

Genotipizacija CYP2C9 u kliničkoj praksi

Krsmanović, Dora

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:646369>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-06**



Repository / Repozitorij:

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



Dora Krsmanović

Genotipizacija *CYP2C9* u kliničkoj praksi

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Molekularna dijagnostika Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Karmele Barišić i suvoditeljstvom dr. sc. Lane Ganoci.

Zahvaljujem se mentoricama prof. dr. sc. Karmeli Barišić i dr. sc. Lani Ganoci koje su mi omogućile izradu ovoga diplomskoga rada. Hvala Vam na savjetima, strpljenju te pristupačnosti i susretljivosti u svakom koraku izrade.

Zahvaljujem se kem. teh. Zrinki Marković na pomoći, strpljivosti, praktičnim savjetima i uvijek dobroj atmosferi za vrijeme moga boravka u laboratoriju Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Zahvaljujem se svojim prijateljicama na lijepim trenucima te svakoj pomoći i riječi podrške koju su mi pružile tijekom ovih pet godina studiranja.

Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji koja mi je uvijek bila velika podrška i oslonac u životu, koja se sa mnom veselila mojoj sreći i tješila me u trenucima žalosti. Hvala vam što ste uvijek vjerovali u mene.

„The mind is not a vessel to be filled but a fire to be ignited.”

Plutarh

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1.	Farmakogenomika	1
1.2.	Sustav citokroma P450 (CYP).....	3
1.3.	CYP2C9.....	4
1.3.1.	Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP2C9	5
1.3.2.	Genski polimorfizmi <i>CYP2C9</i> i njihov utjecaj na funkciju	6
1.3.3.	Učestalost polimorfizama <i>CYP2C9</i>	8
1.3.4.	Klinička značajnost polimorfizama <i>CYP2C9</i>	9
1.4.	Validacija molekularnih metoda.....	9
2.	OBRAZLOŽENJE TEME	13
3.	MATERIJALI I METODE	14
3.1.	Izdvajanje DNA metodom <i>FlexiGene</i> [®]	14
3.2.	Mjerenje koncentracije i čistoće DNA	15
3.3.	Genotipizacija <i>CYP2C9</i>	16
3.3.1.	Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu.....	16
3.3.2.	Genotipizacija <i>CYP2C9</i> *2 i *3 metodom <i>TaqMan</i> [®]	17
3.4.	Validacija metode genotipizacije za kliničku primjenu.....	21
4.	REZULTATI.....	23
4.1.	Preciznost.....	23
4.1.1.	Preciznost u seriji	23
4.1.2.	Preciznost iz dana u dan	24
4.2.	Točnost	25
5.	RASPRAVA.....	27
5.1.	Varfarin.....	27
5.2.	Fenitoin.....	33
5.3.	Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID)	37
5.4.	Siponimod.....	42
5.5.	Ostali lijekovi	44
5.6.	Validacija metode genotipizacije <i>CYP2C9</i> za kliničku primjenu.....	46
6.	ZAKLJUČAK	48
7.	LITERATURA.....	50
8.	SAŽETAK/SUMMARY	61

1. UVOD

1.1. Farmakogenomika

Farmakogenomika je znanost koja se bavi otkrivanjem promjena u genomu i mehanizama njihova nastanka te proučavanjem njihova utjecaja na funkciju produkata pogođenih gena. Varijacije u genima koji kodiraju molekule uključene u farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova rezultiraju velikom varijabilnošću odgovora na djelovanje pojedinoga lijeka među pojedincima: određena doza lijeka može biti učinkovita kod jedne, a neučinkovita kod druge osobe ili čak uzrokovati neželjene reakcije (ADR, od engl. *adverse drug reaction*) (Roden i sur., 2019). Brojni su razlozi intra- i interindividualne varijabilnosti terapijskoga odgovora, poput fizioloških čimbenika (dob, trudnoća, dnevni ciklus, karakteristike tkiva), interakcije lijekova, inhibicije i indukcije enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijekova, patofizioloških stanja, spola, rasnih i etničkih osobitosti, razlika u metabolizmu između vrsta (Rendić i Medić-Šarić, 2013a), no u ovome će radu naglasak biti na genskim varijantama, poglavito polimorfizmima. Smatra se da su genski polimorfizmi odgovorni za trećinu različitih ozbiljnih neželjenih reakcija na lijekove (Roden i sur., 2019). Otkrivanje polimorfizama određenih gena u bolesnika omogućuje pravovremenu primjenu odgovarajućega lijeka i bolji ishod za bolesnika. Međutim, treba spomenuti da nisu svi polimorfizmi klinički relevantni, što ovisi o karakteristikama samoga lijeka. Jedna varijacija u genu čiji je proteinski produkt relevantan za farmakokinetiku lijeka, primjenom aktivne tvari s uskim terapijskim rasponom koja podliježe biotransformaciji posredovanoj samo jednim enzimom, može dovesti do puno jačega učinka unesenoga lijeka. Lijekovi koji se predominantno metaboliziraju jednim enzimom, a imaju široki terapijski raspon, zbog promjena u genima, farmakokinetički se mogu znatno razlikovati, no zbog širokog terapijskog raspona, ta se razlika možda ne bi očitovala varijabilnošću terapijskoga odgovora. Navedeno se također odnosi na lijekove s uskim terapijskim rasponom koji se inaktiviraju preko više enzimskih sustava, osim u slučajevima disfunkcije više metaboličkih putova, kada može doći do toksičnoga djelovanja lijeka na organizam (Roden i sur., 2019).

Promijenjeni geni (aleli), odgovorni za varijabilnost terapijskoga odgovora među pojedincima, označavaju se zvjezdicom (*) te predstavljaju specifičnu varijaciju sekvence unutar genskoga lokusa (npr. polimorfizam jednoga nukleotida, engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), pritom se oznaka *1 najčešće dodjeljuje nepromijenjenom genotipu, odnosno potpuno funkcionalnom alelu (tzv. divlji tip, engl. *wild-type*) (Robarge i sur., 2007). Važno je spomenuti da se ta oznaka najčešće temelji na istraživanju provedenom na određenoj

subpopulaciji te ne predstavlja najčešći alel u svakoj populaciji (Božina i sur., 2019; Wake i sur., 2019; Kalman i sur., 2016). Neki od farmakogena mogu uključivati više od jednog polimorfizma, što predstavlja teškoće u razlikovanju prisutnosti takvoga alela od prisutnosti samo jednog SNP-a. Boljim razumijevanjem broja polimorfizama u važnim farmakogenima, uvodi se i alternativna nomenklatura varijanata prema kojoj se referentnim SNP-ima dodjeljuje rs (engl. *reference SNP*) broj. Većina dosad istraživanih polimorfizama djelomično ili potpuno inhibira djelovanje proteina kodiranoga pogodenim genom (npr. *CYP2C9*3*), no neki od njih uzrokuju povećanje aktivnosti enzima uključenih u metabolizam lijekova (npr. *CYP2C19*17*, duplikacija *CYP2D6*) (Roden i sur., 2019). Smanjenje aktivnosti enzima rezultira manjim klirensom i povećanom koncentracijom lijeka u krvi, dok povećanje aktivnosti dovodi do većega klirensa i smanjene koncentracije lijeka u krvi (Zanger i Schwab, 2013).

Parovi alela – majčina i očeva, koji se nazivaju diplotipovima, kategoriziraju se u fenotipove koji opisuju stupanj enzimske aktivnosti, odnosno funkcionalnost pojedinoga enzima. Prema utjecaju varijanata farmakokinetičkih gena na metabolizam lijekova, pojedinac može imati normalni (NM, od engl. *normal metabolizer*), spori (PM, od engl. *poor metabolizer*), intermedijarni (IM, od engl. *intermediate metabolizer*), brzi (RM, od engl. *rapid metabolizer*) ili vrlo brzi metabolički fenotip (UM, od engl. *ultrarapid metabolizer*), dok se za varijante farmakodinamičkih gena (npr. *VKORC1*) definira kao pozitivna ili negativna za visokoriskantne alele (Roden i sur., 2019; Wake i sur., 2019). Pri odabiru terapije, osim rezultata farmakogenetičkoga testiranja, u obzir treba uzeti i druge čimbenike poput bubrežne i jetrene funkcije, životnih navika (pušenje, alkohol, prehrana) te drugih lijekova (politerapija) i postojećih stanja (Božina i sur., 2019; Wake i sur., 2019).

Tablica 1. Definicija metaboličkih fenotipova (preuzeto i prilagođeno prema Božina i sur., 2019)

Fenotip aktivnosti enzima	Definicija funkcije	Definicija gena
spori metabolizator (PM)	niska ili dokinuta aktivnost enzima	kombinacija alela bez funkcije i/ili alela sa smanjenom funkcijom
intermedijarni metabolizator (IM)	smanjena aktivnost enzima (aktivnost između PM i NM)	kombinacija alela s normalnom funkcijom, alela sa smanjenom funkcijom i/ili alela bez funkcije
normalni metabolizator (NM)	potpuna (normalna) ili očekivana aktivnost enzima	kombinacija alela s normalnom funkcijom i alela sa smanjenom funkcijom
brzi metabolizator (RM)	povećana aktivnost enzima (aktivnost između NM i UM)	kombinacija alela s normalnom funkcijom i alela s povećanom funkcijom
vrlo brzi metabolizator (UM)	značajno povećana aktivnost enzima	2 alela s povećanom funkcijom ili više od 2 alela s normalnom funkcijom

1.2.Sustav citokroma P450 (CYP)

Nakon unosa u organizam, lijekovi i drugi ksenobiotici podliježu složenim biokemijskim procesima koji uključuju oslobađanje lijeka, apsorpciju, raspodjelu, biotransformaciju te eliminaciju (LADME, od engl. *Liberation, Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion*) (Rendić i Medić-Šarić, 2013a). Metabolizam (biotransformacija) ksenobiotika može se podijeliti u dvije faze: metabolizam faze I, koja obuhvaća reakcije oksidacije, redukcije i hidrolize te metabolizam faze II, reakcije konjugacije (glukuronidacija, sulfatacija, metilacija, acetilacija, konjugacija s glutationom, masnim kiselinama i aminokiselinama) (Rendić i Medić-Šarić, 2013b).

Enzimi I. faze, među kojima je sustav citokroma P450 (CYP) odgovoran za oko 90 % svih oksidacijskih reakcija, uključeni su u biotransformaciju više od 75 % propisivanih lijekova (Božina i sur., 2019; Rendić i Guengerich, 2015; Zanger i Schwab, 2013). Osim za metabolizam egzogenih spojeva, enzimi sustava CYP-a odgovorni su i za biosintezu endogenih spojeva, kao što su steroidni hormoni, žučne kiseline, vitamini i eikozanoidi (Guengerich, 2019; Zanger i Schwab, 2013). Membranski su enzimi smješteni u endoplazmatskom retikulu i mitohondrijima, a na razini organa u najvećoj su mjeri eksprimirani u jetri. Strukturno pripadaju hemoproteinima: sadrže prostetičku skupinu Fe-protoporfirin IX (hem) – koenzim zajednički

svim CYP enzimima te proteinski dio koji se razlikuje od jedne izoforme do druge (Guengerich, 2019; Rendić i Medić-Šarić, 2013c).

Geni koji kodiraju CYP enzime iznimno su polimorfni, a time i farmakogenetički vrlo važni. S obzirom na opseg uključenosti CYP enzima u metabolizam lijekova, polimorfizmi tih enzima mogu znatno utjecati na razine lijekova u krvi te, posljedično, promijeniti njihov učinak (Božina i sur., 2019). Zaslužni su za 86 % neželjenih reakcija na lijekove koji se metaboliziraju polimorfnim enzimima I. faze metabolizma (Phillips i sur., 2001). Polimorfizmi koji dovode do potpuna ili djelomična gubitka funkcije (engl. *loss-of-function polymorphisms*) uključuju delecije, mutacije koje rezultiraju pomakom okvira čitanja (tzv. *frameshift* mutacije) te neispravno prekrajanje mRNA (engl. *splicing defect*). U polimorfizme koji rezultiraju pojačanom funkcijom gena (engl. *gain-of-function polymorphisms*) ubrajamo duplikacije/multiplikacije gena, varijacije broja kopija (udvostručenje/mnogostručenje cijeloga gena, engl. *copy number variation*; CNV) te varijacije u promotorskoj regiji (Zanger i Schwab, 2013; Božina i sur., 2019). SNP-i mogu dovesti i do gubitka i do pojačavanja funkcije gena, ovisno o tome rezultira li promjena nukleotida (inercija, delecija, supstitucija) u kodirajućoj sekvenci gena promjenom aminokiseline (*missense* mutacije – nesinonimni SNP, nsSNP, od engl. *nonsynonymous SNP* i SNP u kodirajućoj sekvenci, cSNP, od engl. *coding SNP*) ili ona ostaje ista neovisno o nastaloj promjeni (sinonimni/tzv. tihi SNP, sSNP, od engl. *synonymous SNP*) (Božina i sur., 2019; Sadee i sur., 2011). Najvažniji enzimi iz skupine CYP-a obuhvaćaju CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6, CYP2E1, CYP3A4 i CYP3A5, koji zajedno kataliziraju većinu metabolizma lijekova i drugih ksenobiotika (Božina i sur., 2019).

1.3.CYP2C9

Podobitelj CYP2C sastoji se od izoformi CYP2C18, CYP2C19, CYP2C9 i CYP2C8 čiji su geni, tim redom, smješteni na kromosomu 10q23.3 u obliku klastera (engl. *gene cluster*) veličine oko 390 kb (Zanger i Schwab, 2013). Među njima, CYP2C9 najobilnije se eksprimira, čineći 20 % ukupne količine svih CYP proteina u jetri te u najvećoj mjeri pridonosi metabolizmu lijekova (Daly i sur., 2017). Odgovoran je za metabolizam oko 15 % klinički značajnih lijekova poput kumarinskih antikoagulanata (varfarin), antikonvulziva (fenitoin, valproat), oralnih antidijabetika (gliklazid, tolbutamid), blokatora angiotenzinskih receptora (kandesartan, losartan), većine nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAIDs, od engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*) te siponimoda (Sanguhl i sur., 2021; Zanger i Schwab, 2013). Budući da nekolicina lijekova-supstrata enzima CYP2C9 ima uski terapijski raspon, interindividualna varijabilnost u ekspresiji i aktivnosti toga enzima može znatno utjecati na

učinkovitost i sigurnost pojedinoga lijeka. Osim ksenobiotika, CYP2C9 metabolizira i endogene spojeve, kao što su arahidonska i linolna kiselina te neki steroidi (Daly i sur., 2017; Zanger i Schwab, 2013).

1.3.1. Čimbenici koji utječu na aktivnost CYP2C9

Osim genskih polimorfizama, na ekspresiju i aktivnost CYP2C9 utječu i drugi čimbenici, poput epigenetskih procesa, spola, dobi, zdravstvena stanja te indukcije i inhibicije (Sangkuhl i sur., 2021, Zanger i Schwab, 2013).

Prema dosadašnjim istraživanjima, nema značajne razlike u aktivnosti izoenzima među spolovima, no dolazi do umjerenoga porasta ekspresije i aktivnosti tijekom života (Zanger i Schwab, 2013). Metabolička je aktivnost CYP2C9 u fetalnoj jetri niska te po rođenju linearno raste do 20. godine života, no najveći porast u aktivnosti javlja se tijekom prve dvije godine (Sangkuhl i sur., 2021).

CYP2C9 meta je brojnih lijekova koji induciraju odnosno inhibiraju njegovu aktivnost (Sangkuhl i sur., 2021). Amiodaron, flukonazol, fluvastatin, metronidazol, sulfametoksazol, sulfafenazol i vorikonazol neki su od inhibitora CYP2C9 (Flockart i sur., 2021). Kombinacija inhibitora i lijeka s uskim terapijskim rasponom, kao što su S-varfarin, tolbutamid i fenitoin, može izazvati klinički značajne, potencijalno opasne lijek-lijek interakcije. Amiodaron se, zbog svojega antiaritmičkoga djelovanja, često daje u kombinaciji s varfarinom. Međutim, zbog dokazane lijek-lijek interakcije, koja rezultira povećanom koncentracijom lijeka-supstrata u krvi, potrebno je smanjenje doze varfarina za 6-65 % (Sangkuhl i sur., 2021; Daly i sur., 2017; Van Booven i sur., 2010). Od lijekova koji induciraju aktivnost CYP2C9 poznati su rifampicin, klotrimazol, nevirapin, nifedipin, hiperforin, fenobarbital, fenitoin, karbamazepin, dikloksacilin, flukloksacilin i tamoksifen (Flockart i sur., 2021; Sangkuhl i sur., 2021). Brojni su mehanizmi indukcije, a najpoznatiji uključuju interakciju ligandom aktiviranih nuklearnih receptora, poput pregnanskog X receptora (PXR), konstitutivnoga androstanskog receptora (CAR), glukokortikoidnoga i estrogenskoga receptora te receptora vitamina D (VDR), s regulatornim elementima u promotorskoj regiji *CYP2C9* (Sangkuhl i sur., 2021). U slučaju CAR-posredovane aktivacije transkripcije većina se liganada ne veže izravno na receptor, već signalizira translokaciju CAR-a u jezgru (Chen i sur., 2004). Nuklearni receptori djeluju kao transkripcijski faktori te povećavaju ekspresiju, a, posljedično, i metabolički kapacitet CYP2C9, što dovodi do povećanja klirensa lijekova-supstrata. Indukcija ekspresije *CYP2C9* nekim ligandom može uključivati više nuklearnih receptora, a time i nekoliko različitih veznih mjesta u promotorskoj regiji gena. Estrogenski receptor, osim što antiestrogenima, poput

tamoksifena, inducira ekspresiju *CYP2C9*, vezanjem s estradiolom i etinilestradiolom potiskuje transkripciju gena, zbog čega žene na oralnim kontraceptivima imaju smanjen metabolizam losartana (Daly i sur., 2017).

Na metabolizam lijekova posredovan enzimom *CYP2C9* utječu i varijacije u genu koji kodira citokrom b5 (*CYB5A*), protein u membrani endoplazmatskog retikula zadužen za prijenos elektrona s NAD(P)H na CYP (Sangkuhl i sur, 2021; Rendić i Medić-Šarić, 2013c).

1.3.2. Genski polimorfizmi *CYP2C9* i njihov utjecaj na funkciju

1970. godine dokazan je utjecaj polimorfizma na metabolizam antidijabetika tolbutamida, a prvotno se povezivao s *CYP2D6*. Kasnijim istraživanjima i kloniranjem odgovarajućega gena koji kodira enzim zaslužan za oksidaciju tolbutamida, otkrivena je izoforma nazvana *CYP2C9*. Analizom sekvenci komplementarne DNA (cDNA) identificirana su dva česta SNP-a, danas poznata kao haplotipovi *CYP2C9*2* (c.430C>T, p.Arg144Cys, rs1799853) i *CYP2C9*3* (c.1075A>C, p.Ile359Leu, rs1057910) (Sangkuhl i sur., 2021; Daly i sur., 2017). Utvrđeno je postojanje korelacije između smanjenoga metabolizma tolbutamida i S-varfarina u *in vivo* i *in vitro* uvjetima te prisustva navedenih haplotipova. Daljnjim sekvenciranjem, tijekom ranih 1990. godina, otkrivene su i druge varijante, poput *CYP2C9*5* alela (c.1080C>G, p.Asp360Glu, rs28371686) sa smanjenom funkcijom te nefunkcionalna alela *CYP2C9*6* (c.818delA, p.Lys273Argfs, rs9332131) (Sangkuhl i sur., 2021).

Gen koji kodira izoenzim *CYP2C9* visoko je polimorfan te je, do danas, identificirano preko 60 različitih alela (od *1 do *71), a barem 20 njih dokazano mijenja aktivnost *CYP2C9* (www.pharmvar.org; Pratt i sur., 2019). Funkcionalna značajnost mnogih varijanata *CYP2C9* naširoko je istraživana, osobito u slučaju alela s velikom učestalosti. Detaljni podatci o strukturi proteina omogućuju *in silico* predviđanje učinka promjena aminokiselina, utvrđenih sekvenciranjem, na funkciju proteina. Učinak varijanata poznat je također iz *in vitro* istraživanja ekspresije te *in vivo* istraživanja fenotipova. Vrijedi napomenuti da se kinetički parametri (K_m), pa tako i klirens *CYP2C9* supstrata, razlikuju među različitim izvorima izoenzima (jetreni mikrosomi, rekombinantni *CYP2C9* eksprimiran u različitim staničnim linijama), stoga pri interpretaciji podataka treba biti oprezan. Produkti gena *CYP2C9*3*, *CYP2C9*5*, *CYP2C9*6*, *CYP2C9*11*, *CYP2C9*12* i *CYP2C9*13* dokazano posjeduju smanjenu aktivnost, dok za produkte nekih alela, kao što su *CYP2C9*2*, *8 i *9, situacija nije jednoznačna (Daly i sur., 2017). Supstitucija Ile359Leu u egzonu 7, koja se povezuje s haplotipom *CYP2C9*3*, rezultira smanjenjem klirensa supstrata *CYP2C9* za 70-90 % u *in vitro* uvjetima (Daly i sur., 2017; Zanger i Schwab, 2013). Mutirani homozigoti (*3/*3) imaju smanjenu metaboličku aktivnost

za više od 80 % za sve supstrate CYP2C9, uključujući tolbutamid i fenitoin. Heterozigoti (*1/*3) imaju upola manji klirens S-varfarina, tolbutamida, fluvastatina, glimepirida, tenoksikama, kandesartana, celekoksiba i fenitoina u odnosu na divlji tip (Daly i sur., 2017; Zanger i Schwab, 2013; Van Booven i sur., 2010). CYP2C9*6 rijetki je *null* alel karakteriziran potpunim odsustvom aktivnosti enzima uzrokovanog *frameshift* mutacijom koja rezultira preranom ugradnjom stop kodona te, posljedično, sintezom krnjega proteina (Van Booven i sur., 2010). Za navedeni su alel zabilježeni slučajevi centralne neurotoksičnosti fenitoina. Varijante CYP2C9*5 i CYP2C9*11 (c.1003C>T, p.Arg335Trp, rs28371685) definirane su *missense* varijacijama u egzonu 7 koje rezultiraju smanjenom aktivnosti enzima. Kod pacijenata s identificiranim alelima CYP2C9*6 i *11 nužna je prilagodba doze varfarina zbog povećane koncentracije u krvi (Pratt i sur., 2019). Veličina redukcije enzimske aktivnosti povezane s CYP2C9*2 haplotipom, koji posjeduje nesinonimnu varijaciju u egzonu 3, ovisna je o supstratu te je za neke supstrate metabolizam smanjen za 50 % od divljega tipa (Pratt i sur., 2019; Daly i sur., 2017; Van Booven i sur., 2010). Mutirani homozigoti (*2/*2) imaju značajno smanjeni klirens S-enantiomera acenokumarola i varfarina, fenitoina, tolbutamida, ibuprofena, nateglinida, fluvastatina i fenprokumona u usporedbi sa zdravim homozigotom (*1/*1) (Daly i King, 2006; Kircheiner i Brockmüller, 2005). Za navedene lijekove, izuzev varfarina i acenokumarola, klirens je smanjen i kod heterozigota (Van Booven i sur., 2010; Kircheiner i Brockmüller, 2005). Utjecaj nesinonimne varijacije u egzonu 3 alela CYP2C9*8 (c.449G>A, p.Arg150His, rs7900194) na funkciju proteina ovisan je o supstratu: za varfarin i fenitoin pokazuje smanjenu aktivnost, dok je za tolbutamid učinak suprotan. Dva polimorfizma u promotorskoj regiji gena (c.-1766T>C, rs9332094 i -1188T>C, rs4918758), koji se javljaju zajedno sa supstitucijom Arg150His te povezuju sa smanjenom ekspresijom CYP2C9 također mogu pridonijeti učinku alela (Pratt i sur., 2019). Računalne simulacije predviđaju smanjenje aktivnosti izoenzima kodiranoga genom CYP2C9*9, dok nikakav učinak na klirens fenitoina nije uočen *in vivo*. *In vitro* istraživanja pokazala su neznatno i statistički beznačajno smanjenje klirensa varfarina i tolbutamida. (Daly i sur., 2017). Prema PharmVar bazi, pojedinci s pozitivnom CYP2C9*9 varijantom imaju potpuno funkcionalni enzim (www.pharmvar.org).

Iako *missense* mutacije u kodirajućoj regiji gena definiraju funkcionalnost CYP2C9, smatra se da polimorfizmi u promotorskoj regiji pridonose varijabilnosti ekspresije, a time i karakteristikama fenotipova, neovisno o poznatim varijantama u kodirajućim regijama (Daly i sur., 2017; Zanger i Schwab, 2013; Van Booven i sur., 2010). Poznato je da, osim s regulatornim elementima, CYP2C9 može biti u veznoj neravnoteži (engl. *linkage disequilibrium*) s drugim genima CYP2C klastera. 2002. godine prvi je puta pokazano da su gotovo svi pojedinci s

dokazanom *CYP2C9**2 varijantom bili pozitivni i na *CYP2C8**3, alel definiran dvjema nesinonimnim mutacijama za koje se vjeruje da smanjuju aktivnost enzima. Jedno je istraživanje pokazalo postojanje vezne neravnoteže između dvaju polimorfizama u promotorskoj regiji *CYP2C9* i nefunkcionalnih alela *CYP2C19**2 te *CYP2C19**3. Međutim, vjeruje se da spomenuti polimorfizmi ne utječu na ekspresiju *CYP2C9*, stoga združeni učinak na metabolizam lijekova nije vjerojatan. Varijacija u promotorskoj regiji *CYP2C18* – rs12777823, smještena daleko uzvodno u odnosu na *CYP2C9*, povezuje se s povećanim metabolizmom varfarina, što zahtijeva prilagodbu doze u Afroamerikanaca (Daly i sur., 2017).

1.3.3. Učestalost polimorfizama *CYP2C9*

Učestalost pojedina *CYP2C9* alela značajno se razlikuje među etničkim populacijama (Du i sur., 2016). Aleli *CYP2C9**2 i *3 najbolje su istražene i najčešće varijante *CYP2C9* (Daly i sur., 2017). Baza *Exome Aggregation Consortium (ExAC)* pruža opsežne informacije o učestalosti velikog broja polimorfizama *CYP2C9* u populacijama (GnomAD browser, 2021; Karczewski i sur., 2017). Prema toj bazi, *CYP2C9**2 i *3 imaju vrlo veliku učestalost u usporedbi s drugim varijantama, međutim njihova se frekvencija razlikuje od populacije do populacije. *CYP2C9**2 vrlo se rijetko javlja u istočnoazijskoj populaciji (0,21 %), dok je *CYP2C9**3 najučestalija varijanta (3,76 %), a slijedi je *CYP2C9**52. Frekvencija *CYP2C9**3 velika je i u južnoazijskoj populaciji (10,99 %), u kojoj najveću učestalost ima varijanta *CYP2C9**2 (11,38 %). U populaciji afričkoga podrijetla učestalost alela *CYP2C9**8 (13,48 %) i *9 (12,96 %) veća je od učestalosti *CYP2C9**2 (3,5 %) i *3 (2,47 %), koji su najčešće varijante u Europljana (12,73 %, odnosno 7,55 %). Također, *CYP2C9**11 približno je 25 puta češći u Afrikanaca (3,96 %) u usporedbi s europskom populacijom (0,16 %), iako je *CYP2C9**11, zajedno s *CYP2C9**12, nakon *CYP2C9**2 i *3, alel s najvećom učestalosti u Europljana. Južnoindijska populacija često je pozitivna na varijante *CYP2C9**2 i *3, no značajna je i učestalost alela *CYP2C9**14, koji se puno rjeđe javlja u drugim populacijama (Whirl-Carillo i sur., 2021; Daly i sur., 2017).

Hrvatski su znanstvenici 2003. i 2016. godine, na 200, odnosno 1080 ispitanika, proveli istraživanje o učestalosti najčešćih varijantnih alela sustava CYP-a, uključujući *CYP2C9*, u hrvatskoj populaciji (Ganoci i sur., 2017; Božina i sur., 2003). Novijim istraživanjem ustanovljene su frekvencije od 14,5 % za alel *CYP2C9**2, odnosno 7,6 % za alel *CYP2C9**3 u populaciji Hrvatske (Ganoci i sur., 2017).

1.3.4. Klinička značajnost polimorfizama *CYP2C9*

Velika interindividualna varijabilnost aktivnosti enzima *CYP2C9* rezultira različitim terapijskim odgovorima te neželjenim reakcijama na primijenjeni lijek (Kirchheiner i Brockmüller, 2005). S obzirom da neki lijekovi-supstrati *CYP2C9* imaju uski terapijski raspon, genetski polimorfizmi uvelike pridonose incidenciji nuspojava. Zbog veličine reducirajućeg učinka na aktivnost enzima te relativno velike frekvencije u europskoj populaciji, aleli *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* od iznimne su kliničke važnosti (Zanger i Schwab, 2013). Navedeni haplotipovi smanjuju metabolizam većine supstrata, što dovodi do duljega zadržavanja lijeka u organizmu i povećanja koncentracije lijeka u krvi, a time se povećava rizik nastupanja ozbiljnih neželjenih reakcija. Aleli *CYP2C9*5*, **6*, **8* i **11*, koji se povezuju sa smanjenom funkcijom *CYP2C9*, najveću kliničku značajnost imaju u populaciji afričkoga podrijetla, u kojoj su najučestaliji (Johnson i sur., 2017).

Prema sposobnosti metaboliziranja lijekova-supstrata izoenzimom *CYP2C9*, pojedinac može biti spori (PM), srednje brzi (IM) ili normalni (NM) metabolizator (Caudle i sur., 2017). U bjelačkoj populaciji spori metabolizatori čine 3-5 % (Ganoci i sur., 2017). U Tablici 2, za svaki od navedenih fenotipova, prikazani su mogući diplotipovi najčešćih varijanti te njihov utjecaj na metabolički kapacitet.

Tablica 2. Odnos genotip-fenotip varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* (preuzeto i prilagođeno prema DPWG, 2021a)

Fenotip	Genotip*	Metabolički kapacitet
spori metabolizator (PM)	<i>*2/*2</i> <i>*2/*3</i> <i>*3/*3</i>	iznimno smanjen
intermedijarni metabolizator (IM)	<i>*1/*2</i> <i>*1/*3</i>	smanjen
normalni metabolizator (NM)	<i>*1/*1</i>	normalan

* diplotipovi su, za svaki fenotip, poredani prema padajućoj aktivnosti enzima

1.4. Validacija molekularnih metoda

Uvođenje molekularnoga genetičkoga testa u rutinski rad laboratorija složeni je proces koji zahtijeva detaljnu procjenu (engl. *validation*) valjanosti metode, a ključne su komponente analitička validacija, klinička validacija, klinička korisnost te društveni, etički i zakonski aspekt testa (Mattocks i sur., 2010; Haddow i Palomaki, 2003). Ovisno o dostupnosti specifikacija

izvedbe metode pod određenim uvjetima, provodi se potpuna validacija ili verifikacija metode (Mattocks i sur., 2010). Validacija je proces kojim se procjenjuje zadovoljava li metoda zahtjeve normi za namijenjenu svrhu (ISO 9000:2005 - Sustavi upravljanja kvalitetom - Temeljna načela i terminološki rječnik). Provodi se u slučajevima kada specifikacije izvedbe nisu dostupne, stoga se procjena vrši u usporedbi sa zlatnim standardom ili referentnom metodom. S obzirom na gotovo potpuno odsustvo referentnih testova ili certificirana referentna materijala u području molekularne dijagnostike, kao referentna metoda koristi se ona najpouzdanija (Mattocks i sur., 2010). Verifikacijom se potvrđuju ili opovrgavaju navodi proizvođača, odnosno specifikacije izvedbe metode (ISO 15189:2012 - Medicinski laboratoriji - Zahtjevi za kvalitetu i osposobljenost). Provodi se kod testova koji su odobreni za upotrebu u *in vitro* uvjetima (CE-IVDD, od engl. *CE-marked in vitro diagnostic device*), kod uvođenja novoga testa koji se temelji na već poznatoj tehnologiji (npr. sekvenciranje novoga gena) te kod testova koje je drugi laboratorij već validirao (Mattocks i sur., 2010).

Nakon donošenja odluke o uvođenju pojedinoga testa u rad laboratorija, potrebno je provesti procjenu dijagnostičkih postupaka i tehničkih specifikacija kako bi se osiguralo prikupljanje podataka relevantnih za postavljeno dijagnostičko pitanje te jasna identifikacija željenoga analita. To uključuje definiranje analita od interesa, osiguravanje potrebna materijala (oprema, reagensi, početnice, kontrolni materijal), odabir parametara koji će se ispitati i definiranje kriterija prihvatljivosti, osmišljavanje protoka rada te identificiranje ograničenja i kritičnih čimbenika koji bi mogli utjecati na izvedbu testa, primjerice dizajn početnice, duljina fragmenta, sastav G-C parova u području od interesa, vrsta i položaj mutacija unutar fragmenta. Također, važno je utvrditi kliničku korisnost pojedinih analiza te osigurati mjerenje samo analita od interesa, stoga je potrebno voditi računa o selektivnosti testa, mogućim interferencijama i kontaminaciji uzoraka. Glavni je cilj svakog validacijskog postupka ustanoviti zadovoljava li metoda, koja se želi uvesti u rutinski rad laboratorija, zahtjeve dijagnostičkoga standarda, preciznije ima li odgovarajuću razinu točnosti za namijenjenu svrhu te može li se ta razina održati u rutinskome radu. Razlikujemo analitičku i dijagnostičku točnost (engl. *accuracy*): analitička je točnost mjera slaganja dobivenih rezultata sa stvarnom vrijednosti analita, dok je dijagnostička točnost frekvencija dobivanja rezultata koji su u skladu sa stvarnim stanjem ispitanika (Mattocks i sur., 2010).

Tri su vrste molekularnih testova: kvantitativni, kategorički i kvalitativni. Rezultat kvantitativnoga testa broj je koji predstavlja količinu određenog analita u uzorku, a može biti izražen kao apsolutna (npr. mjerenje genske ekspresije) ili relativna (npr. mjerenje razine heteroplazmije mitohondrijskih alela) vrijednost (Mattocks i sur., 2010). Kod takvih je testova

potrebno odrediti istinitost (engl. *trueness*; bliskost slaganja između prosječne vrijednosti rezultata mjerenja i prave vrijednosti), na temelju koje se izračunava netočnost (engl. *bias*; razlika između srednje vrijednosti niza ponovljenih mjerenja i prave vrijednosti), i preciznost (bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja dobivenih u postavljenim uvjetima) (Čepelak i Štraus, 2009; Hauck i sur., 2008; Menditto i sur., 2007). Preciznost se izražava kao standardna devijacija ili koeficijent varijacije u nizu ponovljenih mjerenja, odnosno nepreciznost, a dijeli se na ponovljivost (engl. *repeatability*, *within-run precision*), intermedijarnu preciznost (engl. *intermediate precision*; međupreciznost, engl. *between-run precision* i ukupna preciznost, engl. *within-laboratory precision*) te reproducibilnost (engl. *inter-laboratory precision*) (Mattocks i sur., 2010; Čepelak i Štraus, 2009). Osim navedenih parametara, moguće je ispitati granicu detekcije (LoD, od engl. *limit of detection*; najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati s određenom vjerojatnošću) i granicu kvantifikacije (LoQ, od engl. *limit of quantification*; najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati definiranom preciznošću i istinitošću u definiranim uvjetima) (Mattocks i sur., 2010; WHO-BS/95.1793). Kategorijski se testovi koriste u slučajevima kada se kvantitativni podatci grupiraju u kategorije. Za procjenu izvedbe ovakvog testa određuju se isti parametri kao kod kvantitativnih testova, no u ovome se slučaju istinitost i preciznost mogu odrediti na razini kategorije, kao i na razini primarnih sirovih podataka. Kvalitativni su testovi granični oblik kategorijskih testova jer se rezultati grupiraju u samo dvije kategorije – pozitivno i negativno. Odluka o pripadnosti rezultata pojedinoj kategoriji donosi se na temelju granične vrijednosti (engl. *cut-off*) kvantitativna rezultata ili prisustva odnosno odsustva signala. U kontekstu analitičke točnosti, rezultat može biti točan ili netočan te su moguća 4 ishoda: stvarno pozitivni (TP, od engl. *true positive*), stvarno negativni (TN, od engl. *true negative*), lažno pozitivni (FP, od engl. *false positive*) i lažno negativni (FN, od engl. *false negative*) rezultat. Navedeni se ishodi koriste u izračunu dijagnostičke osjetljivosti (udio pozitivnih rezultata ispravno identificiranih testom) i specifičnosti (udio negativnih rezultata ispravno identificiranih testom), parametara koji opisuju dijagnostičku točnost, prema sljedećim jednadžbama:

$$\text{dijagnostička osjetljivost} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}},$$

$$\text{dijagnostička specifičnost} = \frac{\text{TN}}{\text{TN} + \text{FP}}.$$

Dijagnostička se točnost može opisati i udjelom ispravno identificiranih rezultata u ukupnom broju testova prema sljedećoj jednadžbi:

$$\text{dijagnostička točnost} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{FP} + \text{TN} + \text{FN}}.$$

Kod sve tri vrste molekularnih testova korisno je ispitati robusnost metode – sposobnost metode da pouzdano odredi analit pod uvjetima koji nisu optimalni (Mattocks i sur., 2010; Čepelak i Štraus, 2009). Varijabilni uvjeti u laboratoriju uključuju vrstu uzorka (puna krv uzeta na antikoagulant EDTA), rukovanje uzorkom, kvalitetu uzorka, koncentraciju DNA, lot reagensa, model mjerna instrumenta i uvjete okoliša (temperatura, vlažnost) (Mattocks i sur., 2010).

Broj uzoraka korištenih u validacijskom postupku određuje pouzdanost dobivenih rezultata. Za većinu primjena dovoljno je uključiti jednaki broj pozitivnih (mutiranih) i negativnih (divlji tip) uzoraka. Međutim, u situacijama kada su dijagnostička osjetljivost i specifičnost osobito važne, broj uzoraka može se prilagoditi po kategoriji. Također, korisno je analizu uzoraka napraviti u više ponavljanja (engl. *replicates*) kako bi se smanjila vjerojatnost ponovnih analiza zbog neuspjelih rezultata, čime se štedi na vremenu. Tako dobiveni podatci mogu se upotrijebiti u procjeni preciznosti (ponovljivosti i/ili reproducibilnosti) (Mattocks i sur., 2010).

Vođenje jasne i opsežne dokumentacije cijeloga validacijskog postupka iznimno je važno. Prilikom izvještavanja o rezultatima validacije, važno je uključiti izvedene parametre dijagnostičke točnosti, intervale pouzdanosti te sve podatke koji bi mogli utjecati na interpretaciju tih parametara, kao što su kriteriji odabira uzoraka, vrsta uzoraka, detaljni podatci o korištenoj referentnoj metodi i opremi, tehnički detalji, popravne radnje te ispitani kritični čimbenici. Rezultati analitičke validacije odnosno verifikacije određuju hoće li se, i na koji način, ispitana metoda uvesti u rutinski rad laboratorija te koji se zahtjevi moraju ispunjavati tijekom validacije koja će se kontinuirano provoditi u rutinskome radu. Kontinuirana validacija mora uključivati rezultate unutarnje i vanjske kontrole kvalitete te nesukladnosti metode i opreme (Mattocks i sur., 2010).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Sustav citokroma P450 sudjeluje u biotransformaciji 70-80 % svih lijekova, a njih 15 % podliježe katalizi izoformom CYP2C9. Upravo je zbog toga CYP2C9 jedan od najvažnijih enzima CYP sustava. Većina njegovih supstrata ima uski terapijski raspon, stoga svaka promjena u aktivnosti i ekspresiji tog enzima može utjecati na terapijski učinak i sigurnost lijeka. Gen *CYP2C9* iznimno je polimorfan, a smatra se da su genski polimorfizmi odgovorni za čak trećinu neželjenih reakcija na lijekove. Mnoga su istraživanja pokazala superiornost liječenja temeljena na genotipu *CYP2C9*, odnosno personalizirana pristupa liječenju nad uobičajenim pristupom. Upravo zbog toga, u svrhu optimizacije terapije i liječenja te povećanja sigurnosti lijeka, u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, provodi se genotipizacija *CYP2C9*.

Cilj je ovoga rada prikazati postupak farmakogenetičke analize gena *CYP2C9*, objasniti utjecaj genskih varijacija na terapijski učinak i sigurnost lijekova-supstrata enzima CYP2C9 te ukazati na važnost individualizacije terapije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Izdvajanje DNA metodom *FlexiGene*[®]

Uzorak:

- puna krv uzeta u spremnik s antikoagulantom K₃-EDTA

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikropruvete volumena 1,5-2,0 mL
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga Centrifuge 5425 Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)
- termostat

Reagensi:

- reagens za izdvajanje DNA *FlexiGene*[®] - *Qiagen* (Qiagen, Njemačka)
- otopljena *QIAGEN Protease*

Priprema reagenasa:

QIAGEN Protease otopi se u 0,3 mL pufera *FG3* do sat vremena prije uporabe.

Postupak izdvajanja DNA iz pune krvi:

1250 µL pufera *FG1* (liza stanica) pipetira se u mikropruvetu volumena 2 mL, dodaje se 500 µL krvi i promiješa okretanjem mikropruvete 5 puta, nakon čega se centrifugira u mikrocentrifugi 20 s pri 10000 g. Supernatant se odlije, a mikropruvetu se ostavi naopako naslonjenu na sloj upijajućeg papira, pritom treba paziti da talog ostane u mikropruveti. Nakon 2 min, talogu se dodaje 250 µL već pripremljenog pufera *FG2/QIAGEN Protease* (razgradnja proteina), mikropruveta se zatvori i odmah promiješa na vrtložnoj miješalici dok se talog ne homogenizira. Ukoliko je uzorak želatinozan, potrebno je dodati još 50 µL pufera *FG2/QIAGEN Protease* i ponovno promiješati na vrtložnoj miješalici. Nakon homogeniziranja, mikropruveta se kratko centrifugira 3 – 5 s te se inkubira u termostatu 5 min na 65 °C, pri čemu se boja uzorka mijenja iz crvene u zelenu zbog razgradnje proteina. Uzorku se dodaje 250 µL 100 % izopropanola (precipitacija DNA), temeljito se promiješa okretanjem mikropruvete te se centrifugira 3 min pri 10000 g (u slučaju slabog taloga, potrebno je produžiti

centrifugiranje). Supernatant se odlije te se mikroeprevetu nakratko ostavi naopako naslonjenu na sloj upijajućeg papira pazeći da bijeli talog ostane u mikroepreveti. Potom se talogu dodaje 250 μL 70 % etanola (ispiranje DNA), promiješa se 5 min na vrtložnoj miješalici te se centrifugira 3 min pri 10000 g. Supernatant se odlije, a mikroeprevetu se ostavi naopako naslonjenu na sloj upijajućeg papira najmanje 5 min, pritom treba paziti da talog ostane u mikroepreveti. Nakon petominutnog sušenja na zraku, talogu se dodaje 200 μL pufera *FG3* (otapanje DNA), lagano se promiješa 5 s na vrtložnoj miješalici te se uzorak inkubira u termostatu 1 h na 65 °C ili se ostavi na sobnoj temperaturi preko noći.

3.2.Mjerenje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija DNA mjeri se na spektrofotometru te izračunava na temelju optičke gustoće (OD, od engl. *Optical Density*) otopine pri valnoj duljini od 260 nm prema sljedećoj formuli:

$$\text{koncentracija DNA } \left(\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) = \text{OD}_{260} \times \text{razrjeđenje} \times 50$$

Određivanje čistoće DNA temelji se na spektrofotometrijskom mjerenju optičke gustoće otopine (apsorbancije) pri valnim duljinama od 260 nm i 280 nm. Omjer očitavanja A_{260}/A_{280} od 1,7-1,9 ukazuje na visoku čistoću DNA bez prisutnosti proteina.

Oprema:

- spektrofotometar za određivanje koncentracije i čistoće nukleinskih kiselina te koncentracije proteina NanoDrop Lite (Thermo Scientific, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 μL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)

Postupak mjerenja koncentracije i čistoće DNA:

Pipetira se 1 μL TE pufera i stavlja na uređaj, čime se uklanja odziv instrumenta na sastavnice matriksa, kapljica se briše slojem upijajućeg papira, nakon čega slijedi mjerenje u uzorcima. Najprije se prethodno izdvojena DNA otopljen u TE puferu promiješa na vrtložnoj miješalici dok se uzorak ne homogenizira, a potom se pipetira 1 μL uzorka i stavlja na uređaj.

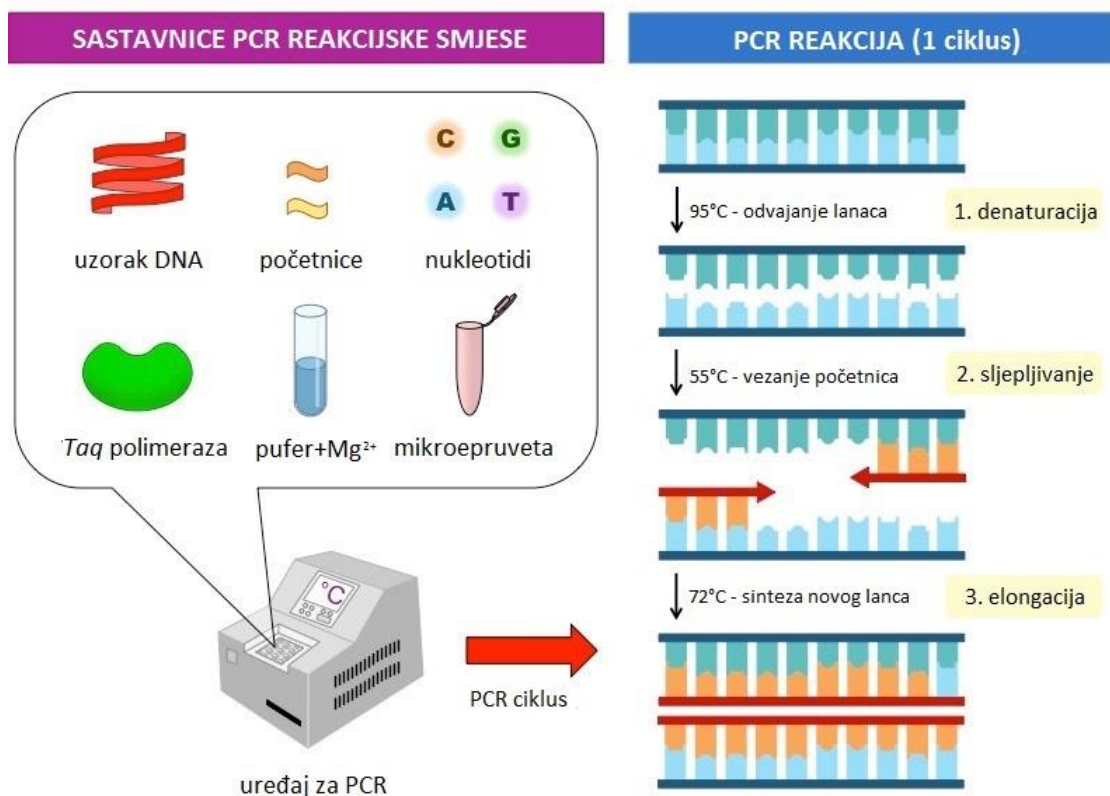
3.3. Genotipizacija *CYP2C9*

3.3.1. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*), još nazvana kvantitativni PCR (qPCR, od engl. *quantitative PCR*), temelji se na PCR-u, kojim se, od vrlo male početne količine uzorka, u *in vitro* uvjetima, može sintetizirati veliki broj kopija DNA. Osim umnažanja specifičnih fragmenata DNA, *real-time* PCR omogućuje kvantifikaciju DNA u reakcijskoj smjesi u stvarnome vremenu, dakle tijekom odvijanja PCR reakcije. Ova metoda omogućuje izračunavanje početne koncentracije DNA, stoga se često koristi u procjeni broja kopija DNA, virusnog opterećenja, detekciji polimorfizama jednoga nukleotida (SNP, od engl. *single nucleotide polymorphism*) i alelnoj diskriminaciji (Dymond, 2013.).

Svaka PCR reakcijska smjesa zahtijeva termostabilnu DNA polimerazu (*Taq* polimeraza), smjesu 4 deoksiribonukleozid-trifosfata (dNTP), izoliranu DNA, koja služi kao kalup za sintezu novih molekula, dvije specifične početnice (engl. *primers*), ione Mg^{2+} i pufer. U svrhu povećanja specifičnosti i prinosa, uvjeti PCR reakcije moraju se optimizirati prilagodbom sastavnica reakcijske smjese, uključujući koncentraciju $MgCl_2$, relativnu koncentraciju DNA kalupa, početnica, dNTP i DNA polimeraze, temperaturu te vrijeme vezanja i produljivanja početnica. Za reakciju ključna je termostabilna *Taq* DNA polimeraza, koja produljuje početnice hibridizirane na ciljni slijed DNA od 5' prema 3' kraju. Izolirana je iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, optimalnu aktivnost ima pri 72 °C, no podnosi ponavljajuća izlaganja temperaturama do 95 °C. PCR reakcija provodi se u 20-50 ciklusa, a svaki se sastoji od 3 koraka – denaturacija, sljepljivanje početnica, elongacija, koji se provode u različitim uvjetima temperature i vremena. Denaturacija se obično provodi 20 s na 94 °C, sljepljivanje početnica 20 s na 55 °C, a elongacija 30 s na 72 °C (Hoy, 2013).

Nakon pripreme PCR reakcijske smjese, provodi se umnažanje (engl. *amplification*) ciljnog fragmenta DNA. Dvolančana DNA (dsDNA, od engl. *double-stranded DNA*) denaturira se zagrijavanjem kako bi se omogućilo razdvajanje dvolančane DNA u pojedinačne lance (ssDNA, od engl. *single-stranded DNA*) te potom sljepljivanje (engl. *annealing*) početnica na 3' kraj jednolančane ciljne molekule DNA. *Taq* polimeraza produljuje hibridizirane početnice ugradnjom određenih deoksiribonukleozid-trifosfata, pri čemu koristi jednolančanu DNA kao kalup za sintezu novoga komplementarnoga lanca DNA. U idućim ciklusima novosintetizirane jednolančane molekule DNA, kao i početna DNA, služe kao kalup za sintezu novih lanaca. Nakon n broja ciklusa, od jedne kopije DNA dobije se 2^n identičnih kopija (Hoy, 2013.).

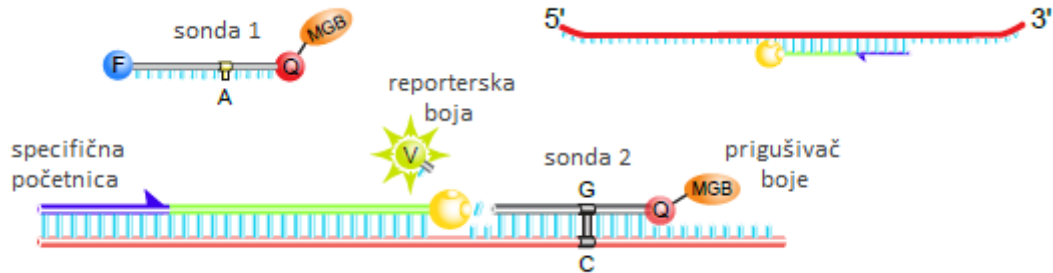


Slika 1. Sastavnice reakcijske smjese i princip lančane reakcije polimerazom (PCR) (preuzeto i prilagođeno prema <https://microbenotes.com/polymerase-chain-reaction-pcr-principle-steps-applications/>)

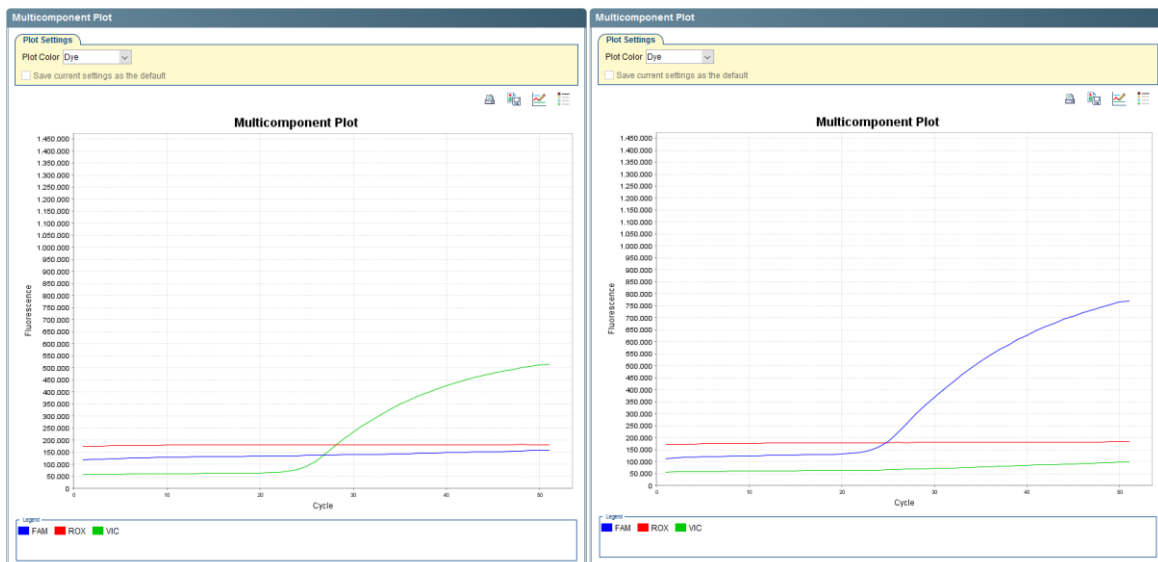
3.3.2. Genotipizacija *CYP2C9* *2 i *3 metodom *TaqMan*[®]

U svrhu genotipizacije *CYP2C9* *2 i *3, primjenjuje se *TaqMan*[®] metoda PCR u stvarnom vremenu, koja omogućuje otkrivanje i analizu SNP-a. Za umnažanje ciljnoga slijeda DNA koristi se *TaqMan*[®] Drug Metabolism Genotyping (*TaqMan*[®] DME) Assay koji sadrži specifične početnice i dvije *TaqMan*[®] fluorescentno obilježene oligonukleotidne sonde za detekciju alela, pri čemu se jedna sonda veže za divlji tip (engl. *wild type*), a druga za varijantni tip alela. Na 5'-kraju svake sonde nalazi se reporterska boja (engl. *reporter dye*) VIC[®] ili FAM[®], a na 3'-kraju nefluorescentni prigušivač (engl. *quencher*). Dok su reporterska boja i prigušivač na međusobno maloj udaljenosti, zbog preklapanja emisijskog spektra reporterske boje i ekscitacijskog spektra prigušivača, dolazi do rezonantnog prijenosa energije (FRET, engl. *fluorescence resonance energy transfer*) pa izostaje fluorescentni signal. Međutim, oslobađanjem reporterske boje od prigušivača povećava se udaljenost, izostaje FRET i opaža se fluorescencija (Dymond, 2013.). Tijekom PCR reakcije, početnice i sonde vežu se na ciljni slijed DNA, *Taq* polimeraza produljuje početnice te svojom 5'-egzonukleaznom aktivnošću

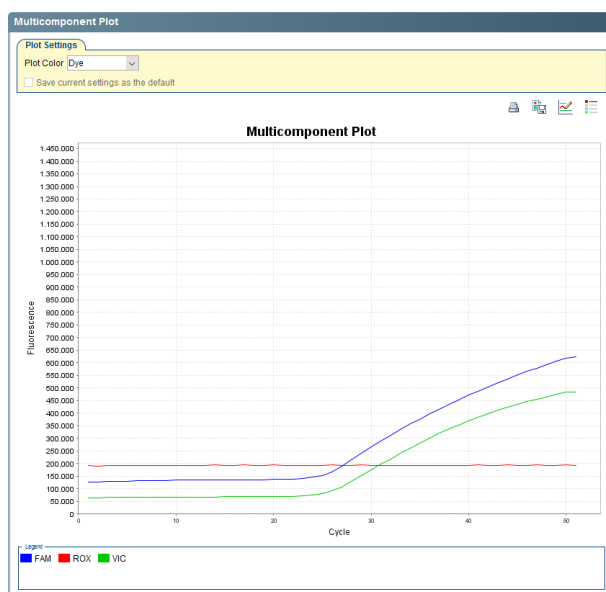
kida sonde hibridizirane na ciljnu slijed DNA, što dovodi do odvajanja prigušivača od reporterske boje koja tada emitira fluorescenciju. Opaženi fluorescentni signal detektira se i analizira pomoću računalnog programa. Prisutnost određenog fluorescentnog signala VIC[®] i/ili FAM[®] ukazuje na prisutnost odgovarajućih alela: sonda čiji slijed nije komplementaran slijedu baza u genu neće se razgraditi, što rezultira odsustvom tog signala.



Slika 2. Polimerizacija i generiranje signala metodom *TaqMan*[®] (preuzeto i prilagođeno prema *TaqMan*[®] SNP Genotyping Assays User Guide, Pub. No. MAN0009593, Rev. B.0, Thermo Fisher Scientific, 2017)



Slika 3. Prisutnost samo jednog fluorescentnog signala, VIC[®] (lijevo) ili FAM[®] (desno), ukazuje na homozigotni genotip



Slika 4. Prisutnost oba fluorescentna signala, VIC[®] i FAM[®], ukazuje na heterozigotni genotip

Oprema:

- uređaj za PCR u stvarnom vremenu 7500 Real-Time PCR System Applied Biosystems (Applied Biosystems, SAD)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 µL
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Centrifuge 5810R Eppendorf (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi:

- *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix*
- *TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2C9*2 (ID: C_25625805_10)*
- *TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping Assay CYP2C9*3 (ID: C_27104892_10)*

Uzorci DNA:

- *CYP2C9*2 *1/*1*
- *CYP2C9*2 *1/*2*
- *CYP2C9*2 *2/*2*
- *CYP2C9*2* negativna kontrola (NTC, od engl. *negative template control*)
- *CYP2C9*3 *1/*1*
- *CYP2C9*3 *1/*3*
- *CYP2C9*3 *3/*3*
- *CYP2C9*3* negativna kontrola (NTC, od engl. *negative template control*)

Priprema reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu:

Prilikom pripreme reakcijske smjese za PCR u stvarnom vremenu, najprije je potrebno izvaditi i pripremiti reagense te razrjeđenja DNA s destiliranom vodom za PCR.

Tablica 3. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Koncentracija u reakcijskoj smjesi
<i>TaqMan</i> [®] <i>Universal PCR Master Mix</i>	12,5	1×
<i>TaqMan</i> [®] <i>DME Assay Mix</i> [*]	1,25	1×
DNA razrjeđenje	11,25	1-20 ng
ukupni volumen reakcijske smjese	25	

* za analizu svakog polimorfizma, koristi se odgovarajući *TaqMan*[®] *DME Assay*

Reagensi se lagano promiješaju na vrtložnoj miješalici te centrifugiraju u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 okretaja u minuti (rpm, od engl. *revolutions per minute*) kako bi se sadržaj bočica spustio na dno. U mikroepruvetu pipetira se 12,5 μL *TaqMan*[®] *Universal PCR Master Mix* i 1,25 μL *TaqMan*[®] *DME Assay*, lagano se promiješa protresanjem mikroepruvete prstom i centrifugira 3-5 s. Pripremljena reakcijska smjesa pipetira se u mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroepruvete te se dodaje 11,25 μL razrijeđene DNA, a za negativnu kontrolu, umjesto uzorka, stavlja se ista količina destilirane vode za PCR. Mikrotitarska pločica zatvara se pokrovnom optičkom folijom, a „strip“ mikroepruvete poklopcima te se centrifugiraju u centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s pri 3000 rpm. Uzorci se stavljaju na uređaj ABI 7500 i pokreće se odgovarajući program (alelna diskriminacija ili amplifikacija). Nakon završetka programa, očitava se rezultat kako je navedeno za odgovarajući polimorfizam u Tablici 5.

Tablica 4. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *CYP2C9* na uređaju ABI 7500

	PCR (50 ciklusa)				
	<i>Pre-PCR Read</i>	Inicijacija	Denaturacija	Amplifikacija	<i>Post-PCR Read</i>
temperatura/trajanje	60 °C/1'	50 °C/2' 95 °C/10"	95 °C/15"	60 °C/90"	60 °C/1'

Tablica 5. Interpretacija signala za alele *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3*

	<i>CYP2C9*2</i>		<i>CYP2C9*3</i>	
<i>TaqMan</i> [®] DME Assay ID	C_25625805_10		C_27104892_10	
Reporterska boja	Nukleotid	Tip alela	Nukleotid	Tip alela
VIC [®]	C	divlji	C	mutirani
FAM [®]	T	mutirani	A	divlji

3.4. Validacija metode genotipizacije za kliničku primjenu

U svrhu validacije metode genotipizacije, provodi se ispitivanje preciznosti i točnosti. Ispitivanje preciznosti obuhvaća provjeru preciznosti u seriji te preciznosti iz dana u dan. Obje podrazumijevaju analizu uzorka s dokazanim nepromijenjenim genotipom (divlji tip) te uzoraka nositelja mutacije kojima je dokazana molekulska promjena (heterozigot i homozigot). Kod provjere preciznosti u seriji, uzorci se analiziraju u 10 ponavljanja u jednom danu, dok se kod provjere preciznosti iz dana u dan uzorci analiziraju kroz 10 dana. Rezultati se izražavaju kao postotak.

Ispitivanje točnosti obuhvaća analizu uzoraka s dokazanom molekulskom promjenom te uzoraka bez molekulske promjene, pri čemu broj analiziranih uzoraka treba prilagoditi učestalosti promjene, odnosno poremećaja. Analiza se provodi u jednome danu, a rezultat se izražava kao postotak.

Prilikom validacije, provodi se unutarnja kontrola kvalitete rada. Nekoliko je mogućih vrsta kontrolna materijala: (1) komercijalne kontrole, (2) uzorci vanjske kontrole kvalitete (VKK), (3) kontrole dobivene sekvenciranjem te (4) kontrole pripremljene u laboratoriju – uzorci DNA ispitanika kojima je utvrđena određena mutacija/polimorfizam i normalni uzorci (nije utvrđena mutacija/polimorfizam), pod uvjetom da je za utvrđivanje genotipa primijenjena metoda za koju je dobiven certifikat VKK i/ili dvije različite metode te da su analizirani s uzorcima VKK ili komercijalnim kontrolama. Također, u svrhu utvrđivanja prisustva

kontaminacije reagenasa, u svakoj se analizi koristi i negativna kontrola (NTC, od engl. *negative template control*).

Za provedbu validacije metode genotipizacije *CYP2C9* korišteni su uzorci s genotipovima *CYP2C9**1/*1, *1/*2, *2/*2, *1/*3, *3/*3 utvrđenim već akreditiranom metodom, uzorci vanjske kontrole kvalitete s dostupnim rezultatima organizatora te negativna kontrola.

4. REZULTATI

Rezultati validacije metode genotipizacije *CYP2C9* dobiveni ispitivanjem preciznosti i točnosti prikazani su u ovome poglavlju.

4.1. Preciznost

4.1.1. Preciznost u seriji

Preciznost u seriji ispitivala se u 10 ponavljanja u seriji na trima uzorcima međusobno različitih genotipova, od čega je jedan bio dokazani divlji tip, a druga dva polimorfni tipovi alela *CYP2C9*2* (Tablica 6).

Tablica 6. Rezultati ispitivanja preciznosti u seriji na trima uzorcima za *CYP2C9*2*

<i>CYP2C9*2</i>				
Ponavljanje	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	
1.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	Dobiveni rezultat
2.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
3.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
4.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
5.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
6.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
7.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
8.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
9.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
10.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
Očekivani rezultat	*1/*1	*1/*2	*2/*2	

Rezultati ispitivanja preciznosti u seriji pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sva 3 uzorka.

Preciznost u seriji ispitivala se u 10 ponavljanja u seriji na trima uzorcima međusobno različitih genotipova, od čega je jedan bio dokazani divlji tip, a druga dva polimorfni tipovi alela *CYP2C9*3* (Tablica 7).

Tablica 7. Rezultati preciznosti u seriji na trima uzorcima za *CYP2C9*3*

<i>CYP2C9*3</i>				
Ponavljjanje	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	
1.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	Dobiveni rezultat
2.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
3.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
4.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
5.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
6.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
7.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
8.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
9.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
10.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
Očekivani rezultat	*1/*1	*1/*3	*3/*3	

Rezultati ispitivanja preciznosti u seriji pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sva 3 uzorka.

4.1.2. Preciznost iz dana u dan

Preciznost iz dana u dan ispitivala se kroz 10 dana na trima uzorcima međusobno različitih genotipova, od čega je jedan bio dokazani divlji tip, a druga dva polimorfni tipovi alela *CYP2C9*2* (Tablica 8).

Tablica 8. Rezultati ispitivanja preciznosti iz dana u dan na trima uzorcima za *CYP2C9*2*

<i>CYP2C9*2</i>				
Dan	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	
1.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	Dobiveni rezultat
2.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
3.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
4.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
5.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
6.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
7.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
8.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
9.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
10.	*1/*1	*1/*2	*2/*2	
Očekivani rezultat	*1/*1	*1/*2	*2/*2	

Rezultati ispitivanja preciznosti iz dana u dan pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sva 3 uzorka.

Preciznost iz dana u dan ispitivala se kroz 10 dana na trima uzorcima međusobno različitih genotipova, od čega je jedan bio dokazani divlji tip, a druga dva polimorfni tipovi alela *CYP2C9*3* (Tablica 9).

Tablica 9. Rezultati ispitivanja preciznosti iz dana u dan na trima uzorcima za *CYP2C9*3*

<i>CYP2C9*3</i>				
Dan	Uzorak 1	Uzorak 2	Uzorak 3	
1.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	Dobiveni rezultat
2.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
3.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
4.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
5.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
6.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
7.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
8.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
9.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
10.	*1/*1	*1/*3	*3/*3	
Očekivani rezultat	*1/*1	*1/*3	*3/*3	

Rezultati ispitivanja preciznosti iz dana u dan pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sva 3 uzorka.

4.2.Točnost

Točnost se ispitivala na 10 različitih uzoraka poznatih genotipova, uključujući dokazani divlji tip te polimorfne tipove alela *CYP2C9*2* (Tablica 10).

Tablica 10. Rezultati ispitivanja točnosti na deset uzoraka za *CYP2C9*2*

<i>CYP2C9*2</i>		
Uzorak	Očekivani rezultat	Dobiveni rezultat
1	*1/*1	*1/*1
2	*1/*2	*1/*2
3	*1/*1	*1/*1
4	*1/*2	*1/*2
5	*2/*2	*2/*2
6	*1/*1	*1/*1
7	*1/*2	*1/*2
8	*1/*1	*1/*1
9	*1/*1	*1/*1
10	*1/*1	*1/*1

Rezultati ispitivanja točnosti pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sve analizirane uzorke.

Točnost se ispitivala na 10 različitih uzoraka poznatih genotipova, uključujući dokazani divlji tip te polimorfne tipove alela *CYP2C9*3* (Tablica 11).

Tablica 11. Rezultati ispitivanja točnosti na deset uzoraka za *CYP2C9*3*

<i>CYP2C9*3</i>		
Uzorak	Očekivani rezultat	Dobiveni rezultat
1	*1/*1	*1/*1
2	*1/*3	*1/*3
3	*3/*3	*3/*3
4	*1/*1	*1/*1
5	*1/*3	*1/*3
6	*3/*3	*3/*3
7	*1/*1	*1/*1
8	*1/*3	*1/*3
9	*1/*1	*1/*1
10	*1/*1	*1/*1

Rezultati ispitivanja točnosti pokazali su 100 % slaganje dobivenih vrijednosti s očekivanim vrijednostima – dokazanim genotipovima za sve analizirane uzorke.

5. RASPRAVA

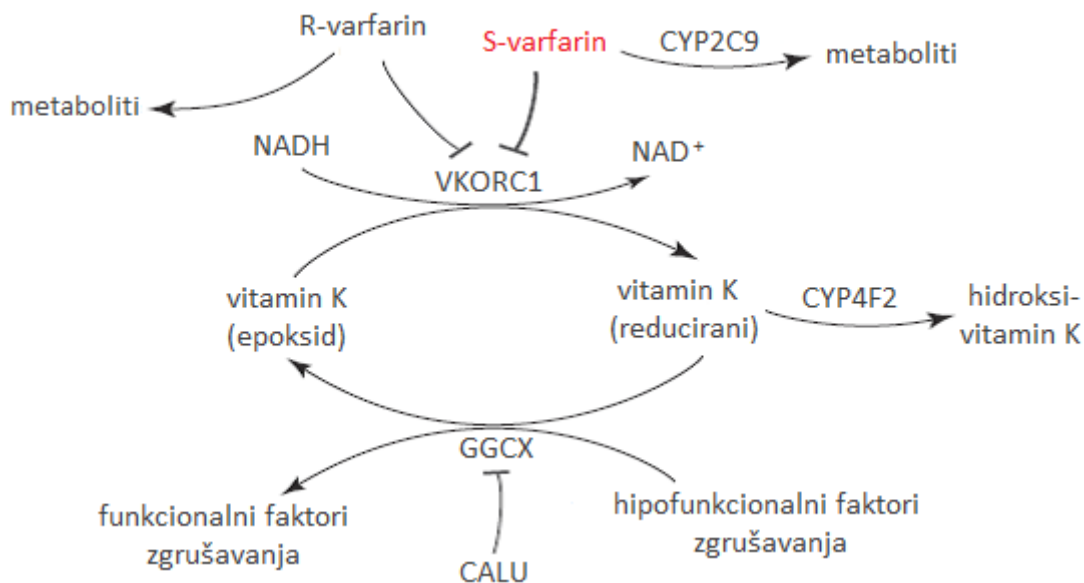
Promjene u metaboličkoj aktivnosti enzima uzrokovane polimorfizmima gena *CYP2C9* igraju glavnu ulogu u nastanku neželjenih reakcija na lijekove (Van Booven i sur., 2010). Zabilježeni su slučajevi neurotoksičnosti fenitoina, hipoglikemije uzrokovane antidijabeticima, gastrointestinalnih krvarenja i kardiovaskularne toksičnosti NSAID-a, krvarenja uzrokovanih oralnim antikoagulantima te bradikardije uzrokovane siponimodom (Sanguhl i sur, 2021; Zanger i Schwab, 2013). U svrhu sprječavanja takvih reakcija te optimizacije doze i liječenja, za navedene su lijekove objavljene kliničke smjernice za doziranje temeljene na genotipu *CYP2C9*. Smjernice su objavila profesionalna društva za primjenu farmakogenetike, kao što su Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenomike (CPIC, od. engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) (cpicpgx.org; Relling i sur., 2011), Nizozemska radna skupina za farmakogenetiku (DPWG, od. engl. *Royal Dutch Association for the Advancement of Pharmacy - Pharmacogenetics Working Group*) (www.knmp.nl; DPWG, 2021; Swen i sur., 2018; Swen i sur., 2011), Kanadsko farmakogenetičko društvo za sigurnost lijekova (CPNDS, od engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*) i drugi, a dostupne su na mrežnoj stranici *The Pharmacogenomics Knowledgebase* (PharmGKB) (www.pharmgkb.org; Whirl-Carrillo i sur., 2021). Važno je istaknuti da se genotipizacijom obično probire na samo najčešće varijante, stoga se utvrđeni genotip može razlikovati od stvarnog genotipa. Također, s obzirom da genski polimorfizmi nisu jedini čimbenici koji utječu na metabolizam, smjernice temeljene na genotipu samo su pomagalo u procjeni optimalne doze, koja bi trebala uključivati i procjenu drugih parametara te terapijsko praćenje lijeka (DPWG, 2021a).

5.1. Varfarin

Varfarin je najčešće propisivani antikoagulantni lijek, s uskim terapijskim rasponom, koji zahtijeva oprezno doziranje i terapijsko praćenje, a koristi ga 0,5-1,5 % zapadne populacije. Pripada skupini kumarina te se koristi u liječenju i prevenciji tromboembolijskih poremećaja (venska tromboza, plućna embolija, fibrilacija atrijske, umjetni srčani zalisci, ortopedske operacije) (Al Ammari i sur., 2020; Johnson i sur., 2017; Donaldson i Harrington, 2017). Zbog uskog terapijskog raspona i velike interindividualne varijabilnosti u postizanju željena antikoagulantna učinka, utvrđivanje odgovarajuće doze varfarina dugotrajan je proces koji može potrajati tjednima pa čak i mjesecima (Johnson i sur., 2017; Whirl-Carrillo i sur., 2012). U tom su periodu pacijenti izloženi povećanom riziku krvarenja ili tromboza uslijed predoziranja odnosno poddoziranja. Doza se obično određuje empirijski: početna se doza

temelji na prosjeku populacije (4-5 mg/dan), a potom se prilagođava na temelju vrijednosti internacionalnog normaliziranog omjera (INR, engl. *international normalized ratio*) (Johnson i sur., 2017). Da bi se postigao optimalni antikoagulantni učinak, vrijednosti INR-a trebaju se kretati unutar raspona 2,5-3,5 za pacijente s umjetnim srčanim zaliscima, odnosno 2,0-3,0 za pacijente s ostalim indikacijama (Sridharan i sur., 2021). Stabilne doze za postizanje optimalna INR-a u rasponu 2,0-3,0 kreću se 1-20 mg/dan. Komplikacije uzrokovane neodgovarajućim doziranjem varfarina među najčešće su prijavljenim neželjenim reakcijama i jedan od najčešćih razloga hitna prijema (Johnson i sur., 2017).

Varfarin se primjenjuje kao racemična smjesa S- i R-enantiomera. S-varfarin 3-5 puta je potentniji od R-varfarina i predominantno se metabolizira enzimom CYP2C9, dok se R-stereoizomer metabolizira brojnim enzimima, u najvećoj mjeri enzimom CYP3A4 (Johnson i sur., 2017; Whirl-Carillo i sur., 2012). Svoj učinak vrši inhibicijom vitamin K-epoksid-reduktaze (VKOR), membranskoga proteina čija je uloga redukcija oksidiranoga oblika vitamina K, vitamin K 2,3-epoksida, u aktivni oblik potreban za aktivaciju faktora zgrušavanja u procesu hemostaze. Reducirani (aktivni) oblik vitamina K, vitamin K hidrokinon, esencijalni je kofaktor u posttranslacijskoj reakciji karboksilacije γ -glutaminskih ostataka koagulacijskih faktora FII, FVII, FIX, FX te proteina C i S kataliziranoj gama-glutamil-karboksilazom (GGCX, engl. *gamma-glutamyl carboxylase*). Inhibicija dovodi do smanjenja koncentracije aktivnoga oblika vitamina K, smanjenja brzine reakcije karboksilacije te, posljedično, funkcionalno inaktivnih proteina ovisnih o vitaminu K (Johnson i sur., 2017; Tie i Stafford, 2008). U regulaciji vitamin K-ovisne karboksilacije sudjeluju kalumenin (CALU), protein koji inhibira djelovanje karboksilaze te CYP4F2, enzim koji uklanja vitamin K iz ciklusa (Johnson i sur., 2017). Varfarin stupa u interakcije s nekim lijekovima (inhibitori: amiodaron, fluvastatin, izoniazid; induktori: fenitoin, rifampicin, karbamazepin) i hranom bogatom vitaminom K (kelj, špinat, avokado) te se predominantno izlučuje putem bubrega (Whirl-Carillo i sur., 2012; Flockart i sur., 2021).



Slika 5. Shematski prikaz metabolizma varfarina i mehanizma njegova djelovanja (preuzeto i prilagođeno prema Johnson i sur., 2011)

Velika interindividualna varijabilnost u doziranju i odgovoru na terapiju varfarinom pripisuje se genskim polimorfizmima unutar gena odgovornih za farmakokinetiku i farmakodinamiku varfarina (Al Ammari i sur., 2020). Česte varijante gena *CYP2C9*, *VKORC1*, *CYP4F2* i *CYP2C* klastera (rs12777823) te negenetički čimbenici zaslužni su za oko 50 % varijabilnosti u doziranju varfarina (Johnson i sur., 2017). S obzirom da *CYP2C9* inaktivira S-varfarin, polimorfizmi koji smanjuju aktivnost enzima te dovode do porasta plazmatske koncentracije i jačeg farmakološkog učinka lijeka manifestiraju se porastom INR-a, odnosno većim rizikom krvarenja (Roden i sur., 2019). Pojedinci koji naslijede jednu ili dvije kopije alela *CYP2C9**2 ili *3, u usporedbi s normalnim metabolizatorima homozigotnim za *CYP2C9**1, trebaju manje doze varfarina za postizanje slična antikoagulantna učinka te dulje vrijeme za stabilizaciju INR-a (Johnson i sur., 2017).

Tablica 12. Kliničke smjernice za doziranje varfarina temeljene na genotipu *CYP2C9*
(preuzeto i prilagođeno prema DPWG, 2021b)

Fenotip	Genotip	Značaj	Smjernice
IM	<i>CYP2C9</i> *1/*2	Nema dovoljno dokaza o uzrokovanju problema prilikom uobičajene inicijalizacije terapije.	Prilagodba standardne doze nije potrebna.
	<i>CYP2C9</i> *1/*3	Smanjena pretvorba varfarina u inaktivne metabolite. Povećani rizik krvarenja.	Primjena 65 % standardne početne doze.
PM	<i>CYP2C9</i> *2/*2	Smanjena pretvorba varfarina u inaktivne metabolite. Povećani rizik krvarenja.	Primjena 65 % standardne početne doze.
	<i>CYP2C9</i> *2/*3	Smanjena pretvorba varfarina u inaktivne metabolite. Povećani rizik krvarenja.	Primjena 45 % standardne početne doze.
	<i>CYP2C9</i> *3/*3	Smanjena pretvorba varfarina u inaktivne metabolite. Povećani rizik krvarenja.	Primjena 20 % standardne početne doze.

VKORC enzimski je kompleks sastavljen od više proteinskih lanaca, a za njegovu je reduktivnu aktivnost u najvećoj mjeri zaslužna podjedinica 1 (VKORC1, engl. *vitamin K epoxid reductase complex subunit 1*) (DPWG, 2018; Li i sur., 2015a). Upravo je VKORC1 ciljna meta djelovanja varfarina. Brojni su polimorfizmi otkriveni u genu *VKORC1*, međutim dva česta SNP-a, -1639G>A i 1173C>T, identificirana u nekodirajućim regijama gena, objašnjavaju varijabilnost u osjetljivosti na kumarine (DPWG, 2018). Varijanta -1639G>A (rs9923231) smještena je u promotoru *VKORC1* te rezultira smanjenom ekspresijom i aktivnosti genskoga produkta, a varijanta 1173C>T smještena je u intronu 1 gena (DPWG, 2018; Li i sur., 2015b). Smanjena produkcija VKORC1 ograničava regeneraciju aktivnog oblika vitamina, što može pojačati učinak kumarina. Pacijenti s varijantnim alelima (-1639A/1173T) imaju veću osjetljivost na varfarin, stoga trebaju manje doze od pacijenata koji su homozigotni nositelji alela divljega tipa (-1639G/G, 1173C/C). S obzirom da se ova dva polimorfizma povezano nasljeđuju (engl. *linkage disequilibrium*), potrebna je genotipizacija samo jednog od njih. Njihova se učestalost razlikuje među bijelcima, crncima i Azijatima te je najveća u azijskoj populaciji (DPWG, 2018; Johnson i sur, 2017). Također, identificirano je nekoliko rijetkih nesinonimnih polimorfizama u kodirajućim regijama *VKORC1* koji dovode do rezistencije na varfarin, pri čemu vrijednost INR-a ne raste ni kod primjene vrlo velikih doza varfarina (Roden i sur., 2019; Johnson i sur., 2017).

Tablica 13. Kliničke smjernice za doziranje varfarina temeljene na genotipu *VKORC1*
(preuzeto i prilagođeno prema DPWG, 2021b)

Genotip	Značaj	Smjernice
<i>VKORC1</i> -1639 AA	Povećana osjetljivost na varfarin. Povećani rizik pretjerane inhibicije zgrušavanja krvi (INR > 4) tijekom 1. mj. terapije.	Primjena 60 % standardne početne doze.
<i>VKORC1</i> -1639 AG	Smanjenje doze te povećani rizik pretjerane inhibicije zgrušavanja krvi tijekom 1. mj. terapije.	Prilagodba standardne doze nije potrebna.*

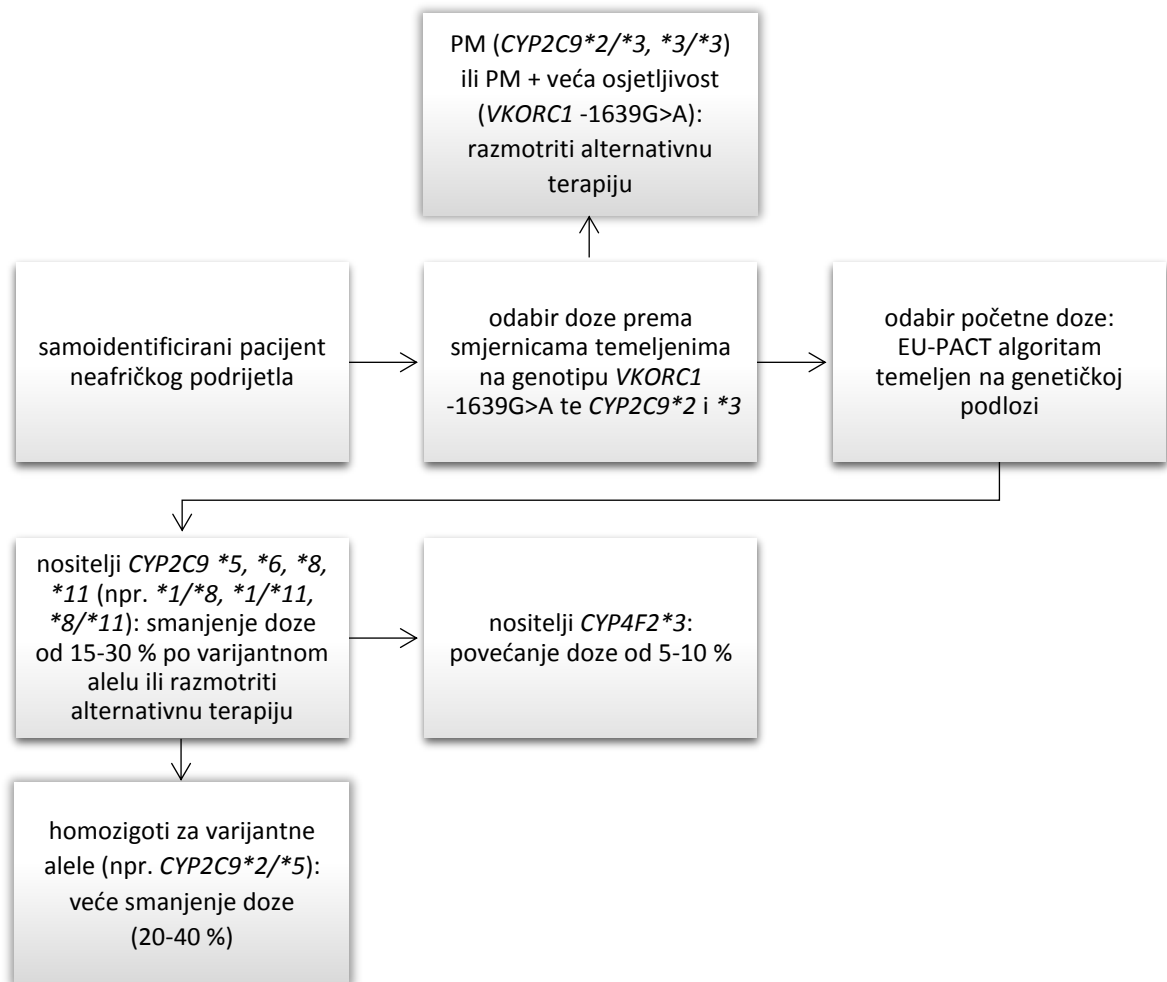
* S obzirom na mali učinak i veliku prevalenciju genotipa, standardno liječenje biti će primarno temeljeno na pacijentima s genotipom *VKORC1* -1639 AG.

CYP4F2 katalizira NADPH-ovisnu oksidaciju postraničnih lanaca vitamina K u jetri (Alverellos i sur., 2015). Pretvorbom hidrokinona u hidroksi-vitamin K, enzim inaktivira vitamin K te tako ograničava njegovo nakupljanje (Roden i sur., 2019, Johnson i sur., 2017). U genu *CYP4F2* otkrivena je varijanta *CYP4F2**3 (c.1297G>A, p.Val433Met, rs2108622), koja ima mali, ali značajni utjecaj na doziranje varfarina u nekim populacijama, osobito u Han Kineza. Smatra se da polimorfizam rezultira nižom razinom proteina uslijed sporije translacije ili ubrzane degradacije, zbog čega, prema podacima dviju meta-analiza, u nositelja varijantnog alela dozu treba povećati za 8-11 % (Johnson i sur., 2017; Alverellos i sur., 2015). Uključivanje *CYP4F2* u modele doziranja varfarina koji uključuju genotipizaciju *CYP2C9* i *VKORC1* te kliničke čimbenike povećalo je točnost predviđanja doze (Gage i sur., 2017), a njihovu korelaciju potvrđuju istraživanja provedena na osobama europskoga i azijskoga, ali ne i afričkoga podrijetla (Drozda i sur., 2015; Pirmohamed i sur., 2013; Kimmel i sur., 2013; Johnson i sur., 2017).

rs12777823 (g.96405502G>A) smješten je u nekodirajućoj regiji *CYP2C* klastera, blizu *CYP2C18*, na kromosomu 10 te ima veliku učestalost u Amerikanaca afričkog podrijetla (25 %). Pokazuje klinički značajan utjecaj na koncentraciju varfarina, neovisan o varijantama *CYP2C9**2 i *3. Cjelogenomske studije povezanosti (GWAS, od engl. *genome-wide association study*) provedene u populaciji Afroamerikanaca utvrdila su povezanost rs12777823 s dozom od oko 7 mg/tjedan u heterozigota, odnosno 9 mg/tjedan u homozigota. Iako je rs12777823 čest i u drugim populacijama, statistički značajna varijabilnost u doziranju varfarina uočena je samo u Amerikanaca afričkih korijena. Navedena opažanja ukazuju da spomenuti SNP sam nije uzrok, već se vjerojatno nasljeđuje zajedno s drugim polimorfizmima unutar haplotipa. Uključivanje rs12777823 u IWPC (engl. *International Warfarin*

Pharmacogenetics Consortium) algoritam doziranja povećava točnost predviđanja doze u populaciji afričkog podrijetla za 21 % (Johnson i sur., 2017; Perera i sur., 2013).

U odraslih pacijenata koji se ne identificiraju kao osobe afričkoga podrijetla preporučeni algoritam doziranja varfarina prikazan je na Slici 6. Ukoliko genotipizacija *VKORC1* te *CYP2C9**2 i *3 nije moguća, doziranje se vrši na temelju kliničkih algoritama doziranja, odnosno prema standardnom pristupu. U pedijatrijskoj populaciji doza se odabire prema odgovarajućim algoritmima temeljenim na genotipu *VKORC1* -1639G>A te *CYP2C9**2 i *3, ali samo u djece europskoga podrijetla jer za ostale etničke skupine ne postoje dokazi o važnosti tih alela. Kao i u odraslih, ukoliko genotipizacija *VKORC1* -1639G>A te *CYP2C9**2 i *3 nije moguća ili je dijete druge nacionalnosti, doziranje se vrši na temelju kliničkih algoritama doziranja, odnosno prema standardnom pristupu (Johnson i sur. 2017).



Slika 6. Farmakogenetički algoritam doziranja varfarina u odraslih pacijenata neafričkog podrijetla (preuzeto i prilagođeno prema Johnson i sur., 2017)

Tablica 14. Preporučene dnevne doze varfarina (mg/dan) za postizanje terapijskog INR-a prema kombinaciji genotipova *CYP2C9* i *VKORC1* (prema uputama o lijeku koje je odobrila FDA*)

Genotip <i>VKORC1</i> 1173C>T	Genotip <i>CYP2C9</i>					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
CC	5-7	5-7	3-4	3-4	3-4	0,5-2
CT	5-7	3-4	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2
TT	3-4	3-4	0,5-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2

* Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, od engl. *U. S. Food and Drug Administration*)

U svrhu procjene učinkovitosti doziranja varfarina temeljena na genotipu *CYP2C9* i *VKORC1*, provedena su klinička istraživanja koja su bila ograničena na alele *CYP2C9**2 i *3. U sudionika europskog podrijetla predterapijska je genotipizacija imala bolju kontrolu zgrušavanja te manji rizik krvarenja, tromboemboličnih događaja i smrti, dok je u osoba afričkih korijena imala suprotan učinak. Rezultate istraživanja objašnjava činjenica da se u Europljana predominantno javljaju aleli *CYP2C9**2 i *3, a u populaciji afričkoga podrijetla varijante *CYP2C9**5, *6, *8 i *11 (Sanguhl i sur., 2021). Hrvatska su istraživanja također potvrdila da liječenje temeljeno na genotipu skraćuje vrijeme potrebno za stabilizaciju i poboljšava kontrolu zgrušavanja, a time i klinički ishod u pacijenata s akutnim moždanim udarom te fibrilacijom atrijske (Makar-Aušperger i sur., 2018; Šupe i sur., 2015).

5.2.Fenitoin

Fenitoin i njegov prolijek fosfofenitoin često su propisivani antiepileptici koji se koriste za liječenje parcijalnih (fokalnih) i generaliziranih epileptičnih napadaja (*status epilepticus*). Fenitoin je indiciran za kontrolu generaliziranih toničko-kloničkih (*grand-mal*) i kompleksnih parcijalnih napadaja koji zahvaćaju psihomotorne živce i temporalni režanj te prevenciju i liječenje konvulzija tijekom ili nakon neurokirurška zahvata (Karnes i sur., 2021). Karakterizira ga uski terapijski raspon, velika interindividualna varijabilnost u farmakokinetici, sklonost izazivanju nuspojava i po život potencijalno opasnih neželjenih reakcija te stupanje u interakcije s drugim lijekovima, zbog čega je potrebno terapijsko praćenje koncentracija. Neželjene reakcije koje fenitoin izaziva mogu se podijeliti u dvije kategorije: toksičnost ovisna o dozi (koncentraciji) te idiosinkratske reakcije preosjetljivosti (Karnes i sur., 2021; Caudle i sur., 2014; Thorn i sur., 2012). Akutne nuspojave izazvane dozom uključuju sedaciju, ataksiju, vrtoglavicu, nistagmus (nekontrolirano trzanje očiju), mučninu i kognitivno oštećenje. Zbog

hiperalergijskoga djelovanja, uzrokuje blage osipe i životno ugrožavajuće reakcije preosjetljivosti, a može izazvati i toksičnost jetre. Osim hepatotoksičnosti, može dovesti do razvoja leukopenije i pancitopenije te se, prema Američkoj agenciji za hranu i lijekove (FDA, od engl. *United States Food and Drug Administration*), povezuje s razvojem suicidalnih misli i ponašanja. S obzirom da povišene koncentracije fenitoina povećavaju rizik toksičnosti, vrlo je važno odrediti odgovarajuću dozu lijeka. Međutim, nelinearna saturabilna kinetika, autoindukcija CYP2C9, varijante CYP2C9 te potreba za prilagodbom doze prema dobi, spolu i tjelesnoj težini uvelike su otežali doziranje. Potencijalne lijek-lijek interakcije, kompleksno doziranje i toksično djelovanje fenitoina odgovorni su za smanjenje njegove primjene (Karnes i sur., 2021).

Brojni su enzimi uključeni u biotransformaciju fenitoina, no 90 % lijeka primarno se metabolizira u inaktivni hidroksifenitoin djelovanjem CYP2C9 i CYP2C19 te glukuronidira i izlučuje mokraćom. Prilikom inaktivacije lijeka nastaje reaktivni međuprodukt aren oksid, što se smatra glavnim mehanizmom razvoja reakcija preosjetljivosti – Stevens-Johnson sindroma (SJS), toksične epidermalne nekrolize (TEN), hepatotoksičnosti i drugih idiosinkratskih reakcija. Dozom uzrokovane nuspojave posljedica su neadekvatne hidroksilacije i akumulacije fenitoina (Thorn i sur., 2012).

Ciljna su meta djelovanja fenitoina o naponu ovisni natrijevi ionski kanali (NaV, engl. *voltage-gated sodium channels*) u mozgu koji imaju važnu ulogu u propagaciji akcijska potencijala. Ti su kanali heteromerni kompleksi građeni od glikozilirane α podjedinice i jedne ili više β podjedinica. Ekspimirani su u srčanom i skeletnim mišićima te perifernom i središnjem živčanom sustavu, a kodira ih SCN obitelj gena. Mutacije u genima *SCN1A* (NaV_{1.1}), *SCN2A* (NaV_{1.2}), *SCN3A* (NaV_{1.3}), *SCN8A* (NaV_{1.6}) i *SCN9A* (NaV_{1.7}) povezuju se s razvojem epilepsije (Menezes i sur., 2020; Thorn i sur., 2012). Mehanizam farmakodinamičkoga učinka fenitoina uključuje blokadu natrijevih kanala ovisnih o naponu, zbog čega izostaje pozitivna povratna sprega koja održava ponavljajuća izbijanja signala visoke frekvencije (engl. *high-frequency repetitive firing*), čime se sprječava širenje žarišne točke napadaja (Gupta i Tripp, 2021).

Kod terapije fenitoinom od kliničke su važnosti varijante gena CYP2C9 odgovorne za farmakokinetičku varijabilnost i humanoga leukocitnog antigena B (*HLA-B*, od engl. *human leukocyte antigen B*). *HLA-B* sastavni je dio genskog klastera nazvana glavni sustav tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) smještena na kromosomu 6. Pripada klasi MHC I te kodira za površinski proteini koji veže u proteasomu razgrađene peptide i prezentira ih stanicama imunostoga sustava, što imunostom sustavu omogućuje razlikovanje

vlastitih od stranih proteina. *HLA* geni, osobito *HLA-B*, među najpolimorfnijim su genima u ljudskome genomu, a danas je identificirano preko 7000 *HLA-B* alela. Varijanta *HLA-B*15:02* povezuje se s fenitoinom induciranim kožnim neželjenim reakcijama – SJS/TEN, a najveću učestalost ima u azijskoj populaciji. Rezultati genotipizacije za *HLA-B*15:02* interpretiraju se kao pozitivni ili negativni (Tablica 15), dok se diplotipovima *CYP2C9* dodjeljuju stupnjevi aktivnosti (AS, engl. *activity score*) od 0 do 2 koji se potom transliraju u fenotip (Tablica 16) (Karnes i sur, 2021).

Tablica 15. Očekivani fenotip *HLA-B*15:02* prema dodijeljenom genotipu (preuzeto i prilagođeno prema Karnes i sur, 2021)

Fenotip	Genotip	Diplo-tip
<i>HLA-B*15:02</i> negativan	homozigot za neki drugi <i>HLA-B</i> alel (*X)	*X/*X
<i>HLA-B*15:02</i> pozitivan	heterozigot ili homozigot za varijantu <i>HLA-B*15:02</i>	*15:02/*X, *15:02/*15:02

Tablica 16. Očekivani fenotip *CYP2C9* prema dodijeljenom genotipu (preuzeto i prilagođeno prema Karnes i sur, 2021)

Fenotip	Stupanj aktivnosti (AS)*	Genotip	Diplo-tip
NM	2	dva normalna, funkcionalna alela	*1/*1
IM	1,5	alel s normalnom funkcijom i alel sa smanjenom funkcijom	*1/*2
	1	alel s normalnom funkcijom i alel s dokinutom funkcijom ili dva alela sa smanjenom funkcijom	*1/*3, *2/*2
PM	0,5	alel sa smanjenom funkcijom i alel s dokinutom funkcijom	*2/*3
	0	dva alela s dokinutom funkcijom	*3/*3

* *activity score* (AS) - zbroj vrijednosti aktivnosti svakog alela (0 - dokinuta funkcija, 0,5 - smanjena funkcija, 1 - normalna funkcija)

Prilikom uvođenja terapije, uobičajena je početna doza u odraslih 5-7 mg/kg/dan (nešto veća u djece), no kod oštećenja jetre potrebno je smanjiti dozu. Naredne se doze prilagođavaju na temelju koncentracije lijeka u krvi, odgovora na terapiju i nuspojava, a ciljani je terapijski

raspon fenitoina obično 10-20 mg/L. U osoba s varijantnim genotipom *CYP2C9* i *HLA-B* terapiju i dozu fenitoina potrebno je prilagoditi prema CPIC smjernicama (Tablica 17). Važno je napomenuti da negativni test na *HLA-B*15:02* ne uklanja rizik razvoja fenitoinom inducirano SJS/TEN (Karnes i sur., 2021).

Tablica 17. Kliničke smjernice za doziranje fenitoina/fosfofenitoina temeljene na fenotipu/genotipu *HLA-B*15:02* i *CYP2C9* (preuzeto i prilagođeno prema Karnes i sur., 2021)

<i>HLA-B*15:02</i> fenotip	<i>CYP2C9</i> fenotip	Značaj	Smjernice
<i>HLA-B*15:02</i> pozitivan	bilo koji <i>CYP2C9</i> fenotip	Povećani rizik razvoja fenitoinom inducirano SJS/TEN.	U pacijenata koji nisu koristili fenitoin primijeniti alternativni antikonvulziv. Izbjegavati karbamazepin i oksakarbazepin.
			U pacijenata koji su kontinuirano koristili fenitoin > 3 mj. bez pojave nuspojava nastaviti terapiju s oprezom.*
<i>HLA-B*15:02</i> negativan	<i>CYP2C9</i> NM	Normalni metabolizam fenitoina.	Prilagodba uobičajene strategije doziranja nije potrebna.
<i>HLA-B*15:02</i> negativan	<i>CYP2C9</i> IM (AS 1,5)	Blago smanjeni metabolizam fenitoina. Vjerojatnost pojave nuspojava nepromijenjena.	Prilagodba uobičajene strategije doziranja nije potrebna.
<i>HLA-B*15:02</i> negativan	<i>CYP2C9</i> IM (AS 1)	Smanjeni metabolizam fenitoina. Povećana vjerojatnost toksičnog djelovanja.	Primjena standardne početne doze, ali 75 % standardne doze održavanja.
<i>HLA-B*15:02</i> negativan	<i>CYP2C9</i> PM	Smanjeni metabolizam fenitoina. Povećana vjerojatnost toksičnog djelovanja.	Primjena standardne početne doze, ali 50 % standardne doze održavanja.

* Period latencije lijekom-induciranog SJS/TEN kratak je kod kontinuirane primjene i pridržavanja terapije (4-28 dana) te se obično javlja u prva 3 mjeseca terapije.

Prema nekim istraživanjima, varijacije u genu *CYP2C9* nisu jedini uzrok farmakokinetičke varijabilnosti fenitoina – varijacije u genima koji kodiraju za druge enzime uključene u metabolizam fenitoina (*CYP2C19*, *CYP1A1*, *EPHX1*) također pridonose varijabilnosti. Osim toga, inhibitori *CYP2C9* (flukonazol, amiodaron) mogu dovesti do

znatnoga povećanja koncentracije fenitoina u krvi i toksičnosti. S druge strane, fenitoin je potentni induktor CYP enzima pa značajno utječe na metabolizam i koncentracije drugih lijekova (citostatici i imunosupresivi, hipolipemici, psihotropni lijekovi, oralni kontraceptivi, antifungalni lijekovi, varfarin). Stoga vrlo je važno rezultate farmakogenetičkoga testiranja protumačiti u kontekstu postojećih konkomitantnih lijekova (Karnes i sur., 2021).

5.3. Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID)

NSAID najraznovrsnija su skupina lijekova i, zahvaljujući odsustvu adiktivna potencijala, među najčešće korištenim analgeticima. U odraslih se svakodnevno primjenjuju za liječenje kronične boli, a kratkoročno za liječenje akutne boli i boli uzrokovane ozljedama mišićnoskeletna sustava. U pedijatrijskoj se populaciji često koriste radi snižavanja temperature i ublažavanja boli te induciranja zatvaranja duktusa arterije u nedonoščadi i novorođenčadi s otvorenim ductusom arteriosusom (engl. *patent ductus arteriosus*). NSAID-i imaju široki terapijski raspon, no mogu uzrokovati ozbiljne komplikacije poput gastrointestinalnog krvarenja, hipertenzije, infarkta miokarda, zatajenja srca, oštećenje bubrega i u rijetkim slučajevima – aritmije i naglu smrt. S obzirom na bezreceptni (engl. *over-the-counter*) status nekih NSAID-a i široku primjenjivost u populaciji, nuspojave ovih lijekova mogu imati značajan utjecaj na javno zdravstvo i ekonomiju (Theken i sur., 2020).

Princip djelovanja NSAID-a temelji se na inhibiciji prostaglandin G/H sintaza 1 i 2, poznatih i kao ciklooksigenaze (COX), koje kataliziraju biosintezu prostaglandina iz arahidonske kiseline. Većina su reverzibilni neselektivni inhibitori COX-1 i COX-2, no neki od njih (celekoksib, meloksikam, diklofenak) selektivni su samo prema COX-2 (Theken i sur., 2020).

Biotransformacija većine NSAID-a vrši se u jetri djelovanjem izoenzima CYP2C9, CYP1A2 i CYP3A4, a izlučuje mokraćnim sustavom. Na aktivnost CYP enzima utječu brojni čimbenici: genski polimorfizmi, dob, spol, cirkadijalni ritam, bolest te supstrati, induktori i inhibitori enzima, stoga promjene u metabolizmu imaju značajan utjecaj na izloženost lijekovima. Nekoliko NSAID-a podliježe enterohepatičkoj cirkulaciji, što amplificira interindividualnu varijabilnost. Neželjene su reakcije posljedica inhibicije ciklooksigenaza u tkivima u kojima vrše fiziološke funkcije, poput gastrointestinalna trakta, bubrega i kardiovaskularnoga sustava, što rezultira povećanim rizikom razvoja komplikacija zbog povećane koncentracije lijeka ili dulje izloženosti. Čimbenici rizika za razvoj nuspojava starija su dob, konkomitantni lijekovi (politerapija) te već postojeća bolest (Theken i sur., 2020).

Jetreni izoenzim CYP2C9 sudjeluje u metabolizmu brojnih NSAID-a: celekoksiba, diklofenaka, flurbiprofena, indometacina, ibuprofena, lornoksikama, meloksikama, nabumetona, naproksena, piroksikama i tenoksikama. Aleli *CYP2C9* sa smanjenom i dokinutom funkcijom manifestiraju se povišenom koncentracijom lijeka u krvi, što povećava rizik za razvoj nuspojava, stoga je važno identificirati prisutnost varijacija *CYP2C9*. Na temelju rezultata genotipizacije *CYP2C9* dodjeljuje se stupanj aktivnosti (AS) i zaključuje o metaboličkom fenotipu (Tablica 16). Osim toga, utvrđena je čvrsta povezanost varijanti *CYP2C9**2 i *CYP2C8**3 u mnogim populacijama, gdje čak > 80 % pojedinaca nosi obje mutacije, što može biti klinički relevantno kod primjene NSAID-a koji se metaboliziraju preko oba enzima, poput diklofenaka i ibuprofena. CPIC smjernice organizirane su prema vremenu poluživota lijekova u krvi normalnih metabolizatora CYP2C9 te su primjenjive na sva vremena trajanja terapije (dugoročno, kratkoročno, po potrebi) (Tablica 18-20). Celekoksib, flurbiprofen, ibuprofen i lornoksikam imaju kratko do umjereno dugo (celekoksib: 11-16 h, flurbiprofen: 2-6 h, ibuprofen: 2-4 h, lornoksikam: 3-5 h), meloksikam nešto dulje od celekoksiba (15-20 h), a piroksikam i tenoksikam ekstremno dugo vrijeme poluživota (piroksikam: 30-86 h, tenoksikam: 60 h) u CYP2C9 NM (Theken i sur., 2020). Kao alternativna terapija mogu se primijeniti NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju preko CYP2C9, što uključuje aspirin, ketorolak (isključivo kratkoročna upotreba), metamizol, naproksen, sulindak, etorikoksib, parekoksib i valdekoksib, ili oni čija farmakokinetika *in vivo* nije značajno promijenjena genskim polimorfizmima CYP2C9, poput diklofenaka (Theken i sur., 2020).

Tablica 18. Kliničke smjernice za doziranje celekoksiba, flurbiprofena, ibuprofena i lornoksikama temeljene na fenotipu/genotipu *CYP2C9* (preuzeto i prilagođeno prema Theken i sur., 2020)

Fenotip	Značaj	Smjernice	Napomene
NM	Normalni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odabrati najmanju učinkovitu dozu za najkraće trajanje terapije.	
IM (AS 1,5)	Blago smanjeni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije.	IM mogu imati povećani rizik incidencije nuspojava, osobito u kombinaciji s rizičnim čimbenicima. U osoba s <i>CYP2C9</i> *2 pristupiti s oprezom zbog veze s <i>CYP2C8</i> *3 i ibuprofena kao supstrata <i>CYP2C8</i> .
IM (AS 1)	Umjereno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost toksičnog djelovanja.	Primjena najmanje preporučene početne doze. Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije. Pratiti krvni tlak i bubrežnu funkciju.	
PM	Značajno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost i/ili ozbiljnost toksičnog djelovanja.	Primjena 25-50 % najniže preporučene početne doze. Titrirati dozu do klinička učinka ili do 25-50 % maksimalne preporučene doze s oprezom.* Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije. Pratiti krvni tlak i bubrežnu funkciju. Razmotriti primjenu alternativne terapije.	Alternativni NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju enzimom <i>CYP2C9</i> : aspirin, ketorolak, naproksen i sulindak.

* doza se povećava tek nakon postizanja stabilne koncentracije u krvi (minimalno 8 dana od prve primjene za celekoksib, 5 dana za ostale)

Tablica 19. Kliničke smjernice za doziranje meloksikama temeljene na fenotipu/genotipu *CYP2C9* (preuzeto i prilagođeno prema Theken i sur., 2020)

Fenotip	Značaj	Smjernice	Napomene
NM	Normalni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije.	
IM (AS 1,5)	Blago smanjeni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije.	IM mogu imati povećani rizik incidencije nuspojava, osobito u kombinaciji s rizičnim čimbenicima.
IM (AS 1)	Umjereno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost toksičnog djelovanja.	Primjena 50 % najmanje preporučene početne doze. Titrirati dozu do klinička učinka ili do 50 % maksimalne preporučene doze s oprezom.* Odabrati najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije. Pratiti krvni tlak i bubrežnu funkciju. Razmotriti primjenu alternativne terapije ili NSAID-a s kraćim poluživotom (Tablica 18).	IM mogu imati povećani rizik incidencije nuspojava, osobito u kombinaciji s rizičnim čimbenicima. Alternativni NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju enzimom CYP2C9: aspirin, ketorolak, naproksen i sulindak.
PM	Značajno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost i/ili ozbiljnost toksičnog djelovanja.	Primjena alternativne terapije ili NSAID-a s kraćim poluživotom (Tablica 18).	Alternativni NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju enzimom CYP2C9: aspirin, ketorolak, naproksen i sulindak.

* doza se povećava tek nakon postizanja stabilne koncentracije u krvi (minimalno 7 dana od prve primjene)

Tablica 20. Kliničke smjernice za doziranje piroksikama i tenoksikama temeljene na fenotipu/genotipu *CYP2C9* (preuzeto i prilagođeno prema Theken i sur., 2020)

Fenotip	Značaj	Smjernice	Napomene
NM	Normalni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odaberi najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije.	
IM (AS 1,5)	Blago smanjeni metabolizam.	Primjena preporučene početne doze. Odaberi najmanju učinkovitu dozu uz najkraće trajanje terapije.	IM mogu imati povećani rizik incidencije nuspojava, osobito u kombinaciji s rizičnim čimbenicima.
IM (AS 1)	Umjereno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost toksičnog djelovanja.	Primjena alternativne terapije ili NSAID-a s kraćim poluživotom (Tablica 18).	Alternativni NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju enzimom CYP2C9: aspirin, ketorolak, naproksen i sulindak.
PM	Značajno smanjeni metabolizam. Povećana vjerojatnost i/ili ozbiljnost toksičoga djelovanja.	Primjena alternativne terapije ili NSAID-a s kraćim poluživotom (Tablica 18).	Alternativni NSAID-i koji se primarno ne metaboliziraju enzimom CYP2C9: aspirin, ketorolak, naproksen i sulindak.

Prilikom propisivanja lijeka, osim genotipa *CYP2C9*, u obzir treba uzeti i druge čimbenike, kao što su dob, spol, rasa, nacionalnost, disfunkcija jetre, komorbiditeti, konkomitantni lijekovi, genska povezanost s varijantama *CYP2C8* te farmakokinetika lijekova i nuspojave koje uzrokuju. U pacijenata s bubrežnom disfunkcijom, zatajenjem srca te visokim rizikom incidencije kardiovaskularnih i gastrointestinalnih neželjenih reakcija NSAID-e treba izbjegavati (Theken i sur., 2020). Poznato je da diklofenak uzrokuje toksičnost jetre i bubrega, no, prema CPIC smjernicama, nema dovoljno dokaza o utjecaju genotipa *CYP2C9* na farmakokinetiku lijeka da bi se u kliničku praksu uvele smjernice za doziranje (Božina i sur., 2021; Theken i sur., 2020). Iako NSAID-i već pri terapijskim koncentracijama mogu uzrokovati oštećenje bubrega, varijacije u genima koje utječu na LADME profil diklofenaka mogu potencirati lijekom izazvanu nefrotoksičnost (Božina i sur., 2021). U literaturi navode se kontradiktorni rezultati o utjecaju genotipa *CYP2C9*3* na farmakokinetiku diklofenaka: neka su klinička ispitivanja pokazala značajno povećanje koncentracije lijeka u plazmi nositelja varijantnih alela *CYP2C9*3*, kao i *5, *8, *13, *35, ali ne i *CYP2C9*2*, dok su druga odbacila povezanost haplotipa *CYP2C9*3* i reduciranog metabolizma, odnosno klirensa diklofenaka

(Xia i sur., 2014; Zi i sur., 2010; Maekawa i sur., 2009; Kirchheiner i sur., 2003). S obzirom da neki enzimi CYP sustava posreduju biotransformaciju arahidonske kiseline, čiji metaboliti imaju regulatorne i zaštitne fiziološke funkcije, varijacije koje dovode do potpuna ili djelomična gubitka funkcije enzima također mogu pridonijeti razvoju nefrotoksičnosti (Božina i sur., 2021; Imig i Khan., 2015). Kod smanjene aktivnosti CYP2C9 povećano je stvaranje minornih metabolita putem enzima CYP2C8, CYP3A4 i CYP2C19 te nastanka toksičnih benzokinona, koji stvaranjem adukata s proteinima dovode do razvoja hepatotoksičnosti (Coffman i sur., 1998). U patofiziologiju razvoja nefrotoksičnosti i hepatotoksičnosti inducirane diklofenakom uključene su i varijacije u genima koji kodiraju brojne druge molekule, kao što su membranski prijenosnici lijeka i enzimi (npr. UGT, uridin-5'-difosfo-glukuronoziltransferaze) (Božina i sur., 2021).

5.4.Siponimod

Siponimod (Mayzent) je modulator sfingozin-1-fosfat (S1P, engl. *sphingosine 1-phosphate*) receptora uključenih u regulaciju stanična prometa tvari, frekvencije srca, endotelne pregradne funkcije i tonusa glatke muskulature, a eksprimirani su na limfocitima, oligodendrocitima, astrocitima, eritrocitima, oku i slezeni (Goodman i sur., 2019). Indiciran je za liječenje odraslih pacijenata s klinički izoliranim sindromom (CIS, od engl. *clinically isolated syndrome*), relapsno-remitirajućom multiplom sklerozom (RRMS, od engl. *relapsing-remitting multiple sclerosis*) te aktivnim oblikom sekundarne progresivne multiple skleroze (SPMS, od engl. *secondary-progressive multiple sclerosis*) koji je potvrđen relapsima ili nalazima slikovnih tehnika koji pokazuju upalnu aktivnost karakterističnu za bolest (CADTH, 2020; Novartis, 2020; Gardin i sur., 2019). Liječenje započinje petodnevnom titracijom koja se inicira primjenom 0,25 mg te se postupno povisuje do 1,25 mg 5. dan, a 6. se dan daje doza održavanja od 2 mg. Ukoliko se u tom periodu doza preskoči, titracijski se postupak mora ponoviti počevši od 1. dana (0,25 mg) upotrebom nova titracijska pakiranja. Preporučena dnevna doza održavanja iznosi 2 mg siponimoda i ukoliko se, počevši od 6. dana liječenja, terapija prekine na 4 ili više uzastopnih dana, liječenje se ponovno započinje titracijom (CADTH, 2020). Siponimod može uzrokovati prolaznu bradikardiju ovisnu o dozi, koju je moguće izbjeći titracijom zbog brze desenzitizacije (engl. *down-regulation*) S1PR već pri niskim koncentracijama, čime se postiže minimalan učinak na srčanu frekvenciju pri punoj dozi (Goodman i sur., 2019). Najčešće su nuspojave liječenja glavobolja i hipertenzija te porast aktivnosti jetrenih transaminaza, a javljaju se i limfopenija, infekcije gornja respiratorna sustava, makularni edem, gastrointestinalne smetnje (mučnina, proljev) i dr. (Novartis, 2020;

Goodman i sur., 2019). Siponimod pripada skupini lijekova koji ublažavaju bolest (DMT, od engl. *disease-modifying therapy*), dakle ne može izliječiti MS, ali odgađa progresiju fizičke invalidnosti te se smatra da posjeduje neuroprotektivni potencijal (CADTH, 2020; Novartis, 2020; Goodman i sur., 2019).

Siponimod djeluje kao funkcionalni antagonist S1P receptora – selektivno se veže na dva receptora spregnuta s G-proteinom (S1PR₁ i S1PR₅), internalizira ih i degradira. Vezanjem za S1PR₁ na limfocitima sprječava izlazak limfocita iz limfnih čvorova i timusa te, posljedično, smanjuje recirkulaciju limfocita u središnji živčani sustav i ograničava središnju upalu (CADTH, 2020; Novartis, 2020; Goodman i sur., 2019). Zbog reverzibilne sekvencijalne sekvencijacije limfocita u limfoidnim tkivima, broj limfocita u perifernoj krvi smanjuje se već unutar 6 h od prve doze (Novartis, 2020). Smanjenje ovisi o dozi, a posljedica je dugodjelujuće internalizacije S1P₁ receptora. Zbog relativno kratka vremena poluživota (~ 30 h) siponimoda, broj limfocita vraća se u referentni raspon unutar 10 dana od prekida terapije (Novartis, 2020; Goodman i sur., 2019). Siponimod ima visoki afinitet za S1PR₅ prisutne na oligodendrocitima, a vezanjem potiče njihovu diferencijaciju i preživljavanje te utječe na mijelinizaciju neurona u središnjem živčanom sustavu (Goodman i sur., 2019).

Na svom metaboličkom putu, siponimod najprije podliježe hidroksilaciji posredovanoj enzimom CYP2C9 (79,2 %), u manjoj mjeri CYP3A4 (18,5 %), a potom sulfataciji i glukuronidaciji, pri čemu nastaju netoksični metaboliti koji se poglavito izlučuju fecesom. (Gardin i sur., 2019; Goodman i sur., 2019; Huth i sur., 2019). Prema farmakokinetičkim simulacijama temeljenima na fiziologiji, CYP2C9 genotip utječe na frakcijske doprinose navedenih oksidativnih metaboličkih putova cjelokupnoj eliminaciji siponimoda. Očekivani je doprinos jetrena izoenzima CYP2C9 metabolizmu siponimoda 80,4 % kod genotipa CYP2C9*1/*1, odnosno 7,4 % kod CYP2C9*3/*3, dok je doprinos CYP3A4 samo 17,5 % kod CYP2C9*1/*1, ali 82,2 % kod CYP2C9*3/*3 (Gardin i sur., 2019). S obzirom na razlike u doprinosu enzima cjelokupnom klirensu lijeka u različitim genotipovima CYP2C9, kod smanjene metaboličke aktivnosti CYP2C9, predviđa se veći učinak induktora i inhibitora CYP3A4 (i CYP2C9) na izloženost siponimodu. Populacijska farmakokinetička istraživanja pokazala su da se, prilikom eliminacije siponimoda, ispitanici s genotipovima CYP2C9*1/*1 i CYP2C9*1/*2 ponašaju kao normalni metabolizatori, ispitanici s CYP2C9*1/*3 i CYP2C9*2/*2 kao srednje brzi metabolizatori, a ispitanici s CYP2C9*2/*3 i CYP2C9*3/*3 kao spori metabolizatori (Novartis, 2020; Gardin i sur., 2019; Huth i sur., 2019). U usporedbi s divljim tipom, pojedinci s genotipovima CYP2C9*2/*2, *1/*3, *2/*3 i *3/*3 imaju redom 20 %, 35-38 %, 45-48 % i 74 % manje vrijednosti klirensa siponimoda (Novartis, 2020).

Tablica 21. Kliničke smjernice za doziranje siponimoda temeljene na genotipu *CYP2C9*
(preuzeto i prilagođeno prema DPWG, 2021b)

Fenotip	Genotip	Značaj	Smjernice
NM	<i>CYP2C9</i> *1/*2	Izloženost siponimodu neznatno je povećana. Učinak je premali da bi se manifestirao promjenom učinkovitosti ili incidencijom nuspojava.	Prilagodba doze nije potrebna.
IM	<i>CYP2C9</i> *2/*2	Izloženost siponimodu malo je povećana. Učinak je premali da bi se manifestirao promjenom učinkovitosti ili incidencijom nuspojava.	Prilagodba doze nije potrebna.
	<i>CYP2C9</i> *1/*3	Povećana koncentracija siponimoda u krvi. Povećani rizik incidencije nuspojava.	Primjena 50 % standardne doze održavanja. Procijeniti korisnost siponimoda u pacijenata koji koriste umjerene CYP3A4 induktore.*
PM	<i>CYP2C9</i> *2/*3	Povećana koncentracija siponimoda u krvi. Povećani rizik incidencije nuspojava	Primjena 50 % standardne doze održavanja. Procijeniti korisnost siponimoda u pacijenata koji koriste umjerene CYP3A4 induktore.*
	<i>CYP2C9</i> *3/*3	Znatno povećana koncentracija siponimoda u krvi. Iznimno povećani rizik incidencije nuspojava.	Primjena je siponimoda kontraindicirana.

* Prema farmakokinetičkom modelu, induktori CYP3A4 rezultiraju smanjenjem izloženosti siponimodu za 49 %.

5.5.Ostali lijekovi

Osim gore opisanih lijekova, brojni drugi lijekovi podliježu oksidativnoj biotransformaciji posredovanoj enzimom *CYP2C9*, uključujući antihipertenzive (irbesartan, losartan), oralne antidijabetike (gliklazid, glibenklamid, glimepirid, tolbutamid), diuretik torasemid, bosentan i fluvastatin, za koje je *CYP2C9* odgovoran za više od 25 % metabolička klirensa (Daly i sur., 2017). Ispitan je značaj čestih polimorfizama *CYP2C9* na farmakokinetiku i terapijski učinak navedenih lijekova.

Derivati sulfonilureje najraširenije su korištena skupina oralnih antidijabetika u liječenju dijabetesa tipa 2 (Xu i sur, 2009). Njemački su znanstvenici proveli kliničko ispitivanje u kojemu su zdravi ispitanici nositelji varijantnih alela *CYP2C9**2 i *3 imali manji klirens

tolbutamida u odnosu na one s divljim tipom alela. U usporedbi s homozigotima za *CYP2C9*1*, prosječni je klirens tolbutamida u nositelja genotipova *CYP2C9*1/*2*, **2/*2*, **1/*3*, **2/*3* i **3/*3* redom bio 88 %, 77 %, 58 %, 46 % i 16 %. Unatoč značajnom utjecaju na farmakokinetiku tolbutamida, koncentracija glukoze ostala je nepromijenjena (Kirchheiner i sur., 2002). Drugo je ispitivanje pokazalo značajno manji porast koncentracije glukoze u krvi nakon peroralne primjene 100 g dekstroze u zdravih ispitanika nositelja *CYP2C9*1/*3* u odnosu na divlji tip nakon primjene iste doze tolbutamida (Shon i sur., 2002). S druge strane, ispitivanja provedena na zdravim ispitanicima različitih genotipova *CYP2C9* pokazala su slabi, statistički neznačajan utjecaj alela *CYP2C9*2* i **3* na farmakokinetiku gliklazida (Zhou i sur., 2010; Xu i sur., 2008; Zhang i sur, 2007). Pritom je učinak *CYP2C9*2/*2* na funkciju metabolizma bio jači od heterozigotnih alela *CYP2C9*2* i **3*, ali najjači je učinak pokazao genotip *CYP2C9*2/*3*. Nositelji varijantnih alela imali su 3,4 puta veću vjerojatnost postizanja ciljnih vrijednosti HbA_{1c} u usporedbi s nositeljima alela divljeg tipa (Zhou i sur., 2010).

Losartan je blokator receptora tipa 1 za angiotenzin II te se djelovanjem *CYP2C9* i *CYP3A4* prevodi u metabolit E-3174, koji je također aktivan (Whirl-Carillo i sur., 2012). Ispitivanjima je ustanovljena smanjena formacija E-3174 u nositelja genotipa *CYP2C9*3*: u usporedbi s *CYP2C9*1/*1* i **1/*2*, koncentracija je metabolita bila značajno manja kod heterozigota za *CYP2C9*3*, a izuzetno mala kod nositelja *CYP2C9*3/*3* (Yasar i sur., 2002). S obzirom da je metabolit E-3174 potentniji od roditeljske molekule, homozigoti i heterozigoti za *CYP2C9*3* pokazuju slabiji antihipertenzivni odgovor na lijek (Sekino i sur., 2003). Međutim, kod primjene kandesartana i irbesartana, koji se biotransformacijom inaktiviraju, u osoba pozitivnih na varijantne alele *CYP2C9* postoji rizik hipotenzije (Uchida i sur., 2003; Hallberg i sur., 2002).

Fluvastatin je inhibitor hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA)-reduktaze, enzima neophodna za biosintezu kolesterola te se koristi u kontroli dislipidemija (Hirota i sur., 2020). S obzirom da se statini, zbog komorbiditeta koji prate dislipidemiju (hipertenzija, dijabetes), često primjenjuju u kombinaciji s drugim lijekovima, povećana je vjerojatnost incidencije nuspojava uzrokovanih međusobnim interakcijama lijekova (Bottorff, 2006). Fluvastatin se primarno metabolizira enzimom *CYP2C9* te, u puno manjoj mjeri, enzimima *CYP3A4* i *CYP2C8* (Scripture i Pieper, 2001). Čimbenici koji inhibiraju metabolizam statina (starija dob, jetrena ili bubrežna disfunkcija, perioperativni postupci, multisistemska bolest, sitna tjelesna građa, neliječeni hipotiroidizam, politerapija), ali i genski polimorfizmi koji mijenjaju aktivnost enzima i funkciju membranskih prijenosnika, povezuju se s povećanim rizikom miotoksičnosti i hepatotoksičnosti (Mirošević Skvrce i sur., 2013; Chatzizisis i sur., 2010; Neuvonen i sur.,

2006; Pasternak i sur., 2002). Istraživanjem provedenim 2013. godine hrvatski su znanstvenici, u osoba s transplantiranim bubregom, potvrdili vezu između polimorfizama gena koji kodiraju enzim CYP2C9 te prijenosnik ABCG2 i toksičnosti inducirane fluvastatinom. Heterozigoti i homozigoti za varijantne alele CYP2C9*2 i *3 imali su 2,5 puta veću vjerojatnost razvoja nuspojava od homozigota za divlji tip alela. Također, nositelji barem jednog varijantnog alela CYP2C9 (*2 ili *3) koji su istovremeno primali inhibitore CYP2C9 imali su najmanje 6 puta veći rizik za razvoj nuspojava od onih na terapiji bez inhibitora CYP2C9. Nositelji varijantnog alela ABCG2 421C>A imali su slične rezultate (Mirošević Skvrce i sur., 2013).

5.6. Validacija metode genotipizacije CYP2C9 za kliničku primjenu

Radna skupina za farmakogenomiku udruge za molekularnu patologiju (AMP, od engl. *Association for Molecular Pathology*) objavila je smjernice koje daju pregled varijantnih alela koje se preporuča uključiti u panele za genotipizaciju CYP2C9 u kliničkoj praksi. Kreirane su dvije razine strategije (engl. *two-tier strategy*) ispitivanja. Razina 1 uključuje varijantne alele (1) koji su dobro opisani i za koje je poznato da značajno utječu na funkciju proteina i/ili gena, a time i na terapijski odgovor, (2) čija je frekvencija u populaciji/etničkoj skupini znatna te (3) za koje su dostupni referentni materijali. Varijantni aleli koji ne zadovoljavaju sva tri navedena kriterija pripadaju razini 2 te se smatraju alelima po izboru za uključivanje u proširene genotipizacijske panele. Varijante nepoznata značaja ne preporučuju se za ciljano ispitivanje genotipa CYP2C9 (Pratt i sur., 2019).

U genotipizacijske panele razine 1 preporuča se uključivanje varijantnih alela CYP2C9*2, *3, *5, *6, *8 i *11. Od svih poznatih varijacija u genu koje rezultiraju smanjenom funkcijom enzima, aleli CYP2C9*2 i *3 odgovorni su za 98-100 % varijabilnosti u Europljana i Azijata, no samo 25 % u pojedinaca afričkih korijena. S obzirom da su, u Afrikanaca i Afroamerikanaca, aleli CYP2C9*5, *6, *8 i *11 učestaliji od alela *2 i *3 te su odgovorni za 75 % ukupne varijabilnosti uzrokovane poznatim mutacijama CYP2C9, genotipiziranje samo haplotipova CYP2C9*2 i *3 u tim populacijama neće otkriti većinu osoba sa smanjenom aktivnosti enzima. S druge strane, učestalost tih varijanata u populaciji europskoga i azijskoga podrijetla poprilično je niska (Pratt i sur., 2019). Osim navedenih alela CYP2C9, preporučenim alelom razine 1 smatra se VKORC1 c.-1639G>A, čija je učestalost u bijelaca 41-47 %, oko 88 % u istočnoazijskoj populaciji, a manja u osoba afričkog podrijetla (~ 13 %) i pripadnika Južne i Središnje Azije (~ 15 %). Međutim, određivanje varijante VKORC1 c.1173C>T moglo bi također biti korisno u osoba na terapiji varfarinom zbog velike vezne neravnoteže s c.-1639G>A u većini populacija (Pratt i sur., 2020). U panele razine 2 preporuča se uključivanje varijantnih

alela *CYP2C9**12, *13 i *15, koji se povezuju sa smanjenom ili dokinutom funkcijom enzima (Pratt i sur., 2019). U kontekstu varfarina, preporučeni su aleli razine 2 *CYP4F2**3, čije bi određivanje moglo biti korisno u bijelaca i Azijata, ali ne i u Afrikanaca, aleli povezani s rezistencijom na varfarin – *VKORC1* c.196G>A (p.Val66Met) i c.106G>A (p.Asp36Tyr), koji se javljaju u > 1:1000 pojedinaca najmanje jedne subpopulacije te rs12777823 – varijacija u *CYP2C* klasteru, česta u Afroamerikanaca (25 %) (Pratt i sur., 2020).

S obzirom na značajnu interpopulacijsku razliku u prevalenciji varijantnih alela (Mizzi i sur., 2016), iznimno je važno provesti genotipizaciju onih alela čija je učestalost u pojedinoj populaciji značajna. Rezultati istraživanja provedena 2016. godine na hrvatskoj populaciji pokazala su frekvenciju od 14,5 % za alel *CYP2C9**2 i 7,6 % za alel *CYP2C9**3. Od 1080 ispitanika, nositelji *CYP2C9**1/*1 (NM) činili su 59,72 %, oni kojima je dodijeljen genotip *CYP2C9**1/*2 ili *CYP2C9**1/*3 (IM) činili su 36,30 %, a njih 3,98 % proglašeno je sporim metabolizatorima (*CYP2C9**2/*2, *2/*3, *3/*3) (Ganoci i sur., 2017). Zbog relativno velike učestalosti u populaciji Hrvatske i klinički značajnoga utjecaja na funkciju enzima, navedeni su aleli odabrani za implementaciju u kliničku praksu. U tu se svrhu, u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb, provela validacija genotipizacije *CYP2C9**2 i *3, a potom i integracija u rutinski rad laboratorija.

6. ZAKLJUČAK

Ljudsko je tijelo složeni multiorganski sustav koji posjeduje različite mehanizme koji omogućuju provođenje fizioloških funkcija i pružaju zaštitu od štetnih djelovanja ksenobiotika. Ksenobiotici su sve, živom organizmu, strane tvari koje se endogeno ne stvaraju, a uključuju razne prirodne i sintetske spojeve, kao i lijekove. Danas je na tržištu prisutno mnoštvo lijekova, a svaki je od njih razvijen s ciljem postizanja određenoga terapijskoga učinka. Poznato je da, u kliničkoj praksi, svi pacijenti ne odgovaraju jednako na odabranu terapiju: određena doza lijeka može biti učinkovita kod jedne, a neučinkovita kod druge osobe ili čak uzrokovati neželjene reakcije. Brojni su razlozi interindividualne, ali i intraindividualne varijabilnosti, no smatra se da su varijacije u genima koji kodiraju molekule uključene u farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka odgovorne za trećinu neželjenih reakcija induciranih lijekovima. Dva su tipa nuspojava lijekova: reakcije ovisne o koncentraciji lijeka i idiosinkratske reakcije, koje imaju podlogu u genima. Procjenjuje se da je 80 % neželjenih reakcija uzrokovano dozom te bi se, kao takve, mogle spriječiti.

Metabolizam većine lijekova posredovan je enzimima sustava CYP-a, a među njima najvažniji su CYP3A4, CYP2D6, CYP2C19 i CYP2C9. Gen *CYP2C9* visoko je polimorfan, a njegov je genski produkt odgovoran za biotransformaciju brojnih klinički značajnih lijekova, uključujući antikoagulant varfarin, antikonvulziv fenitoin, NSAID-e, oralne antidijabetike, antihipertenzive te siponimod, ali i biološki važnih endogenih molekula, poput arahidonske kiseline. Neki od lijekova-supstrata enzima CYP2C9 imaju uski terapijski raspon, što predstavlja dodatni rizik za razvoj nuspojava. U svrhu otkrivanja pojedinaca s povećanim rizikom razvoja neželjenih reakcija i prije početka liječenja, profesionalna su društva objavila kliničke smjernice za doziranje varfarina, fenitoina, NSAID-a i siponimoda koje se temelje na genotipu farmakokinetički/farmakodinamički važnih gena. S obzirom da se učestalost pojedinih alela *CYP2C9* značajno razlikuje među etničkim populacijama, genotipizacija *CYP2C9*, u Republici Hrvatskoj, provodi se na varijantne alele s najvećom prevalencijom u bjelačkoj populaciji – *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3.

Farmakogenomika ima vrlo važnu ulogu u poboljšanju učinkovitosti lijekova i smanjenju njihove toksičnosti, a time i unaprjeđenju liječenja. Mnoga su istraživanja pokazala superiornost liječenja temeljena na genotipu, odnosno personalizirana pristupa liječenju nad uobičajenim pristupom. Otkrivanje varijacija gena koje utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku pojedina lijeka u bolesnika omogućuje pravovremenu primjenu odgovarajuće terapije i bolji ishod za bolesnika. Međutim, važno je istaknuti da se genotipizacijom obično probire na samo najčešće varijante, stoga se utvrđeni metabolički

fenotip može razlikovati od stvarnog fenotipa. Zbog toga je korisno terapijsko praćenje lijekova. Također, s obzirom da varijacije u genima nisu jedini čimbenici koji utječu na metabolizam, odnosno sudbinu lijeka u organizmu, prilikom odabira te optimizacije liječenja i doze, osim rezultata farmakogenetičkoga testiranja, u obzir treba uzeti i druge čimbenike, poput dobi, spola, bubrežne i jetrene funkcije, životnih navika (pušenje, alkohol, prehrana), konkomitantnih lijekova (politerapija) te postojećih stanja.

Boljim razumijevanjem i novim saznanjima u području molekularne dijagnostike te razvojem tehnologije, razvijaju se nove i unaprjeđuju već postojeće dijagnostičke metode. Uvođenje novih testova u rutinski rad laboratorija složen je proces koji se nastavlja i nakon detaljne procjene njihove valjanosti, a krajnji je cilj pružanje kvalitetne i bolje zdravstvene skrbi. Validacija metode genotipizacije *CYP2C9**2 i *3, provedena u ovome radu, pokazala je zadovoljavajuće rezultate ispitivanja točnosti i preciznosti, koji su u skladu sa zahtjevima dijagnostičkog standarda, stoga je metoda pogodna za kliničku primjenu.

7. LITERATURA

Al Ammari M, AlBalwi M, Sultana K, Alabdulkareem IB, Almuzzaini B, Almakhlafi NS, Aldrees M. The effect of the VKORC1 promoter variant on warfarin responsiveness in the Saudi Warfarin Pharmacogenetic (SWAP) cohort. *Sci Rep*, 2020, 10, 11613.

Alvarellos ML, Sangkuhl K, Daneshjou R, Whirl-Carrillo M, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP4F2. *Pharmacogenet Genomics*, 2015, 25, 41-47.

Bottorff MB. Statin Safety and Drug Interactions: Clinical Implications. *Am J Cardiol*, 2006, 97, 27C-31C.

Božina N, Ganoci L, Simičević L, Gvozdanović K, Domjanović IK, Fistrek Prlić M, Križ T, Borić Bilušić A, Laganović M, Božina T. Drug-drug-gene interactions as mediators of adverse drug reactions to diclofenac and statins: a case report and literature review. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2021, 72, 114-128.

Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Božina N, urednica, Zagreb, Medicinska naklada, 2019, str. 1-34.

Božina N, Granić P, Lalić Z, Tramisak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian population. *Croat Med J*, 2003, 44, 425-428.

CADTH. Clinical Review Report: Siponimod (Mayzent): (Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.): Indication: Secondary-progressive multiple sclerosis [Internet]. Ottawa (ON), Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health (CADTH), 2020, str. 8-9.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK566877/pdf/Bookshelf_NBK566877.pdf, pristupljeno 1. 9. 2021.

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

Caudle KE, Rettie AE, Whirl-Carrillo M, Smith LH, Mintzer S, Lee MT, Klein TE, Callaghan JT; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical pharmacogenetics

implementation consortium guidelines for CYP2C9 and HLA-B genotypes and phenytoin dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2014, 96, 542-548.

Čepelak I, Štraus B. Uvodni dio. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 3-17.

Chatzizisis YS, Koskinas KC, Misirli G, Vaklavas C, Hatzitolios A, Giannoglou GD. Risk factors and drug interactions predisposing to statin-induced myopathy: implications for risk assessment, prevention and treatment. *Drug Saf*, 2010, 33, 171–187.

Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 308, 495-501.

Coffman BL, King CD, Rios GR, Tephly TR. The glucuronidation of opioids, other xenobiotics, and androgens by human UGT2B7Y(268) and UGT2B7H(268). *Drug Metab Dispos*, 1998, 26, 73–77.

Daly AK, King BP. Contribution of CYP2C9 to variability in vitamin K antagonist metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2006, 2, 3-15.

Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. *J Pers Med*, 2017, 8, 1.

Donaldson CJ, Harrington DJ. Therapeutic warfarin use and the extrahepatic functions of vitamin K-dependent proteins. *Br J Biomed Sci*, 2017, 74, 163-169.

Du H, Wei Z, Yan Y, Xiong Y, Zhang X, Shen L, Ruan Y, Wu X, Xu Q, He L, Qin S. Functional characterization of CYP2C9 allelic variants in COS-7 cells. *Front Pharmacol*, 2016, 7, 98.

Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) of the Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP). Pharmacogenetic recommendations – update May 2021, 2021, <https://www.knmp.nl/downloads/pharmacogenetic-recommendations-3mei2021.pdf>, pristupljeno 11. 8. 2021.

Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) of the Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP). General background text Pharmacogenetics - CYP2C9, 2021, <https://www.knmp.nl/downloads/g-standaard/farmacogenetica/english-background-information/cyp2c9-english-background-2aug2021.pdf>, pristupljeno 21. 8. 2021.

Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) of the Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP). General background text Pharmacogenetics – VKORC1, 2018, <https://www.knmp.nl/downloads/g-standaard/farmacogenetica/english-background-information/vkorc1-english-2018.pdf>, pristupljeno 21. 8. 2021.

Dymond JS. Explanatory chapter: quantitative PCR. *Methods Enzymol*, 2013, 529, 279-289.

Flockhart DA, Thacker, D., McDonald, C., Desta, Z. The Flockhart Cytochrome P450 Drug-Drug Interaction Table. Division of Clinical Pharmacology, Indiana University School of Medicine, 2021, <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/>, pristupljeno 20. 8. 2021.

Gage BF, Bass AR, Lin H, Woller SC, Stevens SM, Al-Hammadi N, Li J, Rodríguez T Jr, Miller JP, McMillin GA, Pendleton RC, Jaffer AK, King CR, Whipple BD, Porche-Sorbet R, Napoli L, Merritt K, Thompson AM, Hyun G, Anderson JL, Hollomon W, Barrack RL, Nunley RM, Moskowitz G, Dávila-Román V, Eby CS. Effect of Genotype-Guided Warfarin Dosing on Clinical Events and Anticoagulation Control Among Patients Undergoing Hip or Knee Arthroplasty: The GIFT Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 2017, 318, 1115-1124.

Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther*, 2017, 32, 11-21.

Gardin A, Shakeri-Nejad K, Feller A, Huth F, Neelakantham S, Dumitras S. Siponimod pharmacokinetics, safety, and tolerability in combination with the potent CYP3A4 inhibitor itraconazole in healthy subjects with different CYP2C9 genotypes. *Eur J Clin Pharmacol*, 2019, 75, 1565-1574.

GnomAD browser, The Genome Aggregation Database, CYP2C9, 2021, https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000138109?dataset=gnomad_r2_1, pristupljeno 1. 9. 2021.

Goodman AD, Anadani N, Gerwitz L. Siponimod in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs*, 2019, 28, 1051-1057.

Guengerich FP. Cytochrome P450 research and The Journal of Biological Chemistry. *J Biol Chem*, 2019, 294, 1671-1680.

Gupta M, Tripp J. Phenytoin. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island. StatPearls Publishing, 2021, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551520/>, pristupljeno 28. 8. 2021.

Haddow JE, Palomaki GE. ACCE: a model process for evaluating data on emerging genetic tests. U: Human Genome Epidemiology: A Scientific Foundation for Using Genetic Information to Improve Health and Prevent Disease. Khoury M, Little J, Burke W, urednici, Oxford University Press, New York, 2003, str. 217–233.

Hallberg P, Karlsson J, Kurland L, Lind L, Kahan T, Malmqvist K, Ohman KP, Nystrom F, Melhus H. The CYP2C9 genotype predicts the blood pressure response to irbesartan: Results from the Swedish Irbesartan Left Ventricular Hypertrophy Investigation vs Atenolol (SILVHIA) trial. *J Hypertens*, 2002, 20, 2089–2093.

Hauck WW, Kock W, Abernethy D, Williams RL. Making sense of trueness, precision, accuracy and uncertainty. *Pharmacopeial Forum*, 2008, 34, 838–842.

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

Hoy MA. DNA Amplification by the Polymerase Chain Reaction: Molecular Biology Made Accessible. U: Insect Molecular Genetics. Hoy, MA, urednica, Academic Press, 2013, str. 307-372.

Huth F, Gardin A, Umehara K, He H. Prediction of the Impact of Cytochrome P450 2C9 Genotypes on the Drug-Drug Interaction Potential of Siponimod With Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling: A Comprehensive Approach for Drug Label Recommendations. *Clin Pharmacol Ther*, 2019, 106, 1113-1124.

Imig JD, Khan MA. Cytochrome P450 and Lipoygenase Metabolites on Renal Function. *Compr Physiol*, 2015, 6, 423-441.

Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein CM, Scott SA, Lee MT, Gage BF, Kimmel SE, Perera MA, Anderson JL, Pirmohamed M, Klein TE, Limdi NA, Cavallari LH, Wadelius M. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102, 397-404.

Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, Anderson JL, Kimmel SE, Lee MT, Pirmohamed M, Wadelius M, Klein TE, Altman RB. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 90, 625-629.

Kalman LV, Agúndez J, Appell ML, Black JL, Bell GC, Boukouvala S, Bruckner C, Bruford E, Caudle K, Coulthard SA, Daly AK, Del Tredici A, den Dunnen JT, Drozda K, Everts RE, Flockhart D, Freimuth RR, Gaedigk A, Hachad H, Hartshorne T, Ingelman-Sundberg M, Klein TE, Lauschke VM, Maglott DR, McLeod HL, McMillin GA, Meyer UA, Müller DJ, Nickerson DA, Oetting WS, Pacanowski M, Pratt VM, Relling MV, Roberts A, Rubinstein WS, Sangkuhl K, Schwab M, Scott SA, Sim SC, Thirumaran RK, Toji LH, Tyndale RF, van Schaik R, Whirl-Carrillo M, Yeo K, Zanger UM. Pharmacogenetic allele nomenclature: International workgroup recommendations for test result reporting. *Clin Pharmacol Ther*, 2016, 99, 172-185.

Karczewski KJ, Weisburd B, Thomas B, Solomonson M, Ruderfer DM, Kavanagh D, Hamamsy T, Lek M, Samocha KE, Cummings BB, Birnbaum D; The Exome Aggregation Consortium, Daly MJ, MacArthur DG. The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45, D840-D845.

Karnes JH, Rettie AE, Somogyi AA, Huddart R, Fohner AE, Formea CM, Ta Michael Lee M, Llerena A, Whirl-Carrillo M, Klein TE, Phillips EJ, Mintzer S, Gaedigk A, Caudle KE, Callaghan JT. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2C9 and HLA-B Genotypes and Phenytoin Dosing: 2020 Update. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 109, 302-309.

Kimmel SE, French B, Kasner SE, Johnson JA, Anderson JL, Gage BF, Rosenberg YD, Eby CS, Madigan RA, McBane RB, Abdel-Rahman SZ, Stevens SM, Yale S, Mohler ER 3rd, Fang MC, Shah V, Horenstein RB, Limdi NA, Muldowney JA 3rd, Gujral J, Delafontaine P, Desnick RJ, Ortel TL, Billett HH, Pendleton RC, Geller NL, Halperin JL, Goldhaber SZ, Caldwell MD, Califf RM, Ellenberg JH; COAG Investigators. A pharmacogenetic versus a clinical algorithm for warfarin dosing. *N Engl J Med*, 2013, 369, 2283-2293.

Kirchheiner J, Bauer S, Meineke I, Rohde W, Prang V, Meisel C, Roots I, Brockmoller J. Impact of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms on tolbutamide kinetics and the insulin and glucose response in healthy volunteers. *Pharmacogenetics*, 2002, 12, 101-109.

Kirchheiner J, Brockmoller J. Clinical consequences of cytochrome P450 2C9 polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther*, 2005, 77, 1-16.

Kirchheiner J, Meineke I, Steinbach N, Meisel C, Roots I, Brockmüller J. Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *Br J Clin Pharmacol*, 2003, 55, 51–61.

Li Y, Zhu J, Ding J. VKORC1 -1639G/A and 1173 C/T Genetic Polymorphisms Influence Individual Differences in Warfarin Maintenance Dose. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2015, 19, 488-493.

Li Y, Zhu J, Ding JQ. VKORC1 rs2359612 and rs9923231 polymorphisms correlate with high risks of cardiovascular and cerebrovascular diseases. *Genet Mol Res*, 2015, 14, 14731-14744.

Maekawa K, Harakawa N, Sugiyama E, Tohkin M, Kim SR, Kaniwa N, Katori N, Hasegawa R, Yasuda K, Kamide K, Miyata T, Saito Y, Sawada J. Substrate-dependent functional alterations of seven CYP2C9 variants found in Japanese subjects. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37, 1895–1903.

Makar-Aušperger K, Krželj K, Lovrić Benčić M, Radačić Aumiler M, Erdeljić Turk V, Božina N. Warfarin Dosing According to the Genotype-guided Algorithm is Most Beneficial in Patients With Atrial Fibrillation: A Randomized Parallel Group Trial. *Ther Drug Monit*, 2018, 40, 362-368.

Mattocks CJ, Morris MA, Matthijs G, Swinnen E, Corveleyn A, Dequeker E, Müller CR, Pratt V, Wallace A; EuroGentest Validation Group. A standardized framework for the validation and verification of clinical molecular genetic tests. *Eur J Hum Genet*, 2010, 18, 1276-1288.

Menditto A, Patriarca M, Magnusson B. Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accred Qual Assur*, 2007, 12, 45–47.

Menezes LFS, Sabiá Júnior EF, Tibery DV, Carneiro LDA, Schwartz EF. Epilepsy-Related Voltage-Gated Sodium Channelopathies: A Review. *Front Pharmacol*, 2020, 11, 1276.

Mirošević Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolić Šarinić V. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics*, 2013, 14, 1419-1431.

Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimiri N, Balogh I, Başak N, Böhm R, Borg J, Borgiani P, Bozina N, Bruckmueller H, Burzynska B, Carracedo A, Cascorbi I, Deltas C, Dolzan V, Fenech A, Grech G, Kasiulevicius V, Kádaši Ľ, Kučinskas V, Khusnutdinova E, Loukas YL, Macek M Jr, Makukh H, Mathijssen R, Mitropoulos K, Mitropoulou C, Novelli G, Papantoni I, Pavlovic S, Saglio G, Setric J, Stojiljkovic M, Stubbs AP, Squassina A, Torres M, Turnovec M, van Schaik RH, Voskarides K, Wakil SM, Werk A, Del Zompo M, Zukic B, Katsila T, Lee MT, Motsinger-Rief A, McLeod HL, van der Spek PJ, Patrinos GP. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. *PLoS One*, 2016, 11, e0162866.

Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drug: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther*, 2006, 80, 565–581.

Novartis Europharm Limited. Mayzent - sažetak opisa svojstava lijeka [Internet]. European Medicines Agency (EMA), 2020. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/mayzent-epar-product-information_hr.pdf, pristupljeno 1. 9. 2021.

Pasternak RC, Smith SC, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. American College of Cardiology; American Heart Association; National Heart, Lung and Blood Institute. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40, 567–572.

Perera MA, Cavallari LH, Limdi NA, Gamazon ER, Konkashbaev A, Daneshjou R, Pluzhnikov A, Crawford DC, Wang J, Liu N, Tatonetti N, Bourgeois S, Takahashi H, Bradford Y, Burkley BM, Desnick RJ, Halperin JL, Khalifa SI, Langa TY, Lubitz SA, Nutescu EA, Oetjens M, Shahin MH, Patel SR, Sagreya H, Tector M, Weck KE, Rieder MJ, Scott SA, Wu AH, Burmester JK, Wadelius M, Deloukas P, Wagner MJ, Mushiroda T, Kubo M, Roden DM, Cox NJ, Altman RB, Klein TE, Nakamura Y, Johnson JA. Genetic variants associated with warfarin dose in African-American individuals: a genome-wide association study. *Lancet*, 2013, 382, 790-796.

PharmVar, The Pharmacogene Variation Consortium. CYP2C9 gene, 2021. <https://www.pharmvar.org/gene/CYP2C9>, pristupljeno 20. 8. 2021.

Phillips KA, Veenstra DL, Oren E, Lee JK, Sadee W. Potential role of pharmacogenomics in reducing adverse drug reactions: a systematic review. *JAMA*, 2001, 286, 2270-2279.

Pirmohamed M, Burnside G, Eriksson N, Jorgensen AL, Toh CH, Nicholson T, Kesteven P, Christersson C, Wahlström B, Stafberg C, Zhang JE, Leathart JB, Kohnke H, Maitland-van der Zee AH, Williamson PR, Daly AK, Avery P, Kamali F, Wadelius M; EU-PACT Group. A randomized trial of genotype-guided dosing of warfarin. *N Engl J Med*, 2013, 369, 2294-2303.

Pratt VM, Cavallari LH, Del Tredici AL, Hachad H, Ji Y, Moyer AM, Scott SA, Whirl-Carrillo M, Weck KE. Recommendations for Clinical CYP2C9 Genotyping Allele Selection: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*, 2019, 21, 746-755.

Relling MV, Klein TE. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89, 464-467.

Rendić S, Guengerich FP. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals. *Chem Res Toxicol*, 2015, 20, 28, 38-42.

Rendić S, Medić-Šarić M. Metabolizam i biotransformacije lijekova i nekih ksenobiotika i endobiotika. U: *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*. Rendić S, Medić-Šarić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 7-14.

Rendić S, Medić-Šarić M. Reakcije I. faze – Oksidoredukcijske reakcije i reakcije hidrolize. U: *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*. Rendić S, Medić-Šarić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 132-149.

Rendić S, Medić-Šarić M. Uvod. U: *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*. Rendić S, Medić-Šarić M, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 3-6.

Robarge JD, Li L, Desta Z, Nguyen A, Flockhart DA. The star-allele nomenclature: retooling for translational genomics. *Clin Pharmacol Ther*, 82, 244-248.

Roden DM, McLeod HL, Relling MV, Williams MS, Mensah GA, Peterson JF, Van Driest SL. Pharmacogenomics. *Lancet*, 2019, 394, 521-532.

Sadee W, Wang D, Papp AC, Pinsonneault JK, Smith RM, Moyer RA, Johnson AD. Pharmacogenomics of the RNA world: structural RNA polymorphisms in drug therapy. *Clin Pharmacol Ther*, 2011, 89, 355-365.

Sangkuhl K, Claudio-Campos K, Cavallari LH, Agundez JA, Whirl-Carrillo M, Duconge J, Del Tredici AL, Wadelius M, Rodrigues Botton M, Woodahl EL, Scott SA, Klein TE, Pratt VM, Daly AK, Gaedigk A. PharmVar GeneFocus:CYP2C9. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110, 662-676.

Scripture CD, Pieper JA. Clinical pharmacokinetics of fluvastatin. *Clin Pharmacokinet*, 2001, 40, 263–281.

Sekino K, Kubota T, Okada Y, Yamada Y, Yamamoto K, Horiuchi R, Kimura K, Iga T. Effect of the single CYP2C9*3 allele on pharmacokinetics and pharmacodynamics of losartan in healthy Japanese subjects. *Eur J Clin Pharmacol*, 2003, 59, 589–592.

Shon JH, Yoon YR, Kim KA, Lim YC, Lee KJ, Park JY, Cha IJ, Flockhart DA, Shin JG. Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genetic polymorphisms on the disposition of and blood glucose lowering response to tolbutamide in humans. *Pharmacogenetics*, 2002, 12, 111-119.

Sridharan K, Al Banna R, Malalla Z, Husain A, Sater M, Jassim G, Otoom S. Influence of CYP2C9, VKORC1, and CYP4F2 polymorphisms on the pharmacodynamic parameters of warfarin: a cross-sectional study. *Pharmacol Rep*, 2021. doi: 10.1007/s43440-021-00256-w.

Šupe S, Poljaković Z, Božina T, Ljevak J, Macolić Šarinić V, Božina N. Clinical Application of Genotype-guided Dosing of Warfarin in Patients with Acute Stroke. *Arch Med Res*, 2015, 46, 265-273.

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

Swen JJ, Nijenhuis M, van Rhenen M, de Boer-Veger NJ, Buunk AM, Houwink EJF, Mulder H, Rongen GA, van Schaik RHN, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VHM, Guchelaar HJ; Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) of the Royal Dutch Pharmacists Association (KNMP). Pharmacogenetic Information in Clinical Guidelines: The European Perspective. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103, 795-801.

Theken KN, Lee CR, Gong L, Caudle KE, Formea CM, Gaedigk A, Klein TE, Agúndez JAG, Grosser T. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline (CPIC) for CYP2C9 and Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clin Pharmacol Ther*, 2020, 108, 191-200.

Thorn CF, Whirl-Carrillo M, Leeder JS, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: phenytoin pathway. *Pharmacogenet Genomics*, 2012, 22, 466-470.

Tie JK, Stafford DW. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. *Vitam Horm*, 2008, 78, 103-130.

Uchida S, Watanabe H, Nishio S, Hashimoto H, Yamazaki K, Hayashi H, Ohashi K. Altered pharmacokinetics and excessive hypotensive effect of candesartan in a patient with the CYP2C9/3 genotype. *Clin Pharmacol Ther*, 2003, 74, 505–508.

Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Carrillo MW, Sangkuhl K, Klein TE, Altman RB. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*, 2010, 20, 277-281.

Wake DT, Ilbawi N, Dunnenberger HM, Hulick PJ. Pharmacogenomics: Prescribing Precisely. *Med Clin North Am*, 2019, 103, 977-990.

Whirl-Carrillo M, Huddart R, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Whaley R, Klein TE. An Evidence-Based Framework for Evaluating Pharmacogenomics Knowledge for Personalized Medicine. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110, 563-572.

Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clinical Pharmacol Ther*, 2012, 92, 414-417.

WHO. Expert Committee on Biological Standardization. Glossary of Terms for Biological Substances Used for Texts of the Requirements. HO unpublished document BS/95.1793. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1995.

Xia MM, Wang L, PAan PP, Wang HY, Chen MC, Chen Y, Dai DP, Cai JP, Hu GX. The role of CYP2C9 genetic polymorphisms in the oxidative metabolism of diclofenac in vitro. *Pharmazie*, 2014, 69, 898–903.

Xu H, Williams KM, Liauw WS, Murray M, Day RO, McLachlan AJ. Effects of St John's wort and CYP2C9 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of gliclazide. *Br J Pharmacol*, 2008, 153, 1579-1586.

Yasar U, Forslund-Bergengren C, Tybring G, Dorado P, Llerena A, Sjöqvist F, Eliasson E, Dahl ML. Pharmacokinetics of losartan and its metabolite E-3174 in relation to the CYP2C9 genotype. *Clin Pharmacol Ther*, 2002, 71, 89-98.

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

Zhang Y, Si D, Chen X, Lin N, Guo Y, Zhou H, Zhong D. Influence of CYP2C9 and CYP2C19 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of gliclazide MR in Chinese subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64, 67-74.

Zhou K, Donnelly L, Burch L, Tavendale R, Doney AS, Leese G, Hattersley AT, McCarthy MI, Morris AD, Lang CC, Palmer CN, Pearson ER. Loss-of-function CYP2C9 variants improve therapeutic response to sulfonylureas in type 2 diabetes: a Go-DARTS study. *Clin Pharmacol Ther*, 2010, 87, 52-56.

Zi J, Liu D, Ma P, Huang H, Zhu J, Wei D, Yang J, Chen C. Effects of CYP2C9*3 and CYP2C9*13 on diclofenac metabolism and inhibition-based drug-drug interactions. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2010, 25, 343–350.

8. SAŽETAK

CYP2C9 jedan je od najvažnijih i najobilnije eksprimiranih enzima sustava citokrom P450 (CYP) u ljudskim jetrima. Odgovoran je za biotransformaciju oko 15 % klinički važnih lijekova, uključujući kumarinske antikoagulate (varfarin), antikonvulzive (fenitoin, valproična kiselina), oralne antidijetike (gliklazid, tolbutamid), blokatore angiotenzinskih-II receptora (kandesartan, losartan), nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) te fluvastatin i siponimod. Gen *CYP2C9* visoko je polimorfan te je, do danas, identificirano preko 60 različitih alela, među kojima najmanje njih 20 dokazano mijenja aktivnost genskog produkta, što pridonosi velikoj interindividualnoj varijabilnosti terapijskog odgovora. S obzirom na učinak polimorfizama na smanjenu aktivnost enzima te njihovu relativno veliku učestalost u bjelačkoj populaciji, najvažniji su haplotipovi *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3. Navedeni aleli rezultiraju smanjenim metabolizmom većine supstrata CYP2C9 i većom izloženosti lijeku te posljedično povećanim rizikom razvoja neželjenih reakcija, osobito kod primjene lijekova s uskim terapijskim rasponom. U svrhu otkrivanja pojedinaca s povećanim rizikom razvoja neželjenih reakcija i prije početka liječenja, provodi se genotipizacija *CYP2C9*, na temelju koje se zaključuje o metaboličkom fenotipu. Tri su moguća fenotipa CYP2C9: spori (PM), intermedijarni (IM) i normalni (NM) metabolizatori. U bjelačkoj populaciji spori metabolizatori čine 3-5 %. Ovakav personalizirani pristup omogućuje pravovremenu primjenu odgovarajuće terapije i bolji ishod za bolesnika. U ovome su radu prikazana dosadašnja saznanja o utjecaju genskih varijacija *CYP2C9* na terapijski učinak i sigurnost lijekova-supstrata CYP2C9 te je opisan praktični pristup validaciji metode za genotipizaciju *CYP2C9* u kliničkoj praksi.

8. SUMMARY

CYP2C9 is one of the most important and abundantly expressed enzymes of the cytochrome P450 system in the human liver. It is responsible for the metabolism of approximately 15 % of clinically important drugs, including coumarin anticoagulants (warfarin), anticonvulsants (phenytoin, valproic acid), oral antidiabetic agents (gliclazide, tolbutamide), angiotensin II receptor antagonists (candesartan, losartan), nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), fluvastatin and siponimod. *CYP2C9* gene is highly polymorphic and, to this day, over 60 different alleles have been identified, among which at least 20 have been proven to alter its gene product activity, which contributes to significant inter-individual variability of therapeutic response. Due to the decreasing effect on enzyme activity and the relatively high prevalence in Caucasians, *CYP2C9**2 and *CYP2C9**3 are the most important haplotypes. These alleles result in reduced metabolism for most CYP2C9 substrates, increased drug exposure, and consequently increased risk of adverse drug reactions, especially when administered drugs have a narrow therapeutic index. To identify individuals with increased risk of adverse drug reactions (ADRs) even before the treatment initiation, preemptive *CYP2C9* genotyping is performed, and metabolic phenotype is inferred based on these results. There are three possible CYP2C9 phenotypes: poor metabolizer (PM), intermediate metabolizer (IM), and normal metabolizer (NM). In the Caucasian population, poor metabolizers make 3-5 %. This personalized approach enables in time selection of appropriate therapy and a better outcome for a patient. In this paper, current knowledge on the influence of *CYP2C9* gene variations on the efficacy and safety of drugs metabolized by the CYP2C9 enzyme and a practical approach to validation of methods for *CYP2C9* genotyping in clinical practice is presented.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Samostalni kolegij Molekularna dijagnostika
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

GENOTIPIZACIJA *CYP2C9* U KLINIČKOJ PRAKSI

Dora Krsmanović

SAŽETAK

CYP2C9 jedan je od najvažnijih i najobilnije eksprimiranih enzima sustava citokrom P450 (*CYP*) u ljudskim jetrima. Odgovoran je za biotransformaciju oko 15 % klinički važnih lijekova, uključujući kumarinske antikoagulate (varfarin), antikonvulzive (fenitoin, valproična kiselina), oralne antidijabetike (gliklazid, tolbutamid), blokatore angiotenzinskih-II receptora (kandesartan, losartan), nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) te fluvastatin i siponimod. Gen *CYP2C9* visoko je polimorfan te je, do danas, identificirano preko 60 različitih alela, među kojima najmanje njih 20 dokazano mijenja aktivnost genskog produkta, što doprinosi velikoj interindividualnoj varijabilnosti terapijskog odgovora. S obzirom na učinak polimorfizama na smanjenu aktivnost enzima te njihovu relativno veliku učestalost u bjelačkoj populaciji, najvažniji su haplotipovi *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3. Navedeni aleli rezultiraju smanjenim metabolizmom većine supstrata *CYP2C9* i većom izloženosti lijeku te posljedično povećanim rizikom razvoja neželjenih reakcija, osobito kod primjene lijekova s uskim terapijskim rasponom. U svrhu otkrivanja pojedinaca s povećanim rizikom razvoja neželjenih reakcija i prije početka liječenja, provodi se genotipizacija *CYP2C9* na temelju koje se zaključuje o metaboličkom fenotipu. Tri su moguća fenotipa *CYP2C9*: spori (PM), intermedijarni (IM) i normalni (NM) metabolizatori. U bjelačkoj populaciji spori metabolizatori čine 3-5 %. Ovakav personalizirani pristup omogućuje pravovremenu primjenu odgovarajuće terapije i bolji ishod za bolesnika. U ovome su radu prikazana dosadašnja saznanja o utjecaju genskih varijacija *CYP2C9* na terapijski učinak i sigurnost lijekova-supstrata *CYP2C9* te je opisan praktični pristup validaciji metode za genotipizaciju *CYP2C9* u kliničkoj praksi.

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

Rad sadrži: 62 stranice, 6 grafičkih prikaza, 21 tablica i 94 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: farmakogenomika, *CYP2C9*, genski polimorfizmi, varfarin, fenitoin, NSAID, siponimod, validacija

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

Dr. sc. Lana Ganoci, znanstveni suradnik, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

Ocjenjivači: **Dr. sc. Karmela Barišić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Dr. sc. Lana Ganoci, znanstveni suradnik, specijalist analitičke toksikologije, Klinički bolnički centar Zagreb

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

Rad prihvaćen: listopad 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Independent course Molecular diagnostics
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

CYP2C9 GENOTYPING IN CLINICAL PRACTICE

Dora Krsmanović

SUMMARY

CYP2C9 is one of the most important and abundantly expressed enzymes of the cytochrome P450 system in the human liver. It is responsible for the metabolism of approximately 15 % of clinically important drugs, including coumarin anticoagulants (warfarin), anticonvulsants (phenytoin, valproic acid), oral antidiabetic agents (gliclazide, tolbutamide), angiotensin II receptor antagonists (candesartan, losartan), nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), fluvastatin and siponimod. *CYP2C9* gene is highly polymorphic and, to this day, over 60 different alleles have been identified, among which at least 20 have been proven to alter its gene product activity, which contributes to significant inter-individual variability of therapeutic response. Due to the decreasing effect on enzyme activity and the relatively high prevalence in Caucasians, *CYP2C9*2* and *CYP2C9*3* are the most important haplotypes. These alleles result in reduced metabolism for most CYP2C9 substrates, increased drug exposure, and consequently increased risk of adverse drug reactions, especially when administered drugs have a narrow therapeutic index. To identify individuals with increased risk of adverse drug reactions (ADRs) even before the treatment initiation, preemptive *CYP2C9* genotyping is performed, and metabolic phenotype is inferred based on these results. There are three possible CYP2C9 phenotypes: poor metabolizer (PM), intermediate metabolizer (IM), and normal metabolizer (NM). In the Caucasian population, poor metabolizers make 3-5 %. This personalized approach enables in time selection of appropriate therapy and a better outcome for a patient. In this paper, current knowledge on the influence of *CYP2C9* gene variations on the efficacy and safety of drugs metabolized by the CYP2C9 enzyme and a practical approach to validation of methods for *CYP2C9* genotyping in clinical practice is presented.

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

Thesis includes: 62 pages, 6 figures, 21 tables and 94 references. Original is in Croatian language.

Keywords: pharmacogenomics, *CYP2C9*, gene polymorphisms, warfarin, phenytoin, NSAIDs, siponimod, validation

Mentor: **Karmela Barišić, Ph.D.** /Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lana Ganoci, Ph.D. /Analytical toxicology specialist, University Hospital Centre Zagreb

Reviewers: **Karmela Barišić, Ph.D.** /Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lana Ganoci, Ph.D. /Analytical toxicology specialist, University Hospital Centre Zagreb

Nada Božina, Ph.D. /Associate Professor, University of Zagreb Faculty of medicine

The thesis was accepted: October 2021.