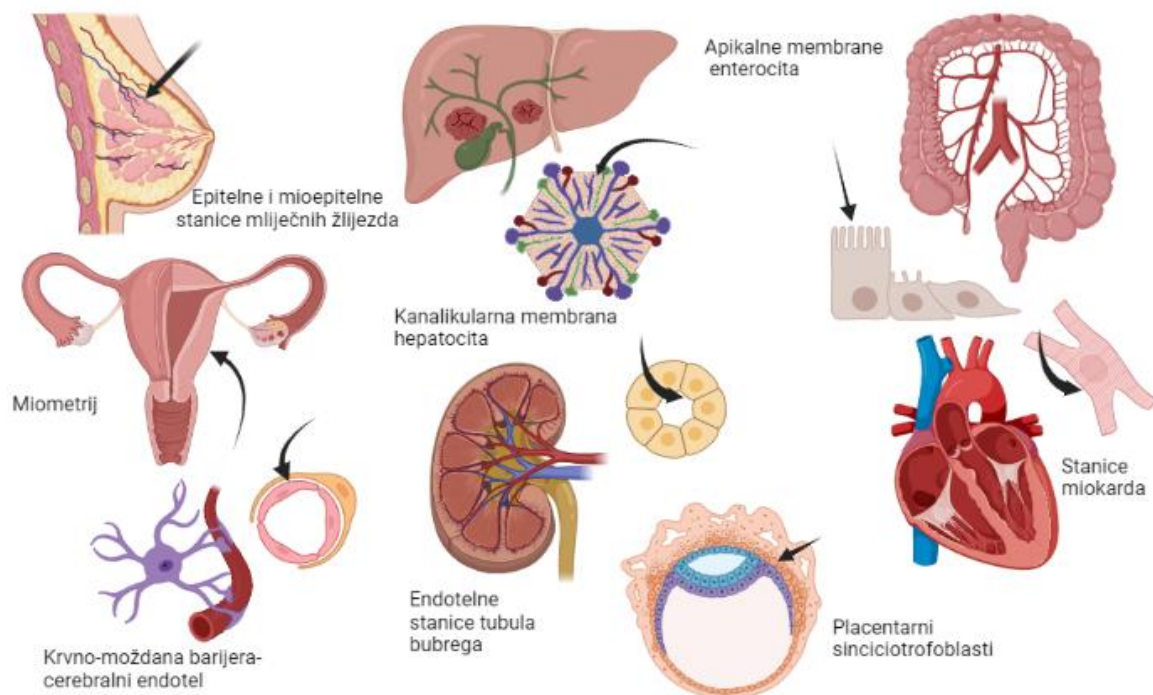
ABC transporteri kodirani su s 49 gena koji su svrstani u sedam podporodica (*ABCI, MDR/TAP, MRP, ALDP, OABP, GCN20, White*) s obzirom na strukturnu homologiju proteina. Podporodice se nekad označavaju i kao *ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF* i *ABCG*. Proteini koje kodiraju djeluju kao prijenosnici širokoga spektra endogenih i egzogenih supstrata. S kliničke strane, najzanimljiviji su membranski transporteri od kojih se ističu P-glikoprotein (engl. *Permeability Glycoprotein 1*) kodiran *ABCB1/MDR1* (engl. *Multi-Drug Resistance Gene 1*) genom te *MRP1* (engl. *Multi-Drug Resistance-associated Protein 1*) kodiran *ABCC1* genom. Sličan njima je i *ABCG2* membranski prijenosnik, pripadnik *White/ABCG* podrazreda, koji djeluje tako da izbacuje supstrate izvan stanice, točnije kao tzv. *efflux* pumpa.

Monomer *ABCG2* proteina građen je od jedne transmembranske domene (engl. *Transmembrane Domain, TMD*) i jedne nukleotid-vezujuće domene (engl. *Nucleotide Binding Domain, NBD*) povezane polipeptidnim lancem. Za potpunu funkcionalnost transportera nužna je prethodna dimerizacija dvaju monomera. Stoga se ovaj transporter naziva i tzv. polu-transporterom (Eckenstaler i sur., 2020.). Transmembranska domena sastoji se od šest transmembranskih  $\alpha$ -zavojnica (engl. *Transmembrane Helix, TMH*). Kako bi se ista mogla ugraditi u staničnu membranu, površinski dio TMD domene građen je od nenabijenih hidrofobnih aminokiselina. Mjesto vezanja supstrata nalazi se unutar TMD domene, a čine ga *TMH2* i *TMH5a'* te *TMH2'* i *TMH5* uzvojnice (Radman 2021; Manolaridis i sur. 2018).

Predloženi mehanizam prijenosa supstrata u izvanstanični prostor temelji se na konformacijskoj promjeni u nukleotid-vezujućim domenama nakon vezanja i hidrolize ATP-a (engl. *Adenosine Triphosphate*, ATP). U odsutnosti ATP-a kao liganda, NBD domene su odvojene.

Nakon hidrolize ATP-a i njihova približavanja, transmembranske domene mijenjaju konformaciju iz one okrenute prema unutrašnjosti stanice (engl. *inward-facing*) u konformaciju okrenutu prema ekstracelularnom prostoru (engl. *outward-facing*). Tim je promjenama omogućeno izbacivanje supstrata (Radman 2021; Eckenstaler i sur., 2020.; Grižančić 2014.).

Svoje drugo ime, BCRP protein može zahvaliti prvotnoj identifikaciji u tumorskom tkivu dojke (Doyle i sur., 1998.). Međutim, ABCG2 pronađen je i u mnogim drugim zdravim tkivima kao što su placentarni sinciciotrofoblasti, kanalikularna membrana hepatocita, cerebralni endotel, epitel i mioepitel dojke, miokard, miometrij te apikalne membrane polarnih stanica gastrointestinalnog sustava. Po zastupljenosti, protein prednjači u mikrovilima enterocita duodenuma, tankoga i debeloga crijeva, u endotelnim stanicama sabirnih i distalnih tubula bubrega te u endotelnim stanicama endometrija (<https://www.proteinatlas.org/>). Zahvaljujući svojoj ekspresiji na mjestima bitnim u regulaciji apsorpcije, ali i na nekim bitnim fiziološkim barijerama (krvno-moždana te transplacentarna barijera), ABCG2 transporter štiti kritična mjesta od prodora neželjenih toksina i ksenobiotika. S druge strane, ta ista karakteristika odgovorna je i za utjecaj na farmakokinetiku određenih lijekova, a što izravno utječe na njihovu biološku raspoloživost i učinkovitost (Zhang i sur., 2016.).



Slika 1. Fiziološka rasprostranjenost prijenosnika ABCG2 (izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

### 1.1.2. Supstrati i inhibitori prijenosnika ABCG2

Do otkrića ABCG2 proteina došlo je 1998. tijekom istraživanja otpornosti tkiva tumora dojke na kemoterapeutike kada su Doyle i sur. identificirali protein s prekomjernom ekspresijom u staničnoj liniji tumorskoga tkiva dojke. Među lijekovima na koje su stanice pokazale rezistenciju jesu mitoksantron, antraciklini (daunorubicin i doksorubicin) te kamptotekini SN-38 i topotekan. Tehnikom otiska prsta (engl. *mRNA fingerprinting*), u staničnoj liniji, identificirana je prekomjerna ekspresija mRNA (engl. *messenger RNA*) koja kodira do tada nepoznat protein (Doyle i sur., 1998.).

Predloženi mehanizam rezistencije je uključivao djelovanje ABCG2 transportera kao pumpe koja izbacuje lijekove u ekstracelularni prostor i time sprječava akumulaciju lijeka unutar stanice (Bates i sur., 2001.). Novootkriveni protein nazvan je BCRP te je stavljen u fokus istraživanja kemorezistencije stanica karcinoma dojke. Međutim, daljnje studije pokazale su kako je BCRP eksprimiran i u drugim maligno transformiranim tkivima (kolorektalni karcinom, kronična mijeloična leukemija), ali i onim zdravima (Zhang i sur., 2016., Loscocco i sur., 2019., Stenvang i sur., 2020.). Stanice karcinoma koje karakterizira prekomjerna ekspresija ovog i



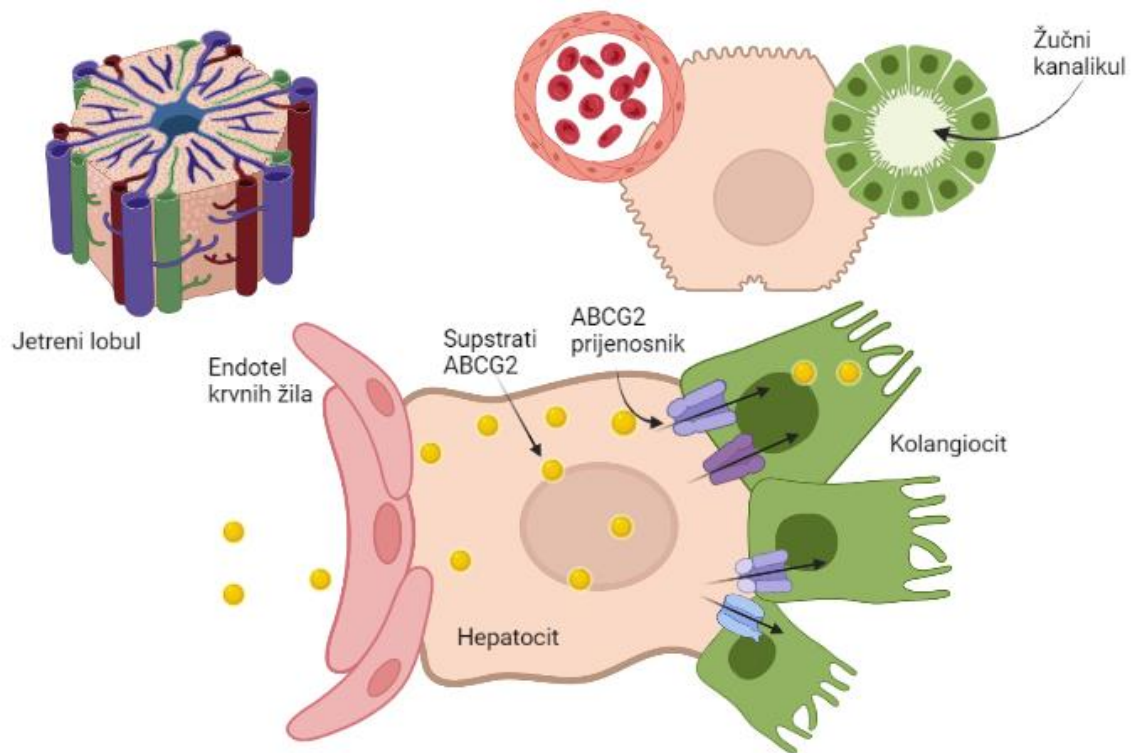
njemu sličnih *efflux* pumpi, pokazuju smanjenu osjetljivost na kemoterapeutike (Palshof i sur., 2020.). Polimorfizmi ABC prijenosnika (ABCB1, ABCC1 i ABCG2) razmatrani su kao potencijalni biomarkeri molekularnog odgovora na terapiju tirozin kinaznim inhibitorima. Povećan rizik od relapsa i slabiji molekularni odgovor na terapiju nilotinobom, jednim od supstrata ABCG2, u kohorti pacijenta koji boluju od kronične mijeloične leukemije istraživani su od strane Loscocco i sur. (2019.). Prevladavanje prepreke otpornosti i adaptabilnosti tumorskih stanica sve češće zauzima svoje mjesto u ciljanom traganju za novim terapijskim metama (Lu i sur., 2023.; Zattoni i sur., 2022.).

Zbog svoje supstratne polispecifičnosti, ABCG2 utječe na širok spektar ksenobiotika i endobiotika. Među supstratima ističu se mnogi citostatici, sulfokonjugati i glukuronidni konjugati koji su produkti druge faze hepatičke biotransformacije mnogih lijekova (Dudas i sur., 2022.). Endogeni supstrati su urat ili mokraćna kiselina, estron-3-sulfat, dihidroepiandrosteron-sulfat, 17 $\beta$ -estradiol 17-( $\beta$ -D-glukuronid) (Eckenstaler i sur., 2021.; Safar i sur.; 2019.; Mao i sur., 2015.) te protoporfirin IX (Mao i sur., 2015.). Urat se eliminira putem bubrega, a njegova homeostaza regulirana je primarno renalnim tubularnim stanicama koje eksprimiraju transportere zadužene za reapsorpciju ili ekskreciju urata. ABCG2 djeluje kao uratni transporter na apikalnoj strani četkaste membrane proksimalnog tubula bubrega te na intestinalnim epitelnim stanicama gdje se odvija manji dio ekskrecije urata. Polimorfizmi ovog transportera povezivani su s hiperuricemijom. Uzrok povećane koncentracije mokraćne kiseline u krvi leži u nemogućnosti bubrega da eliminira akumulirani urat što vodi do hiperuricemije (Eckenstaler i sur., 2021.). Novija istraživanja povezuju ABCG2 rs2231142 polimorfizam i s nefrolitijazom [OR=1,18 (95 % CI=1,09 - 1,28); OR=1,12 (95 % CI=1,06 - 1,18) za TT i GT genotipove u odnosu na GG genotip ( $p < 0,001$ )] (Lin i sur., 2023.).

Naposlijetku je otkriveno preko 200 supstrata ovog transportera za koje još uvijek nisu napravljene detaljne SAR (engl. *Structure-Activity Relationship*, SAR) (Mao i sur., 2015.) studije. Među najproučavanijima jesu rosvastatin (Cooper-DeHoff i sur., 2022.), atorvastatin (Mirošević Skvrce i sur., 2015.; Keskitalo i sur., 2009.), rivaroksaban (Mueck i sur., 2014.), doksorubicin (Garrido-Cano i sur., 2022.), fluorouracil (Mao i sur., 2015.), metotreksat (Stamp i sur., 2011.), apiksaban (Ueshima i sur., 2017.), sulfasalazin (Mao i sur., 2015.; Yamasaki i sur., 2008.), irinotekan (Palshof i sur., 2020.; Mao i sur., 2015.), gemcitabin (Ata i sur., 2022.), pantoprazol (Wang i sur., 2012.), topotekan (Lei i sur., 2019.), lamotrigin (Kukal i sur., 2023.; Klarica Domjanović i sur., 2018.), valproična kiselina, fenitoin (Kukal i sur., 2023.), mikofenolna kiselina (Borić-Bilušić i sur., 2023.) te tirozin kinazni inhibitori (nilotinib,

imatinib, gefitinib) (Loscooco i sur., 2019.; Mao i sur., 2015.). Izbacivanje ksenobiotika, kao što su neki od navedenih kemoterapeutika, otegotna je okolnost za akumulaciju lijeka stanici, a time i za priželjkivan terapijski ishod (Ata i sur., 2022.).

Zbog svoje važnosti u metaboličkim putevima mnogih lijekova, ABCG2 prepoznat je kao ključan transporter čiju ulogu valja razmotriti u mnogim lijek-lijek interakcijama (engl. *Drug-Drug Interactions*, DDI). Preduvjet za poznavanje DDI-ja jest poznavanje supstrata, ali i inhibitora proteina. Mikotoksin fumitremorgin C (FTC), izoliran iz vrste *Aspergillus fumigatus*, prvi je identificirani inhibitor ABCG2 (Radman, 2021.). Budući da je ovaj mikotoksin neurotoksičan (Jackson i sur., 2018.), sintetizirani su njegovi derivati s većom sposobnošću inhibicije proteina, a s manjom toksičnošću (Radman, 2021.). Poznati inhibitori ABCG2 jesu kabozantinib (Lei i sur. 2019.), ritonavir, sakvinavir i nelfinavir, imatinib, nilotinib i apatinib kao dualni P-gp/ABCG2 inhibitori, serin/treonin Polo-like kinazni 1 inhibitor BI2536, tamoksifen te imunosupresivi takrolimus i ciklosporin (Mao i sur., 2015.). Deng i sur. (2022.) identificirali su 75 inhibitora ABCG2 te za njih 13, okarakteriziranih kao jaki inhibitori, odredili koncentraciju potrebnu za 50 % inhibiciju proteina ( $IC_{50}$ ). Vemurafenib, dabigatran eteksilat i everolimus pokazali su se najjačim inhibitorima ( $IC_{50}$  vrijednost iznosila je 1,2, 1,8 te 2,2  $\mu$ M). Vrijedi izdvojiti i inhibitornu aktivnost ivakaftora, loratadina, lovastatina, meloksikama, mikonazola te aprepitanta.



Slika 2. Shematski prikaz funkcije ABCG2 prijenosnika na kanalikularnoj membrani (izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

ABCG2 limitira intestinalnu apsorpciju svojih supstrata iz crijeva i povećava njihovu ekskreciju u žučne kanalikule hepatocita. Sumarno, njegovo djelovanje reducira biorasploživost supstrata. Za neke od supstrata i inhibitora utvrđene su klinički značajne interakcije lijek-lijek. Tako su, primjerice, istraživane interakcije statina s inhibitorima proteaze kod liječenja infekcije HIV-om (engl. *Human Immunodeficiency Virus*). Geometrijski omjer (engl. *Geometric Mean*, GM) te AUC (engl. *Area Under The Curve*) atorvastatina koadministriranog s kombinacijom tipranavira i ritonavira, u odnosu na primjenu atorvastatina samog, iznosio je 9,36 (95 % CI=8,02 - 10,94), a  $C_{max}$  8,61 (95 % CI=7,25 - 10,21). Mehanizam spomenute interakcije rezultat je inhibicije ABCG2 prijenosnika proteaznim inhibitorima, a što smanjuje hepatobilijarnu ekskreciju te povećava apsorpciju atorvastatina. Naime, pacijenti na kroničnoj polipragmaziji koja zahtijeva primjenu hipolipemika i antivirusa izloženi su većoj koncentraciji statina (Pham i sur., 2009.). Klarica Dojmanović i sur. (2018.) istraživali su utjecaj polimorfnog alela A ABCG2 na poluvrijeme eliminacije dva supstrata ABCG2 prijenosnika; lamotrigina i valproične kiseline. Promatrano je poluvrijeme eliminacije lamotrigina i kombinacije lamotrigina i valproata u odraslih pacijenata liječenih od epilepsije. U pacijenata koji su primali samo lamotrigin, dokazano je kraće poluvrijeme eliminacije u onih s 421A varijantom, GM=0,76 (95 % CI=0,59 - 0,98), u odnosu na one s divljim tipom alela. Međutim,

u pacijenata na terapiji lamotriginom i valproatom utvrđen je GM od 1,72 (95 % CI=1,14 - 2,62) usporedbom nositelja varijantnog alela i divljeg tipa alela. Konačno, koadministracija valproata povezana je s duljim poluvremenom eliminacije u odnosu na monoterapiju lamotriginom s geometrijskim omjerom od 5,24 (95 % CI=3,38 - 8,15) za nositelje alela A. Jedna od predloženih hipoteza koja objašnjava farmakorezistentne slučajeve epilepsije jest prekomjerna ekspresija *efflux* pumpi pripadnika ABC obitelji, tzv. *multidrug transporters*, na krvno-moždanoj barijeri. Izloženost stanica cerebralnog mikrovaskularnog endotela valproičnoj kiselini, poznatom antikonvulzivu, inducirala je *BCRP/ABCG2* mRNA. Kukal i sur. (2023.) ovim su istraživanjem utrljali put ka istraživanju poboljšanja centralne bioraspodjelivosti mnogih antikonvulziva. Šimičević i sur. (2023.) su predstavili sigurnosni profil novih oralnih antikoagulansa u pacijenata s polimorfizmima farmakogena koji sudjeluju u njihovom metabolizmu. Tako su opisani slučajevi potencijalnog povećanog rizika od krvarenja kao nuspojave rivaroksabana u onih s polimorfizmom *ABCG2* gena. Nedavno je istražen utjecaj polimorfizma *ABCG2* na enterohepatičku cirkulaciju mikofenolne kiseline. Ovaj se imunosupresiv administrira kao natrijeva sol ili kao mikofenolat mofetil s ciljem prevencije GvHD (engl. *Graft versus Host Disease*) u pacijenata s presađenom jetrom, bubregom ili srcem. Djeluje kao inhibitor inozin-monofosfat-dehidrogenaze, a važan je supstrat *ABCG2* transportera. Borić-Bilušić i sur. (2023.) proveli su studiju na primateljima bubrežnog transplantata na standardnim imunosupresivnim protokolima s mikofenolatom (N=68; 43 pacijenata s koadministriranim ciklosporinom, 25 pacijenata s koadministriranim takrolimusom). Terapijskim praćenjem lijekova, tjedan dana nakon započinjanja liječenja, i genotipizacijom *ABCG2* c.421C>A (rs2231142), pokazana je 40 % viša ukupna izloženost lijeku (AUC) (frekvencijski GM=1,45, 95 % CI=1,10 - 1,91; Bayesov GM=1,38, 95 % CI=1,07 - 1,81) i 30 % niži ukupni klirens (frekvencijski GM=0,66, 95 % CI=0,58 - 0,90; Bayesov GM=0,71, 95 % CI=0,53 - 0,95) u nositelja varijantnoga nego u nositelja divljega tipa alela.

### 1.1.3. Polimorfizmi jednog nukleotida *ABCG2* gena

Od preko 80 sekvenciranjem identificiranih polimorfizama jednog nukleotida (engl. *Single-Nucleotide Polymorphism*, SNP) *ABCG2*, najrelevantnijima su se pokazali 34G>A (V12M) i 421C>A (Q141K). Zamjena citozina adeninom na poziciji 421 u nukleotidnom slijedu (421C>A) rezultira točkastom, točnije mutacijom pogrešnog smisla (engl. *missense mutation*) ([GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search](#)). Mutacija pogrešnog smisla uvodi drugačiji kodon u sekvencu DNA (engl. *Deoxyribonucleic Acid*) koji kodira za

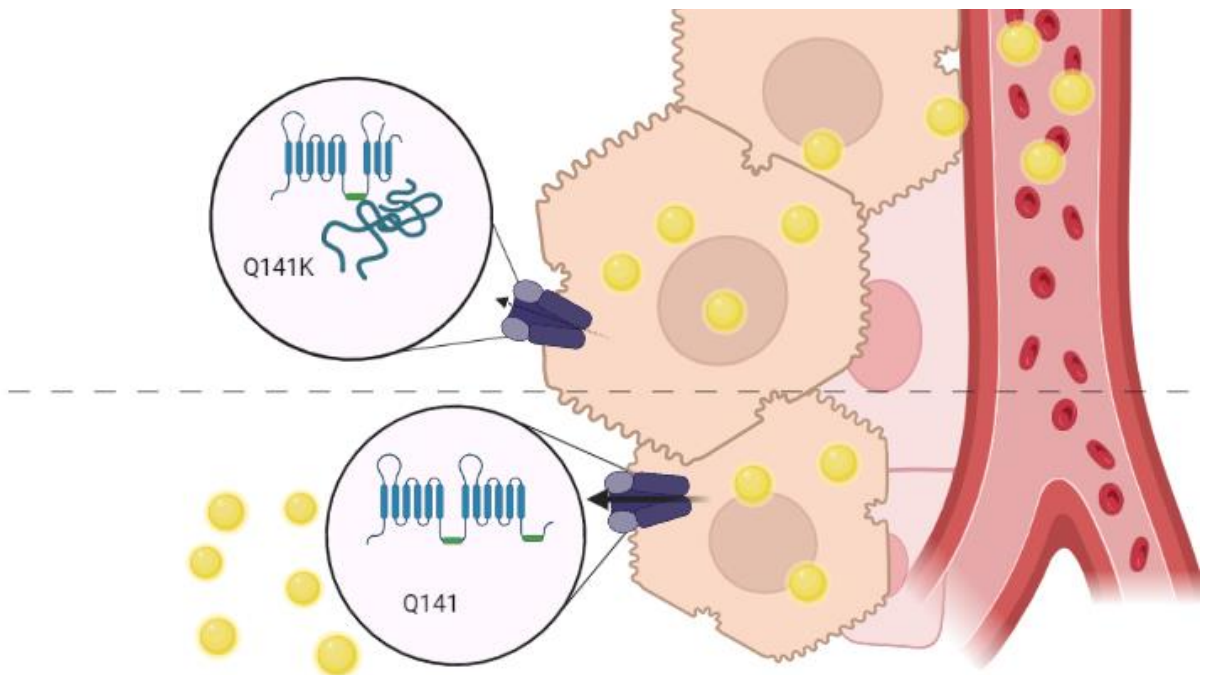
nesinonimnu aminokiselinu u polipeptidnom lancu (Cooper, 2019.). Konkretno, *ABCG2* 421C>A (rs2231142) polimorfizam rezultira zamjenom glutaminskog ostatka lizinskim na poziciji 141 u aminokiselinskom slijedu, a 34G>A zamjenom valina metioninom na poziciji 12. Dva su SNP-a, 376C>T (Q126STOP) i 1000G>T (E334STOP), odgovorna za supstitucije koje vode do preuranjenog stvaranja STOP kodona, a time i zaustavljanja translacije. V12M varijanta pokazuje fenotipski profil sličan divljem tipu BCRP. Utjecaj polimorfizama pronađenih u promotorskoj regiji, 15622C>T i 1379A>G, na ekspresiju i aktivnost proteina još uvijek nije razjašnjen (Mao i sur., 2015.).

Frekvencija *ABCG2* 421C>A polimorfizma ovisi o promatrajnoj etničkoj skupini. Prema podacima iz 1000 Genomes projekta, globalna učestalost minornog alela A iznosi 12 %, dok je kod Europljana učestalost nešto niža i iznosi 9 %. U populaciji istočne Azije učestalost iznosi 29 %, u južnoj Aziji 10 %, a u Africi samo 1 %. Sjeverna i Južna Amerika područja su s frekvencijom od 14 % ([dbSNP Summary \(nih.gov\)](#)). Istraživanje u hrvatskoj populaciji (N=761 ispitanik) pokazalo je učestalost heterozigotnog genotipa (421C/A) od 17,61 % te učestalost homozigotnog varijantnog alela (421 A/A) od 0,92 %. Frekvencija varijantnog alela A iznosi 9,72 % (Karačić, 2021.). Božina i sur. (2022.) odredili su učestalost CC, CA i AA genotipova na 905 ispitanika hrvatskog porijekla, a iznosili su 81,4 %, 17,8 % i 0,8 %. Studija na 250 Koreanaca pokazuje učestalost alela A od 27,8 % (Kim i sur., 2007.). Distribucija alela i genotipova na području Tajlanda konzistentna je s podacima iz istraživanja u drugim državama Azije. Alelna frekvencija *ABCG2* c.421A iznosi 25 %, a *ABCG2* c.421CA i AA genotipovi čine 37,7 % te 5,7 % genotipiziranih (Rattanacheeworn i sur., 2020.).

SNP c.421C>A uzrokom je mutacije pogrešnog smisla p. Gln141Lys, točnije zamjene glutaminske kiseline lizinom na poziciji 141 u aminokiselinskom slijedu proteina. Takav protein smata se u terciarnu strukturu prijenosnika sa smanjenom aktivnošću i narušenom stabilnošću. Konkretno, varijanta p. Q141K (c.421C>A, rs2231142), tj. varijantni alel A povezan je s 30-40 % smanjenom ekspresijom proteina ([dbSNP Summary \(nih.gov\)](#)). To vodi do povećane koncentracije njegovih supstrata uslijed povećane apsorpcije i nemogućnosti njihova izlučivanja izvan stanica na čijim je membranama *ABCG2* ključan transporter. Stoga, navedeni polimorfizam ovog farmakogena mogao bi objasniti nuspojave povezane s muskuloskeletnim sustavom i akutne manifestacije jetrenih oštećenja (Mirošević Skvrce i sur., 2015.).

Predviđanja iz homolognih modela i strukturni podaci dobiveni cryo-EM (engl. *cryogenic-Electron Microscopy*) tehnikom otkrivaju da se Q141 nalazi na NBD domeni

transportera. Glutamin ondje stvara vodikovu vezu s asparaginom na poziciji 158 (N158)  $\alpha$ -heliksa unutar NBD domene. Smatra se da ta vodikova veza igra ulogu u konformacijskim promjenama induciranim vezanjem ATP-a ili njegovom hidrolizom. To objašnjava gubitak funkcije transportera s varijantnom Q141K. Naime, protein s Q141K mutacijom podliježe većoj stopi proteasomalne razgradnje zbog čega je njegova ekspresija na membrani manja. Također, dolazi do pogrešnog smatranja proteina (engl. *misfolding*) i smanjene stabilnosti tako smotanog proteina. Nadalje, c.C421 > A mutacija promovira supresiju translacije ABCG2 promovirane microRNA (engl. *micro Ribonucleic Acid*). (Eckenstaler i sur., 2021., Li i sur., 2015, Eckenstaler i sur., 2020.). Ključ ka uspješnom predviđanju i prevenciji farmakokinetičke varijabilnosti povezane s ABCG2 proteinom jest bolje razumijevanje njegova mehanizma izbacivanja supstrata te utjecaja na metabolizam pojedinog lijeka (Dudas i sur., 2022.).



Slika 3. Shematski prikaz aktivnosti ABCG2 ovisne o polimorfizmu 421C>G (izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

## 1.2. Inhibitori HMG-CoA reduktaze-statini

### 1.2.1. Farmakodinamika statina

Glavni mehanizam djelovanja statini duguju dijelu strukture analognoj mevalonskoj kiselini. Djeluju kao kompetitivni i reverzibilni inhibitor enzima 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A

(engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A*, HMG-CoA) reduktaze. Vežu se na aktivno mjesto i uzrokuju promjenu konformacije enzima. Enzim je eksprimiran na membrani endoplazmatskog retikuluma hepatocita. Smanjenjem pretvorbe  $\beta$ -hidroksi  $\beta$ -metilglutaril-CoA u mevalonat, statini inhibiraju ograničavajući korak u endogenoj sintezi kolesterola. Kolesterol, kao kranji produkt ovog puta, nije jedini čija je sinteza reducirana. Smanjena bioraspoloživost izoprenoidnih metabolita; farnezil pirofosfata, geranilgeranil pirofosfata, hem A i koezima Q10 reflektira se na mnoge druge metaboličke puteve. Naposljetku, kolesterol služi kao intermedijarni produkt mnogih drugih puteva kao što su oni za sintezu skvalana, žučnih kiselina, vitamina D ili kortikosteroida. Kako je jetra glavni izvor endogenog kolesterola, statini su vrlo učinkoviti u sniženju ukupne koncentracije kolesterola. Smanjenje glavnog prekursora svih lipoproteina rezultira kompenzatornim povećanjem ekspresije gena za LDL (engl. *Low-Density Lipoprotein*) receptor. Naime, smanjena intracelularna koncentracija kolesterola rezultira proteaznim cijepanjem SREBP (engl. *Sterol Regulatory Binding Protein*). Oni se translociraju u jezgru i vežu za SRE (engl. *Sterol Regulatory Element*) elemente u promotorskim regijama i potiču ekspresiju gena za regulaciju lipidnog metabolizma. VLDL (engl. *Very-Low-Density Lipoprotein*) i LDL čestice vežu se za LDL receptore i endocitozom posredovanom receptorom ulaze u hepatocite. Time je koncentracija cirkulirajućeg kolesterola smanjena, a njegov katabolizam povećan. (Ciberlin, 2021.; Mollazadeh i sur., 2021.; Goodman i sur., 2017.)

Ekstrahepatički učinci i pleiotropna djelovanja statina ovisni su o lipofilnosti lijekova i variraju s obzirom na intenzitet i farmakokinetička svojstva različitih predstavnika skupine. (Mollazadeh i sur., 2021.). Izuzev klinički najvažnijeg učinka sniženja kolesterola, statini imaju brojne pleiotropne učinke s utjecajem na kardiovaskularni, ali i na ostale sustave. Ovi lijekovi pokazuju protektivan učinak na krvožilni sustav mehanizmima neovisnima o snižavanju koncentracije plazmatskog LDL-a (Ciberlin, 2021.). Međutim, ti su učinci, prvenstveno, posredovani smanjenom koncentracijom preniliranih prekursora kolesterola kao što su farnezil pirofosfat i geranilgeranil pirofosfat. Time je onemogućena posttranslacijska dorada proteina. Rho i Rac jedne su od pogođenih GTP-aza (engl. *Guanosine Triphosphatase*), a čija nepotpuna funkcija rezultira poremećajem mnogih signalnih puteva i prometa ostalih proteina. Glavnina ishoda odnosi se na imunomodulatorni, protuupalni te učinak na poboljšanu endotelnu funkciju (Mollazadeh i sur., 2021.). Naime, terapija statinima povećava dostupnost dušikovog (I) oksida povećanjem aktivnosti endotelne sintaze dušikovog oksida. Vazodilataciji pogoduje i smanjena ekspresija endotelina-1, inhibicija tvorbe ROS-ova (engl. *Reactive Oxygen Species*) te

mobilizacija matičnih endotelnih stanica. Smanjenja migracija i proliferacija stanica glatkog mišića žila posredovana je djelovanjem na citoskelet kojeg inače reguliraju Rho kinaze. Rac ima ulogu u aktivaciji NADPH (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) oksidaze i proizvodnji ROS-ova koji promoviraju nastanak proaterogenog oksidiranog LDL-a. Pleiotopni učinci uključuju i anti-trombotičku te imunosupresivnu aktivnost smanjenjem sinteze tromboksana A<sub>2</sub>, proinflamatornih citokina, ekspresije metaloproteinaza, kemotaksije upalnih stanica i migracije makrofaga (Oesterle i sur., 2018.).

### 1.2.2. Farmakokinetika statina

Izuzev simvastatina i lovastatina, svi statini se nalaze u oliku β-hidroksi kiselina, a što i jest njihova aktivna forma koja inhibira HMG-CoA reduktazu. Spomenuti izuzeci se, iz inaktivnog laktona, u jetri pretvaraju u svoje β-hidroksi oblike. Nakon oralne primjene, intestinalna apsorpcija im varira u rasponu 30 % - 85 %. U hepatocite se unose većinom putem OAT1B1 transportera (engl. *Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*) kodiranog *SLCO1B1* genom (engl. *Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1*). Dokazano je da \*5 alel (p.Val174Ala, 521T > C, rs4149056) interferira s lokalizacijom transportera na membrani hepatocita, što dovodi do smanjenog unosa njegovih supstrata u hepatocite. U slučaju statina, to dovodi do povećane sistemske koncentracije lijeka te time i do povećane izloženosti ekstrahepatičkih tkiva akumuliranom lijeku. Međutim, hepatotoksičnost ne bi trebala biti posljedica 521T>C polimorfizma jer bi isti trebao smanjivati hepatičku koncentraciju lijeka (Mirošević Skvrce i sur., 2015). Svi podliježu intenzivnom hepatičkom metabolizmu prvog prolaska nakon čega se pretvaraju u mnoge aktivne i inaktivne metabolite. Atorvastatin, simvastatin i lovastatin metaboliziraju se primarno CYP3A4/5 (engl. *cytochrome P450*) enzimima, a fluvastatin, te manjim dijelom rosuvastatin, CYP2C9 enzimom. Roditeljske molekule i njihovi produkti glukuronidiraju se enzimima druge faze UGT (engl. *UDP-glucuronosyltransferase*). Bioraspoloživost statina i njihovih metabolita nakon metabolizma u jetri iznosi 5 % do 30 % od primjenjene doze. Metaboliti, osim metabolita pravastatina i fluvastatina, također imaju sposobnost inhibicije HMG-CoA. Preko 95 % roditeljskih molekula i njihovih metabolita nalaze se u plazmi vezani za proteine. Glavnina metabolita je podložna hepatičkom izlučivanju (Goodman i sur., 2017).

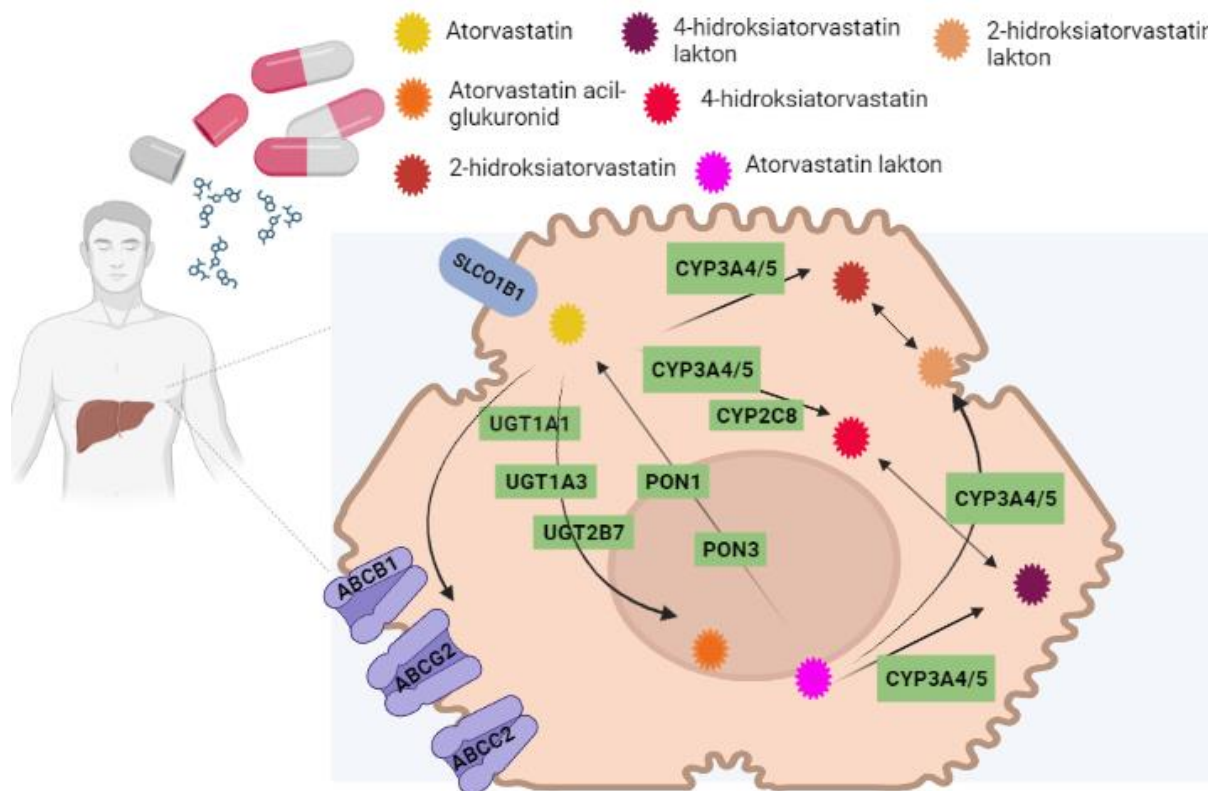
Endogena proizvodnja kolesterola najveća je između ponoći i dva sata ujutro. Poznat cirkadijalni ritam hepatičke sinteze omogućava optimizaciju vremena administracije. Statini s poluvremenom života od četiri sata piju se u večernjim satima kako bi djelovali upravo u trenutku kada su najpotrebniji. Atorvastatin i rosuvastatin imaju dulji t<sub>1/2</sub> biološkog učinka od



oko 20 sati, a simvastatin 12 sati, a što omogućuje njihovu administraciju i u drugim dijelovima dana. U nekih pacijenata se to pokazalo korisnim zbog povećane adherencije na kroničnu terapiju. Dulji  $t_{1/2}$  vjerojatno je razlogom bolje učinkovitosti ovih predstavnika statina na sniženje kolesterola (Goodman i sur., 2017).

### 1.2.3. Atorvastatin

Atorvastatin (ATK oznaka: C10AA05) je statin visoke potentnosti, a zbog svoje učinkovitosti i područja primjene je svrstavan među najpropisivnije lijekove ikada (<https://www.fiercepharma.com/>, <https://www.whocc.no/> ). Vršnu plazmatsku koncentraciju postiže nakon jednog do dva sata nakon peroralne primjene, ali njegovo je poluvrijeme raspada oko 14 sati. Poluvijek biološkog učinka inhibicije HMG-CoA reduktaze iznosi oko 20 do 30 sati, zbog doprinosa aktivnih metabolita. Bioraspoloživost mu iznosi oko 12 %, a sistemska raspoloživost inhibitorne aktivnosti HMG-CoA-reduktaze iznosi oko 30 %. Niska bioraspoloživost pripisuje se klirensu u mukozni gastrointestinalnog trakta i ekstenzivnom hepatičkom metabolizmu. Nju kompenzira visoka potentnost lijeka. Stanje dinamičke ravnoteže (engl. *steady-state concentration*) postiže sedam do osam dana nakon početka svakodnevne administracije. Terapijski odgovor uočava se unutar dva tjedna, a maksimalni se odgovor obično postiže unutar četiri tjedna. Glavnina lijeka i njegovih produkata je izlučena putem žuči. Budući da se primarno metabolizira u jetri, hepatička disfunkcija utječe na farmakokinetiku atorvastatina (HALMED, 2021.).



Slika 4. Shematski prikaz jetrene biotransformacije oralno primjenjenog atorvastatina (ABC - pripadnici obitelji ATP-vezujućih kazetnih prijenosnika, CYP – pripadnici CYP 450 superobitelji, PON – pripadnici obitelji paraoksonaza, SLC01B1- prijenosnik otopljenih tvari član 1B1, UGT- pripadnici obitelji uridin 5'-difosfo-glukuronoziltransferaza; izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com))

#### 1.2.4. Indikacije za terapiju statinima

Između svih hipolipemika, statini su okosnica svake terapije s ciljem sniženja serumskog LDL-a. Uz nefarmakoterapijske mjere koje igraju ključnu ulogu u prevenciji pojavnosti kardiovaskularnih entiteta, kao što je uvođenje zdravijih i aktivnijih životnih navika, učinkovitost statina pokazala se nezamjenjivom (Arnett i sur., 2019.).

Najčešća indikacija za korištenje statina jest aterosklerotska kardiovaskularna bolest (engl. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease*, ASCD). Zbog sve veće učestalosti ASCD-a, ali i ostalih dijagnoza s dokazanom hiperkolesterolemijom, statini su jedni od najpropisivanih lijekova u svijetu. Međutim, svi se pripadnici iz skupine statina koriste u svrhu prevencije kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta, prema smjernicama ACC/AHA/NHLBI (engl. *American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute*) (Arnett i sur., 2019.). Za razliku od ostalih hipolipemika, pokazuju se korisnima i kod liječenja dislipidemija, konkretno primarne hiperkolesterolemije. Dokazi mnogih kohortnih,

prospektivnih istraživanja nedvosmisleno dokazuju korisnost statina u sekundarnoj prevenciji kardiovaskularne bolesti (Mach i sur., 2020.; Hadžibegović, 2016.).

Ovakvi epidemiološki podaci pozivaju na detaljno poznavanje omjera koristi i rizika liječenjem statinima. Korisnost statina u primarnoj i sekundarnoj prevenciji kardiovaskularnih dijagnoza dokazana je studijama učinkovitosti i sigurnosti u mnogim randomiziranim kontroliranim ispitivanjima i metaanalizama. Stoga, statini se danas smatraju najučinkovitijim lijekovima u smanjenu kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (Olmastroni i sur., 2022.).

Europsko kardiološko društvo (engl. *the European Society of Cardiology (ESC)/European Atherosclerosis Society (EAS)*), u svrhu procjene ukupnog kardiovaskularnog rizika, donose SCORE (engl. *Systematic Coronary Risk Estimation*) tablice. Rezultat primjene SCORE klasifikacije je podjela pacijenata u dobi od 40 do 65 godina na četiri skupine ukupnoga kardiovaskularnog rizika:

- vrlo visoki rizik (SCORE  $\geq 10$  % ili 10-godišnja vjerojatnost kardiovaskularne bolesti jednaka ili veća od 10 %);
- visoki rizik (SCORE  $\geq 5$  % i  $< 10$  %);
- umjereni rizik (SCORE  $\geq 1$  % i  $< 5$  %) i
- niski rizik (SCORE  $< 1$  %).

Valja imati na umu i podjelu na visokorizične, gdje spada i Hrvatska, te niskorizične regije prilikom upotrebe tablica. Optimalna redukcija serumskih razina LDL-a i triglicerida postiže se kombinacijom terapijskih i nefarmakoloških mjera. Zdrava prehrana i redovna fizička aktivnost nadopuna su svakoj medikamentoznoj terapiji (Mach i sur., 2020.).

Utjecaj na sniženje razina LDL kolesterola ovisan je o dozi. Pokazano je da je sa svakim udvostručenjem doze LDL snižen za 6 % u odnosu na koncentraciju pri početku terapije. Dakle, sniženje kolesterola ovisno je o dozi lijeka na logaritamski način. Nakon 7-10 dana postiže se maksimalan učinak lijeka, tj. smatra se da se koncentracija lijeka nalazi u dinamičkoj ravnoteži. Utjecaj statina na povišenje razina protektivnog HDL (engl. *High-Density Lipoprotein*) kolesterola još uvijek nije dovoljno istražen. Razine triglicerida pokazuju sličnu dinamiku kao i razine LDL kolesterola tijekom primjene statina (Goodman i sur., 2017).

Svoju zastupljenost statini mogu zahvaliti, između ostalog, i činjenici da su učinkoviti na velikom broju pacijenata i dokazano relativno sigurni lijekovi za svakodnevnu primjenu.

Kontraindicirani su kod trudnica i dojilja, osoba s jetrenom bolešću ili s trajnim povišenjem jetrenih transaminaza (Goodman, 2017.).

Ostali lijekovi s tim indikacijama uključuju ezetimib, sekvestrante žučnih kiselina te inhibitore PCSK9 (engl. *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*). Fibrati koji primarno snižavaju razinu triglicerida, ispoljavaju slab učinak na sniženje LDL-a (Arnett i sur., 2019.).

Prije početka liječenja statinima bolesnika treba staviti na standardnu dijetu za snižavanje koncentracije kolesterola, te se dijeta mora nastaviti i tijekom terapije. Dozu treba prilagoditi s obzirom na osnovne vrijednosti LDL kolesterola, cilj liječenja i odgovor bolesnika na liječenje (HALMED, 2021.).

Europske i američke smjernice ne daju eksplicitne preporuke o trajanju terapije. U slučaju primjene s ciljem sekundarne prevencije, opće je prihvaćeno stajalište trajne terapije do trenutka intolerancije (Hadžibegović, 2016.).

### **1.2.5. Neželjeni učinci terapije statinima**

Statini se dijele na one niskog, umjerenog i visokog intenziteta snižavanja LDL kolesterola. Statini visokog intenziteta snižavanja kolesterola (engl. *high-intensity statin*) snižavaju koncentracije LDL za  $\geq 50\%$ , oni umjerenog intenziteta za  $30\%$  do  $49\%$ , a oni niskog do  $30\%$  od početne razine. Naravno, valja imati na umu incijalnu dijagnozu ili preventivnu mjeru zbog koje su lijekovi indicirani prilikom ordiniranja ove skupine lijekova. Zbog svoje rasprostranjenosti te zbog sve veće incidencije kroničnih kardiovaskularnih bolesti koje se liječe, ali i preveniraju statinima, farmakokinetički i farmakodinamički profili statina posebno su istraživani. Dugotrajna, a možebitno i doživotna terapija mora biti sigurna. Bolje farmakološke karakteristike i veća učinkovitost za pojedine skupine pacijenata fokus su kinetičkih istraživanja na statinima. Korisnost takve terapije mora nadvladavati potencijalne rizike od akutnih nuspojava i dugoročnih posljedica (Grundy i sur., 2019.).

Statini se opravdano smatraju sigurnim lijekovima s niskom incidencijom neželjenih učinaka, ali iste treba minimizirati gdje god je to moguće. Nuspojave statina nazivaju se i sa statinima povezanim simptomima (engl. *Statin-Associated Symptoms, SAS*). Od svih nuspojava, najprijavljiviji jesu tzv. *Statin-Associated Muscle Symptoms (SAMS)*, a ujedno su i najčešći razlog neadherencije i samoinicijativnog prekida terapije (Mollazadeh i sur., 2021.). Izuzev njih, prijavljivane su i nuspojave vezane za jetrenu i bubrežnu funkciju (Goodman, 2017.). U rijetke nuspojave spadaju dispepsija, mučnina i nadutost, eozinofilija, glavobolje, poremećaji spavanja kao što su noćne more ili nesanica, pojava kožnih osipa, urtikarija ili

svrbeža, artralgiya ili artritis, alopecija, erektilna disfunkcija ili ginekomastija (HALMED, 2021.; Hadžibegović, 2016.).

Intolerancija na statine označava nemogućnost podnošenja doze potrebne za optimalno smanjenje kardiovaskularnog rizika zbog nuspojava (Hadžibegović, 2016.).

Najčešća neželjena nuspojava je miotoksičnost, konkretno toksičnost po skeletne mišiće, koja se manifestira kao SAMS. SAMS, prema ACC/AHA/NHLBI, podrazumijeva više kliničkih entiteta kao što su mijalgija (mišićna bol bez dokaza razgradnje mišićnog tkiva, primjerice povišenje koncentracije CK (engl. *creatine kinase*) manje od tri puta gornje granice referentnog intervala), miopatija (dokazana mišićna degradacija, primjerice povišenje koncentracije CK  $\geq$  od tri puta gornje granice referentnog intervala) i rabdomioliza (kreatininemija, smeđe obojena mokraća zbog mioglobinurije, porast koncentracije CK za 10 puta od gornje granice referentnog intervala) (Merćep i sur., 2021.). *The United States Food and Drug Administration* (FDA) definira rabdomiolizu kao stanje definirano povišenjem CK u krvi veće od 50 puta gornje granice referentnog intervala povezano s mioglobinom induciranom akutnom ozljedom bubrega. Rabdomioliza jest najozbiljnija nuspojava statina, ali ostaje rijetka komplikacija koja se javlja u oko 0,01 % liječenih pacijenata. Miopatija u praksi rijetko progradira do rabdomiolize zbog prekidanja terapije. Mioglobinurija, uzrokovana otpuštanjem mioglobina u cirkulaciju uslijed mišićne nekroze, uzrokuje mehaničku opstrukciju i akutnu nekrozu renalnih tubula te vodi do bubrežnog zatajenja (Mollazadeh i sur., 2021.).

Nuspojave obuhvaćaju i ireverzibilnu imunosno posredovanu nekrotizirajuću miopatiju. Riječ je o patogenezi posredovanoj specifičnim autoimunim protutijelima na HMG-CoA-reduktazu. Manifestira se proksimalnom miopatijom i povišenim razinama CK-a u serumu, a javlja se vrlo rijetko. Ova nuspojava nije sklona regresiji po ukidanju terapije, a tretira se imunosupresivima (Weeding i sur., 2021.; HALMED, 2021.).

EAS Consensus predlaže tri kriterija za dijagnozu SAMS: porast razina CK-a s uvođenjem statina, povlačenje simptoma s prekidanjem terapije (engl. *positive dechallenge*), ponovna pojava simptoma s uvođenjem terapije (engl. *positive rechallenge*). Valja napomenuti kako se SAMS može javiti i u pacijenata bez dokazanog porasta koncentracije CK-a u krvi. Također, određen broj pacijenata prezentira se asimptomatskim povišenjem razina CK-a manjim od tri puta gornje granice referentnog intervala (Mollazadeh i sur., 2021.). Rizik za razvoj nuspojava vezanih za mišiće proporcionalan je dozi i plazmatskoj koncentraciji lijeka. Razumljivo, svi čimbenici koji utječu na procese distribucije, metabolizma i eliminacije statina promovirat će rizik za o dozi ovisne nuspojave. Antropometrijski rizici su starosna dob iznad

80 godina, niži BMI (engl. *Body Mass Index*) i ženski spol. Pacijenti koji boluju od akutnih infekcija, kronične jetrene i bubrežne bolesti, neliječenog hipotireoidizma, šećerne bolesti, opstrukcije žučnih puteva, nedostatka vitamina D ili su HIV pozitivni, podložniji su nuspojavama vezanim uz mišiće. Također, primjena statina trebala bi se izbjegavati u perioperativnim razdobljima (Goodman i sur., 2017). Simptomi se javljaju 4-6 tjedana nakon započinjanja terapije, uz iznimke slučajeva kada se simptomi mogu javiti mjesecima pa i godinama nakon (Mollazadeh i sur., 2021.). Učestalost SAMS-a u kliničkoj praksi veća je no što je to uočeno u kontroliranim studijama. Iako je velik dio nuspojava svrstan u one blage, njihova je pojava dovoljna da pacijent prekine terapiju samoinicijativno. S obzirom da kardiovaskularne bolesti danas zauzimaju prvo mjesto po smrtnosti među nezaraznim bolestim (engl. *noncommunicable diseases*), kronična polipragmazija koja je nužna za održanje kvalitete života, mora biti siguran izbor za pacijenta (Ciberlin, 2021.). Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization, WHO*), 17,9 milijuna ljudi godišnje umire od kroničnih kardiovaskularnih bolesti. Drugo mjesto zauzimaju maligne bolesti (9,3 milijuna), kronične respiratorne (4,1 milijuna) pa šećerna bolest (2 milijuna) ([www.who.com](http://www.who.com)).

Etiologija neželjenih učinaka statina na mišićno-koštani sustav do danas nije u potpunosti rasvijetljena. Nepobitna je činjenica da miotoksičnost nije uzrokovana isključivo izravnim učinkom na smanjenje koncentracije kolesterola. Na staničnoj razini, statini interferiraju s aktivnošću mitohondrija. Izravan mehanizam podrazumijeva poremećaj lanca prijenosa elektrona. Neizravni su mehanizmi posljedica deplecije prekursora kolesterola kao što je koenzim Q10 i izoprenoidi. Histopatološki, miopatija uzrokovana statinima je karakterizirana lipidnom agregacijom u mitohondrijima i crvenim vlaknima akumuliranim u subsarkolemalnoj regiji. Do subsarkolemalne mitohondrijske akumulacije dolazi zbog povećanja broja mitohondrija u toj regiji mišićnih vlakana. Nakupljanje mitohondrija smatra se kompenzacijskim mehanizmom za povećanje proizvodnje ATP-a u mišićnim vlaknima zahvaćenim poremećajem oksidativne fosforilacije. Abnormalan omjer laktata i piruvata u pacijenata tretiranih statinima govori u prilog staničnom stresu i disrupciji metaboličkih puteva (Mollazadeh i sur., 2021.).

Inhibitorni učinak statina na metabolite sintetskog puta kolesterola vodi do redukcije razina koenzima Q10 ili ubikinona za 16-54 % (Marcoff i sur., 2007.). Međutim, podaci o utjecaju statina na koncentraciju koenzima Q10 u tkivu skeletnih mišića su oskudni. Kliničko ispitivanje u trajanju od osam tjedana pokazalo je redukciju koncentracije ubikinona u

mišićnom tkivu prilikom administracije 80 mg dnevno simvastatina, ali ne i prilikom 40 mg dnevno atorvastatina (Päivä i sur., 2005.). Značajno sniženje omjera mitohondrijske i nuklearne DNA uočeno je u spomenutom ispitivanju, ali ponovno isključivo kod administracije simvastatina (Schick i sur., 2007.). Inhibicija kompleksa I, III i IV u skeletnim mišićima štakora dokazana je nakon 24-satne izloženosti 100  $\mu\text{mol/L}$  cerivastatinu, simvastatinu, fluvastatinu i atorvastatinu (Kaufmann i sur., 2006.). Smanjenje potencijala unutarnje membrane mitohondrija i njezina depolarizacija posljedica su inhibicije kompleksa lanca prijenosa elektrona koji vode do izmjenjene permeabilnosti izmjenjivača. Povećan  $\text{Ca}^{2+}$  *efflux* iz sarkoplazmatskog retikula potencijalno je uzrokovan disrupcijom lanca prijenosa elektrona. Primarni tok kalcija iz sarkoplazmatskog retikula uzrokovan je promijenjenom permeabilnosti  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  izmjenjivača (Sirvent i sur., 2005.).

Abnormalna aktivacija intrinzičnog apoptotičkog puta posljedica je smanjenja Bcl-2/Bax omjera. Apoptoza posredovana statinima odgovorna je za mnoge korisne pleiotropne, ali i otegotne nuspojave liječenja. Već spomenuta povećana sarkoplazmatska koncentracija kalcija vodi do translokacije Bax u vanjsku membranu mitohondrija. Time je pokrenut intrinzični apoptotički put otpuštanjem citokroma c u citosol i formacijom apoptosoma (Mollazadeh i sur., 2021.).

Predloženi mehanizmi kojima atorvastatin vodi do disfunkcije mitohondrijskih metaboličkih puteva jesu inhibicija kompleksa I, III i IV, disregulacija homeostaze kalcija, redukcija koncentracije koenzima Q10, deplecija mitohondrijske DNA, disrupcija Akt signalnog puta. Do inducirane apoptoze vodi akumulacija reaktivnih kisikovih spojeva te disregulacija Akt puta (Liantonio i sur., 2007., Saha i sur., 2016., Mullen i sur., 2011., Dirks i sur., 2006.).

Farnezilacija i geranilacija proteina važne su posttranslacijske dorade za pravilnu funkciju proteina. Usklađen metabolizam na razini mitohondrija, kao organela zaduženog za produkciju ATP-a, te dostupnost metabolita sintetskog puta mevalonata ključni su za održanje homeostaze na razini svih stanica. Nema prijepora kako opisana disrupcija ima ulogu u patogenezi mišićnih nuspojava, ali potrebne su još mnoge *in vivo* studije kako bi se dokazao učinak pojedinih čimbenika i njihova povezanost s konkretnim entitetom (Mollazadeh i sur., 2021.).

Hepatotoksičnost je rijetka i nepredvidiva nuspojava. Oštećenja jetre kao posljedica terapije statinima prezentiraju se kao više kliničkih entiteta. Međutim, ove su nuspojave vrlo rijetke. Najčešće se javljaju kao asimptomatski porast razina aspartat-aminotransferaze (AST)

i alanin-aminotransferaze (ALT) u serumu, a rjeđe se radi o hepatitisu ili kolestazi te, vrlo rijetko, o akutnom zatajenju jetre (Goodman i sur., 2017).

Prijavljeni slučajevi gubitka kognitivnih funkcija, uključujući gubitak pamćenja, podigli su sumnju 2012. godine kada FDA izdaje upozorenje (engl. *black box warning*) zbog bojazni od kognitivne deterioracije kao potencijalne nuspojave statina (<https://www.fda.gov/>, Mirošević Skvrce i sur., 2015). Podatci sakupljeni iz kratkoročnih studija išli su u prilog gubitku pamćenja, ali dugotrajne studije pokazivale su oprečne rezultate i podupirale protektivnu ulogu statina u prevenciji staračke demencije (Oлмаstroni i sur., 2022.).

Smatra se da protuupalni i antioksidativni učinci statina igraju ulogu ne samo u kardiovaskularnom, već i ostalim organskim sustavima. Preventivno djelovanje statina na razvoj demencije i kognitivnog propadanja (engl. *cognitive decline*) istražili su Olmastroni i sur. (2022.) metaanalizom koja je obuhvatila 46 observacijskih studija. Utvrđeno je da je korištenje statina povezano sa smanjenim rizikom razvoja demencija za 20 % kod razvoja Alzheimerove bolesti. Podgrupa pacijenata dobi  $\geq 75$  godina izdvaja se kao grupa s 18 % smanjenjem rizika razvoja demencije (OR=0,82, 95 % CI=0,72 - 0,93) i 27 % smanjenja rizika za razvoj Alzheimerove bolesti (OR=0,73, 95 % CI= 0,54 - 0,98).

Neuroprotektivni učinak statina baziran je na dokazima iz observacijskih studija te na malom broju kliničkih ispitivanja. U tijeku je STAREE (engl. *STAtins in Reducing Events in the Elderly*) kliničko ispitivanje koje uključuje zdrave ispitanike s preko 70 godina starosne dobi tretirane s 40 mg atorvastatina ili placebo s razvojem demencije kao primarnim ishodom (<https://clinicaltrials.gov/ct2/home> ).

*Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk* (PROSPER) dokazala je povezanost korištenja pravastatina (40 mg/dan) s povećanom incidencijom šećerne bolesti tipa 2. Sukladno tome sljedeća studija, *Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin* (JUPITER), pokazala je veću incidenciju novodijagnosticirane šećerne bolesti u populaciji tretiranoj rosuvastatinom u odnosu na placebo skupinu tijekom dvije godine. Ova i slična istraživanja nagnala su FDA na navođenje rizika od razvitka šećerne bolesti. Povećanje razina glukoze i smanjena sekrecija inzulina dokazana je na animalnim studijama. Štakori tretirani s 80 mg/kg dnevno lovastatina ili 20 mg/kg dnevno atorvastatina tijekom dva tjedna imali su povišene serumske razine glukoze i smanjenu sekreciju inzulina u usporedbi s kontrolnom skupinom životinja. Nakon izolacije mitohondrija iz gušterača štakora, analizirane su njihova vijabilnost (smanjena u odnosu na kontrolnu grupu, pokazano testom aktivnosti sukcinat-dehidrogenaze  $p < 0,01$ ) i razina ROS-ova (povećana u odnosu na kontrolnu grupu, dokazana fluorimetrijskim testom mjerenja  $H_2O_2$ ,  $p < 0,001$ ).



Dijabetogena aktivnost statina nije u potpunosti razjašnjena, ali se smatra kako je inzulinska rezistencija jedan od mogućih mehanizama (Sadighara i sur., 2017., Mollazadeh i sur., 2021., <https://www.fda.gov/>).

### 1.3. Utjecaj polimorfizama *ABCG2* gena na ishode liječenja statinima

Utjecaj varijante c.421C>A, koja rezultira smanjenom ekspresijom BCRP-a, proučavan je u svezi s farmakokinetikom, toksičnošću i efikasnošću nekih lijekova (Božina i sur., 2022.). Među najproučavanijima su oni iz skupine statina kao što su atorvastatin, pitavastatin, fluvastatin i lovastatin. Izuzev jedne studije koja jasno pokazuje klinički i statistički značajnu povezanost polimorfizma i izloženosti fluvastatina, dokazi za ostale statine ostaju nepotpuni. Studije su nekonzistentne i često rađene na malim uzorcima (Cooper-DeHoff i sur., 2022.).

Mirošević Skvrce i sur. (2013.) ispitali su povezanost polimorfizama *CYP2C9* i *ABCG2* kao rizičnih čimbenika za razvoj nuspojava u transplantiranih pacijenata koji primaju fluvastatin s ciljem prevencije razvoja kardiovaskularnih bolesti. Smanjeni očekivani životni vijek pacijenata s transplantiranim bubregom u velikom broju slučajeva uzorkovan je bolestima krvožilnog sustava. Osobe s presađenim bubregom specifična su skupina pacijenata koji su liječeni dvjema skupinama lijekova s poznatim DDI-jima; kalcineurinski inhibitori, naime, inhibiraju transportere statina, a, kao imunosupresivi, nužni su za sprječavanje odbacivanja transplantata. Stoga su takvi pacijenti izloženi većem riziku od nuspojava liječenja statinima zbog njihove veće systemske bioraspodjelivosti. Za razliku od ostalih, fluvastatin nije transportiran u hepatocite putem OATP1B1 pa njegova aktivnost ne utječe na farmakokinetiku lijeka. *ABCG2*, eksprimiran na apikalnim membranama intestinalnih epitelnih stanica i hepatocita, ograničava intestinalnu apsorpciju i pojačava hepatsku eliminaciju fluvastatina. Međutim, nositelji A/A genotipa pokazuju povećan AUC fluvastatina u odnosu na one s C/A i C/C genotipom; 97 % ( $p=0,015$ ), točnije 72 % ( $p=0,009$ ) (Keskitalo i sur. 2008.). Nađena je statistički značajna razlika u distribuciji *ABCG2* 421C>A genotipa između pacijenata s nuspojavama i kontrolama ( $\chi^2=8,559$ ;  $df=2$ ;  $p=0,014$ ; Cramer  $\phi=0,29$ ). Nositelji polimorfizma bili su češće zastupljeni u skupini ispitanika s nuspojavama (28,8 %) u odnosu na kontrolnu skupinu (7,7 %). Logističkom je regresijom dokazano da pacijenti s alelom A imaju 2,75 puta (95 % CI=1,02 - 7,40) veći omjer vjerojatnosti za razvitak nuspojava nego oni s divljim tipom alela (Mirošević Skvrce i sur., 2013.).

Merćep i sur. (2021.) su proučavali povezanost polimorfizama *ABCG2* s nuspojavama na rosuvastatin. Dokazi su u skladu sa smjernicama donešenim od strane Konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation*

*Consortium, CPIC*) (PharmGKB). Omjeri vjerojatnosti za pojavu nuspojava u nositelja *ABCG2* c.421C>A alela bili su 2,1 - 2,3 puta veći (OR=2,24, 95 % CI=1,04 - 4,83; Bayesov OR=2,35, 95 % CI=1,09 - 4,31 u logističkoj regresiji; OR=2,10, 95 % CI=0,83 - 5,31; Bayesov OR=2,17, 95 % CI=1,07 - 4,35 u multivarijatnom logističkom modelu).

Mirošević Skvrce i sur. (2015.) prvi su istražili povezanost *ABCG2* polimorfizma rs2231142 s atorvastatinom posredovanim nuspojavama, uzimajući u obzir utjecaj *CYP3A4* i *SLCO1B1* gena te ostale kliničke relevantne čimbenike rizika. Nađena je statistički značajna razlika u frekvenciji *ABCG2* 421C>A genotipova između pacijenata s nuspojavama i kontrola (Fisherov egzaktni test  $p=0,018$ ; Cramer  $\phi=0,21$ ). Povezanost je ponovno analizirana univarijantnom logističkom regresijom. Dobiveni rezultati upućuju na 2,9 puta (95 % CI=1,22 - 6,95;  $p=0,016$ ) veće omjere vjerojatnosti za razvoj s atorvastatinom povezanih neželjenih učinaka u onih s *ABCG2* 421 CA i *ABCG2* 421 AA genotipom nego u onih s *ABCG2* 421 CC genotipom. Distribucija alela također se razlikovala između populacija slučajeva i kontrola (Fisherov egzaktni test  $p=0,013$ ; Cramer  $\phi=0,15$ ). Multivarijatna logistička regresija iskorištena je za evaluaciju povezanosti ishoda liječenja s genotipom. Nakon korekcije za klinički važne čimbenike rizika, polimorfizam *ABCG2* ostaje statistički značajan prediktor nuspojava (OR=2,75; 95 % CI=1,1 - 6,87;  $p=0,03$ ). Zbunjujući čimbenici, tj. ostali čimbenici rizika uključuju interakcije s *ABCG2* inhibitorima, *SLCO1B1* 388A>G i *SLCO1B1* 521T>C varijante te šećernu bolest tipa 2. Radi se o prvoj studiji koja je povezala neželjene učinke atorvastatina s nuspojavama na skeletne mišiće i jetru. Ta su saznanja nadopunila znanja iz farmakokinetičkih studija. Keskitalo i sur. (2015.) pokazali su kako je AUC atorvastatina za 72 % veća u onih s 421AA genotipom nego u onih s 421 CC genotipom.

#### 1.4. CPIC smjernice

PharmGKB objavljuje smjernice donešene od strane Konzorcija za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium, CPIC*), Nizozemske farmakogenetičke radne skupine (engl. *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy-Pharmacogenetics Working Group, DPWG*) i drugih društava kao što su Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnost lijekova (engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety, CPNDS*), Francuska nacionalna mreža za farmakogenetiku (engl. *French National Network of Pharmacogenetics, RNPGx*) te Swissmedic. Objavljene smjernice uključuju kliničke smjernice (engl. *Clinical Guidelines Annotation*) te upozorenja uključena u upute o lijeku (engl. *Drug Label Annotations with Genotype-Based Prescribing Information*). CPIC smjernice za doziranje temelje se na

pretkliničkim i kliničkim podacima te na određenim smjernicama specifičnim za promatranu bolest koja je indikacija za primjenu lijeka. Nastale su sažimanjem i evaluacijom literaturnih navoda koji se tiču svrhovitosti farmakogenetičkog testiranja polimorfizama s ciljem optimizacije postojeće ili uvođenja prikladne terapije (PharmGKB).

2012. godine CPIC propisuje smjernice za propisivanje simvastatina s obzirom na farmakogenetičke podatke o *SLCO1B1* genotipu. Nakon nadopune izvornog dokumenta 2014., uslijedila je opsežnija nadopuna u veljači 2022. godine. Novo ruho smjernice uključivalo je pregled statina kao skupine lijekova koja uključuje atorvastatin, fluvastatin, simvastatin, lovastatin, pitavastatin te pravastatin i njihove interakcije s varijantama gena *SLCO1B1*, ali i *ABCG2*. Smjernice se odnose na odraslu i pedijatrijsku populaciju. Zaključci iz studija koji povezuju genotip *SLCO1B1* s fenotipom svrstani su po tipu eksperimentalnog modela te po snazi dokaza. Prema tome, postoje umjereno jaki dokazi koji povezuju *SLCO1B1* rs4149056 (c.521T>C) C alel s povećanim rizikom od atorvastatinom uzrokovane miopatije. Viši AUC i vršna koncentracija lijeka u plazmi ( $C_{max}$ ) atorvastatina u osoba s polimorfizmom dokazani su u publikacijama ocjenjinima kao jako snažnim. Stoga, *SLCO1B1* postaje prvi gen s obzirom na čije polimorfizme nastaju smjernice za doziranje pojedinih statina (Cooper-DeHoff i sur., 2022.).

CPIC je izdao dvije smjernice glede lijekova s obzirom na čiji su metabolizam varijante *ABCG2* prepoznate kao ključni čimbenici, a tiču se rosuvastatina i alopurinola. Za pacijente s dokazano smanjenom ekspresijom transportera, preporučena inicijalna doza rosuvastatina je  $\leq 20$  mg. Ako ova doza ne postiže željeni učinak, preporučuje se kombinirana terapija s nekim drugim hipolipemikom kao što je ezetimib ili terapija zamjenskim statinom. Smjernice su utemeljene isključivo na farmakokinetičkim podacima; AUC je dokazano 144 % veći u onih s c.421AA genotipom nego u homozigota divljeg tipa. Visoka plazmatska koncentracija rosuvastatina povezana je s boljim odgovorom na sniženje kolesterola. Smjernice ne navode eksplicitan rizik od razvoja miopatija. Međutim, za očekivati je uvjetovanost nuspojava s povećanom izloženošću ekstrahepatičkih tkiva lijeku. CPIC ističe važnost etničke pripadnosti pacijenta s obzirom na različitu distribuciju varijantnog alela u populaciji. U trenutku izdavanja smjernica, CPIC navodi nedovoljno dokaza za primjenu smjernica kod liječenja ostalim statinima. Međutim, prepoznat je utjecaj polimorfizma na farmakokinetiku atorvastatina (Cooper-DeHoff i sur., 2022.).

Specifične kombinacije *SLCO1B1* i *ABCG2* ili *CYP2C9* genotipova vjerojatno rezultiraju aditivnim efektom na farmakokinetiku statina, ali ta je tema još nedovoljno istražena za snažne kliničke dokaze (Cooper-DeHoff i sur., 2022.).

Smanjena ekspresija *ABCG2* transportera odražava se ne samo na ksenobiotike već i na spomenute endogene supstrate. Učinkovitost inhibitora ksantin oksidaze, enzima koji pretvara hipoksantin i ksantin u mokraćnu kiselinu, ovisi o ostalim transporterima i enzimima metaboličkog puta urata. Alopurinol se pretvara u oksipurinol koji djeluje tako da smanjuje plazmatsku koncentraciju mokraćne kiseline u slučaju asimptomatske hiperuricemije ili one koja se manifestira kao giht. Međutim, kada je aktivnost enzima koji su zaduženi za fiziološku ekskreciju urata smanjena, konvencionalne doze lijeka nisu dostatne za željeni terapijski učinak. Također, uočena je statistički značajna povezanost Q141K mutacije i hiperuricemije; veća učestalost A alela zabilježena je u pacijenata s hiperuricemijom, a koji su, shodno tome, korisnici lijekova za snižavanje koncentracije urata. Smjernice DPWG iz 2021. sugeriraju primjenu doze 1,25 puta, odnosno 1,4 puta veće od standardne kod bolesnika s GT, odnosno s TT genotipom kako bi se postigla optimalna inhibicija ksantin-oksidaze koja rezultira željenom redukcijom hiperuricemije (van der Pol i sur., 2022.).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog svoje učinkovitosti i široke primjene u liječenju i prevenciji kardiovaskularnih bolesti, statini su jedni od najpropisivanijih lijekova današnjice. S obzirom na rastući broj takvih dijagnoza, nuspojave povezane s kroničnom terapijom nužno je predvidjeti. Farmakogenetička testiranja polimorfnih gena dio su preventivnih strategija budućnosti. Polimorfizmi prisutni unutar nukleotidne sekvence *ABCG2* gena imaju utjecaj na aktivnost BCRP transportera te mogu pridonijeti uočenoj razlici u podnošljivosti terapije atorvastatinom. Cilj rada je ispitati postoji li povezanost između prijavljivanih nuspojava povezanih s liječenjem atorvastatinom u skupini pacijenta koji boluju od različitih kardiovaskularnih i bolesti metabolizma s polimorfizmima gena *ABCG2*. Statističkom obradom prikupljenih podataka, odredit će se distribucija varijante p.Q141K (c.421C>A, rs2231142) u skupini pacijenata koji nisu te u onih koji jesu iskusili nuspojave te će se utvrditi postoji li povezanost nuspojava s prisutnosti varijantnoga alela A. Ustanovljeni utjecaj polimorfizama na učinkovitost i sigurnost terapije statinima, konkretno atorvastatinom, ukazao bi na važnost farmakogenetičkog testiranja. Implementacija takvih metodologija u svakodnevnu kliničku praksu zahtjevan je proces koji vodi k uspješnom minimiziranju rizika nastanka nuspojava i postizanju ciljanih terapijskih ishoda.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1 Ispitanici i uzorci

Za potrebe izrade ovoga diplomskog rada analizirani su uzorci periferne krvi pacijenata liječenih u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, u razdoblju od siječnja 2021. do ožujka 2023. godine, s primarnom dijagnozom u skupini kardiovaskularnih ili bolesti metabolizma.

Istraživanje je provedeno kao retrospektivna epidemiološka studija, točnije kao istraživanje parova (engl. *case-control study*). U *case-control* studiju uključeno je 223 ispitanika, od čega 119 muškaraca i 104 žene na terapiji atorvastatinom. Bolesnicima je napravljena rutinska laboratorijska obrada i genotipizacija *ABCG2* c.421C>A, rs2231142 polimorfizma. Podaci o neželjenim učincima i dozi atorvastatina prikupljeni su iz kliničkih podataka pacijenata. Svim ispitanicima uzorkovana je venska krv iz antekubitalne jame prema Nacionalnim uputama za uzorkovanje venske krvi (Nikolac i sur., 2013.). Iz uzorka pune venske krvi, uzete na antikoagulans EDTA (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*) u epruvetu s podlatkom, izolirana je humana DNA metodom *QIAamp*<sup>®</sup>. Izolirana DNA pohranjena je pri temperaturi 2 - 8 °C. Kako bismo bili sigurni da smo spomenutim postupkom izolirali dovoljnu količinu DNA za postupak genotipizacije, izmjerena je njezina koncentracija na NanoDrop 2000 spektrofotometru. Sekundarni uzorak čini otopina izolirane DNA u TE (Tris-EDTA) puferu. Kada su svi predanalitički zahtjevi uspješno zadovoljeni i koncentracija izolirane DNA je zadovoljila zahtjeve metode, uzorci DNA pacijenata su genotipizirani metodom *TaqMan*<sup>®</sup> *DME*.

#### 3.2 Izdvajanje genomske DNA iz uzorka pune krvi metodom *QIAamp*<sup>®</sup>

##### 3.2.1. Načelo metode

*QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Kits* koriste se u kliničkoj praksi za izolaciju ukupne DNA iz svježih uzoraka briseva, tkiva, likvora, krvi i ostalih tjelesnih tekućina. Također, genomska i mitohondrijska DNA mogu biti izolirane i pročišćene iz zamrznutih uzoraka krvi, tkiva ili uzoraka krvi na filter papiru (engl. *Dried Blood Spots*, DBS). Reagensi *QIAamp*<sup>®</sup> *DNA Kits* liziraju leukocite iz uzorka, stabiliziraju nukleinske kiseline i omogućavaju selektivnu adsorpciju DNA na membranu *QIAamp*<sup>®</sup> kolone. 96-100 % etanol precipitira DNA. Puferi za ispiranje uklanjaju nečistoće i zaostale reagense iz prethodnih koraka.

Izolirana DNA pročišćena je od svih nečistoća koje bi mogle interferirati pri mjernim postupcima kao što su proteini i nukleaze. Kopročišćena RNA ne interferira s postupkom genotipizacije. Resuspendirani izdvojeni fragmenti DNA duljine do 50 kilobaza pogodni su za

osjetljive amplifikacijske metode kao što su lančana reakcija polimeraze i lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu. Uzorak izbora za farmakogenetička testiranja je puna krv s dodatkom citrata ili EDTA kao antikoagulansa. Osobine reagensa omogućuju učinkovitu izolaciju 5 - 8 µg DNA iz 200 µL pune krvi. Za veće prinose preporuča se korištenje leukocitnog sloja (engl. *buffy coat*).

### 3.2.2. Potrebna oprema

- automatska pipeta i odgovarajući sterilni nastavci volumena 10 - 100 µL (Eppendorf™ Research™ plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- automatska pipeta i odgovarajući sterilni nastavci volumena 100 -1000 µL (Eppendorf™ Research™ plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- sterilne mikroeprovete volumena 1,5 - 2,0 mL (Eppendorf Safe-Lock® Tubes, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- vrtložna mješalica (Biosanvia BS-010-203-AAG V1-plus Vortex Mixer, Riga, Latvija, Biosan Laboratories)
- mikrocentrifuga (Eppendorf 5424 Microcentrifuge, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- termostat (Eppendorf ThermoStat C, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)

### 3.2.3. Reagensi

Komplet reagenasa za izdvajanje DNA *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* – *Qiagen* (Hilden, Njemačka, Qiagen) sastoji se od kolona za odvajanje DNA (*QIAamp*® *Mini Spin Columns*), epruveta za skupljanje DNA (*Collection Tubes* (2 mL)), pufera AL, ATL, AW1, AW2 te AE, proteaze (*QIAGEN*® *Protease*), otapala za proteazu i proteinaze K. Kolone za sakupljanje i puferi stabilni su do jedne godine pri sobnoj temperaturi (15 - 25 °C) uz očuvanje svih specifikacija. Ukoliko temperatura okoliša prelazi 25 °C ili je komplet reagenasa potrebno pohraniti na dulji vremenski period, *QIAGEN*® *Protease* mora biti pohranjena pri temperaturi od 2 - 8 °C. 96 - 100 % etanol nije dio komercijalnog paketa reagensa, a potreban je za izolaciju DNA.

Priprema reagensa provodi se prema uputama proizvođača. *QIAGEN*® *Protease stock* otopina priprema se iz liofilizirane *QIAGEN*® *Protease* pipetiranjem 1,2 mL otapala, ako koristimo *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* (50) komplet, ili 5,5 mL otapala ako se koristi *QIAamp*® *DNA Blood Mini Kit* (250) komplet. Tako pripremljena otopina proteaze skladišti se pri temperaturi 2 - 8 °C (stabilna do 12 mjeseci). Puferi koji čine sastavni dio kompleta su

AW1, AW2, AL te AE pufer. Svi su stabilni do jedne godine pri temperaturi 15 - 25 °C. Puferi AW1 i AW2 u kompletu dolaze kao koncentracije koje je potrebno resuspendirati u prikladnom volumenu 96 - 100 % etanola. Prije upotrebe pufera AL potrebno ga je lagano protresti rukom. Kaotropne soli sastavni su dio pufera AL te su odgovorne za njegov mehanizam djelovanja. Centrifugiranje tijekom svih koraka odvija se pri sobnoj temperaturi (15 - 25 °C) pri 6000 g (8000 rpm).

Kako bi se izbjeglo zagađenje izolata i očuvala svojstva kolona, s istima valja rukovati uz izniman oprez. Pipetiranje uzoraka izvodi se bez dodira stijenki kolone, a nakon svakog pipetiranja mijenjaju se sterilni nastavci automatskih pipeta. Tijekom čitavog postupka izdvajanja preporučljivo je nositi sterilne rukavice i zaštitnu laboratorijsku odjeću.

### **3.2.4. Postupak izdvajanja DNA iz pune krvi ili leukocitnog sloja**

Protokol opisuje korake za izdvajanje ukupne (genomska, mitohondrijska i virusna DNA) iz uzoraka pune krvi, plazme, seruma, leukocitnog sloja, limfocita i ostalih tjelesnih tekućina koristeći mikrocentrifugu. Prije početka izolacije nužno je uravnotežiti temperature svih uzoraka i reagensa na sobnu temperaturu.

1. Pipetiranje 20 µL *QIAGEN Protease* u mikroeprovetu volumena 1,5 mL.
2. Dodavanje 200 µL pune krvi ili leukocitno sloja u mikroeprovetu. Ukoliko je dostupan volumen manji od optimalnog, preporuča se dodatak potrebnog volumena fosfatnog pufera (engl. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS).
3. Dodavanje 200 µL pufera AL uzorku i miješanje na vrtložnoj mješalici 15 sekundi. Homogena otopina preduvjet je za uspješnu lizu leukocita.
4. Inkubacija reakcijske smjese na 56 °C tijekom 10 minuta u termostatu.
5. Kako bi se uklonile eventualne kapljice s poklopca i stijenki epruvete, kratko centrifugiranje mikroeprevete.
6. Dodavanje 200 µL etanola (96 - 100 %) i miješanje vrtložnom mješalicom 15 sekundi. Kratko centrifugiranje kao u prethodnom koraku.
7. Pipetiranje reakcijske smjese na *QIAamp® Mini Spin* kolonu (smještenu u epruvetu za sakupljanje volumena 2 mL) bez dodirivanja stijenki ili poklopca. Centrifugiranje pri 6000 g (8000 rpm) tijekom 1 minute. Odbacivanje eluata u mikroeprovetu od 2 mL te premještanje kolone u novu mikroeprovetu od 2 mL.
8. Dodavanje 500 µL pufera AW1 i centrifugiranje pri 6000 g (8000 rpm) tijekom 1 minute. Premještanje kolone u novu epruvetu za sakupljanje i odbacivanje eluata.

9. Dodavanje 500  $\mu\text{L}$  pufera AW2 i centrifugiranje pri najvećoj brzini (20 000 g, odnosno 14 000 rpm) tijekom 3 minute.
10. Preporučljivo je premjestiti kolonu u novu mikroeprevetu od 2 mL te još jednom centrifugirati pri najvećoj brzini tijekom 1 minute kako bismo eliminirali sav eventualno zaostali pufer AW2.
11. Premještanje kolone u novu mikroeprevetu od 1,5 mL i odbacivanje eluata. Dodavanje 200  $\mu\text{L}$  pufera AE. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (15 - 25 °C) tijekom 1 minute, centrifugiranje pri 6000 g (8000 rpm) tijekom 1 minute.

### 3.3. Mjerenje koncentracije i čistoće izdvojene DNA

Koncentracija nukleinskih kiselina mjeri se spektrofotometrijski. Pri valnoj duljini od 260 nm, mjeri se optička gustoća otopine (engl. *optical density*, OD). Jedinična optička gustoća odgovara približno 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dvolančane DNA. Konačno, koncentraciju DNA izračunavamo formulom:

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

Čistoća DNA određena je omjerom apsorbancija pri 260 te pri 280 nm. Naime, pri 280 nm emitirat će aminokiselinski ostaci tirozina, triptofana te fenilalanina. Omjer apsorbancija pri 260 i 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) unutar raspona 1,7 - 1,9 govori u prilog čistoj dvolančanoj DNA bez zaostalih proteina koji bi taj omjer snizili.

Za potrebe mjerenja koncentracije i određivanja čistoće DNA uzoraka, korišten je NanoDrop 2000 spektrofotometar.

#### 3.3.1. Oprema

- NanoDrop 2000 spektrofotometar (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Waltham, Massachusetts, SAD, ThermoFisher Scientific)
- automatska pipeta i odgovarajući sterilni nastavci volumena 0,5 - 10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf™ Research™ plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- vrtložna mješalica (Biosanvia BS-010-203-AAG V1-plus Vortex Mixer, Riga, Latvija, Biosan Laboratories)

#### 3.3.2. Postupak mjerenja koncentracije i čistoće DNA

Prethodno izdvojena DNA resuspendirana u TE puferu promiješa se koristeći vrtložnu mješalicu. Tako homogeniziran uzorak volumena 1  $\mu\text{L}$  pipetira se na označenu poziciju na uređaju. Dobivene vrijednosti automatski se čitaju sa zaslona uređaja i evidentiraju.



### 3.4. Genotipizacija *ABCG2* c.421C>A metodom *TaqMan*<sup>®</sup> *DME*

#### 3.4.1. Lančana reakcija polimeraze

Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polimerase Chained Reaction*, PCR) temelji se na sposobnosti DNA polimeraze da sintetizira novi lanac DNA komplementaran lancu kalupu DNA. Budući da polimerazna aktivnost DNA polimerazi omogućuje dodavanje nukleotida isključivo na 3'-OH kraj, za započinjanje reakcije u *in vitro* uvjetima nužno je enzimu opskrbiti početnice (engl. *primers*). Upravo je taj zahtjev omogućio omeđivanje slijeda DNA od interesa koji se, nakon sinteze komplementarnoga lanca, može amplificirati i kvantificirati. Naizgled jednostavan princip leži u podlozi mnogih metoda molekularne dijagnostike. Reakcijska smjesa za PCR, neovisno o specifikacijama izvedbe i namjeni, mora sadržavati termostabilnu DNA polimerazu, smjesu sva četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*, dNTP), izdvojenu DNA koja čini kalup, specifične početnice (oligonukleotidne sekvence komplementarne 3' i 5' krajevima slijeda DNA od interesa), magnezijeve ione (kofaktori DNA polimeraze) i prikladni pufer. Jednom sintetiziran, ciljni slijed DNA se amplificira opetovanim ciklusima (Mullis i sur., 1987.).

Svaki ciklus PCR reakcije može se podijeliti na određene faze. Prvi korak reakcije zahtijeva razdvajanje dvolančane DNA u pojedinačne lance. Denaturacija dvolančane DNA se događa na temperaturi od oko 95 °C. Sljepljivanje prikladnih početnica (engl. *annealing*) omogućeno je nakon postizanja temperaturnih vrijednosti između 50 °C i 65 °C, a što ovisi o korištenim početnicama, točnije o broju njihovih GC parova koji određuju tzv. temperaturu mekšanja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ). Sinteza komplementarnoga lanca pomoću DNA polimeraze moguća je isključivo uz DNA polimerazu koja ne gubi svoju enzimsku aktivnost pri tako visokim temperaturama, točnije uz termoslabilnu polimerazu. Otkriće Taq-polimeraze omogućilo je sintezu DNA pri spomenutim uvjetima. Temperatura od 72 °C optimalna je za enzimsko djelovanje Taq-polimeraze i sintetiziranje komplementarnoga lanca. Nakon faze elongacije, slijedi odvajanje DNA polimeraze od novosintetiziranoga fragmenta. Novi ciklus započet je ponovnim podizanjem temperature do 95 °C. Svaki je ciklus reguliran promjenama temperature budući da se denaturacija, sljepljivanje početnica te elongacija odvijaju na specifičnim temperaturama. Prethodnim ciklusom sintetiziran slijed služi kao kalup u nadolazećem ciklusu zajedno s početnom DNA. Naposljetku, provođenjem n broja ciklusa dobivamo  $2^n$  identičnih kopija DNA (Skovgaard, 2011.).

Ukoliko je poznat slijed DNA od interesa, jedina prepreka njegovoj detaljnoj analizi jest dizajn specifičnih početnica i optimizacija PCR metode. Jednom kada je metoda uspostavljena, lančana reakcija polimeraze predstavlja, do danas, najmoćniji alat u analizi slijeda nukleinskih kiselina (Burtis i Bruns, 2022.).

### 3.4.2. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Kvantitativni PCR (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) ili lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *Real-Time PCR*) omogućuje kontinuiranu detekciju i kvantifikaciju specifičnih sekvenci nukleinskih kiselina u uzorku. Za razliku od tradicionalnoga PCR-a, koji daje samo kvalitativnu indikaciju prisutnosti ili odsutnosti ciljne sekvence, qPCR omogućuje precizno mjerenje količine DNA u uzorku. U qPCR-u, količina ciljne DNA mjeri se tijekom procesa amplifikacije u stvarnom vremenu, za razliku od detekcije nakon završetka reakcije u kvalitativnom PCR-u. To se postiže korištenjem fluorescentnih sonde ili boja koje emitiraju fluorescentni signal tijekom reakcije amplifikacije, koji se detektira i kvantificira pomoću optičkih metoda prilagođenih i inkorporiranih u mjerne instrumente (Artika i sur., 2022.; Livak i sur., 2001.).

Pri tome, razlikuju se dva principa kvantifikacije. Novonastali dvolančani fragment koji predstavlja produkt može se detektirati nakon vezanja nespecifičnih boja sa sposobnošću interkaliranja u svaku dvostruku uzvojnica DNA prisutnu u reakcijskoj smjesi, kao što je SYBR<sup>®</sup> Green boja. Specifičniji način kvantifikacije predstavlja primjena fluorescentno obilježenih sonde koje se vežu na specifični slijed DNA od interesa za vrijeme njegove amplifikacije. Automatizirani uređaji za PCR umreženi su s računalnim sustavom za interpretaciju dobivenih grafičkih prikaza podataka. Ekscitacijski i emisijski filteri te sustav lasera odgovorni su za pobuđivanje fluorescencije te detekciju emitirane svjetlosti, a integralni su dio samog PCR uređaja. Amplifikacijska krivulja grafički je prikaz ovisnosti intenziteta fluorescencije uzorka (normiran za pozadinski intenzitet) o broju ciklusa umnožavanja. U nekom trenutku, fluorescencija uzorka premašuje pozadinsku fluorescenciju, a što se naziva pragom detekcije (engl. *threshold*). Isti može biti postavljen automatski ili izmijenjen ručno. Početna koncentracija DNA kalupa određuje broj ciklusa u kojem fluorescencija dotičnoga uzorka premašuje prag detekcije. Dakle, svaki uzorak karakterizira tzv. *threshold cycle* (Ct) pri kojem je dosegnut prag detekcije. qPCR danas se koristi u analizama genske ekspresije, detekciji virusnih ili bakterijskih patogena i analizi genetičkih varijacija. Dakle, qPCR postao je neizostavan dio dijagnostičkih postupaka u kliničkoj praksi. Postoji mnogo različitih izvedbi kvantitativnoga PCR-a s obzirom na vrstu sonde i način detekcije amplifikacijskoga produkta

(Livak i sur., 2001.). Neke od vrsta qPCR-a jesu SYBR<sup>®</sup> Green qPCR, *TaqMan*<sup>®</sup> qPCR, *molecular beacons* qPCR, *scorpion probes* qPCR, *digital droplet* qPCR, *high resolution melting analysis* i *dual-labeled probes* qPCR (Artika i sur., 2022.).

### 3.4.3. *TaqMan*<sup>®</sup> lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

*TaqMan*<sup>®</sup> metoda je jedna od izvedbi kvantitativnoga PCR-a koja omogućuje apsolutnu kvantifikaciju produkta u stvarnom vremenu. Metoda je prvi puta opisana 1996. od strane istraživačke grupe unutar farmaceutske kompanije Cetus Corporation, a čiji je član bio i Kary Mullis; američki znanstvenik koji 1993. godine dobiva Nobelovu nagradu za kemiju zbog otkrića PCR-a (Heid i sur., 1996.).

Test 5'-nukleaze ili *TaqMan*<sup>®</sup> test koristi Försterov rezonantni prijenos energije (engl. *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET) za otkrivanje i kvantificiranje specifičnih sekvencija nukleinskih kiselina. Za Försterov rezonantni prijenos energije, uvriježeno je koristiti izraz fluorescentni rezonantni prijenos energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET) iako se ovaj fenomen ne opaža isključivo prilikom prijenosa energije fluorescencijom. Fluorescencijski rezonantni prijenos energije je fenomen koji se događa između dvije fluorescentne molekule koje se nalaze u neposrednoj blizini. Kada su fluorofore smještene na međusobnoj udaljenosti od nekoliko nanometara (10 - 100 Å), molekula donor može prenijeti energiju na molekulu akceptor bez emitiranja energije u obliku vidljive svjetlosti, točnije bez emisije fotona (Förster, 1948.).

U slučaju *TaqMan*<sup>®</sup> PCR-a, molekulu donora predstavlja fluorescentna *reporterska* boja (engl. *reporter*) na 5'-kraju *TaqMan*<sup>®</sup> sonde, a molekulu akceptora prigušivač (engl. *quencher*) na 3'-kraju *TaqMan*<sup>®</sup> sonde. Sonde su oligonukleotidni sljedovi dizajnirani tako da hibridiziraju sa specifičnom regijom ciljne sekvencije nukleinske kiseline. Kada sonda nije vezana na ciljni slijed, ona ostaje netaknuta, a fluorescentni signal *reporterske* boje gasi obližnja molekula prigušivača. Princip *TaqMan*<sup>®</sup> metode zasniva se na djelovanju enzima DNA-polimeraza, pa tako i *Taq*-polimeraze, koje posjeduju polimeraznu i egzonukleaznu aktivnost. Tijekom PCR reakcije, polimerazna aktivnost enzima dodaje nukleotide rastućem DNA lancu. Kako polimeraza dopijeva do mjesta gdje je sonda hibridizirana s ciljnom sekvencijom DNA, egzonukleazna aktivnost enzima cijepa sondu u području između fluorescentne boje i prigušivača. Egzonukleazna aktivnost enzima cijepa sondu počevši od njenog 5'-kraja. Stoga se naziv „5'-nukleazni test“ odnosi na djelovanje egzonukleazne aktivnosti enzima polimeraze.

Budući da fluorescentna boja i prigušivač više nisu na odgovarajućoj udaljenosti, oslobađa se fluorescentni signal koji detektira fluorometar u stvarnom vremenu ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Ono što FRET čini vrlo osjetljivom tehnikom jest opadanje učinkovitosti prijenosa energije s povećanjem udaljenosti između molekula. Efikasnost neradijativnog prijenosa energije je inverzno proporcionalna intermolekulskoj udaljenosti dipola dignutoj na šestu potenciju. Konkretno, donorska i akceptorska molekula moraju biti na odgovarajućoj udaljenosti ili, u protivnom, dolazi do emisije signala (Atkins i sur., 2017.).

#### **3.4.4. Načelo metode za genotipizaciju**

Farmakogenetičko testiranje polimorfizama jednog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) vrši se komercijalno dostupnim testom *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (TaqMan<sup>®</sup> DME)*, (Waltham, Massachusetts, SAD, Thermo Fisher Scientific). *TaqMan<sup>®</sup> DME* koristi se za detekciju polimorfizama, insercija i delecija (engl. *indels*) te za tzv. *Multi-Nucleotide Polymorphisms* (MNPs) na uzorcima koji sadrže dijelove genoma odgovorne za metabolizam ksenobiotika (engl. *Drug Metabolism Related genes*, DME). Načelo metode temelji se na specifičnosti sonde za ciljnu sekvenciju nukleinske kiseline i sposobnosti enzima *Taq*-polimeraze da cijepa sondu isključivo kada je vezana na ciljnu nukleinsku kiselinu. Količina fluorescentnoga signala generiranoga tijekom reakcije proporcionalna je količini ciljne nukleinske kiseline prisutne u uzorku, što omogućuje kvantifikaciju ciljne sekvencije u stvarnom vremenu ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Detekcija polimorfizama vrši se tzv. alelnom diskriminacijom. Alelna diskriminacija je metoda molekularne biologije kojom je omogućena diskriminacija dvaju alela istoga gena u jednoj reakciji. *TaqMan<sup>®</sup>* alelna diskriminacija koristi dvije sonde, od kojih je svaka označena različitom fluorescentnom bojom. Sonde su dizajnirane tako da prepoznaju različite alele gena od interesa. Prethodno objašnjenim principom, dolazi do odvajanja fluorofora od prigušivača te generiranja fluorescencije. Fluorescentne boje koje koristi *TaqMan<sup>®</sup> DME*, FAM<sup>™</sup> te VIC<sup>®</sup>, imaju različite ekscitacijske i emisijske spektre što omogućava njihovu diskriminaciju prilikom detekcije fluorescentnoga signala. Sonda specifična za divlji tip alela (*wt*) je označena s FAM<sup>™</sup> bojom, a sonda specifična za određenu alelnu varijantu (*mut*) označena je VIC<sup>®</sup> bojom. Analiza uzoraka homozigota za divlji ili mutirani tip alela rezultirat će detekcijom samo jedne boje; FAM<sup>™</sup> ili VIC<sup>®</sup>, tj. pripadajućega fluorescentnog signala. U slučaju da je u uzorku prisutan heterozigot s jednim divljim, a jednim mutiranim alelom, uređaj bilježi fluorescentni signal obje boje ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### 3.4.5. Potrebna oprema

- Uređaj PCR u stvarnom vremenu (7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 - 10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf <sup>TM</sup> Research <sup>TM</sup> plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10 - 100  $\mu\text{L}$  (Eppendorf <sup>TM</sup> Research <sup>TM</sup> plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 100 - 1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf <sup>TM</sup> Research <sup>TM</sup> plus, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5 - 2,0 mL (Eppendorf Safe-Lock<sup>®</sup> Tubes, Hamburg, Njemačka, Eppendorf AG)
- „strip“ mikroeprovete s poklopcima (MicroAmp<sup>TM</sup> Optical 8-Tube Strip, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)
- stalak za „strip“ mikroeprovete (MicroAmp<sup>TM</sup> Fast Optical 96-Well GPLE Reaction Plates, Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD)
- vrtložna mješalica (Biosanvia BS-010-203-AAG V1-plus Vortex Mixer, Riga, Latvija, Biosan Laboratories)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (MiniSpin<sup>®</sup>/ MiniSpin<sup>®</sup> plus - Mini Centrifuge, Hamburg, Njemačka, Eppendorf)
- centrifuga za mikrotitarske pločice (Eppendorf Centrifuge 5804/5804 R - Benchtop Centrifuge, Hamburg, Njemačka, Eppendorf)

### 3.4.6. Reagensi

Svi reagensi koji su dio *TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays* ne smiju se izlagati direktnoj sunčevoj svjetlosti. Čuvaju se pri temperaturi od 2 - 8 °C ili 15 - 25 °C. Priprava alikvota preferira se nad ponavljanim odmrzavanjem i zamrzavanjem (engl. *freeze-thaw cycles*).

*TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assay* sastoji se od *TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix* i *TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay ABCG2 421C>A* (ID: C\_\_15854163\_70) reagensa. Negativna kontrola je voda, tzv. *No Template Control* (NTC). Korištene su tri pozitivne kontrole; pozitivna kontrola homozigota divljeg tipa (*wt*) te pozitivne kontrole heterozigota i homozigota za *mut* alel.

*TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* sadrži:

- mjesno specifične početnice, „*forward*“ i „*reverse*“, za amplifikaciju polimorfne sekvence od interesa
- dvije *TaqMan*<sup>®</sup> *MGB* sonde:
  - sonda označena s VIC<sup>®</sup> bojom koja detektira *mut* alel
  - sonda označena s FAM<sup>™</sup> bojom koja detektira *wt* alel

Svaka *TaqMan*<sup>®</sup> *MGB* sonda sadrži:

- fluorescentnu reportersku boju na 5'-kraju (VIC<sup>®</sup> boja je povezana s 5'-krajem sonde za *mut* alel, a FAM<sup>™</sup> boja s 5'-krajem sonde za *wt* alel,
- *minor groove binder* (MGB) koji služi povećanju temperature mekšanja (*T<sub>m</sub>*) za danu duljinu sonde, a što omogućuje primjenu kraćih sondi. Stoga, sparena i nesparena sonda imaju veću razliku u temperaturama mekšanja zbog čega je izvedba metode robusnija,
- nefluorescentni prigušivač (engl. *quencher*).

Tablica 1. Prikaz odgovarajućeg reagensa za dotični polimorfizam gena

Gen-alel	db SNP* (rs#)	promijena u aminokiselinskom slijedu	promijena u nukleotidnom slijedu	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>DME</i> Assay ID
<i>ABCG2</i> c.421C>A	rs2231142	p.Gln141Lys	c.421C>A	C__15854163_70

\*Reference SNP (rs#) - broj referentnog SNP-a dodijeljen od strane Single Nucleotide Polymorphism Database - National Center for Biotechnology Information (NCBI)

Tablica 2. Sastojci reakcijske smjese za lančanu reakciju polimeraze

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Universal PCR Master Mix</i>	12, 5	1x
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>DME Assay Mix ABCG2 421C&gt;A</i> (ID: C__15854163_70), 20x	1, 25	1x
Razrijeđenje DNA u TE puferu	11, 25	1-20 ng
Ukupni volumen reakcijske smjese	25	

### 3.4.7. Priprema reakcijske smjese

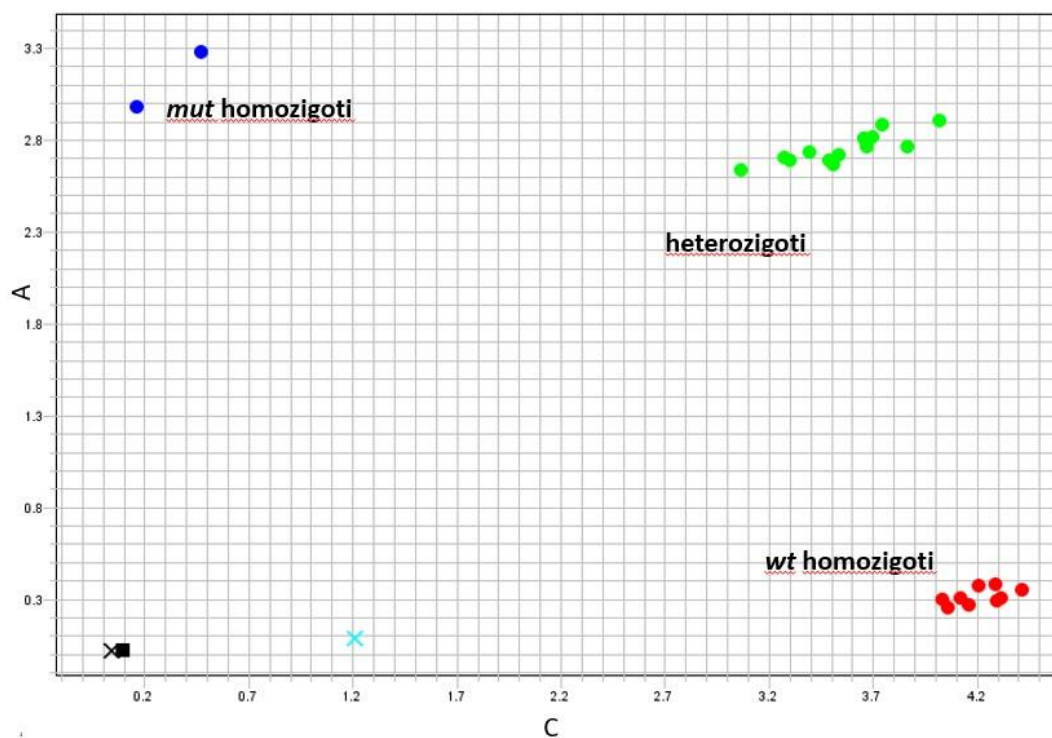
Pripremljena su razrjeđenja DNA s količinom DNA od 1 - 20 ng. Metoda je optimizirana za genomsku DNA u količini od 3 - 20 ng DNA. Reagensi su otopljeni na sobnoj temperaturi nakon pohrane na temperaturi 2 - 8 °C te lagano promiješani na vrtložnoj mješalici. Kako bi se sadržaj mikroepreveta s reagensima spustio na dno, centrifugirane su 3 - 5 s pri 3000 rpm. Reakcijska smjesa pripravljena je pipetiranjem 12,5 µL TaqMan® Universal PCR Master Mix i 1,25 µL TaqMan® DME Assay *ABCG2* 421C>A nakon čega je lagano promiješana pokretom ruke i centrifugirana 3 - 5 s pri 3000 rpm. Tako pomiješani reagensi otpipetirani su u „strip“ mikroeprevete na prikladnim stalcima koje čine mikrotitarsku pločicu od ukupno 96 jažica. Dakle, 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems omogućuje simultanu analizu 96 uzoraka na jednoj mikrotitarskoj pločici.

Potom je u svaku mikroeprevetu dodano po jedno razrijeđenje genomske DNA, tj. uzorak od interesa, kontrolni uzorci (*wt*, *het* i *mut*) te negativna kontrola. Mikrotitarska pločica sa „strip“ mikroeprevetama prekrivena je pokrovnom folijom te je centrifugirana u centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s pri 3000 rpm.

Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *ABCG2* c.421C>A *TaqMan*® *DME* metodom

Naziv koraka	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Pre-PCR read	60 °C	60 sekundi	
Inicijacija	50 °C	2 minuta	
	95 °C	10 minuta	
Denaturacija	95 °C	15 sekundi	x50
Amplifikacija	60 °C	90 sekundi	
Post-PCR read	60 °C	60 sekundi	

Naposlijetku, pločice s uzorcima stavljene su u uređaj za PCR. Reakcija je pokrenuta u računalnom programu *7500 Fast Software v.2.3*. Uvjeti PCR reakcije, koja uključuje 50 amplifikacijskih ciklusa, prikazani su u Tablici 3. Po završetku reakcije, rezultati se očitavaju i interpretiraju iz grafičkih prikaza.



Slika 5. Analiza alelna diskriminacije TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu (crvene točke - *wt* homozigoti; zelene točke – heterozigoti; plave točke – *mut* homozigoti)

### 3.5. Statistička analiza podataka

Statistička obrada prikupljenih podataka nakon alelna diskriminacije provedena je uporabom komercijalno dostupnih *software* programa Microsoft Excel 2019 i Social Science Statistics 2018. Svi statistički testovi su dvostrani, a razina statističke signifikantnosti iznosi  $p < 0,05$ . Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže odbačeno je hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom.

Kolmogorov-Smirnovim testom utvrđeno je da kontinuirana varijabla dobi ispitanika u ukupnoj populaciji te u obje skupine prati normalnu distribuciju, ali varijabla primjenjene doze lijeka odstupa od iste kako u ukupnoj tako i u skupinama slučajeva i kontrola. Kao mjera centralne tendencije korišteni su medijan i interkvartilni raspon. Učestalost genotipova, alela i nuspojave utvrđena je direktnim prebrojavanjem. Za usporedbu dvaju nezavisnih kategorijskih varijabli (genotip vs nuspojave lijeka) korišten je Fisherov egzaktni test.

## 4. REZULTATI

Ovo istraživanje slučajeva i kontrola (engl. *case-control study*) provedeno je na KBC Zagreb tijekom razdoblja od siječnja 2021. do ožujka 2023. godine u skladu s Helsinškom



deklaracijom te je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta i KBC-a Zagreb. Odrasli pacijenti s primarnom dijagnozom u skupini kardiovaskularnih ili bolesti metabolizma regrutirani su u studiju. Ispitivana populacija (N=223) obuhvaća 45 pacijenata s prijavljenom nuspojavom na atorvastatin te 178 pacijenata koji su primali atorvastatin, a nisu iskusili neželjene događaje. Od ukupno 223 ispitanika, njih 104 čine muškarci te 119 žene. Medijan dobi ispitanika iznosi 64 godine, a interkvartilni raspon 71 - 54. 45 pacijenata koji su doživjeli nuspojave povezane s atorvastatinom, znani kao „slučajevi“ (engl. *cases*) i 178 pacijenata bez nuspojava, „kontrole“ (engl. *controls*) uključeni su u ispitivanje. Demografske karakteristike i doza primjenjenog lijeka regrutiranih ispitanika prikazani su u tablici 4. Medijan (interkvartilni raspon) dobi bio je 61 (67 - 51) i 64 (73 - 56) u skupinama pacijenata s i bez neželjenih učinaka, redom. Ograničavajući čimbenik jesu određena odstupanja u raspodjeli prema dobi i spolu između kontrola i slučajeva. Također, potencijalna koterapija kalcineurinskim inhibitorima, ujedno i inhibitorima BCRP, utječe na distribucija lijeka. Spomenute varijable jesu tzv. „zbunjujuće“ varijable (engl. *confounding factors*), točnije varijable povezane s rizičnim čimbenikom, ali neovisno o tom čimbeniku predstavljaju rizik razvoja nuspojava. Optimalno je da se skupine međusobno podudaraju u svim značajkama osim ispitivane varijable kako bi se izbjeglo odstupanje kod uzorkovanja (engl. *sampling bias*). Svi regrutirani ispitanici su Hrvati, što je bitno imati na umu prilikom interpretacije rezultata s obzirom na spomenutu razliku u učestalosti polimorfizama između etničkih skupina. Podaci o dobi, spolu, uporabi i dozi atorvastatina su prikupljeni iz Kliničke dokumentacije.

Egzaktna etiopatogeneza miotoksičnosti i hepatotoksičnosti nije rasvijetljena, ali spomenuti učinci posredovani su povišenom bioraspoloživošću lijeka uslijed izmijenjene farmakokinetike.

Manifestacije nuspojava klasificirane su prema sljedećim kriterijima. Mijalgija je definirana kao bol u mišićima, neovisno o razinama CK-a ili drugim dokazima mišićne degradacije. Povećanje razine CK-a je povećanje koncentracije CK-a iznad gornje granice referentnoga intervala, a koje se može očitovati i neovisno o mijalgiji, ali i uz nju. Miopatija je definirana kao povećanje CK-a veće od četiri puta gornje granice referentnoga intervala. Rabdomioliza je teška miopatija s razinama CK-a koje su više od deset puta gornje granice referentnoga intervala, a prezentira se razgradnjom skeletnih mišića i posljedičnim oslobađanjem slobodnoga mioglobina u cirkulaciju što može dovesti do bubrežnoga zatajenja. Nuspojave su svrstane kao hepatotoksičnost u slučaju asimptomatskog povišenja aktivnosti jetrenih aminotransferaza (AST i ALT) iznad gornje granice referentnoga intervala, pojave

jetrene lezije ili jetrenog zatajenja. Većina nuspojava bile su miotoksičnost (N=25, 55,55 %), a od čega je 23 (92 %) pacijenata iskusilo mijalgiju s ili bez povišenja CK-a. Samo dva (8 %) ispitanika iskusila su miopatiju. Nitko od pacijenata nije razvio najopasniju od svih spomenutih, rabdomiolizu. Hepatotoksičnost iskusilo je ukupno osam (17,78 %) pacijenta. Neželjeni učinci svrstani pod „ostale neželjene učinke“, njih 12 (26,67 %), jesu kožna stanja (osip, svrbež), alopecija te subjektivna zaboravljivost.

Tablica 4. Demografske karakteristike i primjenjivana doza atorvastatina u ispitanika podijeljenih na slučajeve i kontrole; numeričke varijable prikazane kao medijan i interkvartilni raspon vrijednosti, kategorijske varijable kao apsolutne frekvencije (M-muškarci, Ž-žene).

	slučajevi N=45	kontrole N=178	ispitivana populacija N=223
dob	61 (67 - 51)	64 (73 - 56)	64 (71 - 54)
spol	14 (M)	105 (M)	119 (M)
	31 (Ž)	73 (Ž)	104 (Ž)
doza atorvastatina	40 (20 - 40) mg/dan	40 (20 - 80) mg/dan	40 (20 - 80) mg/dan

Tablica 5. Raspodjela neželjenih učinaka s obzirom na genotip *ABCG2* prikazana kao apsolutna frekvencija (N) i relativna frekvencija (%).

neželjeni učinci	genotip 421C/A ili	genotip	ukupno N (%)
	genotip 421A/A	421C/C	
miotoksičnost	10	15	25 (55,55 %)
hepatotoksičnost	3	5	8 (17,78 %)
ostali neželjeni učinci	2	10	12 (26,67 %)
ukupno (N)	15	30	45

Tablica 6. Distribucija genotipova *ABCG2* c.421 C>A između slučajeva i kontrola prikazana kao apsolutna frekvencija (N) i relativna frekvencija (%).

	genotip 421C/C (homozigot <i>wt</i> alela)	genotip 421C/A (heterozigot)	genotip 421A/A (homozigot varijantnih ( <i>mut</i> ) alela)	ukupan broj
broj ispitanika, N (%)	175 (78,48 %)	47 (21,08 %)	1 (0,44 %)	223
slučajevi, N (%)	30 (66,67 %)	15 (33,33 %)	0	45
kontrole, N (%)	145 (81,46 %)	32 (17,98 %)	1 (0,56 %)	178

Tablica 7. Distribucija varijantnog alela *ABCG2* c.421C>A u ispitivanoj populaciji te između slučajeva i kontrola prikazana kao apsolutna frekvencija (N) i relativna frekvencija (%).

	genotip 421C/C (homozigot <i>wt</i> alela)	genotip 421C/A (heterozigot)	genotip 421A/A (homozigot varijantnih ( <i>mut</i> ) alela)	slučajevi N=45, broj alela (%)	kontrole N=178, broj alela (%)	ukupno alela
ukupno genotipova	175	47	1			
alel C	350	47	/	75 (83,33 %)	322 (90,45 %)	397 (89,01 %)
alel A	/	47	2	15 (16,67 %)	34 (9,55 %)	49 (10,99 %)
ukupno alela						446 (100 %)

Nađena je statistički značajna razlika u učestalosti *ABCG2* c.421C>A genotipa između pacijenata s prijavljenim nuspojavama i kontrolnom skupinom ispitanika. Fisherovim egzaktnim testom utvrđena je povezanost odabrane populacije pacijenata koji su doživjeli nuspojave s *ABCG2* c.421C> A genotipom ( $p=0,0416$ ).

## 5. RASPRAVA

Rezultati upućuju na razliku u distribuciji genotipova i alela između pacijenata sa i bez nuspojave. Polimorfni A alel i sam heterozigotni genotip alela A češći su u skupini pacijenata koji su iskusili nuspojave, što prikazuju i tablični podaci. Diskrepancija mutacijskoga statusa gena kod slučajeva i kontrola evaluirana je Fisherovim egzaktnim testom s dobivenom p vrijednošću od 0,0416. Dobiveni podaci slažu se s podacima iz recentne znanstvene literature koja dovodi u korelaciju varijabilnu kinetiku atorvastatina u nositelja varijantnoga alela A, što vodi do povećane incidencije miotoksičnih i hepatotoksičnih događaja. Spomenuto je istraživano i na hrvatskoj populaciji. Mirošević Skvrce i sur. (2015.) pokazali su snažnu asocijaciju o dozi-ovisnih nuspojava atorvastatinom s rizikom od nuspojave, kako je ranije objašnjeno.

Neupitna je važnost funkcionalne aktivnosti transportera kao što su OATP1B1 i BCRP u interindividualnim razlikama farmakokinetike statina. Spomenuto se odražava na AUC i  $C_{max}$ , a što govori u prilog većoj sistemske bioraspoloživosti lijeka, a time i većoj izloženosti lijeku što vodi do nuspojave pri efektivnoj terapijskoj dozi za snižavanje koncentracije LDL kolesterola. Kardiovaskularne su bolesti vodeći uzrok mortaliteta i morbiditeta te indiciranoj terapiji valja prisupati s oprezom. Kako bi se nuspojave u ovoj kroničnoj terapiji izbjegle, nužno je identificirati područja visokoga rizika za razvoj nuspojave s obzirom na nositeljstvo varijantnoga alela te ondje preispitati uvođenje farmakogenetičkoga testiranja u kliničku praksu. Varijantni alel *ABCG2* 421A je najučestaliji u Azijata (29 %), a najrjeđi u stanovnika Afrike (1 %). Dobiveni podaci o učestalosti alela A u ispitivanom uzorku hrvatskoga stanovništva (10,99 %) te o učestalosti genotipa 421C/A (21,08 %) i genotipa 421A/A (0,44 %), očekivani su s obzirom na prethodne rezultate provedene na ispitanicima hrvatskoga porijekla (Božina i sur., 2022.; Karačić i sur., 2021.). Također, dokazane učestalosti u hrvatskoj populaciji slažu se s učestalostima u ostalim europskim populacijama.

Započevši s prvim sekvenciranjem ljudskoga genoma, streloviti razvoj tehnologija analize nukleinskih kiselina omogućio je otkrivanje prirode genetske raznolikosti, kako između populacija tako i između pojedinaca. Ovakav uvid u nukleotidnu sekvenciju čovjekova genoma

utro je put ka otkrivanju mnogih varijanti gena povezanih s patogeneom raznih bolesti ili poremećenim metabolizmom ksenobiotika. Iako je klinička važnost farmakogena neupitna, njihova se uporaba u farmakološkom liječenju trenutno ograničava zbog problema prilikom identifikacije farmakogenetskih biljega i preprekama tijekom procesa implementacije. U fazi identifikacije, vrijedan farmakogenetički biljeg trebao bi imati značajnu fenotipsku povezanost koja se može potvrditi višestrukim neovisnim studijama. Međutim, trenutačna literatura raspolaze velikim brojem prijavljenih radova o biljezima podržanima samo slabim dokazima koji nikada nisu uspješno replicirani. Takve nepotpune informacije umanjuju stvarnu vrijednost ovih biljega i limitiraju razumijevanje važnosti njihove valjane primjene. Prema smjernicama CPIC-a, polimorfizmi membranskih transportera prepoznati su kao klinički važne varijante s utjecajima na ishode liječenja statina, kako je prethodno opisano. Shodno tome, preporučuje se niža primjenjena doza rosuvastatina u onih s polimorfizmima *ABCG2* i *SLCO1B1*. Također, FDA je uvrstila u tablicu farmakogenetičkih asocijacija (engl. *Table of Pharmacogenetic Associations*) polimorfizam *SLCO1B1* 521T > C kao potencijalan uzrok povišene plazmatske koncentracije atorvastatina i rosuvastatina ([www.fda.com](http://www.fda.com)). Međutim, u FDA-evom pandanu sažetka opisa svojstava lijeka, *Prescribing Information*, nema naznačene preporuke o testiranju mutacijskog statusa *SLCO1B1* gena prilikom uvođenja terapije atorvastatinom ili rosuvastatinom ([www.fda.com](http://www.fda.com)). HALMED pak navodi preporučene niže doze rosuvastatina u onih pacijenata za koje se zna da su nositelji polimorfizama *SLCO1B1* c.521TT ili *ABCG2* c.421CC (HALMED, 2021.). Atorvastatin ne sadrži smjernice koje povezuju *ABCG2* polimorfizam s većom izloženošću lijeku u svojem sažetku opisa svojstava lijeka, dok za polimorfizam *SLCO1B1* sadrži.

Evidentno je kako veća sistemska izloženost atorvastatinu nosi potencijal rizika za razvoj neželjenih učinaka. Veći rizik razvoja nuspojava, posredovan smanjenom aktivnošću transportnoga proteina, povezivan je s primjenom raznih predstavnika skupine, ali i s lijekovima za ostale indikacije. Statini su uvelike proučavani u svezi s polimorfizmom *ABCG2* gena i varijabilne dispozicije lijeka koja vodi do nastanka nuspojava. U transplantiranih pacijenata često je korištena kombinacija fluvastatina i imunosupresiva ciklosporina ili takrolimusa, a pokazano je kako skupina onih s polimorfizmom *ABCG2* c.421C>A ima 2,75 puta (95 % CI=1,02 - 7,40) veći omjer vjerojatnosti za razvoj nuspojava (Mirošević Skvrce i sur., 2013.). Prilikom primjene rosuvastatina uočen je 2,1 - 2,3 puta viši omjer vjerojatnosti u nositelja *ABCG2* c.421C>A polimorfizma (OR=2,24, 95 % CI=1,04 - 4,83; Bayesov OR=2,35, 95 % CI= 1,09 - 4,31) (Merčep i sur., 2021.). Naposljetku, utvrđeno je kako oni s *ABCG2* 421

CA ili *ABCG2* 421 AA genotipom imaju 2,9 puta (95 % CI=1,22 - 6,95;  $p=0,016$ ) veće omjere vjerojatnosti za razvoj neželjenih učinaka prilikom liječenja atorvastatinom od onih s *ABCG2* 421 CC genotipom. Razlika u distribuciji *ABCG2* 421C>A genotipova između pacijenata s nuspojavama i kontrola potvrđena je Fisherovim egzaktnim testom  $p=0,018$ ; Cramer  $\phi=0,21$  (Mirošević Skvrce i sur., 2015.). U skladu s time, rezultati dobiveni u ovome radu na većoj skupini ispitanika potkrijepljuju dosadašnje spoznanje i elaboriraju važnost preventivnoga testiranja prilikom liječenja atorvastatinom.

Rezultate ove, ali i ostalih observacijskih studija, valja interpretirati s oprezom, točnije u skladu s njihovim ograničenjima. Ispitanici okarakterizirani kao „slučajevi“ te kao „kontrolne“ regrutirani su nasumično nakon ordiniranja farmakogenetičkih testova. Postoji određena opasnost od pogrešne klasifikacije slučajeva, odnosno kontrola. Ispitanici koji su u trenutku testiranja bili kontrolne u nekom trenutku svog liječenja mogu razviti nuspojave i postati slučajem. Ova mogućnost pogrešnog uzorkovanja minimizirana je regrutiranjem kontrola koje su tretirane lijekom kroz podmakli period, točnije dulje vrijeme no što su to oni označeni kao slučajevi. Sukladno tome, rizik od pogrešnoga kategoriziranja sveden je na minimum. Nadalje, neki pripadnici „kontrolne“ skupine potencijalno su iskusili blage nuspojave koje nisu prijavili liječniku, a koje se nisu reflektirale na ordinirane laboratorijske nalaze. Razmjer ovoga ograničenja nemoguće je procijeniti. Prethodno je elaborirano kako je većina nuspojava blaga i možebitno zamijenjena za neka druga fiziološka stanja ili pripisana drugim okolnostima. Farmakokinetički podaci koji bi korelirali s genotipizacijom farmakogena nisu dostupni. Stvarna AUC i  $C_{max}$ , ali i sama adherencija pacijenata nisu poznati. Na bioraspoloživost lijeka utječu i mnogi drugi čimbenici kojima se pripisuje uzročna veza s nuspojavama. Nepoznati čimbenici rizika su konkomitantna terapija, komorbiditeti i čimbenici rizika za razvoj nuspojava (hepatička ili bubrežna disfunkcija, perioperativna razdoblja, multisistemske bolesti, malenost tijela i neliječena hipotireoza) te polimorfizmi ostalih gena uključenih u metabolizam primjenjenih lijekova. Dakle, nužno je utvrditi asocijaciju genotipa s ishodom liječenja uz ujednačavanje po „zbunjujućim čimbenicima“ multivarijantnom logističkom regresijom ili drugim, prikladnim, statističkim modelima za predviđanje vjerojatnosti.

Varijantni alel *ABCG2* 421A nije zanimljiv samo na području farmakokinetike statina. Njegov se utjecaj povezuje s većom izloženošću mnogim lijekovima supstratima, s interakcijskim potencijalom mnogih lijekova te s poligeniskim rizikom zajedno s ostalim farmakogenima iz skupine transportera i pripadnika CYP450 obitelji. Poligeniski rizik podrazumijeva asocijaciju više polimorfizama jedne baze uzduž cijelog genoma s fenotipom

od interesa, primjerice određenom patologijom ili varijabilnom dispozicijom endobiotika ili ksenobiota. U hrvatskoj je populaciji istraživani utjecaj *ABCG2* 421C>A polimorfizma zajedno s fenotipom *CYP2D6* na plazmatsku koncentraciju risperidona. Pokazana je redukcija razine od 31 - 37 % u osoba koje su identificirane kao *CYP2D6* normalni ili ultrabrzi metabolizatori te koji su nositelji *ABCG2* 421C>A varijantnoga alela (Ganoci i sur., 2020.). Loscocco i sur. (2021.) osmislili su prediktivni model koji uključuje četiri genotipa kako bi omogućili procjenu kombiniranoga učinka SNP-ova na postizanje ili gubitak molekularnoga odgovora (engl. *Molecular Response*, MR) kod liječenja kroničnih mijeloidnih leukemija tirozin kinaznim inhibitorom. Njihovo je istraživanje obuhvatilo sedam polimorfizama jednog nukleotida u četiri gena ABC prijenosnika: *ABCC1* rs212090 (5463T>A), *ABCC2* rs3740066 (3972C>T), *ABCC2* rs4148386 G>A, *ABCC2* rs1885301 (1549G>A), *ABCG2* rs2231137 (34G>A), *ABCG2* rs2231142 (G>C), *ABCB1* rs1045642 (3435C>T), s ciljem određivanja njihova utjecaja na postizanje i/ili gubitak molekularnoga odgovora kod 90 pacijenata koji su liječeni nilotinibom. Taj se model pokazao prognostički značajnim za MR3 i MR4 (p=0,005 i p=0,008, redom). Naposljetku, utvrđeno je da je genotip *ABCG2* rs2231142 GG povezan sa smanjenim rizikom gubitka MR3.

Međutim, translacija ovih i drugih saznanja u području genetike do laboratorijskih pretraga s ciljem prevencije nuspojava i poboljšanja učinkovitosti nije u potpunosti zaživjela. Nađene su velike etnogeografske razlike u prevalenciji rizičnih alela što se odražava na znatne razlike u broju pacijenata kojima će preventivno testiranje zaista biti od kliničke koristi. Također, razlika u incidenciji kardiovaskularnih dijagnoza s obzirom na promatrano područje igra ulogu u učestalosti propisivanja lijekova s takvim indikacijama. Nadalje, problematična je i interpretacija međusobne interakcije rijetkih varijanti, utjecaj epigenetičkih čimbenika te utjecaj okoliša budući da se isti ne mogu objasniti konvencionalnim statističkim modelima. Konkretno, prilikom politerapije, postoji opasnost od značajne interakcije lijekova supstrata na razini enzima i prijenosnika njihovih razgradnih puteva. Literatura oskudijeva podacima o socioekonomskoj koristi donošenja kliničkih odluka o propisivanju lijekova s obzirom na genotip pacijenta. Takve analize daju uporište za uvođenje precizne medicine korak uz tradicionalne pristupe. Valja napomenuti kako su Sjedinjene Američke Države i zapadna Europa te istočna Azija područja najčešće zahvaćena takvim istraživanjima, dok nemali ostatak svijeta vapi za pozornošću. Samoodrživost, točnije isplativost takvih testiranja izravno odlučuje o izvedivosti provođenja preventivnih testova. Slučajevi koji su dokazano isplativi imaju šanse za povrat troškova, a isplativost ovisi o više faktora, poput učestalosti rizičnih alela,

alternativnih strategija liječenja, troškovima samih lijekova i genotipizacije te troškovima liječenja potencijalnih nuspojava. Stoga, uvođenje testiranja na određene farmakogene uvijek će ovisi i o etničkoj pripadnosti liječene populacije te incidenciji bolesti za koju su određeni lijekovi indicirani. Dvosmjerno povezivanje temeljnih istraživanja i samih pacijenata, točnije kliničke prakse (engl. *from bench to bedside*), zahtijeva mukotrpan rad pojedinaca uključenih u razvoj lijekova i, neizostavno, onih koji se brinu za pacijente. Vrijedi istaknuti kako su prijeko potrebne kontrolirane kohortne studije kako bi se okarakterizirala učinkovitost i sigurnost atorvastatina u kontroliranim uvjetima, za razliku od podataka prikupljenih retrospektivnom analizom. Jedna od takvih je spomenuto STAREE kliničko ispitivanje s planiranim završetkom 2023. godine.

Smjernice temeljena na istraživanjima farmakogena još uvijek su novina u mnogim područjima medicine. Iskoristiti sve mogućnosti spoznanja koje donose sve više i više studija, ostaje jednako izazovno kao i samo provođenje studija. Poznato je kako bi trebalo stremiti personaliziranom pristupu s krajnjim ciljem povoljnijega ishoda po pacijenta. Jedan od mogućih pristupa je preemptivno testiranje prije započinjanja terapije. Problem se nameće sam po sebi; razgradni putevi lijekova nikada ne ovise samo o jednom proteinu na njegovu putu. Distribucija i djelovanje lijeka uvijek je određeno isprepletenim čimbenicima na koje dodatno utječu i okolišni uvjeti. S druge strane, lijek nikada nije jedini supstrat spomenutim proteinima. Politerapija povlači za sobom lijek-lijek-gen interakcije pa se nameće izazov još težega razumijevanja istih. Čak i u slučajevima kada je poznato više gena od interesa, provođenje većeg broja testova nosi sa sobom tehničke i ekonomske otegotne okolnosti. Iste su prepreke alternativnoga pristupa genotipiziranja višestrukih lokusa relevantnih za odgovore na velik broj lijekova te odabir terapije na osnov identificiranih genotipova.

Pristup farmakogenetičkom testiranju trebali bi imati svi bez iznimke. Nažalost, pitanje je kad će čovjek u bijeloj kuti zaista moći napraviti sve da svi imaju korist od medicine utemeljene na dokazima. Ako pojedinac biva tretiran svim dostupnim alatima personalizirane i/ili preventivne medicine, svi ostali ne smiju trpjeti posljedice drugačijih pristupa. Dokazi koji povezuju varijantu s promijenjenim odgovorom na lijek moraju biti pouzdani, stizati iz prospektivnih kontroliranih randomiziranih studija. Ishod te iste varijabilnosti mora biti klinički značajan. Farmakogenetički nalaz treba biti prekretnica u terapijskom pristupu; isti mora služiti kao raskrižje nakon kojega se pacijentu može propisati adekvatna terapija.



Imajući na umu ishode ove studije, ali i njezina ograničenja, evidentno je kako se utjecaj polimorfizma *ABCG2*, ali i drugih membranskih transportera, na miotoksičnost i hepatotoksičnost, uz ostale nuspojave, mora ostati predmetom istraživanja nedvosmislenih, reproducibilnih podataka koji su statistički značajni, ali, najvažnije, od presudne važnosti za dugoročne ishode po pacijente koji se liječe od kardiovaskularnih bolesti ili primaju statine u svrhu primarne ili sekundarne prevencije istih.

## 6. ZAKLJUČCI

Od njegova otkrića do danas, *ABCG2* ne prestaje biti zanimljiv s gledišta metabolizma ksenobiotika. Bilo da se radi o metaboličkim putevima biotransformacije lijekova koji su promijenjeni uslijed smanjene ekspresije transportera ili o kemorezistenciji malignih stanica na čijim je membrana prekomjerno eksprimiran, *ABCG2* zasigurno obećava kao sukus daljnjih istraživanja u području kardiovaskularnih bolesti i onkologije.

Predstavljeni rezultati naglašavaju važnost farmakogenetičkoga testiranja polimorfizama *ABCG2* gena. Statistički značajna asocijacija neželjenih učinaka atorvastatina s heterozigotnim genotipom *ABCG2* gena utvrđena je Fisherovim egzaktnim testom ( $p=0,0416$ ). Također, pokazana je i učestalost genotipova *ABCG2* (421 C/C 78, 48 %, 421C/A 21,08 % i 421A/A 0,44 %) te alelna frekvencija varijantnog alela A (10,99 %) u skladu s ostalim studijama na hrvatskom stanovništvu. Sve navedeno ima važne implikacije u propisivanju ovoga lijeka i minimiziranju sa statinima povezanih nuspojava uslijed kronične terapije u kardiovaskularnih bolesnika. Kako bi se rezultati potvrdili i korisnost ovoga farmakogenetičkog testiranja etablirala, potrebne su studije na većem broju ispitanika te statistička obrada podataka koja uzima u obzir stratifikaciju ispitanika s obzirom na zbunjujuće čimbenike.

Dublje razumijevanje genetskoga doprinosa varijabilne učinkovitosti primjenjene terapije nosi sa sobom određena pitanja. Sekvenciranje gena preusmjerilo je pogled suvremene medicine s ekstrinzičnoga na ono što leži u samom čovjeku. Nakon iskorištavanja potencijala kemijskih i bioloških terapija i terapijskih meta, preostaje „neizlječiva“ barijera pacijenta samoga. Ljudski nas organizam ne prestaje iznenađivati preprekama koje postavlja gotovo svakoj aktivnoj tvari. Ono što mi jesmo, ono što je zapisano u receptu koji nas čini onime što jesmo, izvor je mnogih boljki, ali i vrelo mnogih rješenja. Plaši li nas to što jednostavnim termostatom možemo otkriti kako svaka naša stanica nosi sa sobom predskazujuće informacije? Rezultat genetičkoga testiranja jest genetička informacija koja

može biti modulirana okolišnim čimbenicima i koja pojedincu omogućuje učinkovito liječenje ili čak preveniranje bolesti. S druge strane, genetička informacija nekad sa sobom nosi nepromjenjive činjenice, a ne govori ništa o tome kako se nositi s istima.

Moć koju čovjek dobiva čitanjem slijeda DNA mora uvijek biti u rukama onih koji pročitano znaju razumijeti. Naši recepti ne smiju doći u ruke onih koji nemaju za cilj pomoći tijelima da opstanu kao nešto više od genoma samoga. Razmišljati o vodi kao o nakupini kisika i vodika većinom nije korisno, tako nije korisno razmišljati o tijelima kao o tvornicama gena koji proizvode pojedinačne aminokiseline koje su pažljivo složene u proteine. Utjecaj tih (ne)pravilno složenih proteina na naše živote je neuredan, nepotpun, nepredvidljiv i ponekad neshvatljiv. Na vašem licu ima nešto od izgleda vašega oca, ali u svojim očima vidite vašu majku. Ponekad čujete vašu sestru u svojem glasu, ali vaš je osmijeh isti kao osmijeh vašega brata. Ipak, nemoguće vas je zamijeniti za ikoga drugoga. Vaša je bolest samo vaša, vaš je lijek samo vaš usprkos istim uputama o lijeku u svakoj kutiji lijeka. Vaše su šanse za izliječenje samo vaše i možda ima smisla vjerojati da iznose sto posto.

Matt Ridley je rekao nešto vrijedno razmišljanja, a ja pomalo izmijenila 24 godine poslije: „The Human Genome Project temelji se na zabludi. Ne postoji „ljudski genom“. Ni u prostoru ni u vremenu ne može se definirati takav određeni objekt. Na stotinama različitih lokusa, raspršenih po dvadeset i tri kromosoma, postoje geni koji se razlikuju od osobe do osobe. Nitko ne može reći da je krvna grupa A „normalna“, a O, B i AB „nenormalne“. Dakle, kada Human Genome Project objavi sekvenciju tipičnoga ljudskog bića, što će objaviti za ABO gen na kromosomu 9? Deklarirani cilj projekta je objaviti prosječnu ili „konzensus“ sekvenciju 200 različitih ljudi. Međutim, to bi promašilo poantu u slučaju ABO gena, jer je ključni dio njegove funkcije da ne bude isti kod svih. Varijacija je inherentni i integralni dio ljudskoga - ili bilo kojega - genoma. Nadalje, nema smisla napraviti snimku u ovom izoliranom trenutku 1999. godine i vjerovati da rezultirajuća slika na neki način predstavlja stabilnu i trajnu sliku. Genomi se mijenjaju. Različite verzije gena dolaze i odlaze. Postoji žalosna ljudska sklonost pretjerivanju stabilnosti, vjerovanju u ravnotežu. Suprotno željenom, genetika ne teži ravnotežnom stanju. Radi se o promjeni, promjeni i promjeni. ... Ljudski genom je knjiga. Pažljivim čitanjem od početka do kraja, dajući si vremena za teške dijelove poput genomskoga utiska, predan tehničar mogao bi stvoriti ljudsko tijelo. Uz pravi mehanizam za čitanje i tumačenje knjige, vješt moderni Frankenstein mogao bi izvesti taj podvig. Ali što onda? Stvorio bi ljudsko tijelo, ali da bi bilo doista živo, moralo bi raditi više

od samo postojanja. Moralo bi se prilagođavati, mijenjati i reagirati. Moralo bi steći svoju autonomiju. Moralo bi pobjeći iz Frankensteinove kontrole. “

Moralo bi znati voljeti, mrziti, praštati, srditi se, obećavati, oholiti se, vjerovati, prezirati, radovati se, zavidjeti, nadati se, žalostiti se, suosjećati ili se ljutiti. Geni bi morali popustiti vlastitoj kontroli. Geni bi morali prkositi svim, čovjeku poznatim, zakonima i tek onda postali bi čovjekom koji čita ove retke razumijevajući ih.

## 7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

ABCA-G – ATP-vezujući kazetni prijenosnik A-G (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily A-G*)

ABCG2 – ATP-vezujući kazetni prijenosnik G2 (engl. *ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2*)

ACC/AHA/NHLBI – Američki koledž za kardiologiju/ Američko udruženje za srce/ Nacionalni institut za srce, pluća i krv (engl. *American College of Cardiology/American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute*)

ALDP – protein adrenoleukodistrofije (engl. *Adrenoleukodystrophy Protein*)

ALT – alanin-aminotransferaza

ASCD – aterosklerotska kardiovaskularna bolest (engl. *Atherosclerotic Cardiovascular Disease*)

AST – aspartat-aminotransferaza

ATP – adenozin-trifosfat (engl. *Adenosine Triphosphate*)

AUC – površina ispod krivulje ovisnosti koncentracije lijeka u plazmi o vremenu (engl. *Area Under The Curve*)

BCRP – protein rezistencije raka dojke (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*)

BMI – indeks tjelesne mase (engl. *Body Mass Index*)

CK – kreatin kinaza (engl. *creatine kinase*)

CPIC – Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*)

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

cryo-EM – kriogena elektronska mikroskopija (engl. *cryogenic-Electron Microscopy*)

CYP – superobitelj citokrom P450 (engl. *cytochrome P450*)

Da – dalton

DDI – lijek-lijek interakcija (engl. *Drug-Drug Interaction*)

DME – dijelovi genoma odgovorni za metabolizam ksenobiotika (engl. *Drug Metabolism Related genes*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *Deoxyribonucleic Acid*)

dNTP – deoksiribonukleozid-trifosfat (engl. *deoxyribonucleotide triphosphate*)

DPWG – Nizozemska farmakogenetička radna skupina (engl. *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy-Pharmacogenetics Working Group*)

EAS – Europsko društvo za aterosklerozu (engl. *European Atherosclerosis Society*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)

FDA – Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *The United States Food and Drug Administration*)

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

FRET – Försterov rezonantni prijenos energije (engl. *Förster Resonance Energy Transfer*)

FTC – fumitremorgin C

GCN20 – engl. *General Control Non-repressible 20*

GM – geometrijski omjer (engl. *Geometric Mean*)

GTP-aza – gvanozin-trifosfataza

GvHD – bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft versus Host Disease*)

HDL– lipoprotein visoke gustoće (engl. *High-Density Lipoprotein*)

HIV – virus humane imunodeficijencije (engl. *Human Immunodeficiency Virus*)

HMG-CoA – 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A (engl. *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A*)

JUPITER – engl. *Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin*

LDL– lipoprotein niske gustoće (engl. *Low- Density Lipoprotein*)

MDR/TAP – protein višestruke rezistencije na lijekove (engl. *Multi-Drug Resistance/Transporter associated with antigen processing 1*)

MGB – engl. *minor groove binder*

microRNA – mikro ribonukleinska kiselina (engl. *micro Ribonucleic Acid*)

MNP – polimorfizmi višestrukih nukleotida (engl. *Multi-Nucleotide Polymorphisms*)

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

MRP – protein višestruke rezistencije na lijekove (engl. *Multi-Drug Resistance Protein*)

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

NADPH – nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (engl. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*)

NBD – nukleotid-vezujuće domene (engl. *Nucleotide Binding Domain*)

NTC – engl. *No Template Control*

OABP – oligoadenilat vezujući protein (engl. *Oligoadenylate Binding Protein*)

OAT1B1 – organski anionski transportni polipeptid 1B1 (engl. *Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1*)

OD – optička gustoća (engl. *Optical Density*)

OR – omjer vjerojatnosti (engl. *Odds Ratio*)

PBS– fosfatni pufer (engl. *Phosphate-Buffered Saline*)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl. *Polimerase Chained Reaction*)

PCSK9 – proprotein konvertaza subtilizin/ keksin tip 9 (engl. *Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9*)

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

PROSPER – engl. *Prospective Study of Pravastatin in the Elderly at Risk*

qPCR – kvantitativni PCR (engl. *quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RNPGx – Francuska nacionalna mreža za farmakogenetiku (engl. *French National Network of Pharmacogenetics*)

ROS – reaktivne kisikove vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SAMS – sa statinima povezani mišićni simptomi (engl. *Statin-Associated Muscle Symptoms*)

SAR – odnos strukture i aktivnosti (engl. *Structure-Activity Relationship*)

SAS – sa statinima povezani simptomi (engl. *Statin-Associated Symptoms*)

SCORE – sustavna procjena koronarnoga rizika (engl. *Systematic Coronary Risk Estimation*)

SLC – prijenosnik otopljenih tvari (engl. *Solute Carrier*)

SLCO1B1 – prijenosnik otopljenih tvari član 1B1 (engl. *Solute Carrier Organic Anion Transporter Family Member 1B1*)

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

SRE – sterolni regulatorni element (engl. *Sterol Regulatory Element*)

SREBP – sterolni regulatorni element-vezujući protein (engl. *Sterol Regulatory Binding Protein*)

STAREE – engl. *STAtins in Reducing Events in the Elderly*

TE – Tris-EDTA

TMD – transmembranska domena (engl. *Transmembrane Domain*),

TMH – transmembranskih  $\alpha$ -zavojnica (engl. *Transmembrane Helix*)

UGT– uridin 5'-difosfo-glukuronoziltransferaza (engl. *uridine 5'-diphospho-glucuronosyltransferase*)

VLDL – lipoprotein vrlo niske gustoće (engl. *Very-Low-Density Lipoprotein*)

WHO – Svjetska zdravstvena organizacije (engl. *World Health Organization*)

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

## 8. LITERATURA

Arnett DK, Blumenthal RS, Albert MA, Buroker AB, Goldberger ZD, Hahn EJ, Himmelfarb CD, Khera A, Lloyd-Jones D, McEvoy JW, Michos ED, Miedema MD, Muñoz D, Smith Jr SC, Virani SS, Williams Sr KA, Yeboah J, Ziaeian B. 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019, 140(11):e596-e646.

Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes (Basel)*. 2022, 13(12):2387.

Ata FK, Yalcin S. The Cisplatin, 5-fluorouracil, Irinotecan, and Gemcitabine Treatment in Resistant 2D and 3D Model Triple Negative Breast Cancer Cell Line: ABCG2 Expression Data. *Anticancer Agents Med Chem*. 2022, 22(2):371-377.

Atkins, P., De Paula, J., Keeler, J. Atkins' physical chemistry (11th ed.). Oxford, Oxford University Press, 2017, str. 768

Atorvastatin Genericon, 2021, <https://halmed.hr/>, pristupljeno 22. 04. 2023.

Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, Litman T. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr*. 2001, 33(6):503-11.

Božina N. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 49.

Božina T, Ganoci L, Karačić E, Šimičević L, Vrkić-Kirhmajer M, Klarica-Domjanović I, Križ T, Sertić Z, Božina N. ABCG2 and SLCO1B1 gene polymorphisms in the Croatian population. *Ann Hum Biol*. 2022, 49(7-8):323-331.

Burtis CA, Brunts DE. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 7th Edition. Amsterdam, Elsevier, 2022, str. 902.

Ciberlin F. Nuspojave statina [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2021 [pristupljeno 22.04.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:400797>



Cooper GM. The cell: a molecular approach 7th ed. Sunderland, Sinauer Associates, 2019, str. 122.

Cooper-DeHoff RM, Niemi M, Ramsey LB, Luzum JA, Tarkiainen EK, Straka RJ, Gong L, Tuteja S, Wilke RA, Wadelius M, Larson EA, Roden DM, Klein TE, Yee SW, Krauss RM, Turner RM, Palaniappan L, Gaedigk A, Giacomini KM, Caudle KE, Voora D. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms. *Clin Pharmacol Ther.* 2022, 11(5):1007-1021.

Cooper-DeHoff RM, Niemi M, Ramsey LB, Luzum JA, Tarkiainen EK, Straka RJ, Gong L, Tuteja S, Wilke RA, Wadelius M, Larson EA, Roden DM, Klein TE, Yee SW, Krauss RM, Turner RM, Palaniappan L, Gaedigk A, Giacomini KM, Caudle KE, Voora D, Hoffman JM, Johnson JA, Relling MV, Gammal RS, Rettie AE, Skaar TC, Owen RP, Soldin OP, Whirl-Carrillo M, Sangkuhl K, Klein MA, Lee MTM, Caudle DL, Huddart R, Ji Y, Scherer SE, Xu C, Wang L, Broeckel U, Johnson JA, Cavallari LH. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms. *Clin Pharmacol Ther.* 2022, 111(3):411-424.

Deng F, Sjöstedt N, Santo M, Neuvonen M, Niemi M, Kidron H. Novel inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) among marketed drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2023, 181:106362.

Dirks AJ, Jones KM. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006, 291(6):C1208-12.

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 1998, 95(26):15665-70.

Dudas B, Decleves X, Cisternino S, Perahia D, Miteva MA. ABCG2/BCRP transport mechanism revealed through kinetically excited targeted molecular dynamics simulations. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022, 20:4195-4205.

Dudas B, Decleves X, Cisternino S, Perahia D, Miteva MA. ABCG2/BCRP transport mechanism revealed through kinetically excited targeted molecular dynamics simulations. *Comput Struct Biotechnol J.* 2022, 20:4195-4205.

Eckenstaler R, Benndorf RA. 3D structure of the transporter ABCG2—what's new? *Br J Clin Pharmacol*. 2020, 177(7):1485–96.

Eckenstaler R, Benndorf RA. The Role of ABCG2 in the Pathogenesis of Primary Hyperuricemia and Gout-An Update. *Int J Mol Sci*. 2021, 22(13):6678.

FDA Drug Safety Communication: Important safety label changes to cholesterol-lowering statin drugs, 2012, [U.S. Food and Drug Administration \(fda.gov\)](https://www.fda.gov), pristupljeno 22.04. 2023.

Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 1948, 437, 55-75.

Fotouhi B., Faramarzi V., Ahmadi V. DNA sequencing by Förster resonant energy transfer. *Opt. Express* 30, 2022, 30(12):21854-21865

From old behemoth Lipitor to new king Humira: Best-selling U.S. drugs over 25 years, 2018, [Fierce Pharma Homepage | Fierce Pharma](https://www.fiercepharma.com), pristupljeno 9.05.2023.

Garrido-Cano I, Adam-Artigues A, Lameirinhas A, Blandez JF, Candela-Noguera V, Rojo F, Zazo S, Madoz-Gúrpide J, Lluch A, Bermejo B, Sancenón F, Cejalvo JM, Martínez-Mañez R, Eroles P. miR-99a-5p modulates doxorubicin resistance via the COX-2/ABCG2 axis in triple-negative breast cancer: from the discovery to in vivo studies. *Cancer Commun (Lond)*. 2022, 42(12):1412-1416.

Goodman LS, Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics 14th ed. New York, McGraw-Hill Education, 2017, str.605-618.

Grižančić L. Polimorfizmi ABC transportera i njihova uloga u tumorskim stanicama [Završni rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2014 [pristupljeno 23.04.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:382969>

Grundey SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal RS, Braun LT, de Ferranti S, Faiella-Tommasino J, Forman DE, Goldberg R, Heidenreich PA, Hlatky MA, Jones DW, Lloyd-Jones D, Lopez-Pajares N, Ndumele CE, Orringer CE, Peralta CA, Saseen JJ, Smith SC Jr, Sperling L, Virani SS, Yeboah J. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA/PCNA Guideline on the Management of Blood Cholesterol: A Report of the American College of

Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2019, 139:e1082-e1143.

Hadžibegović I. Statinska terapija – DA ili NE: sigurna odluka u primarnoj i sekundarnoj prevenciji. *The Medicus*. 2016, 25:153-157.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996, 6(10):986-94.

Highlights of prescribing information Crestor, 2019, <https://www.fda.gov/>, pristupljeno 9.05.2023.

Jackson, S.M., Manolaridis, I., Kowal, J. et al. Structural basis of small-molecule inhibition of human multidrug transporter ABCG2. *Nat Struct Mol Biol*. 2018, 25, 333–340.

Jung YJ, Kim KA, Jeong HJ, Park JS. ABCG2 polymorphisms, 34G>A and 421C>A in a Korean population: analysis and a comprehensive comparison with other populations. *J Clin Pharm Ther*. 2011, 36(1):75-83.

Karačić E. Polimorfizmi gena ABCG2 i SLCO1B1 kao rizični čimbenici terapije statinima, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2021 [pristupljeno 23.04.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:755835>

Kaufmann P, Török M, Zahno A, Waldhauser KM, Brecht K, Krähenbühl S. Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. *Cell Mol Life Sci*. 2006, 63(19-20):2415-25.

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

Kim KA, Joo HJ, Park JY. ABCG2 polymorphisms, 34G>A and 421C>A in a Korean population: analysis and a comprehensive comparison with other populations. *J Clin Pharm Ther*. 2007, 32(5):577-87.

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

Kukul S, Bora S, Kanojia N, Singh P, Paul PR, Rawat C, Sagar S, Bhatraju NK, Grewal GK, Singh A, Kukreti S, Satyamoorthy K, Kukreti R. Valproic Acid-Induced Upregulation of Multidrug Efflux Transporter ABCG2/BCRP via PPAR $\alpha$ -Dependent Mechanism in Human Brain Endothelial Cells. *Mol Pharmacol*. 2023, 103(3):145-157.

Lei ZN, Teng QX, Gupta P, Zhang W, Narayanan S, Yang DH, Wurpel JN, Fan YF, Chen ZS. Cabozantinib reverses topotecan resistance in human non-small cell lung cancer NCI-H460/TPT10 cell line and tumor xenograft model. *Cancer Lett*. 2019, 457:129-138.

Li R, Miao L, Qin L, Xiang Y, Zhang X, Peng H, Mailamuguli, Sun Y, Yao H. A meta-analysis of the associations between the Q141K and Q126X ABCG2 gene variants and gout risk. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015, 8(9):9812-23.

Liantonio A, Giannuzzi V, Cippone V, Camerino GM, Pierno S, Camerino DC. Fluvastatin and atorvastatin affect calcium homeostasis of rat skeletal muscle fibers in vivo and in vitro by impairing the sarcoplasmic reticulum/mitochondria Ca<sup>2+</sup>-release system. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007, 321(2):626-34.

Lin CT, Chen IC, Chen YJ, Lin YC, Chang JC, Wang TJ, Huang WN, Chen YH, Chen YH, Lin CH, Chen YM. The ABCG2 rs2231142 polymorphism and the risk of nephrolithiasis: A case-control study from the Taiwan biobank. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023, 14:1074012.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods*. 2001, 25(4):402-8.

Loscocco F, Visani G, Ruzzo A, Bagaloni I, Fuligni F, Galimberti S, Di Paolo A, Stagno F, Pregno P, Annunziata M, Gozzini A, Barulli S, Gabucci E, Magnani M, Isidori A. Clinical relevance of ABCB1, ABCG2, and ABCC2 gene polymorphisms in chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib. *J Clin Pharmacol*. 2019, 59(7):937-45. doi: 10.1002/jcph.1401. PMID: 30932256.

Lu W, Chen J, Guo Z, Ma Y, Gu Z, Liu Z. Targeted degradation of ABCG2 for reversing multidrug resistance by hypervalent bispecific gold nanoparticle-anchored aptamer chimeras. *Chem Commun (Camb)*. 2023, 59(21):3118-3121.

Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L, Wiklund

O; ESC Scientific Document Group. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020, 41(1):111-188.

Manolaridis I, Jackson SM, Taylor NMI, Kowal J, Stahlberg H, Locher KP. Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states. *Nature*. 2018, 563:426-430.

Mao Q, Unadkat JD. Role of the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) in Drug Transport—an Update. *AAPS J*. 2015, 17(1):65-82.

Marcoff L, Thompson PD. The role of coenzyme Q10 in statin-associated myopathy: a systematic review. *J Am Coll Cardiol*. 2007, 49(23):2231-7.

Mirošević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Muačević Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics*. 2015, 16(13):1483-94.

Mollazadeh H, Tavana E, Fanni G, Bo S, Banach M, Pirro M, von Haehling S, Jamialahmadi T, Sahebkar A. Effects of statins on mitochondrial pathways. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2021, 12(2):237-251.

Mueck W, Stampfuss J, Kubitzka D, Becka M. Clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rivaroxaban. *Clin Pharmacokinet*. 2014, 53(1):1-16.

Mullen PJ, Zahno A, Lindinger P, Maseneni S, Felser A, Krähenbühl S, Brecht K. Susceptibility to simvastatin-induced toxicity is partly determined by mitochondrial respiration and phosphorylation state of Akt. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1813(12):2079-87.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987, 155:335-50.

NanoDrop Microvolume Spectrophotometer Features, 2023, [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com), pristupljeno 22. 04.2023.

National Center for Biotechnology Information SNP: rs2231142, 2022, [Home - SNP - NCBI \(nih.gov\)](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2231142), pristupljeno 22. 04.2023.

Nikolac N, Šupak-Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: national recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med*. 2013, 23(3):242-54.

Oesterle A, Laufs U, Liao JK. Pleiotropic Effects of Statins on the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017, 120(1):229-243.

Olmastroni E, Molari G, De Beni N, Colpani O, Galimberti F, Gazzotti M, Zambon A, Catapano AL, Casula M. Statin use and risk of dementia or Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Eur J Prev Cardiol*. 2022, 29(5):804-814.

Päivä H, Thelen KM, Van Coster R, Smet J, De Paepe B, Mattila KM, Laakso J, Lehtimäki T, von Bergmann K, Lütjohann D, Laaksonen R. High-dose statins and skeletal muscle metabolism in humans: a randomized, controlled trial. *Clin Pharmacol Ther*. 2005, 78(1):60-8.

Palshof JA, Cederbye CN, Høgdall EVS, Poulsen TS, Linnemann D, Nygaard SB, Stenvang J, Christensen IJ, Jensen BV, Pfeiffer P, Brünner N, Yilmaz M, Viuff BM, Nielsen DL. ABCG2 Protein Levels and Association to Response to First-Line Irinotecan-Based Therapy for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(14):5027.

Palshof JA, Cederbye CN, Høgdall EVS, Poulsen TS, Linnemann D, Nygaard SB, Stenvang J, Christensen IJ, Jensen BV, Pfeiffer P, Brünner N, Yilmaz M, Viuff BM, Nielsen DL. ABCG2 Protein Levels and Association to Response to First-Line Irinotecan-Based Therapy for Patients with Metastatic Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2020, 21(14):5027.

Pham PA, la Porte CJ, Lee LS, van Heeswijk R, Sabo JP, Elgadi MM, Piliero PJ, Barditch-Crovo P, Fuchs E, Flexner C, Cameron DW. Differential effects of tipranavir plus ritonavir on atorvastatin or rosuvastatin pharmacokinetics in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009, 53(10):4385-92.

PharmGKB, 2022, <https://www.pharmgkb.org/>, pristupljeno 22.04. 2023.

Product Profile - QIAamp<sup>®</sup> genomic DNA kits, 2015, [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com), pristupljeno 9.05.2023.

Protein Atlas ENSG00000118777 - ABCG2, 2023, [The Human Protein Atlas](https://www.proteinatlas.org/), pristupljeno 22.04. 2023.

Radman K. Molekularno uklapanje potencijalnih inhibitora na protein ABCG2 [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2021 [pristupljeno 23.04.2023.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:191282>

Rattanacheeworn P, Chamnanphon M, Thongthip S, Kittanamongkolchai W, Townamchai N, Avihingsanon Y, Udomnilobol U, Prueksaritanont T, Jianmongkol S, Chariyavilaskul P. SLCO1B1 and ABCG2 Gene Polymorphisms in a Thai Population. *Pharmgenomics Pers Med.* 2020,13:521-530.

Rosuvastatin JGL, 2020, <https://halmed.hr/>, pristupljeno 22. 04. 2023.

Sadighara M, Joktaji JP, Hajhashemi V, Minaiyan M. Protective effects of coenzyme Q10 and L-carnitine against statin-induced pancreatic mitochondrial toxicity in rats. *Res Pharm Sci.* 2017, 12(6):434-443.

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

Saha SP, Wayne TF Jr. Coenzyme Q-10 in Human Health: Supporting Evidence? *South Med J.* 2016, 109(1):17-21.

Schick BA, Laaksonen R, Frohlich JJ, Päivä H, Lehtimäki T, Humphries KH, Côté HC. Decreased skeletal muscle mitochondrial DNA in patients treated with high-dose simvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2007, 81(5):650-3.

Sirvent P, Mercier J, Vassort G, Lacampagne A. Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, 15;329(3):1067-75.

Skovgaard N. PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide. Suzanne Kennedy and Nick Oswald (eds.). Norfolk, Caister Academic Press, 2011, str. 200.

Stamp LK, Chapman PT, O'Donnell JL, Zhang M, James J, Frampton C, Barclay ML, Kennedy MA, Roberts RL. Polymorphisms within the folate pathway predict folate concentrations but are not associated with disease activity in rheumatoid arthritis patients on methotrexate. *Rheumatology (Oxford).* 2011, 50(11):2047-54.

Stenvang J, Budinská E, van Cutsem E, Bosman F, Popovici V, Brünner N. An Explorative Analysis of ABCG2/TOP-1 mRNA Expression as a Biomarker Test for FOLFIRI Treatment

in Stage III Colon Cancer Patients: Results from Retrospective Analyses of the PETACC-3 Trial. *Cancers (Basel)*. 2020, 12(4):977.

Sun Y, Gu M, Zhu L, Liu J, Xiong Y, Wei Y, Li F. Gemcitabine upregulates ABCG2/BCRP and modulates the intracellular pharmacokinetic profiles of bioluminescence in pancreatic cancer cells. *Anticancer Drugs*. 2016, 27(3):183-91.

Šimičević L, Slišković AM, Kirhmajer MV, Ganoci L, Holik H, Palić J, Samardžić J, Božina T. Risk Factors for Rivaroxaban-Related Bleeding Events-Possible Role of Pharmacogenetics: Case Series. *Pharmacy (Basel)*. 2023, 5;11(1):29.

Table of Pharmacogenetic Associations, 2022, [U.S. Food and Drug Administration \(fda.gov\)](https://www.fda.gov), pristupljeno 9.05.2022.

TaqMan® SNP Genotyping Assays USER GUIDE, 2017, [www.thermofisher.com](https://www.thermofisher.com), pristupljeno 9.05.2023.

TaqMan™ Drug Metabolism Genotyping Assay, 2020, [www.thermofisher.com](https://www.thermofisher.com), pristupljeno 9.05.2023.

Tecza K, Pamula-Pilat J, Lanuszewska J, Butkiewicz D, Grzybowska E. Pharmacogenetics of toxicity of 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer patients. *Pharmacogenomics J*. 2019, 19(3):235-242.

Ueshima S, Hira D, Fujii R, Kimura Y, Tomitsuka C, Yamane T, Tabuchi Y, Ozawa T, Itoh H, Horie M, Terada T, Katsura T. Impact of ABCB1, ABCG2, and CYP3A5 polymorphisms on plasma trough concentrations of apixaban in Japanese patients with atrial fibrillation. *Pharmacogenet Genomics*. 2017, 27(8):289-292.

UniProt Consortium ABCG2\_HUMAN/Q9UNQ0, 2023, [UniProt](https://www.uniprot.org), pristupljeno 22.04. 2023.

van der Pol KH, Nijenhuis M, Soree B, van der Heijden J, Boersma-van Ek W, Swen JJ, Guchelaar HJ, Dutch Pharmacogenetics Working Group. Dutch pharmacogenetics working group guideline for the gene-drug interaction of ABCG2, HLA-B and allopurinol, and MTHFR, folic acid and methotrexate. *Eur J Hum Genet*. 2022.

Wang L, Leggas M, Empey PE, McNamara PJ. Stereoselective interaction of pantoprazole with ABCG2. II. In vitro flux analysis. *Drug Metab Dispos*. 2012, 40(5):1024-31.



Weeding E, Tiniakou E. Therapeutic management of immune-mediated necrotizing myositis. *Curr Treatm Opt Rheumatol*. 2021, 7(2):150-160.

Weizmann Institute of Science GeneCards ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2 (Junior Blood Group), 2023, [GeneCards - Human Genes | Gene Database | Gene Search](#), pristupljeno 22. 04.2023.

World Health Organization Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. ATC/DDD Index, 2023, [WHOCC - Home](#), pristupljeno 9.05.2023.

World Health Organization Noncommunicable Diseases (NCD) Country Profiles: European Region, <https://www.who.int/>, pristupljeno 28.04.2023.

Yamasaki Y, Ieiri I, Kusuhara H, Sasaki T, Kimura M, Tabuchi H, Ando Y, Irie S, Ware JA, Nakai Y, Higuchi S, Sugiyama Y. Pharmacogenetic Characterization of Sulfasalazine Disposition Based on NAT2 and ABCG2 (BCRP) Gene Polymorphisms in Humans. *Clin Pharmacol Ther*. 2008, 83(2):355-61.

Zhang YS, Yang C, Han L, Liu L, Liu YJ. Expression of BCRP/ABCG2 Protein in Invasive Breast Cancer and Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Chin Med J (Engl)*. 2016, 129(5):537-44.

Zoungas S A Clinical Trial of STATin Therapy for Reducing Events in the Elderly (STAREE) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02099123, 2023, [Home - ClinicalTrials.gov](#), pristupljeno 28.04.2023.

## 9. SAŽETAK

Statini su jedni od najpropisivanijih lijekova današnjice, često kao dio kronične politerapije u kardiovaskularnih pacijenata. Usprkos opravdanom statusu statina kao sigurnih lijekova, neželjene učinke terapije nužno je prevenirati kako bi se osigurala adherencija, posebice kod terapija u cilju prevencije kardiovaskularnih događaja. Atorvastatin, supstrat ABCG2 prijenosnika, podložan je varijabilnoj farmakokinetici u onih s njegovom izmijenjenom ekspresijom. Varijanta p.Q141K (c.421C>A, rs2231142) povezana je sa smanjenom ekspresijom proteina. To vodi do povećane koncentracije njegovih supstrata uslijed povećane apsorpcije i nemogućnosti izlučivanja izvan stanica na čijim je membranama ABCG2 prijenosnik. Polimorfizam ovog farmakogena mogao bi objasniti o dozi ovisne nuspojave atorvastatina povezane s muskuloskeletnim sustavom i akutne manifestacije jetrenih oštećenja te ostalo rijeđe uočene nuspojave. CPIC smjernice za propisivanje statina tiču se *SLCO1B1* gena, prvog gena čija je važnost u farmakokinetici ove skupine lijekova prepoznata. Do danas, utjecaj polimorfizama *ABCG2* gena ustanovljen je u slučaju doziranja rosuvastatina i alopurinola gdje se preporučuju niže, odnosno više doze u onih s uočenim varijantnim alelom A. U ovom je diplomskom radu provedena *case-control* studija s ciljem evaluacije asocijacije neželjenih učinaka i polimorfizama gena *ABCG2*. Genotipizacija *ABCG2* c.421C>A ukupno 223 ispitanika koji su primali atorvastatin kao dio terapije različitih kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti učinjena je metodom TaqMan<sup>®</sup> DME. Ispitanici su dihotomizirani (slučajevi vs kontrole) s obzirom na to jesu li iskusili nuspojave nakon primjene atorvastatina. Pokazana je statistički značajna povezanost *ABCG2* c.421C>A polimorfizma s prijavljivanim nuspojavama ( $p=0,0416$ ). Nove spoznaje na području farmakogenomike pomažu u procjeni rizika i koristi kod propisivanja atorvastatina, što vodi korak bliže personaliziranoj medicini.

## 9. SUMMARY

Statins are among the most prescribed drugs today, often as part of chronic polytherapy in cardiovascular patients. Despite the justified status of statins as safe drugs, it is necessary to prevent their side effects in order to ensure adherence, especially in therapies aimed at preventing cardiovascular events. Atorvastatin, a substrate of the ABCG2 transporter, is subject to variable pharmacokinetics in individuals with altered expression of this transporter. The p.Q141K variant (c.421C>A, rs2231142) is associated with reduced protein expression. This leads to increased concentrations of its substrates due to increased absorption and the inability to be excreted outside of cells where the ABCG2 acts as an efflux

pump. The polymorphism of this pharmacogene could explain the dose-dependent side effects of atorvastatin associated with the musculoskeletal system, acute manifestations of liver damage, and other less common side effects. CPIC guidelines for statin prescribing relate to the *SLCO1B1* gene, the first gene whose importance in the pharmacokinetics of this drug class has been recognized. To date, the influence of *ABCG2* gene polymorphisms has been established in the case of rosuvastatin and allopurinol dosing, where lower and higher doses are recommended in individuals with the observed variant allele A, respectively.

In this thesis, a case-control study was conducted to evaluate the association between adverse effects and *ABCG2* gene polymorphisms. Genotyping of *ABCG2* c.421C>A was performed using the TaqMan<sup>®</sup> DME method on a total of 223 participants receiving atorvastatin as their therapy for cardiovascular and metabolic diseases. The participants were dichotomized (cases vs. controls) based on whether they experienced side effects after taking atorvastatin or not. A statistically significant association between the *ABCG2* c.421C>A polymorphism and reported side effects was demonstrated ( $p=0,0416$ ). Novel findings in the field of pharmacogenomics assist in assessing the risk and benefits of prescribing atorvastatin, bringing us one step further towards personalized medicine.

## 10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Diplomski rad

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Studij: Medicinska biokemija

Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju,  
kolegij Farmakogenetika

A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

### POVEZANOST POLIMORFIZMA *ABCG2* C.421C>A (rs2231142) S NUSPOJAVAMA ATORVASTATINA

**Marina Galešić**

#### SAŽETAK

Statini su jedni od najpropisivanijih lijekova današnjice, često kao dio kronične politerapije u kardiovaskularnih pacijenata. Usprkos opravdanom statusu statina kao sigurnih lijekova, neželjene učinke terapije nužno je prevenirati kako bi se osigurala adherencija, posebice kod terapija u cilju prevencije kardiovaskularnih događaja. Atorvastatin, supstrat *ABCG2* prijenosnika, podložan je varijabilnoj farmakokinetici u onih s njegovom izmijenjenom ekspresijom. Varijanta p.Q141K (c.421C>A, rs2231142) povezana je sa smanjenom ekspresijom proteina. To vodi do povećane koncentracije njegovih supstrata uslijed povećane apsorpcije i nemogućnosti izlučivanja izvan stanica na čijim je membranama *ABCG2* prijenosnik. Polimorfizam ovog farmakogena mogao bi objasniti o dozi ovisne nuspojave atorvastatina povezane s muskuloskeletnim sustavom i akutne manifestacije jetrenih oštećenja te ostalo rijede uočene nuspojave. CPIC smjernice za propisivanje statina tiču se *SLCO1B1* gena, prvog gena čija je važnost u farmakokinetici ove skupine lijekova prepoznata. Do danas, utjecaj polimorfizama *ABCG2* gena ustanovljen je u slučaju doziranja rosuvastatina i alopurinola gdje se preporučuju niže, odnosno više doze u onih s uočenim varijantnim alelom A.

U ovom je diplomskom radu provedena *case-control* studija s ciljem evaluacije asocijacije neželjenih učinaka i polimorfizama gena *ABCG2*. Genotipizacija *ABCG2* c.421C>A ukupno 223 ispitanika koji su primali atorvastatin kao dio terapije različitih kardiovaskularnih i metaboličkih bolesti učinjena je metodom TaqMan<sup>®</sup> DME. Ispitanici su dihotomizirani (slučajevi vs kontrole) s obzirom na to jesu li iskusili nuspojave nakon primjene atorvastatina. Pokazana je statistički značajna povezanost *ABCG2* c.421C>A polimorfizma s prijavljivanim nuspojavama ( $p=0,0416$ ). Nove spoznaje na području farmakogenomike pomažu u procjeni rizika i koristi kod propisivanja atorvastatina, što vodi korak bliže personaliziranoj medicini.

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

- Rad sadrži: 46 stranica, 5 grafičkih prikaza, 7 tablica i 95 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
- Ključne riječi: atorvastatin, ABCG2, neželjeni učinci, polimorfizmi, genotipizacija, personalizirana medicina
- Mentor: **Dr. sc. Tamara Božina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
- Ocjenjivači: **Dr. sc. Tamara Božina**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Karmela Barišić**, *redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: 14. srpnja 2023.

## 10. BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Master od Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and  
Hematology  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **ASSOCIATION OF *ABCG2* C.421C>A (rs2231142) POLYMORPHISM WITH ATORVASTATIN ADVERSE REACTIONS**

**Marina Galešić**

#### **SUMMARY**

Statins are among the most prescribed drugs today, often as part of chronic polytherapy in cardiovascular patients. Despite the justified status of statins as safe drugs, it is necessary to prevent their side effects in order to ensure adherence, especially in therapies aimed at preventing cardiovascular events. Atorvastatin, a substrate of the *ABCG2* transporter, is subject to variable pharmacokinetics in individuals with altered expression of this transporter. The p.Q141K variant (c.421C>A, rs2231142) is associated with reduced protein expression. This leads to increased concentrations of its substrates due to increased absorption and the inability to be excreted outside of cells where the *ABCG2* acts as an efflux pump. The polymorphism of this pharmacogene could explain the dose-dependent side effects of atorvastatin associated with the musculoskeletal system, acute manifestations of liver damage, and other less common side effects. CPIC guidelines for statin prescribing relate to the *SLCO1B1* gene, the first gene whose importance in the pharmacokinetics of this drug class has been recognized. To date, the influence of *ABCG2* gene polymorphisms has been established in the case of rosuvastatin and allopurinol dosing, where lower and higher doses are recommended in individuals with the observed variant allele A, respectively.

In this thesis, a case-control study was conducted to evaluate the association between adverse effects and *ABCG2* gene polymorphisms. Genotyping of *ABCG2* c.421C>A was performed using the TaqMan® DME method on a total of 223 participants receiving atorvastatin as part of therapy for various cardiovascular and metabolic diseases. The participants were dichotomized (cases vs. controls) based on whether they experienced side effects after taking atorvastatin or not. A statistically significant association between the *ABCG2* c.421C>A polymorphism and reported side effects was demonstrated. Novel findings in the field of pharmacogenomics assist in assessing the risk and benefits of prescribing atorvastatin, bringing us one step further towards personalized medicine.

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

Thesis includes: 46 pages, 5 figures, 7 tables and 95 references. Original is in Croatian language.

Keywords: atorvastatin, ABCG2, adverse effects, polymorphisms, genotyping, personalized medicine

Mentor: **Tamara Božina, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb School of Medicine

**Karmela Barišić, Ph.D.**, *Full Professor with tenure*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Tamara Božina, Ph.D.** *Assistant Professor* University of Zagreb School of Medicine

**Karmela Barišić, Ph.D.**, *Full Professor with tenure*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 14th 2023.