

# Uloga polimorfizama gena CES1 u kliničkoj medicini

---

Prpić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:191751>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**



Repository / Repozitorij:

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



Ivana Prpić

**Uloga polimorfizama gena *CES1* u kliničkoj  
medicini**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkoga bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Dunje Rogić i suvoditeljstvom dr. sc. Livije Šimičević.

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Dunji Rogić i komentorici dr. sc. Liviji Šimičević što su mi dale priliku i omogućile izradu ovoga rada. Hvala Vam na trudu, strpljenju, susretljivosti i usmjeravanju prilikom pisanja rada.*

*Zahvaljujem se doktorandici Jozefini Palić, mag. med. biochem., i Zrinki Marković, kem. teh., na pomoći oko izrade eksperimentalnog dijela rada. Hvala Vam na svim savjetima, prenesenom znanju, strpljenju i ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Posebno se zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i Mislavu na podršci i strpljenju.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Farmakogenetika/farmakogenomika i individualizacija terapije .....	2
1.2. Karboksil-esteraza 1 (CES1).....	3
1.3. Klinički značajni polimorfizmi jednog nukleotida gena <i>CES1</i> .....	8
1.4. Dabigatraneteksilat .....	16
1.5. Farmakogenetika dabigatraneteksilata.....	18
1.6. Interakcije dabigatrana s drugim lijekovima.....	32
<b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>	<b>35</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>37</b>
3.1. Ispitanici i uzorci.....	38
3.2. Izdvajanje DNA QIAamp® metodom .....	38
3.2.1. Mjerenje koncentracija i čistoće izdvojene DNA .....	42
3.3. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu.....	43
3.3.1. Genotipizacija polimorfizama <i>CES1</i> rs2244613 i rs8192935.....	45
3.4. Analiza negenetičkih čimbenika .....	51
3.5. Analiza interakcija lijek-lijek.....	52
3.6. Statistička obrada podataka.....	52
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>54</b>
4.1. Demografska i klinička obilježja ispitanika.....	55
4.2. Povezanost polimorfizama <i>CES1</i> s krvarenjem i tromboembolijom.....	57
4.3. Povezanost negenetičkih čimbenika s krvarenjem i tromboembolijom .....	57
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>66</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>73</b>
<b>7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....</b>	<b>75</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>80</b>

<b>9. SAŽETAK .....</b>	<b>93</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>95</b>
<b>10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD</b>	

# **1. UVOD**

## 1.1. Farmakogenetika/farmakogenomika i individualizacija terapije

Farmakogenomika je znanstvena disciplina koja proučava kako genetička varijabilnost utječe na ishod terapije, odnosno proučava povezanost varijacija gena i interindividualnih razlika u odgovoru na lijek. Varijacije u farmakogenima utječu na funkciju metaboličkih enzima, membranskih prijenosnika, receptora ili ciljnih mjesta djelovanja lijeka što posljedično mijenja farmakodinamiku i/ili farmakokinetiku lijeka i dovodi do izostanka terapijskoga odgovora ili štetnih učinaka lijeka (Rifai i sur., ured., 2018; Božina i Pejnović, 2013; Ingelman-Sundberg i sur., 2005). Osim genetičkih čimbenika, na interindividualni terapijski odgovor utječu i negenetički čimbenici (poput dobi, spola, indeksa tjelesne mase, okolišnih čimbenika, funkcionalnoga statusa jetre i bubrega, prisutnih bolesti, interakcija lijek-lijek i dr.), kao i epigenetički čimbenici (Katara i Yadav, 2019). Od 2005. godine, kada je objavljena prva cjelogenomska studija povezanosti (GWAS, od engl. *genome-wide association study*), pa sve do danas, otkriven je velik broj polimorfizama koji su povezani s varijabilnim terapijskim odgovorom na lijekove. Iako se pojmovi „farmakogenetika“ i „farmakogenomika“ ponekad koriste kao istoznačnice, između njih postoji razlika. Farmakogenetika proučava interakcije jednog gena i lijeka, dok farmakogenomika istražuje utjecaj više gena (ili čak cijeloga genoma) na učinkovitost i nuspojave određenoga lijeka (Božina i sur., 2019).

Farmakogenetika i farmakogenomika pripadaju području personalizirane medicine. Koncept personalizirane medicine podrazumijeva kako svaka osoba ima poznati vlastiti genetički profil koji upućuje liječnike na povećan rizik od razvoja neke bolesti prije nego što se ona klinički manifestira te pomaže liječnicima u odabiru optimalnoga lijeka i njegove optimalne doze ili protokola liječenja čime se smanjuje pojavnost nuspojava, osigurava se što uspješnije liječenje i smanjuju se troškovi zdravstvene skrbi. Takav pristup predstavlja odmak od dosadašnjeg principa liječenja - „jedan lijek za sve“ (od engl. *one-size-fits-all*) ka individualnom pristupu, točnije ciljanoj terapiji specifičnoj za svakoga pacijenta - „odgovarajući lijek za odgovarajućega pacijenta u odgovarajućoj dozi u odgovarajuće vrijeme“ ([www.genome.gov](http://www.genome.gov)). Navedeno, u kontekstu farmakogenetike i farmakogenomike, znači provođenje farmakogenetičkih testiranja kojima se određuje odnos genotip-fenotip jednog ili više gena i enzima čime se prepoznaju pacijenti koji mogu razviti ozbiljne nuspojave lijeka i na temelju kojih se optimizira terapija. Cilj je propisati što učinkovitiju i sigurniju terapiju, a to se postiže pomoću smjernica za odabir lijeka i doze na temelju rezultata farmakogenetičkih istraživanja. Smjernice se temelje na kliničkim dokazima i izdaju ih međunarodna udruženja poput Konzorcija za kliničku primjenu farmakogenomike (CPIC, od engl. *Clinical*

*Pharmacogenetics Implementation Consortium*), Nizozemske radne grupe za farmakogenetiku (DPWG, od engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*), Francuske nacionalne mreže za farmakogenetiku (RNPGx, od franc. *Réseau francophone de pharmacogénétique*) i Kanadske farmakogenomske mreže za sigurnu primjenu lijekova (CPNDS, od engl. *Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety*). Osim implementacije farmakogenomike u kliničku praksu, izrazito je bitna i njezina implementacija u procese razvoja novih lijekova. Sve je više odobrenih lijekova koji, u uputama o lijeku, sadrže informacije o farmakogenomici vezano za propisivanje i doziranje (Božina i sur., 2019; Ganoci, 2019).

Razlikujemo dva pristupa farmakogenetičkih testiranja: pristup gdje se genotipizacija specifičnog polimorfizma (ili više njih) provodi nakon propisivanja lijeka s ciljem utvrđivanja odgovarajuće doze i preventivan (od engl. *pre-emptive*) pristup kod kojeg se genotipizira panel brojnih genetičkih varijanti prije propisivanja lijeka. Kod potonjeg pristupa liječnik dobiva informacije o svim klinički značajnim varijantama farmakogena određenoga pacijenta koje se pohranjuju u njegovom zdravstvenom kartonu i kojima se liječnik služi prilikom svakog propisivanja lijeka. Argument koji ide u prilog preventivnom pristupu testiranja jest što je nekoliko istraživanja pokazalo kako većina ljudi ima barem jednu klinički značajnu varijantu farmakogena koja bi mogla utjecati na učinkovitost i sigurnost dane terapije (Roden i sur., 2019; Roden i sur., 2018).

## **1.2. Karboksil-esteraza 1 (CES1)**

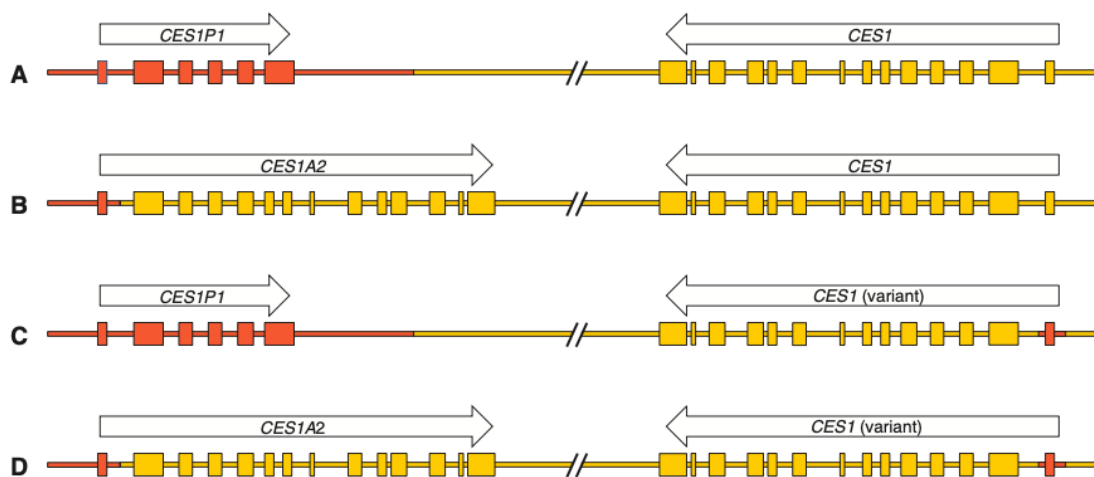
Karboksil-esteraze (CES, E.C. 3.1.1.1) su metabolički važni enzimi koji pripadaju superporodici serinskih hidrolaza, a čija je funkcija hidroliza esterske, tioesterske, amidne i karbamatne veze u velikom broju strukturno različitih spojeva - od endogenih supstrata poput triglicerida i estera kolesterola do ksenobiotika poput lijekova, pesticida i zagađivača okoliša. Imaju bitnu ulogu u metabolizmu lipida, aktivaciji prolijekova i detoksifikaciji lijekova kao i okolišnih toksikanata (Wang i sur., 2018). Osim hidrolitičke aktivnosti, karboksil-esteraze posjeduju i aktivnost transesterifikacije pa tako primjerice u prisutnosti etanola prevode metilne estere supstrata (kokain, metilfenidat, klopidogrel) u etilne estere (Rendić i Medić-Šarić, 2013). Na temelju sličnosti aminokiselinske sekvence karboksil-esteraze sisavaca su klasificirane u pet porodica (CES1 - CES5).

U ljudi je dosad otkriveno pet enzima (CES1, CES2, CES3, CES4A i CES5A) koji dijele oko 40 % sličnosti aminokiselinske sekvence. Osim u građi, međusobno se razlikuju i prema



smještaju u organizmu te specifičnosti prema supstratima. U kontekstu metabolizma ksenobiotika najbolje su istraženi enzimi CES1 i CES2 (Singh i sur., 2021; Chen i sur., 2018; Wang i sur., 2018).

Karboksil-esteraza 1 (CES1) je najzastupljeniji enzim koji metabolizira lijekove (DME, od engl. *drug-metabolizing enzyme*) u jetri čovjeka odgovoran za 80 – 95 % ukupne hidrolitičke aktivnosti u tom organu (Her i Zhu, 2020). To je glikoprotein građen od 567 aminokiselina, molekulske mase 62 521 Da koji je kodiran istoimenim genom *CES1* smještenim na kromosomu 16. Veličina gena iznosi malo više od 30 kb te se sastoji od 14 egzona ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)). Prema Chen i sur. (2018) *CES1* postoji u tri izoforme - *CESIA1* (originalna kopija *CES1*), *CESIA2* i *CESIA3* (pseudogen poznatiji i kao *CESIP1*). U blizini gena *CES1* nalaze se dva nefunkcionalna pseudogena - *CESIP1* udaljen 28 kbp, odnosno *CESIP2* udaljen 53 kbp od *CES1*. Pseudogen *CESIP1* (u literaturi označen i kao *CESIA3*), veličine 14 kbp, sadrži prvih šest egzona *CES1* i ne kodira funkcionalni protein zbog preuranjenoga stop-kodona u egzonu 3, već eksprimira malu količinu nefunkcionalne mRNA. *CESIP1VAR* je funkcionalna varijanta pseudogena *CESIP1* koja kodira protein CES1, koji je identičan genskom produktu *CESIA1*. Međutim, *CESIP1VAR* se manje prepisuje nego *CESIA1*. Navedena varijanta se u literaturi označava i kao *CESIA2*. Drugi pseudogen, *CESIP2*, je velik 26 kbp, sadrži 14 egzona i ne prepisuje se (Chen i sur., 2018; Rasmussen i sur., 2017; Rasmussen i sur., 2015). *CES1* i *CESIA1* su sinonimi koji predstavljaju originalnu kopiju *CES1*, međutim u literaturi je preferirano korištenje termina *CESIA1* kako bi se *CES1* jasno razlikovao od *CESIA2*. *CESIA2* je funkcionalna duplikacija *CES1*, točnije hibrid *CESIA1* i *CESIP1* najvjerojatnije nastao njihovim križanjem. Promotorska regija, egzon 1 i početni dio introna 1 su homologni *CESIP1*, dok je ostatak gena identičan *CESIA1* (Chen i sur., 2018; Rasmussen i sur., 2017). Razlike u promotorskoj regiji između *CESIA1* i *CESIA2* uzrok su razlika u njihovoj transkripcijskoj aktivnosti. Opažena je značajno manja ekspresija *CESIA2* u odnosu na ekspresiju *CESIA1* jer se transkripcijski faktori poput Sp1 s većim afinitetom vežu za promotor *CESIA1* nego za promotor *CESIA2* (Her i Zhu, 2020; Chen i sur., 2018). *CESIA1* ima dvije varijanta koje sadrže segmente *CESIP1* - *CESIA1b*, koja je rjeđa u populaciji, i *CESIA1c* (*CESIVAR*) koja se češće pojavljuje u populaciji. Strukturno, varijanta *CESIA1c* je gotovo identična *CESIA1*, jedino je egzon 1 (s ili bez bočnih sekvenca) zamijenjen homolognim segmentom gena *CESIP1* (Rasmussen i sur., 2018). Dosad su opisana četiri glavna haplotipa gena *CES1* (Slika 1.): *CESIP1* i *CESIA1*, *CESIA2* i *CESIA1*, *CESIP1* i *CESIVAR*, *CESIA2* i *CESIVAR* (Rasmussen i sur., 2018).



**Slika 1.** Prikaz četiri haplotipa *CES1* gena: A: *CES1P1* i *CES1A1* (haplotip divljeg tipa), B: *CES1A2* i *CES1A1*, C: *CES1P1* i *CES1VAR*, D: *CES1A2* i *CES1VAR* (preuzeto iz Rasmussen i sur. (2018) uz dopuštenje autora).

Analizom ekspresije molekula mRNA u različitim tkivima čovjeka otkriveno je kako je enzim dominantno eksprimiran u jetri, dok je u manjim količinama detektiran u brojnim drugim tkivima poput pluća, masnoga tkiva, srca, žučnog mjehura, prostate, koštane srži, mokraćnog mjehura, duž gastrointestinalnoga trakta i dr. ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).

*CES1* je, kao i druge karboksil-esteraze, unutarstanični protein vezan za membranu endoplazmatskoga retikuluma s katalitičkom domenom smještenom u lumenu organela. Međutim, istraživanja pokazuju prisutnost enzima i u citosolu, a taj citosolni oblik također sudjeluje u metabolizmu lijekova (Rasmussen i sur., 2015). N-terminalni kraj *CES1* sadrži signalni slijed aminokiselina koji određuje konačni smještaj enzima jer ga nakon sinteze usmjerava u endoplazmatski retikulum. Na C-terminalnom kraju enzima nalazi se slijed HIEL (His-Ile-Glu-Leu) pomoću kojeg se *CES1* veže na specifični slijed KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) protein-zadržavajućeg receptora na membrani endoplazmatskoga retikuluma što omogućuje trajno zadržavanje enzima s luminalne strane organela i sprječava njegovu sekreciju iz stanica u krvotok u zdravih osoba. Prisutnost enzima u krvotoku uočena je jedino u pacijenata s hepatocelularnim karcinomom (Di, 2019). Primjenom rendgenske kristalografije otkriveno je nekoliko trodimenzionalnih struktura enzima s različitim ligandima. Ujedno, enzim *CES1* postoji u obliku monomera, homotrimerera i homoheksamera. Oligomerizacija enzima je kontrolirana tzv. Z-mjestom, a raspodjela različitih oblika enzima u stanici ovisi o supstratu. Trimerni oblik ima najveću enzimsku aktivnosti (Singh i sur., 2021; Wang i sur., 2018). Strukturalna analiza *CES1* pokazala je kako enzim ima tri vezna mjesta: aktivno središte koje

čini katalitička trijada sastavljena od Ser221, His468 i Glu354, “kanal” za ulazak supstrata i izlazak hidroliziranih produkata i Z-mjesto (Rasmussen i sur., 2015). Aktivno središte enzima je pretežno izgrađeno od hidrofobnih aminokiselina i, osim katalitičke trijade, sadrži vezno mjesto za supstrat u obliku velikoga džepa kojeg Ser221 dijeli na dva manja supstrat-vezajuća džepa različitih svojstava. Jedan je manji i rigidniji te se u njega vežu supstrati s malom alkoholnom, tiolnom ili amino skupinom, dok je drugi veći i fleksibilniji pa se u njega vežu supstrati s većom acilnom skupinom. Takva struktura omogućuje hidrolizu velikog broja različitih spojeva i objašnjava selektivnost enzima prema esterskim supstratima koji imaju malu alkoholnu, tiolnu ili amino skupinu i veću acilnu skupinu poput metilfenidata, klopidogrela, enalapрила, oseltamavira i drugih (Singh i sur., 2021; Wang i sur., 2018). Z-mjesto je vezno mjesto na površini enzima koje ima sposobnost vezanja različitih liganda. Pretpostavlja se kako Z-mjesto ima alosteričku funkciju jer vezanjem liganda dolazi do konformacijskih promjena katalitičkoga mjesta što olakšava hidrolizu, odnosno povećava katalitičku aktivnost enzima (Rasmussen i sur., 2015).

Na ekspresiju i aktivnost CES1 utječu genetički čimbenici poput polimorfizama, ali i negenetički čimbenici poput spola, dobi i nekih bolesti. Prema Her i Zhu (2020) nekoliko *in vitro* i kliničkih studija upućuju na veću ekspresiju CES1 u žena u odnosu na muškarce. Međutim, zbog maloga broja provedenih studija i nekonzistentnih rezultata istih ipak je potrebno provesti dodatna istraživanja kako bi se utvrdio stvaran učinak spola na ekspresiju CES1 te posljedično na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova – supstrata. Ekspresija enzima značajno je manja u novorođenčadi i male djece u odnosu na stariju djecu, adolescente i odrasle. Tijekom intrauterinoga razdoblja CES1 nije uopće ili je vrlo malo eksprimiran, međutim nakon rođenja njegov se izražaj značajno povećava te nakon sedam mjeseci dostiže polovicu izražaja u odraslih. Različit stupanj izražaja enzima u djece i novorođenčadi može utjecati na farmakokinetiku lijekova – supstrata CES1 i posljedično na klinički ishod liječenja. Osim toga, u stanjima upalnih bolesti jetre (poput hepatitisa ili ciroze) dolazi do pojačanog stvaranja proupalnih citokina (prvenstveno interleukina 6, IL-6) koji smanjuju ekspresiju enzima CES1 (Di, 2019).

**Tablica 1.** Pregled supstrata, induktora i inhibitora CES1 (Her i Zhu, 2020; Qian i Markowitz, 2020; Wang i sur., 2018).

<b>SUPSTRATI</b>	
Lijekovi	
ACE inhibitori	benazepril, cilazapril, delapril, enalapril, imidapril, kvinapril, ramipril, trandolapril
Anestetici	lidokain
Antiepileptici	rufinamid
Antiviroci	oseltamivir, remdesivir, sofosbuvir, tenofovirafenamid
Citostatici	kapecitabin, irinotekan
Direktni oralni antikoagulansi	dabigatraneteksilat, edoksaban
Imunosupresivi	mikofenolat mofetil
Inhibitori agregacije trombocita	klopidogrel
Inhibitor neprilizina	sakubitril
Opioidni analgetici	meperidin
Stimulansi središnjeg živčanoga sustava	metilfenidat
Sredstva ovisnosti	kokain, heroin
Endogeni spojevi	esteri kolesterola, trigliceridi, acil-CoA
Organofosforni bojni otrovi	sarin, soman, tabun
Ostali spojevi	pesticidi (p-nitrofenil valerate, trans-permetrin)

**Tablica 1. (nastavak)** Pregled supstrata, induktora i inhibitora CES1 (Her i Zhu, 2020; Qian i Markowitz, 2020; Wang i sur., 2018).

<b>INHIBITORI</b>	
Lijekovi	nelfinavir, nitrendipin, simvastatin, telmisartan, troglitazon
Sredstva ovisnosti	etanol, kanabinoidi (THC, CBD, CBN)
Ostali spojevi	triterpenoidi (oleanolna kiselina, ursolična kiselina i sl.), flavonoidi (galangin, kampferol, kvercetin, luteolin, naringin i sl.)
<b>INDUKTORI</b>	
Lijekovi	fenofarbital, rifampicin
Ostali spojevi	glukoza, sulforafan

CBD – kanabidiol; CBN – kanabinol; THC –  $\Delta^9$ -tetrahidrokanabinol

### 1.3. Klinički značajni polimorfizmi jednog nukleotida gena *CES1*

S obzirom na bitnu ulogu CES1 u bioaktivaciji i metabolizmu brojnih lijekova, nužno je pronaći genetičke varijante koje potencijalno utječu na funkciju enzima i posljedično na ishode liječenja. Do danas je otkriveno nekoliko klinički značajnih polimorfizama jednog nukleotida *CES1* koje su povezane s intervarijabilnim terapijskim odgovorom lijekova supstrata, međutim klinički značaj farmakogenetičkih istraživanja tih varijanti u svrhu individualizacije terapije je i dalje potrebno dodatno ispitati (Wang i sur., 2018; Rasmussen i sur., 2015). Prema podacima NCBI-jeve (od engl. *National Center for Biotechnology Information*) baze podataka polimorfizama jednog nukleotida (dbSNP, od engl. *The Single Nucleotide Polymorphism database*) dosad je opisano preko 13 tisuća SNP-a *CES1* gena. Većina ih je smještena u nekodirajućim regijama, dok su od kodirajućih varijanti najčešće varijante krivog smisla (od engl. *missense*) i sinonimne varijante (od engl. *synonymous*) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Učestalost alela i haplotipova poznatih polimorfizama značajno se razlikuje među etničkim grupama i rasama (Wang i sur., 2018).

Prva otkrivena varijanta *CES1* koja uzrokuje gubitak funkcije enzima (LOF, od engl. *loss-of-function variant*) je polimorfizam rs71647871 (c.428G>A, p.Gly143Glu). Polimorfizam su otkrili Zhu i sur. (2008) kada su analizirali ispitanika koji je u drugoj studiji, u kojoj su Patrick i sur. (2007) istraživali utjecaj etanola na farmakokinetiku i farmakodinamiku metilfenidata u zdravih ispitanika, pokazivao značajno povišene farmakokinetičke parametre (AUC i  $c_{max}$ ) metilfenidata. Metilfenidat je stimulans središnjega živčanog sustava koji se primjenjuje u liječenju narkolepsije i poremećaja pozornosti s hiperaktivnošću (ADHD). Terapijski oblik dostupan na tržištu je racemična smjesa d- i l- enantiomera pri čemu je d-metilfenidat farmakološki aktivniji od l-metilfenidata. Otprilike 80 % doze lijeka se metabolizira deesterifikacijom putem CES1 u inaktivni metabolit (d,l)-ritalinsku kiselinu koja se izlučuje putem bubrega (Brunton i sur., ured., 2017). Istraživanja su pokazala kako je proces hidrolize lijeka enzimom CES1 stereoselektivan prema l-metilfenidatu koji se u krvi nalazi u vrlo niskim koncentracijama i ima značajno kraće  $t_{1/2}$  u odnosu na d-metilfenidat (Markowitz i Patrick, 2008). U spomenutoj studiji, Zhu i sur. (2008) su sekvencirali cijeli gen *CES1* ispitanika koji je pokazivao karakteristike sporog metabolizatora i otkrili su kako je heterozigotni nositelj dvije varijante u kodirajućim regijama gena: p.Gly143Glu (varijanta krivog smisla u egzonu 4) i p.Asp260fs (delecija u egzonu 6 koja uzrokuje pomak okvira čitanja i prijevremenu terminaciju sinteze enzima). Obje varijante uzrokuju gubitak funkcije enzima što dovodi do značajnog povišenja koncentracije metilfenidata u plazmi uslijed smanjene inaktivacije. Nakon otkrića polimorfizma *CES1* rs71647871, Nemoda i sur. (2009) proveli su istraživanje kako bi istražili utjecaj navedenoga polimorfizma na terapijski odgovor u 122 pedijatrijska pacijenta s ADHD-om liječena metilfenidatom. Premda nije pronađena povezanost polimorfizma i interindividualne varijabilnosti između osoba koje su odgovarale na terapiju (n = 90) i osoba koje nisu postigle odgovarajući terapijski odgovor (n = 32), pronađena je povezanost polimorfizma i smanjenja doze lijeka. Naime, u pet pacijenata koji su heterozigotni nositelji varijantnog alela (od ukupno sedam) bila je potrebna niža doza metilfenidata za smanjenje simptoma. Stage i sur. (2017a) potvrdili su utjecaj polimorfizma rs71647871 na farmakokinetiku metilfenidata u 43 zdrava ispitanika. Otkrili su kako heterozigotni nositelji varijantnog alela imaju značajno viši  $AUC_{0-\infty}$  (kao i  $c_{max}$  te  $t_{1/2}$ ) d-metilfenidata te značajno niži  $c_{max}$  d-ritalinske kiseline u odnosu na kontrolu, točnije nenositelje, što upućuje kako nositelji ovoga polimorfizma imaju smanjen metabolizam metilfenidata i povećan rizik od njegovih toksičnih učinaka.

Klopidogrel je antiagregacijski lijek koji djeluje kao ireverzibilni antagonist P2Y<sub>12</sub> receptora, odnosno receptora za ADP. Nakon apsorpcije u gastrointestinalnom traktu, otprilike 85 % klopidogrela se hidrolizira u jetri putem CES1 u neaktivni derivat karboksilne kiseline, dok se preostalih 15 % aktivira putem dvije uzastopne reakcije posredovane enzimima CYP od kojih je CYP2C19 najvažniji. Intermedijarni metabolit (2-okso-klopidogrel) koji nastaje u prvoj reakciji, kao i aktivni metabolit (tiolni derivat klopidogrela) koji nastaje u drugoj reakciji aktivacije, su također supstrati CES1 putem kojeg se metaboliziraju u neaktivne metabolite (Her i Zhu, 2020). Kako bi se istražio utjecaj polimorfizma rs71647871 na metabolizam klopidogrela, provedene su dvije kliničke studije. Najprije su Lewis i sur. (2013) promatrali utjecaj varijante na plazmatsku koncentraciju klopidogrela i njegovoga aktivnog metabolita, ADP-om induciranu agregaciju trombocita i kardiovaskularne ishode liječenja. U nositelja varijantnog alela uočili su značajno višu koncentraciju aktivnog metabolita klopidogrela nižu agregaciju trombocita u odnosu na nenositelje. Potom su Tarkiainen i sur. (2015a) u svojoj studiji na zdravim ispitanicima imali slične rezultate, točnije otkrili su kako nositelji varijantnog alela imaju 53 % niži AUC<sub>0-∞</sub> omjera inaktivnog metabolita i klopidogrela te 123 % viši AUC<sub>0-∞</sub> klopidogrela i 67 % viši AUC<sub>0-∞</sub> aktivnog metabolita u odnosu na nenositelje varijantnog alela. Nadalje, u nositelja varijantnog alela opažena je 19 % veća inhibicija agregacije trombocita, točnije veći antiagregacijski učinak što je u skladu s rezultatima prethodno navedene studije, ali i *in vitro* studije koje su proveli Zhu i sur. (2013).

Oseltamivir je antivirusni lijek indiciran za prevenciju i liječenje gripe koji se na tržištu nalazi u obliku esterskoga prolijeka koji se putem CES1 u jetri aktivira u aktivni oblik oseltamivir karboksilat. Zhu i Markowitz (2009) proveli su *in vitro* istraživanje s ciljem proučavanja učinka polimorfizama p.Gly143Glu (rs71647871) i p.Asp260fs na aktivaciju oseltamivira te su otkrili kako je u stanicama koje su eksprimirale varijantni CES1 brzina aktivacije lijeka bila značajno smanjena u odnosu na stanice koje su eksprimirale CES1 divljeg tipa. Isti rezultat imali su Shi i sur. (2016a) kada su na uzorcima jetre čovjeka istraživali utjecaj četiri polimorfizma *CES1* (rs71647871, rs2244613, rs8192935 i rs3785161) na hidrolizu oseltamivira. Jedino je u stanicama s polimorfizmom rs71647871 zabilježeno značajno smanjenje hidrolize oseltamivira, dok utjecaj drugih polimorfizama nije pronađen. Tarkiainen i sur. (2012) proveli su farmakokinetičko istraživanje utjecaja polimorfizma rs71647871 na bioaktivaciju oseltamivira u zdravih ispitanika te su u heterozigotnih nositelja varijantnog alela opazili 18 % veći AUC<sub>0-∞</sub> oseltamivira i 23 % manji AUC<sub>0-∞</sub> omjera oseltamivir karboksilata i oseltamivira u odnosu na nenositelje što upućuje kako navedeni polimorfizam smanjuje bioaktivaciju lijeka.

Irinotekan, citostatik indiciran za liječenje uznapredovaloga i metastatskoga kolorektalnog karcinoma, je također prolijek koji se aktivira putem enzima CES1 u jetri u aktivni metabolit SN-38. Istraživanje provedeno od strane Teft i sur. (2015) pokazalo je kako nositelji varijantnog alela polimorfizma rs71647871 imaju značajno niže plazmatske koncentracije aktivnog metabolita SN-38 što upućuje na zaključak kako polimorfizam dovodi do smanjene bioaktivacije lijeka što može rezultirati smanjenjem ili izostankom terapijskog učinka.

Većina odobrenih inhibitora angiotenzin konvertaze (ACEI, od engl. *angiotensin-converting enzyme inhibitors*), lijekova za liječenje arterijske hipertenzije, su prolijekovi esterskoga tipa koji zahtijevaju aktivaciju putem CES1 kako bi ostvarili terapijsko djelovanje. Prvo kliničko istraživanje o utjecaju polimorfizma *CES1* rs71647871 na farmakokinetiku ACE inhibitora proveli su Tarkiainen i sur. (2015b) koji su istraživali učinak navedene varijante na farmakokinetiku kvinaprila i enalaprilata u 22 zdrava ispitanika (10 heterozigotnih nositelja varijantnog alela i 12 homozigotnih nositelja alela divljeg tipa). Uočili su kako je  $AUC_{0-\infty}$  enalaprilata (aktivnog metabolita enalaprilata) 20 % niži, a količina izlučenog enalaprilata mokraćom 35 % niža u nositelja varijantnog alela u odnosu na nenositelje, dok utjecaj polimorfizma na farmakokinetiku kvinaprila nije pronađen. Takav pronalazak u skladu je s rezultatima *in vitro* studije Wang i sur. (2016) koji su, ispitujući utjecaj nekoliko genetičkih varijanti *CES1* na bioaktivaciju ACE inhibitora, zapazili kako je aktivacija enalaprilata značajno smanjena u uzorcima hepatocita koji su nositelji polimorfizma *CES1* rs71647871 u odnosu na nenositelje. Za razliku od spomenutih studija, Stage i sur. (2017b) nisu otkrili značajan utjecaj istoga polimorfizma na farmakokinetiku enalaprilata u zdravih ispitanika. Ikonnikova i sur. (2022) također nisu primijetili utjecaj varijante rs71647871 na farmakokinetiku enalaprilata u 286 ispitanika s arterijskom hipertenzijom, međutim otkrili su kako heterozigotni i homozigotni nositelji intronske varijante *CES1* rs2244613 imaju značajno nižu vršnu i najnižu plazmatsku koncentraciju enalaprilata u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa. Premda su rezultati studija nekonzistentni, pretpostavlja se kako polimorfizam rs71647871 smanjuje bioaktivaciju ACE inhibitora i na taj način utječe na terapijske ishode liječenja.

Dabigatraneteksilat i sakubitril su prolijekovi koji, za postizanje terapijskog učinka, zahtijevaju bioaktivaciju enzimom CES1 u jetri. Shi i sur. (2016b; 2016c) proveli su dvije *in vitro* studije čiji su rezultati pokazali značajno smanjenje aktivacije navedenih lijekova u



aktivne metabolite dabigatran i sakubitriat u uzorcima jetre čovjeka koji su nosili polimorfizam rs71647871 u odnosu na nenasitlje.

Jedan od najčešćih nesinonimnih polimorfizama *CES1* je i rs2307240 (c.224G>A, p.Ser75Asn). Xiao i sur. (2017) istraživali su učinak navedenoga polimorfizma na ishod terapije klopidogrelom u 851 pacijenta s akutnim koronarnim sindromom te otkrili njihovu značajnu povezanost, dok s druge strane, Johnson i sur. (2013) nisu pronašle povezanost polimorfizma s kliničkim ishodima liječenja metilfenidatom u 77 pacijenata s ADHD-om. Također, *in vitro* studija koju su proveli Wang i sur. (2017) pokazala je kako polimorfizam ne utječe značajno na ekspresiju i aktivnost *CES1* u uzorcima jetre čovjeka.

*In silico* metodom predviđeno je kako polimorfizam rs200707504 (c.662A>G, p.Glu220Gly) potencijalno smanjuje aktivnost *CES1*, stoga su Oh i sur. (2017) s ciljem potvrđivanja te teze proveli su istraživanje u kojem su proučavali učinak navedenoga polimorfizma na farmakokinetiku oseltamivira u 20 zdravih ispitanika azijske rase. U heterozigotnih nositelja varijantnog alela pronađeno je povišenje  $AUC_{0-48h}$  oseltamivira za 10 % i sniženje  $AUC_{0-48h}$  oseltamivir karboksilata za 5 %, međutim rezultati nisu dosegli razinu značajnosti. S druge strane, Wang i sur. (2017) su zamijetili značajno smanjenje hidrolitičke aktivnosti *CES1* i posljedično metabolizma enalapрила, klopidogrela i sakubitriala u staničnim linijama koje su nosile varijantni alel.

Johnson i sur. (2013) otkrili su povezanost dva polimorfizma *CES1* koji pokazuju neravnotežu vezanosti: rs2244613 i rs2002577 s pojavom tuge kao neželjenog učinka metilfenidata, međutim pretpostavlja se kako je to posljedica neravnotežne veze navedenih polimorfizama s dva polimorfizma gena *SLC6A2* koji kodira noradrenalinski transporter. Trenutno najviše dokaza o utjecaju intronske varijante rs2244613 (c.1168-33A>C) na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova supstrata *CES1* postoji za dabigatraneteksilat te su dosad provedena istraživanja detaljnije opisana u poglavlju 1.5. Farmakogenetika dabigatrana. Postoje i dvije studije koje povezuju polimorfizam rs2244613 s neželjenim toksičnim učincima terapije citostatikom kapecitabinom. Hamzic i sur. (2017) uočili su kako nositelji varijantnog alela navedenoga polimorfizma na terapiji kapecitabinom imaju značajno veći rizik od teškog proljeva, dok su de With i sur. (2023) otkrili kako nositelji varijantnog alela imaju veći rizik od razvoja težeg oblika sindroma šaka-stopalo u odnosu na nenasitlje. Također, Teft i sur. (2015) su u pacijenata s uznapredovalim kolorektalnim karcinomom na

terapiji irinotekanom zapazili kako nositelji varijantnog alela polimorfizma rs2244613 imaju značajno niži rizik od pojave dijareje zbog smanjene pretvorbe lijeka u aktivni metabolit.

U već spomenutoj *in vitro* studiji Wang i sur. (2017) su istraživali 20 nesinonimnih varijanti *CES1* smještenih u blizini aktivnog središta i identificirali pet *loss-of-function* polimorfizama: rs151291296 (L40Ter), rs121912777 (G142E), rs146456965 (G147C), rs148947808 (Y170D) i rs201065375 (R171C) te četiri polimorfizma koji smanjuju aktivnost *CES1*: rs202121317 (A158V), rs2307243 (R199H), rs200707504 (E220G) i rs202001817 (T290M). Usto, Hamzic i sur. (2017) su identificirali četiri polimorfizma *CES1* koji su povezani s ranom pojavom toksičnosti uzrokovane kapecitabinom: rs2244614 (c.1168-41C>T), rs3217164 (c.690+129del), rs7187684 (c.95346T>C) i rs1186118 (c.-1232A>G). Osim spomenutih polimorfizama, u literaturi su zabilježene brojne druge varijante *CES1* koje potencijalno utječu na kliničke ishode lijekova supstrata *CES1* poput rs8192935 koji utječe na aktivaciju dabigatraneteksilata, rs3785161 koji utječe na liječenje imidaprilom i klopidogrelom, rs3815583 koji utječe na farmakokinetiku metilfenidata i irinotekana i dr. (Her i Zhu, 2020; [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)). Većina dosadašnjih *in vivo* i *in vitro* istraživanih polimorfizama *CES1* sažeto je prikazana u Tablici 2.

S obzirom na proturječne rezultate brojnih studija, utjecaj polimorfizama *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku i/ili kliničke ishode lijekova supstrata *CES1* i dalje je nejasan te je potrebno provesti dodatna istraživanja na većoj skupini ispitanika kako bi se utvrdio njihov stvaran klinički značaj.

**Tablica 2.** Prikaz najvažnijih *in vivo* i *in vitro* ispitanih polimorfizama *CES1* (Her i Zhu, 2020; Chen i sur., 2018; [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

Oznaka polimorfizma (dbSNP*)	Nukleotidna promjena	Funkcionalna posljedica varijante	Smještaj na kromosomu	Referentni alel	Minor alel	MAF <sup>†</sup> (europska populacija)	Lijekovi za koje postoje dokazi o utjecaju polimorfizma
rs71647871	c.428G>A	Varijanta krivog smisla (p.Gly143Glu)	16:55823658 (egzon 4)	C	T	0,0149	metilfenidat, klopidogrel, oseltamivir, enalapril, sakubitril, dabigatran-eteksilat, irinotekan
rs2307240	c.224G>A	Varijanta krivog smisla (p.Ser75Asn)	16:55828800 (egzon 2)	C	T	0,0774	klopidogrel
rs200707504	c.662A>G	Varijanta krivog smisla (p.Glu220Gly)	16:55821399 (egzon 5)	T	C	0,0001	enalapril, klopidogrel, sakubitril
rs2244613	c.1168-33A>C	Intronska varijanta	16:55810697	G	T	0,8089	metilfenidat, dabigatran-eteksilat, kapecitabin, irinotekan
rs3785161	c.-816A>C	Promotorska varijanta	16:55759783 (promotorska regija <i>CES1P1</i> )	/	/	/	imidapril, klopidogrel
rs3815583	c.-75G>T	Promotorska varijanta	16:55833130 (promotrska regija <i>CES1</i> )	A	C	0,2020	metilfenidat, irinotekan

**Tablica 2. (nastavak)** Prikaz najvažnijih *in vivo* i *in vitro* ispitanih polimorfizama *CES1* (Her i Zhu, 2020; Chen i sur., 2018; [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

Oznaka polimorfizma (dbSNP*)	Nukleotidna promjena	Funkcionalna posljedica varijante	Smještaj na kromosomu	Referentni alel	Minor alel	MAF <sup>†</sup> (europska populacija)	Lijekovi za koje postoje dokazi o utjecaju polimorfizma
rs8192935	c.257+885T>C	Intronska varijanta	16:55827882	A	G	0,6730	dabigatraneteksilat
rs8192950	c.1315+2025A>C	Intronska varijanta	16:55808492	T	G	0,6419	klopidogrel
rs2244614	c.1168-41C>T	Intronska varijanta	16:55810705	G	A	0,5995	kapecitabin
rs3217164	c.690+129del	Intronska varijanta	16:55821239	G	delG	0,4246	kapecitabin
rs7187684	c.95346T>C	Intronska varijanta	Intronska regija <i>CES1P1</i>	/	/	/	kapecitabin
rs1186118	c.-1232A>G	Intronska varijanta	Intronska regija <i>CES1P1</i>	/	/	/	kapecitabin

\* rs# predstavlja referentni broj SNP-a iz baze podataka dbSNP (od engl. *Single Nucleotide Polymorphism Database*)

† Učestalost *minor* alela (MAF, od engl. *minor allele frequency*) za europsku populaciju prema ALFA projektu ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

## 1.4. Dabigatraneteksilat

Dabigatran je aktivni oblik prolijeka dabigatraneteksilata koji pripada skupini novijih antikoagulantnih lijekova naziva direktni oralni antikoagulansi (DOAK) ili oralni antikoagulansi neovisni o vitaminu K (NOAK), koji djeluje kao izravni oralni inhibitor trombina, tj. aktiviranog faktora zgrušavanja II (FIIa). Prednost dabigatrana i ostalih DOAK-a u odnosu na vitamin K ovisne oralne antikoagulanse poput varfarina jest brz nastup djelovanja, predvidljiva farmakokinetika koja omogućuje fiksno doziranje lijeka bez potrebe za redovitim laboratorijskim praćenjem (osim u specifičnim slučajevima), manje interakcija s hranom i drugim lijekovima, jednak ili bolji terapijski učinak i manji rizik od pojave ozbiljnih krvarenja (Katzung i sur., ured., 2020). Prema sažetku opisa svojstava lijeka Europske agencije za lijekove (EMA, od engl. *European Medicines Agency*), dabigatran je indiciran za primarnu prevenciju venskih tromboembolijskih događaja (VTE-a) u odraslih bolesnika podvrgnutih kirurškom zahvatu ugradnje totalne endoproteze zgloba kuka ili koljena, liječenje VTE-a i prevenciju rekurentnih VTE-a u pedijatrijskih bolesnika, prevenciju moždanoga udara i sistemske embolije u odraslih bolesnika s nevalvularnom fibrilacijom atriya (NVAF, od engl. *non-valvular atrial fibrillation*) te liječenje i prevenciju rekurentne duboke venske tromboze i plućne embolije u odraslih bolesnika ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

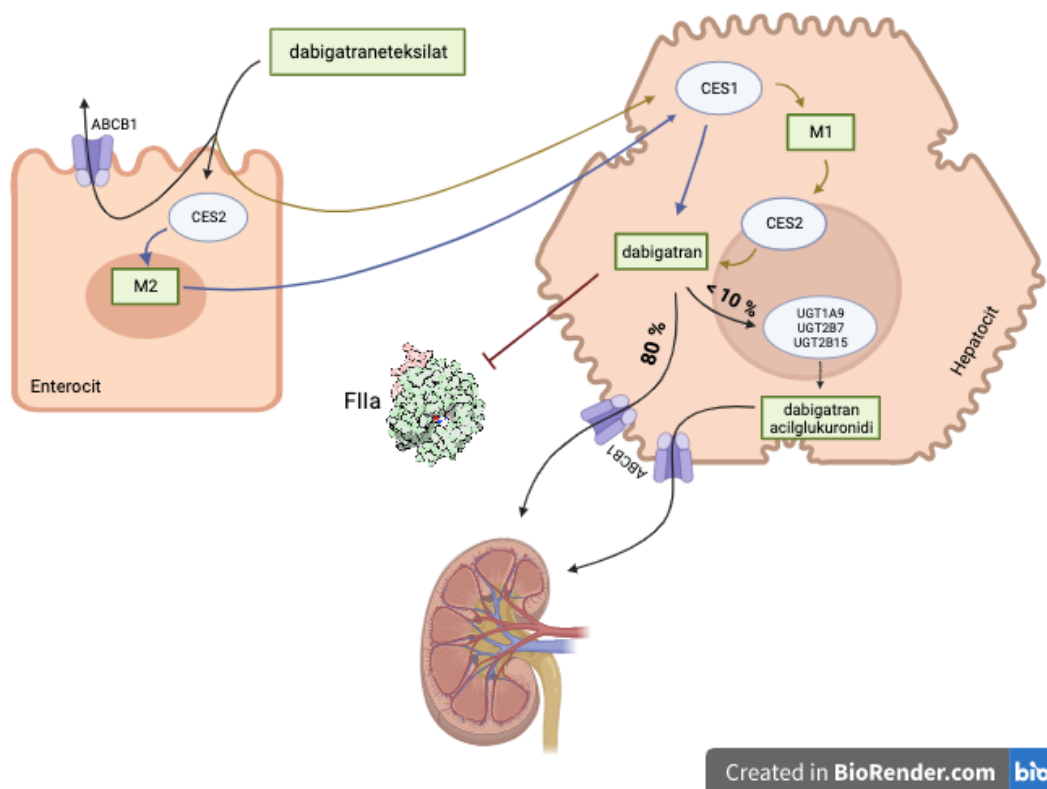
Nakon peroralne primjene, prolijek dabigatraneteksilat se brzo i u potpunosti hidrolizira u aktivni oblik dabigatran djelovanjem esteraza u jetri (CES1) i crijevima (CES2). Dabigatraneteksilat sadrži dvije esterske veze: etilnu i karbamatnu, zbog čega su potrebne dvije reakcije hidrolize kako bi se lijek preveo u aktivni oblik. Prema predloženom putu aktivacije, nakon peroralne primjene, lijek se hidrolizira u intermedijarni metabolit M2 (etilni ester) putem CES2 u crijevima tijekom apsorpcije. Navedeni metabolit se potom pretvara u konačni aktivni metabolit dabigatran putem CES1 u jetri s obzirom da CES2 može hidrolizirati samo karbamatnu estersku vezu. Istraživanja pokazuju kako mali udio dabigatraneteksilata može izbjeći hidrolizu posredovanu CES2 u crijevima, ući u perifernu cirkulaciju i doći do jetre gdje se putem CES1, koji ima sposobnost hidrolize etilne i karbamatne esterske veze, najprije pretvara u intermedijarni metabolit M1 (karbamatni ester) koji se potom hidrolizira u aktivni dabigatran. Premda CES1 može hidrolizirati oba metabolita, katalitička aktivnost pretvorbe M1 u dabigatran značajno je manja u odnosu na pretvorbu M2, dok je s druge strane katalitička aktivnost pretvorbe M1 u dabigatran značajno veća kod CES2 u odnosu na CES1 (Shi i sur., 2016c). Nastali dabigatran se kompetitivno i reverzibilno veže na aktivno mjesto slobodnog i fibrin vezanog trombina čime ga izravno inhibira što onemogućuje daljnju aktivaciju

trombocita i faktora zgrušavanja V, VIII, XI i XIII te pretvorbu fibrinogena u fibrin, što u konačnici sprječava nastanak fibrinskog ugruška (Vuga i sur., 2018; Brunton i sur., ured., 2017).

Lijek se brzo apsorbira i postiže vršnu koncentraciju u plazmi ( $c_{max}$ ), kao i nastup antikoagulantnog učinka, unutar 2 sata od primjene. Bioraspoloživost dabigatrana nakon peroralne primjene iznosi oko 6,5 %, a poluvijek u plazmi 12-14 sati. Stupanj vezanja lijeka za proteine plazme ne ovisi o koncentraciji i iznosi oko 35 %. Otprilike 80 % dabigatrana se izlučuje nepromijenjeno putem bubrega, zbog čega doziranje lijeka, osim o indikaciji i dobi, ovisi i o bubrežnoj funkciji bolesnika. Stoga je prije uvođenja lijeka u terapiju potrebno procijeniti brzinu glomerularne filtracije i, prema uputama, smanjiti dozu ukoliko je bubrežna funkcija blago do umjereno oštećena (klirens kreatinina, CrCL 30-50 mL/min), dok je u slučaju teškog oštećenja bubrega (CrCL < 30 mL/min) lijek kontraindiciran ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Prema Raymondu i sur. (2021), metabolizam se ne odvija putem enzima citokroma P450 (CYP) niti ih dabigatran inducira ni inhibira. Dabigatran se manje od 10 % metabolizira glukuronidacijom kataliziranom UDP-glukuronoziltransferazama: UGT1A9, UGT2B7 i UGT2B15. Pritom nastaju četiri farmakološki aktivna metabolita koji se također izlučuju iz organizma putem bubrega. Dabigatraneteksilat je supstrat P-glikoproteina, transmembranske o ATP-u ovisne izbacivačke pumpe poznatije i kao ABCB1, odnosno MDR1, zbog čega može doći do interakcija lijek-lijek ukoliko se istodobno primjenjuje sa supstratima, inhibitorima ili induktorima P-glikoproteina. Istovremena primjena inhibitora P-glikoproteina (poput amiodarona, dronedarona, itrakonazola, ketokonazola, kinidin, klaritromicina, ciklosporina, ritonavira, verapamila i dr.) povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana, a istovremena primjena induktora (poput karbamazepina, fenitoina, rifampicina, gospine trave (*Hypericum perforatum* L.) i dr.) smanjuje njegovu koncentraciju (Raymond i sur., 2021; Brunton i sur., ured., 2017).

Kao i u slučaju drugih antikoagulanasa, najznačajniji neželjeni učinak dabigatrana je krvarenje koje se može pojaviti na bilo kojem mjestu u organizmu. Čimbenici koji povećavaju rizik od krvarenja su starija životna dob ( $\geq 75$  godina), smanjena bubrežna funkcija, istodobna primjena inhibitora P-glikoproteina, antiagregacijskih lijekova (poput klopidogrela i acetilsalicilne kiseline), nesteroidnih protuupalnih lijekova ili nekih skupina antidepresiva, bolesti gastrointestinalnoga trakta (poput ezofagitisa, gastritisa ili gastroezofagealnoga refluksa), nedavno podvrgavanje invazivnim postupcima poput biopsije, koagulacijski

poremećaji, trombocitopenija ili funkcionalni defekti trombocita i drugi. U slučaju nekontroliranoga ili po život opasnoga krvarenja intravenski se primjenjuje idarucizumab (Praxbind®, Boehringer Ingelheim), Fab fragment humaniziranog monoklonskog protutijela koji se s velikom afinitetom veže za dabigatran i njegove metabolite te na taj način brzo dokida njegov antikoagulacijski učinak. Druge učestalije nuspojave su anemija, sniženi hemoglobin, bol u gastrointestinalnom traktu, mučnina, povraćanje, proljev i povišene aktivnosti jetrenih enzima (Katzung i sur., ured., 2020; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu))



**Slika 2.** Sažet prikaz farmakodinamike i farmakokinetike dabigatraneteksilata (izrađeno pomoću [www.biorender.com](http://www.biorender.com)).

### 1.5. Farmakogenetika dabigatraneteksilata

Na terapijsku učinkovitost i sigurnost dabigatrana, osim negenetičkih čimbenika poput bubrežne funkcije, dobi, tjelesne mase i interakcija lijek-lijek, utječu i genetički čimbenici, točnije polimorfizmi gena koji kodiraju proteine uključene u farmakokinetiku lijeka. Zasad najviše objavljenih dokaza ima za dva gena – *CES1* i *ABCB1* čijih je nekoliko varijanti povezanih s interindividualnom varijabilnosti plazmatskih koncentracija dabigatrana otkriveno

u cjelogenomskoj studiji povezanosti (GWAS). To su dvije intronske varijante gena *CESI* koje pokazuju neravnotežu vezanosti (LD, od engl. *linkage disequilibrium*), rs2244613 (c.1168-33A>C) i rs8192935 (c.257+885T>C) te jedna intronska varijanta gena *ABCB1* - rs4148738 (c.2482-2236G>A) (Cullell i sur., 2018; Tseng i sur., 2018). Osim posljednje navedene varijante, također su istraživana i tri najčešća i najviše istražena polimorfizma gena *ABCB1* povezana s promijenjivom farmakokinetikom lijekova supstrata: rs1045642 (c.3435C>T, p.Ile1145=), rs1128503 (c.1236C>T, p.Gly412=) i rs2032582 (c.2677G>T/A, p.Ala893Ser/Thr). Od dolaska dabigatrana na tržište pa sve danas, provedeno je više od 10 istraživanja kojima je bio cilj istražiti utjecaj polimorfizama na koncentraciju dabigatrana u krvi i/ili na kliničke ishode terapije. Rezultati istraživanja za *CESI* su relativno slični, dok se za *ABCB1* uvelike razlikuju (Tablica 3.).

S obzirom na prethodno uočenu značajnu interindividualnu varijabilnost u plazmatskim koncentracijama dabigatrana, Paré i sur. (2013) proveli su cjelogenomsku studiju povezanosti (GWAS) koristeći uzorke pacijenata iz RE-LY istraživanje (od engl. *Randomised Evaluation of Long-Term Anticoagulant Therapy*, kliničko istraživanje kojim je utvrđena učinkovitost i sigurnost dabigatrana u prevenciji moždanog udara i sistemske embolije u pacijenata s NVAF-om u usporedbi s varfarinom) s ciljem utvrđivanja genetičkih odrednica koje utječu na koncentraciju dabigatrana u krvi te na njegovu učinkovitost i sigurnost. Pronađena su tri polimorfizma, točnije dva polimorfizma gena *CESI* i jedan polimorfizam gena *ABCB1*, povezana s promjenama u vršnoj ( $c_{max}$ , od engl. *peak concentration*) i najnižoj ( $c_{trough}$ , od engl. *trough concentration*) plazmatskoj koncentraciji dabigatrana i potom je istraživana njihova povezanost s kliničkim ishodom terapije, odnosno pojavom krvarenja ili ishemijskog događaja. U heterozigotnih nositelja varijantnog alela polimorfizma *CESI* rs2244613 pronađeno je značajno smanjenje najniže koncentracije dabigatrana za 15 %, odnosno za 28 % u homozigotnih nositelja varijantnog alela, te značajno smanjenje rizika od krvarenja. Nadalje, rezultati su dokazali kako polimorfizam *CESI* rs8192935 značajno smanjuje vršnu koncentraciju dabigatrana za 12 %, dok polimorfizam *ABCB1* rs4148738 značajno povećava vršnu koncentraciju dabigatrana za 12 % bez utjecaja na krvarenje. Nijedan polimorfizam nije povezan s rizikom od ishemijskog događaja. Utjecaj ista tri polimorfizma na vršnu i najnižu plazmatsku koncentraciju dabigatrana u krvi istraživali su Dimatteo i sur. (2016) u pacijenata s fibrilacijom atrijske te su otkrili značajnu povezanost polimorfizama *CESI* rs2244613 i rs8192935 i najniže koncentracije dabigatrana. Značajan utjecaj polimorfizma *ABCB1* rs4148738 na plazmatsku koncentraciju nisu uočili ni Sychev i sur. (2018) koji su istraživali



utjecaj tri polimorfizma: *ABCB1* rs1045642, *ABCB1* rs4148738 i *CES1* rs2244613 na vršnu koncentraciju dabigatrana u 60 pacijenata podvrgnutih kirurškom zahvatu ugradnje potpune endoproteze koljena. Oni su međutim otkrili povezanost genotipa T/T polimorfizma *ABCB1* rs1045642 sa značajno povišenom vršnom koncentracijom dabigatrana i povećanim rizikom od krvarenja u odnosu na genotip C/C (genotip divljeg tipa). Nadalje, u ovom istraživanju nije pronađen značajan utjecaj polimorfizma *CES1* rs2244613 na vršnu i najnižu koncentraciju dabigatrana, ali je u pacijenata mlađih od 60 godina koji su nositelji barem jednog varijantnog alela pronađena značajno niža vršna koncentracija dabigatrana u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa. Dvije godine kasnije, Sychev i sur. (2020) su istraživali učinak ista tri polimorfizma kao i u prethodnoj studiji, ali ovaj put u pacijenata s fibrilacijom atrija i kroničnom bubrežnom bolesti stadija 3A i 3B (GFR: 30-59 mL/min/1,73m<sup>2</sup>). Homozigotni nositelji varijantnog alela rs2244613 (genotip C/C) su imali značajno niži omjer najniže koncentracije lijeka i doze (C/D) u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa (A/A). U nijednoga pacijenta s C/C genotipom nije došlo do krvarenja. Nadalje, provedene su još dvije studije, Lähteenmäki i sur. (2021) i Zubiaur i sur. (2020), kojima je jedan od ciljeva bio istražiti utjecaj polimorfizama *CES1* i *ABCB1* na farmakokinetiku, odnosno kliničke ishode terapije dabigatranom, međutim nijedna nije pronašla značajnu povezanost. Osim spomenutih polimorfizama *CES1*, Shi i sur. (2016c) istraživali su i utjecaj varijante krivog smisla (od engl. *missense*) rs71647871 (c.428G>A, p.Gly143Glu) koja uzrokuje gubitak funkcije enzima *CES1* i značajno utječe na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova supstrata *CES1*.

U provedenoj *in vitro* studiji na 104 biopata jetre zdravih osoba različitih rasa istraživali su učinak spola i tri polimorfizma *CES1* na ekspresiju enzima *CES1* i aktivaciju dabigatraneteksilata i intermedijarnih metabolita. Utjecaj polimorfizama rs2244613 i rs8192935 na farmakokinetiku lijeka nije pronađen, ali je otkrivena značajno niža brzina pretvorbe, odnosno aktivacije dabigatraneteksilata i intermedijarnih metabolita M1 i M2 u dabigatran u uzorcima heterozigota (G/A) polimorfizma rs71647871 u odnosu na uzorke homozigotnih nositelja alela divljeg tipa (G/G) što potencijalno rezultira smanjenom koncentracijom dabigatrana u krvi u nositelja varijantnog alela. Iako je utjecaj polimorfizma rs71647871 na metabolizam drugih lijekova supstrata *CES1* poznat i dobro istražen, njegov učinak na farmakokinetiku dabigatraneteksilata do danas nije istražen ni u jednoj kliničkoj studiji stoga ovaj rezultat *in vitro* studije ima ograničenu kliničku značajnost.

Zanimljivo je i istraživanje Gouin-Thibault i sur. (2017) u kojem su istraživali utjecaj dva polimorfizma *ABCB1* (rs2032582 i rs1045642) i utjecaj istovremenog uzimanja klaritromicina (inhibitora P-gp i CYP3A4) na farmakokinetiku dabigatrana i rivaroksabana u zdravih ispitanika. Rezultati nisu pokazali značaj utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku dabigatrana (i rivaroksabana) za razliku od konkomitantne primjene klaritromicina koji je, neovisno o *ABCB1* genotipu, značajno povećao AUC (površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme, od engl. *area under the curve*) dabigatrana za 100 % i vršnu koncentraciju dabigatrana za 80 %. Nadalje, Roşian i sur. (2020) su istraživali povezanost dva polimorfizma *ABCB1* za koje trenutno postoji najviše dokaza (rs1045642 i rs4148738) s rizikom od ne-velikih krvarenja u pacijenata s fibrilacijom atriya na terapiji dabigatranom ili apiksabanom. Premda nisu otkrili nikakvu značajnu povezanost varijantnih genotipova i haplotipova s rizikom od ne-velikih krvarenja, uočili su kako se u nijednoga pacijenta s haplotipom TG nije pojavilo krvarenje, odnosno da je učestalost toga haplotipa bila viša u pacijenata koji nisu imali krvarenje u odnosu na one koji su imali krvarenje što upućuje na potencijalnu zaštitnu ulogu haplotipa TG od pojave krvarenja.

Osim navedenih studija koje su pretežno provedene na ispitanicima bijele rase, kineski znanstvenici proveli su tri istraživanja kojima su htjeli istražiti utjecaj polimorfizama *CES1* i *ABCB1* na farmakokinetiku dabigatrana i kliničke ishode liječenja u ispitanika azijske rase (Tablica 2). Najprije su Liu i sur. (2021) istraživali utjecaj polimorfizama *CES1* i *ABCB1* na plazmatske koncentracije dabigatrana u 106 zdravih ispitanika nakon jedne doze lijeka od 150 mg. Rezultati su pokazali značajno povećanje omjera vršne koncentracije dabigatrana te omjera doze i tjelesne mase ispitanika ( $C_{max}/DW$ ) u homozigotnih nositelja varijantnog alela polimorfizma *CES1* rs8192935 u odnosu na heterozigote i homozigotne nositelje alela divljeg tipa. Potom su Ji i sur. (2021) proveli sličnu studiju gdje su promatrali utjecaj istih polimorfizama na farmakokinetiku (mjerenjem vršne i najniže koncentracije lijeka u plazmi) i farmakodinamiku dabigatrana (mjerenjem aktiviranog parcijalnog tromboplastinskog vremena (APTV) i trombinskog vremena (TV)) te na kliničke ishode terapije u 198 ispitanika s NVAF-om koji su primali manju dozu lijeka (110 mg dva puta dnevno). Otkriveno je kako nositelji varijantnog alela A polimorfizma *CES1* rs2244613 imaju značajno veću najnižu koncentraciju lijeka i povećani rizik od ne-velikih krvarenja, dok nositelji varijantnog alela C polimorfizma *CES1* rs8192935 također imaju značajno veću najnižu koncentraciju lijeka i povišene vrijednosti APTV-a pri najnižim koncentracijama dabigatrana u odnosu na nenositelje varijantnog alela. Naposljetku, Zhu i sur. (2022) su na uzorku od 86 pacijenata s

NVAF-om koji su primali dozu od 110 mg dva puta dnevno otkrili značajnu povezanost nositelja varijantnog alela G polimorfizma *CES1* rs8192935 i povišenja najniže koncentracije dabigatrana u usporedbi s nenositeljima varijantnog alela. Prvi put je u kineskoj populaciji pronađena povezanost polimorfizama *ABCB1* rs1045642 i rs4148738 i povećanog rizika od velikih krvarenja.

Bitno je napomenuti kako se učestalost polimorfizama *CES1* rs2244613 i rs8192935 značajno razlikuje između bijele i azijske rase, dok je učestalost polimorfizama *ABCB1* u obje rase slična. Promatrajući *CES1* rs2244613, najučestaliji alel u Europljana koji povezujemo s “normalnim” terapijskim odgovorom je A (alel divljeg tipa). Prilikom njegove promjene u manje zastupljeni alel C (varijantni alel) uočavamo smanjenje plazmatskih koncentracija dabigatrana i posljedično manji rizik od krvarenja. Suprotno tome, najučestaliji alel povezan s “normalnim” terapijskim odgovorom u Azijata je C (alel divljeg tipa) te prilikom njegove promjene u varijantni alel A dolazi do porasta plazmatskih koncentracija dabigatrana i povećanog rizika od krvarenja. Iz takvih opažanja može se zaključiti kako nositelji alela A imaju veću, a nositelji alela C imaju manju ekspresiju i/ili aktivnost enzima *CES1* (Liu i sur., 2021; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Pregledom literature do danas, utjecaj polimorfizama gena *UGT1A9*, *UGT2B7* i *UGT2B15* na farmakokinetiku dabigatrana nije istražen. Pretpostavlja se kako je utjecaj malen i vjerojatno beznačajan s obzirom na mali udio lijeka koji se metabolizira glukoronidacijom (Raymond i sur., 2021). Međutim, Shnayder i sur. (2021) smatraju da bi polimorfizmi gena *UGT2B15* mogli utjecati na plazmatsku koncentraciju, odnosno eliminaciju dabigatrana i posljedično na kliničke ishode terapije kao što je u prethodnim studijama pokazan njihov utjecaj na koncentraciju određenih lijekova koji se metaboliziraju na sličan način kao i dabigatran.

Prema podacima baze znanja PharmGKB (od engl. *The Pharmacogenomics Knowledge Base*) uz promjenjivu farmakokinetiku dabigatrana se, osim polimorfizama *ABCB1* i *CES1*, povezuju i polimorfizmi *CYP3A5* te *CYP2D6* ([www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)). Takvi navodi se temelje na istraživanju Zubiaur i sur. (2020) u kojem je nađeno kako su ispitanici s genotipom *CYP3A5\*1/\*1* imali značajno dulji  $t_{1/2}$  u odnosu na ispitanike s genotipovima *CYP3A\*1/\*3* i *CYP3A5\*3/\*3*. Nadalje, ispitanici koji su bili spori metabolizatori *CYP2D6* su pokazivali značajno povišenu vršnu koncentraciju dabigatrana i AUC te značajno sniženi klirens dabigatrana u odnosu na ispitanike s većom enzimskom aktivnosti. Ova saznanja o mogućem

utjecaju enzima CYP2D6 i CYP3A4 na metabolizmu dabigatrana te mogućem utjecaju njihovih polimorfizama na njegovu izloženost se uvelike razlikuju od uvriježenog stajališta kako se dabigatran ne metabolizira preko enzima citokroma P450, zbog čega je u budućnosti potrebno dodatno istražiti takvu povezanost na većem uzorku ispitanika. Također, u istom istraživanju je pronađen dulji  $t_{1/2}$  i  $t_{max}$  u ispitanika s haplotipom gena *SLC22A1* koji sadrži najmanje dvije varijante, \*2 (rs72552763), \*3 (rs12208357) ili \*5 (rs34059508), u odnosu na ispitanike s haplotipovima koji uopće ne sadrže ili sadrže samo jednu varijantu. Ovi rezultati upućuju na mogućnost kako je dabigatran ili dabigatraneteksilat supstrat prijenosnika OCT1 (organski kationski prijenosnik 1 kodiran genom *SLC22A1*) te i polimorfizmi *SLC22A1* potencijalno mogu utjecati na farmakokinetiku lijeka putem odgođene apsorpciju i smanjene eliminacije lijeka (Thompson i sur., 2023; Zubiaur i sur., 2020).

**Tablica 3.** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Paré i sur., 2013 (GWAS)	1.694 ispitanika europske rase s AF i barem još jednim rizičnim čimbenikom za moždani udar, doza: 110 mg/150 mg dva puta na dan	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Značajno smanjenje $c_{\text{trough}}$ DBG za 15 % u heterozigota, a za 28 % u homozigota varijantnog alela ( $p = 1,2 \times 10^{-8}$ ). Nositelji varijantnog alela imaju značajno smanjen rizik od krvarenja ( $p = 7 \times 10^{-5}$ ). Nije pronađena povezanost polimorfizma s ishemijskim događajem.
			rs8192935 c.257+885T>C	Značajno smanjenje $c_{\text{max}}$ DBG za 12 % u heterozigota ( $p = 3,2 \times 10^{-8}$ ), ali bez utjecaja polimorfizma na krvarenje ili ishemijski događaj.
		<i>ABCB1</i>	rs4148738 c.2482-2236G>A	Značajan porast $c_{\text{max}}$ za 12 % u heterozigota ( $p = 8,2 \times 10^{-8}$ ), ali bez utjecaja polimorfizma na krvarenje ili ishemijski događaj.
Dimatteo i sur., 2016	92 ispitanika europske rase s AF, doza: 110 mg/150 mg	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Smanjenje $c_{\text{trough}}$ DBG za 2 % u heterozigota, a 3 % u homozigota varijantnog alela te je linearni regresijski model pokazao značajnu povezanost polimorfizma i $c_{\text{trough}}$ ( $p = 0,04$ ). Utjecaj polimorfizma na $c_{\text{max}}$ nije otkriven.
			rs8192935 c.257+885T>C	Značajno smanjenje $c_{\text{trough}}$ DBG u homozigota varijantnog alela u odnosu na homozigote <i>wt</i> ( $p = 0,033$ ). Utjecaj polimorfizma na $c_{\text{max}}$ nije otkriven.
		<i>ABCB1</i>	rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema učinka polimorfizma na $c_{\text{max}}$ i $c_{\text{trough}}$ DBG.

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Shi i sur., 2016c ( <i>in vitro</i> studija)	104 uzoraka jetre zdravih osoba različitih rasa	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Nema učinka polimorfizama na ekspresiju <i>CES1</i> i aktivaciju DBG-eteksilata i intermedijarnih metabolita M1 i M2 u uzorcima jetre čovjeka.
			rs8192935 c.257+885T>C	
			rs71647871 c.428G>A	
Gouin-Thibault i sur., 2017	60 zdravih muškaraca europske rase, doza: 300 mg dabigatran (jedna doza) + 40 mg rivaroksaban (jedna doza) + klaritromicin (1 g kroz 5 dana)	<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T	Polimorfizam nije utjecao na farmakokinetiku DBG. Heterozigoti i varijantni homozigoti imaju neznačajno povećanje $c_{max}$ i AUC u odnosu na homozigote <i>wt</i> . Nakon dodatka klaritromicina kao inhibitora P-gp, $c_{max}$ i AUC DBG su značajno porasli (p = 0,002 i p = 0,008).
			rs2032582 c.2677G>T/A	Polimorfizam nije utjecao na farmakokinetiku lijeka. Heterozigoti i varijantni homozigoti imaju neznačajno povećanje $c_{max}$ i AUC u odnosu na homozigote <i>wt</i> . Nakon dodatka klaritromicina kao inhibitora P-gp, $c_{max}$ i AUC dabigatrana su značajno porasli (p = 0,002 i p = 0,008).

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Sychev i sur., 2018	60 ispitanika podvrgnutih kirurškom zahvatu ugradnje totalne endoproteze zgloba koljena, doza: 220 mg jedanput na dan	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Nema značajne razlike u $c_{max}$ i $c_{trough}$ DBG između genotipova, ali pacijenti < 60 godina imaju značajno smanjenje $c_{max}$ DBG u skupini pacijenata koji su imali barem jedan varijantni alel u odnosu na skupinu homozigota <i>wt</i> ( $p = 0,025$ ).
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T	T/T genotip je povezan s povišenim $c_{max}$ ( $p = 0,008$ ) i povećanim rizikom od krvarenja u odnosu na C/C genotip ( $p = 0,0214$ ). Nema značajnog utjecaja polimorfizma na $c_{trough}$ DBG.
			rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema značajnog utjecaja polimorfizma na $c_{max}$ i $c_{trough}$ DBG.
Roşian i sur., 2020	104 ispitanika europske rase s NVAF, dozu je za svakoga pacijenta odredio njegov liječnik	<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema povezanosti varijantnih genotipova i haplotipova s rizikom od ne-velikih krvarenja.

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Sychev i sur., 2020	96 ispitanika s AF i CKD (stadij 3A i 3B), doza: 110 mg/150 mg dva puta na dan	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Homozigoti varijantnog alela (C/C) imali su značajno niži C/D (omjer najniže koncentracije lijeka ( $c_{\text{trough}}$ ) i doze) u odnosu na homozigote <i>wt</i> (A/A) (p = 0,001). U nijednog pacijenta s C/C genotipom nije došlo do krvarenja.
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema značajnog utjecaja polimorfizma na C/D (omjer najniže koncentracije lijeka ( $c_{\text{trough}}$ ) i doze) i rizik od krvarenja ili tromboembolijskog događaja.
Zubiaur i sur., 2020 (farmakogenetička studija potencijalnih gena kandidata)	107 zdravih osoba europske i latinoameričke rase, doza: 150 mg DBG uz ili bez prethodnog uzimanja 40 mg pantoprazola dva puta dnevno kroz 4 dana	59 polimorfizama u 15 gena ( <i>ABCB1</i> , <i>CES1</i> , <i>CYP</i> , <i>SLC</i> , <i>UGT</i> i dr.)		Nema značajnog utjecaja polimorfizama <i>CES1</i> i <i>ABCB1</i> te njihovih haplotipova na farmakokinetiku i sigurnost primjene DBG, ali postoji značajan utjecaj spola, konkomitantne primjene pantoprazola i polimorfizama <i>SLC22A1</i> , <i>CYP2D6</i> i <i>CYP3A5</i> .



**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Lähteenmäki i sur., 2021 (retrospektivna studija - podaci preuzeti iz tri finske biobanke)	340 ispitanika s različitim dijagnozama (AF, vaskularne bolesti, PE, moždani udar, VTE)	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33A>C	Nema značajne povezanosti polimorfizma (ni haplotipova) s rizikom od krvarenja niti tromboembolijskih događaja.
			rs8192935 c.257+885T>C	
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T	
			rs1128503 c.1236C>T	
			rs2032582 c.2677G>T/A	
			rs4148738 c.2482-2236G>A	

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Ji i sur., 2021	198 ispitanika azijskog podrijetla s NVAF, doza: 110 mg dva puta na dan	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33C>A	U odnosu na homozigote <i>wt</i> , u nositelja jednog ili oba varijantna alela A postoji značajno viša $c_{\text{trough}}$ DBG ( $p < 0,001$ za A/A vs. C/C, $p = 0,004$ za C/A vs. C/C) i povećani rizik od ne-velikih krvarenja ( $p = 0,034$ ). Nema značajne povezanosti polimorfizma s $c_{\text{max}}$ , niti koagulacijskih parametara.
			rs8192935 c.257+885T>C	U odnosu na homozigote <i>wt</i> , u nositelja jednog ili oba varijantna alela C postoji značajno viša $c_{\text{trough}}$ DBG ( $p < 0,001$ za C/C vs. T/T, $p = 0,014$ za C/T vs. T/T) i povećanje APTV-a pri najnižoj koncentraciji DBG ( $p = 0,015$ ). Nema značajne povezanosti polimorfizma s $c_{\text{max}}$ , niti trombinskog vremena.
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema utjecaja polimorfizama na farmakokinetiku i farmakodinamiku DBG, kao ni na kliničke ishode terapije.

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Liu i sur., 2021	106 zdravih ispitanika azijske rase, doza: 150 mg (jednokratno)	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33C>A	Nema utjecaja polimorfizma na istraživane farmakokinetičke parametre.
			rs8192935 c.257+885A>G	Otkriveno je značajno povećanje $c_{max}/DW$ i $t_{1/2}$ u homozigotnih nositelja varijantnog alela (G/G) u odnosu na heterozigote (G/A) i homozigotne nositelje alela <i>wt</i> (A/A).
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T	Nema utjecaja pojedinačnih polimorfizma ni haplotipova na farmakokinetičke parametre DBG.
			rs2032582 c.2677G>T/A	
			rs4148738 c.2482-2236G>A	

**Tablica 3. (nastavak)** Pregled istraživanja provedenih u razdoblju 2013. – 2022. koja su istraživala utjecaj polimorfizama gena *ABCB1* i *CES1* na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i na kliničke ishode terapije.

Istraživanje	Broj, rasa i dijagnoza ispitanika, primijenjena doza dabigatrana	Istraživani gen	Istraživani polimorfizmi (dbSNP, alelna promjena)	Zaključak
Zhu i sur., 2022.	86 ispitanika azijske rase s NVAF, doza: 110 mg dva puta dnevno	<i>CES1</i>	rs2244613 c.1168-33C>A	Nema utjecaja polimorfizma na koncentracije DBG u plazmi ni na rizik od krvarenja ili tromboembolijskih događaja.
			rs8192935 c.257+885 A>G	U nositelja varijantnog alela G otkriveno je značajno povećanje $c_{trough}$ u odnosu na homozigotne nositelje alela <i>wt</i> ( $p = 0,013$ ). Nema značajnog utjecaja polimorfizma na kliničke ishode terapije DBG.
		<i>ABCB1</i>	rs1045642 c.3435C>T	Postoji značajna povezanost oba polimorfizma i povećanog rizika od velikih krvarenja ( $p = 0,046$ i $p = 0,043$ ).
			rs4148738 c.2482-2236G>A	Nema utjecaja polimorfizama na koncentracije DBG u plazmi ni na rizik od tromboembolijskih događaja.

AF – fibrilacija atrijske; APTV – aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; AUC – površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme; C/D – omjer najniže koncentracije lijeka i doze (koncentracija ujednačena prema dozi); CKD – kronična bubrežna bolest;  $c_{max}$  – vršna koncentracija dabigatrana;  $c_{max}/DW$  – omjer vršne koncentracije dabigatrana i omjera doze i tjelesne mase (od engl. *dose/weight*);  $c_{trough}$  – najniža koncentracija dabigatrana; DBG – dabigatran; NVAF – nevalvularna fibrilacija atrijske; PE – plućna embolija; VTE – venska tromboembolija, *wt* – divlji tip (od engl. *wild type*)

## 1.6. Interakcije dabigatrana s drugim lijekovima

Potencijalne interakcije dabigatrana s drugim lijekovima su bitan čimbenik koji je potrebno razmotriti prilikom uvođenja dabigatrana u terapiju jer je većina pacijenata kojima se propisuje dabigatran, kao i drugi DOAK-i, starije životne dobi s više komorbiditeta zbog čega nerijetko imaju politerapiju. Konkomitantna primjena dabigatrana s određenim lijekovima potencijalno može promijeniti njegovu farmakodinamiku i/ili farmakokinetiku, točnije povećati ili smanjiti njegovu bioraspoloživost i/ili klirens te na taj način utjecati na njegovu učinkovitost i sigurnost (Foerster i sur., 2020). Stöllberger (2017) je u svome radu utvrdila kako je, u usporedbi s drugim DOAK-ima, najviše interakcija lijek-lijek dosad opisano za dabigatran. No, dabigatran je prvi odobreni DOAK za kliničku upotrebu, te nije u potpunosti jasno je li najveći broj interakcija posljedica njegove najdulje upotrebe ili većeg stupanja u interakcije s drugim lijekovima.

Kao što je već spomenuto u poglavlju 1.4., dabigatraneteksilat je supstrat P-gp zbog čega može doći do interakcija lijek-lijek prilikom njegove istovremene primjene s drugim lijekovima koji djeluju kao induktori ili inhibitori P-gp. Smatra se kako induktori P-gp poput rifampicina, karbamazepina, fenitoina, gospine trave (*Hypericum perforatum*) i apalutamida smanjuju plazmatsku koncentraciju dabigatrana čime potencijalno povećavaju rizik od tromboembolijskih događaja. U sažetku opisa svojstava lijeka (SmPC ili SPC, od engl. *summary of product characteristics*) se navodi kako istovremenu primjenu dabigatrana i induktora P-gp treba izbjegavati kada god je to moguće. S druge strane, inhibitori P-gp povećavaju plazmatsku koncentraciju dabigatrana čime potencijalno povećavaju rizik od krvarenja. Klinička značajnost interakcije je povećana u pacijenata sa oštećenom bubrežnom funkcijom. Prema SmPC-u istovremena primjena dabigatrana i snažnih P-gp inhibitora poput ketokonazola, itrakonazola, ciklosporina i dronedarona je kontraindicirana, dok je u primjene blagih do umjerenih P-gp inhibitora poput amiodarona, kinidina, klaritromicina, bisoprolola, karvedilola, verapamila i tikagrelora preporučeno smanjenje doze i pojačani nadzor pacijenata ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Pretpostavlja se kako su simvastatin i lovastatin inhibitori P-gp zbog čega potencijalno mogu povećati rizik od krvarenja, ali klinička značajnost takvih interakcija je i dalje nepoznata. Za rosuvastatin nema dokaza stupanja u interakcije s dabigatranom (Stöllberger, 2017). Prema podacima Lexicomp® baze interakcija lijekova (Lexicomp® Clinical Decision Support System, Wolters Kluwer, Nizozemska) atorvastatin potencijalno smanjuje plazmatsku koncentraciju dabigatrana, ali bez klinički značajnog učinka na njegovu

farmakodinamiku. Pretpostavljeni mehanizmi interakcije su inhibicija ili kompeticija za CES1 ili modifikacija P-gp posredovanog transporta ([www.wolterskluwer.com](http://www.wolterskluwer.com)). Osim već spomenutoga karbamazepina i fenitoina, Gronich i sur. (2021) su utvrdili kako istodobna primjena dabigatrana i valproične kiseline ili levetiracetama također povećava rizik od tromboembolijskih događaja.

Dabigatran je jedini DOAK koji stupa u interakcije s inhibitorima protonskih pumpi poput pantoprazola, esomeprazola, rabeprazola i dr. Nekoliko provedenih istraživanja je otkrilo potencijalan utjecaj konkomitantne terapije s inhibitorima protonskih pumpi na plazmatsku koncentraciju dabigatrana. Pretpostavljeni mehanizam je smanjena apsorpcija dabigatraneteksilata zbog smanjene kiselosti želučanoga soka. Naime, topljivost dabigatraneteksilata ovisi o kiselosti želučanoga medija, stoga povećanje želučanoga pH uslijed primjene inhibitora protonske pumpe smanjuje topljivost i posljedično apsorpciju te bioraspoloživost dabigatrana. Premda je u većini istraživanja koncentracija dabigatrana u plazmi bila smanjena, djelotvornost lijeka nije bila promijenjena te interakcija vjerojatno nema kliničku značajnost (Stöllberger, 2017). U SmPC-u se također navodi kako su tijekom kliničkih ispitivanja inhibitori protonske pumpe bili istovremeno primjenjivani s dabigatranom te učinkovitost lijeka nije bila smanjena. Čak se i preporuča razmatranje njihove primjene kako bi se spriječilo gastrointestinalno krvarenje ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Osim inhibitora protonske pumpe, prema Lexicomp® bazi interakcija lijekova moguće su interakcije dabigatrana i antacida (poput aluminijevog hidroksida, natrijevog bikarbonata, kalcijevog karbonata, magnezijevog karbonata, magnezijevog hidroksida, kalijevog bikarbonat i dr.). Pretpostavljeni mehanizam interakcije je isti kao i u inhibitora protonske pumpe ([www.wolterskluwer.com](http://www.wolterskluwer.com)). Klinička značajnost je nepoznata, a sama interakcija uopće nije spomenuta u SmPC-u.

Od velikog su kliničkoga značaja i farmakodinamske interakcije dabigatrana i drugih antikoagulansa poput enoksaparina, fondaparinuksa, varfarina, rivaroksabana, apiksabana i dr., posebno u slučajevima kada se prelazi s liječenja jednim antikoagulansom na drugi. Prilikom njihove istovremene primjene pojačava se antikoagulantni učinak zbog čega raste rizik od mogućih krvarenja. Prema SmPC-u istovremena primjena dabigatrana i drugih antikoagulansa je kontraindicirana (Stöllberger, 2017; [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Farmakodinamske interakcije se također javljaju pri konkomitantnoj primjeni inhibitora agregacije trombocita (poput klopidogrela, prasugrela, tikagrelora i dr.), nesteroidnih protuupalnih lijekova (poput acetilsalicilne kiseline, ibuprofena, ketoprofena, diklofenaka i dr.) ili antidepresiva iz skupina

SSRI (selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina) i SNRI (selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina). Navedene skupine lijekova imaju antitrombocitni učinak, točnije onemogućuju aktivaciju i agregaciju trombocita zbog čega mogu povećati rizik od krvarenja (Foerster i sur., 2020; Stöllberger, 2017). Stoga je u konkomitantne primjene tih lijekova potrebno procijeniti odnos koristi i rizika te pojačano nadzirati pacijente kako bi se što ranije otkrili znakovi mogućeg krvarenja. Bitno je napomenuti kako rizik od krvarenja ovisi o duljini primjene nesteroidnih protuupalnih lijekova. Kod kratkotrajne primjene nisu povezani s povećanim rizikom od krvarenja dok kod kronične primjene jesu ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Prema Lexicomp® bazi interakcija lijekova značajne interakcije paracetamola i dabigatrana nisu poznate zbog čega je paracetamol potencijalni analgetik izbora u pacijenata na terapiji dabigatranom ([www.wolterskluwer.com](http://www.wolterskluwer.com)).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**



Kako bi predlijevak dabigatraneteksilat ostvario svoj terapijski učinak, nužna je njegova aktivacija putem enzima CES1 u farmako-aktivni oblik dabigatran. Pojedini polimorfizmi gena *CES1* mijenjaju aktivnost i ekspresiju enzima čime potencijalno utječu na farmakokinetiku dabigatraneteksilata što može dovesti do neželjenih kliničkih ishoda poput krvarenja ili tromboembolijskih događaja. Nekoliko dosadašnjih istraživanja pokazalo je kako određeni polimorfizmi jednog nukleotida *CES1* utječu na vršnu ili najnižu koncentraciju dabigatrana u krvi, međutim njihov utjecaj na kliničke ishode terapije još je uvijek nepoznat. Iz tog razloga istraživani polimorfizmi trenutno imaju ograničenu kliničku značajnost te je kliničku korist farmakogenetičkih testiranja potrebno detaljnije istražiti.

Cilj ovoga rada je istražiti utjecaj dva polimorfizma *CES1*, rs2244613 i rs8192935, na učinkovitost i sigurnost primjene dabigatraneteksilata, točnije vidjeti doprinose li povećanom riziku od neželjenih kliničkih ishoda. Kako na farmakokinetiku dabigatrana utječu i negenetički čimbenici, istražiti ćemo i njihov utjecaj, uključujući i interakcije lijek-lijek, na terapijske ishode liječenja dabigatranom.

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

### 3.1. Ispitanici i uzorci

U istraživanje je uključeno 96 ispitanika na terapiji dabigatraneteksilatom (Pradaxa<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim, Njemačka).

Ispitanici su dio kohorte uspostavnoga istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-UIP-2020-02-8189, voditeljica projekta: doc. dr. sc. Tamara Božina) naziva Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova (PGx-CardioDrug). Istraživanje je odobreno od strane etičkih povjerenstava Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkoga bolničkog centra Zagreb. Svi ispitanici su potpisali informirani pristanak za dobrovoljno sudjelovanje u istraživanju i prethodno su upoznati s njegovim ciljevima.

Primarni uzorak je puna krv uzeta u spremnik s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Sekundarni uzorak je izdvojena DNA u epruveti s Tris-EDTA (TE) puferom.

### 3.2. Izdvajanje DNA QIAamp<sup>®</sup> metodom

QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini i QIAamp DNA Blood Mini (QIAGEN, Hilden, Njemačka) su komercijalni kompleti napravljeni za brzo i jednostavno izdvajanje oko 6 µg (točnije 3-12 µg) genomske i mitohondrijske DNA iz 200 µL pune krvi. Ukoliko je potrebna veća količina DNA, izolacija se može provesti i iz trombocitno-leukocitnoga međusloja (od engl. *buffy coat*). Princip metode jest selektivna adsorbicija DNA na membranu kolone, dok ostali kontaminantni prolaze kroz nju i uklanjaju se ispiranjem. Metoda se sastoji od četiri koraka: lize, vezanja, ispiranja i elucije te ne obuhvaća fenol/kloroform ekstrakciju ni precipitaciju DNA s alkoholom. Pogodna je za svježe ili zamrznute uzorke pune krvi koja je izvađena u spremnik s citratom, heparinom ili EDTA. Tako izolirana DNA bez proteina, nukleaza i drugih kontaminanata ili inhibitora je pogodna za daljnju analizu PCR-om (QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2016, QIAGEN, Hilden, Njemačka).

#### Oprema:

- QIAamp<sup>®</sup> DNA (Blood) Mini komplet (QIAGEN, Hilden, Njemačka) koji sadrži kolone i sve potrebne reagense za postupak izdvajanja
- automatska pipeta s pripadajućim sterilnim nastavcima volumena 10 – 100 µL (Eppendorf, Njemačka)

- automatska pipeta s pripadajućim sterilnim nastavcima volumena 100 – 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroepruvete volumena 1,5 i 2 mL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- termostat Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka)

#### Reagensi:

- QIAGEN proteaza (ili proteinaza K, ovisno o vrsti kompleta koji se koristi) i otapalo za proteazu (od engl. *protease solvent*)
- etanol (96 – 100 %)
- pufer za lizu (AL pufer, od engl. *lysis buffer*)
- pufer za ispiranje 1 (AW1 pufer, od engl. *wash buffer 1*)
- pufer za ispiranje 2 (AW2 pufer, od engl. *wash buffer 2*)
- pufer za eluiranje (AE pufer, od engl. *elution buffer*) – TE (Tris-EDTA) pufer, pH 9.0

#### Priprema i pohrana reagensa:

Ukoliko se koristi QIAamp® DNA Blood Mini Kit (50), u vijalu koja sadrži liofilizat QIAGEN proteaze dodaje se 1,2 mL otapala, odnosno ako koristimo QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250), tada se u vijalu dodaje 5,5 otapala kako bi se liofilizat otopio. Tako pripremljena proteaza čuva se na temperaturi 2 – 8 °C i stabilna je 12 mjeseci. QIAamp DNA Mini 50 i 250 kitovi sadrže gotovu otopinu proteinaze K u obliku spremnom za korištenje. Proteinaza K je stabilna godinu dana na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C) ili čak i duže ako je pohranjena na temperaturi 2 – 8 °C.

Pufer za lizu (AL pufer) je prije upotrebe potrebno protresti, dok je pufere za ispiranje (AW1 i AW2 pufer) prije prvog korištenja potrebno razrijediti s odgovarajućom količinom etanola (96 – 100 %) prema uputama na bočici. Svi reagensi su stabilni godinu dana kada su pohranjeni zatvoreni na sobnoj temperaturi (15 – 25 °C).

## Postupak izdvajanja DNA prema QIAamp® protokolu:

### **a) Liza stanica i deproteinizacija**

Pipetirati 20 µL QIAGEN proteaze (ili proteinaze K) u mikroepruvetu volumena 1,5 mL. Potom u istu mikroepruvetu dodati 200 µL uzorka (pune krvi). Dodati 200 µL AL pufera i miješati pomoću vrtložne miješalice 15 sekundi. Na taj se način uzorak i AL pufer homogeniziraju čime se osigurava što učinkovitija liza stanica. Inkubirati mikroepruvete 10 minuta pomoću termostata postavljenog na temperaturu od 56 °C. Kratko centrifugirati mikroepruvete kako bi se uklonile kapljice s unutrašnje strane poklopca. Dodati 200 µL etanola (96 – 100 %) i sadržaj epruvete ponovno pomiješati pomoću vrtložne miješalice 15 sekundi. Ponovno kratko centrifugirati mikroepruvete kako bi se uklonile kapljice s unutrašnje strane poklopca.

### **b) Vežanje DNA za kolonu**

Smjesu iz mikroepruveta pažljivo prenijeti na QIAamp® Mini spin kolone, paziti kako smjesa ne bi zaostala na rubu kolone. Kolone je potrebno staviti u čiste mikroepruvete volumena 2 mL koje služe za skupljanje filtrata nakon centrifugiranja. Zatvoriti kolone i centrifugirati ih na 6.000g (8.000 okretaja u minuti) 1 minutu. Nakon centrifugiranja kolon mora biti “prazna“, odnosno cijeli lizat mora proći kroz nju u mikroepruvete za skupljanje filtrata koje se potom bace.

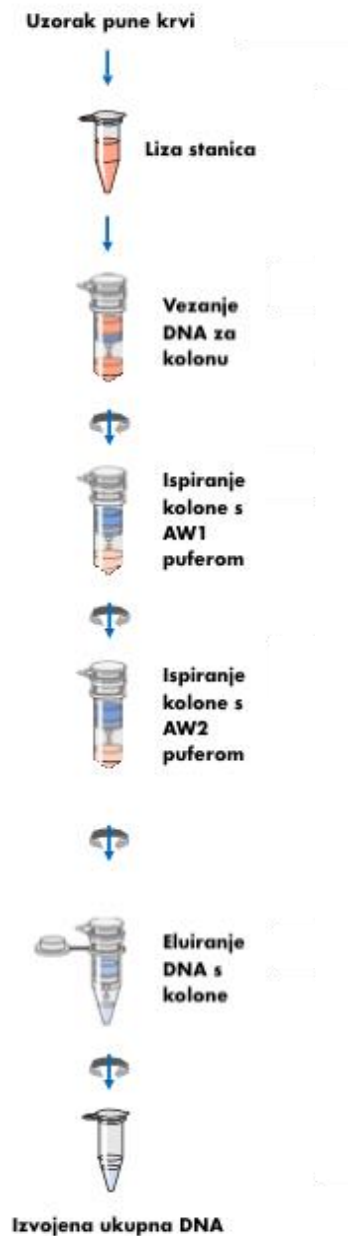
### **c) Ispiranje kolona**

Baciti mikroepruvete s filtratom i kolone staviti u nove čiste mikroepruvete volumena 2 mL. Pažljivo otvoriti kolone i dodati 500 µL AW1 pufera bez dodirivanja ruba. Zatvoriti kolone i centrifugirati ih na 6.000g (8.000 okretaja u minuti) 1 minutu. Ponovno baciti mikroepruvete s filtratom i kolone staviti u nove čiste mikroepruvete volumena 2 mL. Pažljivo otvoriti kolone i dodati 500 µL AW2 pufera bez dodirivanja ruba. Zatvoriti kolone i centrifugirati ih na 20.000g (14000 okretaja u minuti) 3 minute. Baciti mikroepruvete s filtratom i kolone staviti u čiste mikroepruvete volumena 2 mL. Zatvoriti kolone i centrifugirati na 20.000g (14.000 okretaja u minuti) 1 minutu.

### **d) Eluiranje DNA s kolona**

Ponovno baciti mikroepruvete s filtratom i kolone staviti u čiste mikroepruvete volumena 1,5 mL. Pažljivo ih otvoriti i dodati 200 µL AE pufera. Inkubirati na sobnoj temperaturi

(15 – 25°C) 1 minutu i potom centrifugirati na 6.000g (8.000 okretaja u minuti) 1 minutu. Baciti kolone, a mikroepuvete s eluatom u kojima se nalazi izolirana DNA u AE puferu se mogu odmah upotrijebiti za daljnje analize ili pohraniti na temperaturi 2 – 8°C. Po potrebi je moguće provesti i dodatni elucijski korak (s 200 µL AE pufera) čime se povećava prinos DNA za 15 %, međutim za većinu uzoraka pune krvi dodatna elucija nije potrebna.



**Slika 3.** Postupak izdvajanja DNA na QIAamp® centrifugirajućim kolonama (preuzeto i prilagođeno prema QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2016, QIAGEN, Hilden, Njemačka).

### 3.2.1. Mjerenje koncentracija i čistoće izdvojene DNA

Koncentracija i čistoća izdvojene DNA određuju se spektrofotometrijski. Koncentracija DNA određuje se mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm ( $A_{260}$ ) pomoću spektrofotometra i izračuna se prema niže navedenoj formuli. Izmjerena apsorbancija trebala bi iznositi između 0,1 i 1,0 kako bi mjerenje koncentracije bilo pouzdano i točno.  $A_{260} = 1,0$  odgovara koncentraciji dvolančane DNA od 50  $\mu\text{g/mL}$ .

$$\text{koncentracija DNA } (\mu\text{g/mL}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

Čistoću izolirane DNA određujemo mjerenjem apsorbancija pri valnim duljinama od 260 nm ( $A_{260}$ ) i 280 nm ( $A_{280}$ ) pomoću spektrofotometra te izračunavanjem njihovoga omjera ( $A_{260}/A_{280}$ ). Ako omjer  $A_{260}/A_{280}$  iznosi 1,7 – 1,9, izolirana DNA je zadovoljavajuće čistoće (bez onečišćenja proteinima) (QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook, 2016, QIAGEN, Hilden, Njemačka).

#### Oprema i reagensi:

- spektrofotometar NanoDrop Lite (Thermo Scientific, SAD)
- automatska pipeta s pripadajućim sterilnim nastavcima volumena 0,5 – 10  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- komercijalni TE pufer (QIAGEN, Hilden, Njemačka)

#### Postupak mjerenja koncentracija i čistoće izolirane DNA:

Pipetirati 1,5  $\mu\text{L}$  TE pufera na uređaj kako bi se spektrofotometar “postavio na nulu“. Kapljica pufera se obriše staničevinom i potom se pipetira isti volumen uzorka DNA. Bitno je prije pipetiranja uzorak homogenizirati pomoću vrtložne miješalice. Uređaj za svaki uzorak izmjeri koncentraciju i čistoću. Nakon svake analize potrebno je kapljicu uzorka obrisati staničevinom.

### 3.3. Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*) je metoda koja, kao i „klasični“ PCR, omogućuje u *in vitro* uvjetima umnožavanje velikog broja specifičnih fragmenata DNA (veličine oko 500 pb) iz malog broja molekula kalupa prisutnih na početku reakcije. Metoda je poznatija i kao kvantitativni PCR (qPCR, od engl. *quantitative PCR*) jer omogućuje preciznu kvantifikaciju početne količine kalupa DNA. PCR u stvarnom vremenu omogućuje kontinuirano praćenje umnožavanja (od engl. *amplification*) u stvarnom vremenu, tj. dok se reakcija odvija, tijekom svakog ciklusa nastanak PCR produkata mjeri se na temelju fluorescentnoga signala koji nastaje uporabom fluorescentnih boja ili fluorescentno obilježenih sonda (Buckingham, 2019; [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)). Metoda predstavlja moćan alat koji se danas primjenjuje za analizu genske ekspresiju, detekciju mikroorganizama, genotipizaciju, detekciju SNP-ova i varijanti broja kopija itd. ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Kod „klasičnog“ PCR-a nastali PCR produkti se najčešće detektiraju i (polu)kvantificiraju elektroforezom na agaroznom gelu nakon završenog procesa umnožavanja, odnosno kada reakcija postigne plato fazu (od engl. *endpoint analysis*). Nedostatak takve metode je nepouzdana kvantifikacija te smanjena osjetljivost, preciznost i razlučivost. S druge strane qPCR ne zahtjeva obradu produkata nakon završetka reakcije jer prikuplja podatke, odnosno mjeri intenzitet fluorescentnoga signala na kraju svakog ciklusa tijekom eksponencijalne faze čime se dobivaju točni i precizni podaci za pouzdanu kvantifikaciju početne količine kalupa DNA. Ako se fragment od interesa uspješno umnožava, tada se u reakcijskoj smjesi nakon svakog ciklusa bilježi fluorescentni signal čiji intenzitet raste jer je intenzitet fluorescencije proporcionalan količini nastalih PCR produkata (Buckingham, 2019; [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Svaka reakcijska smjesa za PCR sastoji se od DNA kalupa, odnosno molekule DNA čiji se specifični fragment želi umnožiti, termostabilne *Taq* DNA polimeraze,  $Mg^{2+}$  iona (kofaktor DNA polimeraze), pufera, smjese četiri deoksiribonukleozid-trifosfata (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i specifičnog para početnica tj. „primera“ (od engl. *primers*). Koncentracija svake navedene komponentne reakcijske smjese utječe na uspješnost umnožavanja stoga je izrazito bitno prije početka PCR-a optimirati uvjete reakcije ([www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

Svaki ciklus lančane reakcije polimeraze se sastoji od tri koraka koji se odvijaju pri određenim uvjetima temperature i trajanja: razdvajanje lanaca molekule DNA tj. denaturacija



(od engl. *denaturation*), vezanje početnica na lance DNA kalupa tj. sparivanje početnica (od engl. *annealing*) i produljenje lanaca tj. ekstenzija (od engl. *extension*).

Reakcija započinje zagrijavanjem reakcijske smjese na visoku temperaturu (94 – 96°C) što uzrokuje denaturaciju, odnosno razdvajanje lanaca DNA kalupa. Bitno je napomenuti kako se prije prvoga ciklusa odvija faza inicijacije u kojoj se kalup, odnosno genomska DNA dulje zagrijava na temperaturi 94 – 96°C kako bi se osigurala potpuna denaturacija s obzirom na veličinu početne molekule DNA. Temperatura se potom snizuje na 50 – 70°C kako bi se omogućilo vezanje početnica za komplementarne slijedove na lancima DNA kalupa. Početnice su kemijski sintetizirani jednolančani oligonukleotidi duljine od 20 do 30 nukleotida. Za umnožavanje ciljnog fragmenta potreban je specifičan par početnica – uzvodna (od engl. *forward*) i nizvodna (od engl. *reverse*). Svaka se početnica veže za komplementarnu sekvencu na 3' kraju jednog lanca DNA kalupa i na taj način omeđuju područje DNA koje se želi umnožiti. Temperatura pri kojoj dolazi do njihovoga vezanja je specifična za svaki par početnica i ovisi o njihovoj duljini, sastavu (udjelu GC baznih parova) i koncentraciji Na<sup>+</sup> iona u smjesi. U zadnjem koraku ciklusa reakcijska smjesa se ponovno zagrijava na temperaturu 70 – 75°C jer je to optimalna temperatura za djelovanje termostabilnog enzima *Taq* DNA polimeraze koja produljuje hibridizirane početnice dodavanjem odgovarajućih dNTP-ova u smjeru 5' → 3' i na taj način dolazi do sinteze novog lanca koji je komplementaran kalupu. Tako opisan ciklus ponavlja se 25 – 45 puta. Tijekom svakog ciklusa broj DNA molekula se udvostručuje, odnosno iz jedne molekule DNA nakon  $n$  broj ciklusa teorijski nastaje  $2^n$  identičnih kopija (Buckingham, 2019; Cooper i sur., 2010).

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu se provodi na isti način kao što je opisano u prethodnom paragrafu, jedino se u reakcijsku smjesu dodaje fluorescentna boja koja se veže za dvolančane DNA molekule (poput *SYBR Green* boje) ili sonde koje se vežu za specifično mjesto na molekuli DNA i na sebi imaju vezanu fluorescentnu boju (fluoroforu). Jedan od najčešćih načina detekcije PCR produkata je uporaba *TaqMan*<sup>®</sup> sondi (od engl. *probes*). To su kratki jednolančani oligonukleotidi koji su komplementarni slijedu nukleotida unutar sekvence DNA koja se umnožava i za nju se vežu istovremeno s početnicama tijekom *annealing* faze. Na 5' kraju sonde kovalentno je vezana reporterska fluorescentna boja (R, od engl. *reporter*) poput VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup>, dok se na suprotnom 3' kraju nalazi neka druga fluorescentna boja ili nefluorescentna molekula koja se naziva prigušivač (Q, od engl. *quencher*). Kada se sonde nalaze nehibridizirane u reakcijskoj smjesi ili kada se hibridiziraju za ciljnu sekvencu između veznih mjesta početnica, uređaj ne detektira fluorescenciju jer dolazi

do pojave prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom (FRET, od engl. *fluorescence resonance energy transfer*) s reporterske fluorofore na prigušivač. Reakcijska smjesa je tijekom cijelog umnožavanja obasjana zrakom svjetlosti specifične valne duljine koja ekscitira reportersku fluoroforu koja prilikom povratka u osnovno stanje fluorescira, odnosno emitira svjetlost veće valne duljine. Budući da se reporterska boja i prigušivač nalaze u neposrednoj blizini, prigušivač “utiša“ fluorescenciju reportera zbog čega se fluorescencija ne detektira u reakcijskoj otopini. Osim što sintetizira novi lanac produljenjem početnica, *Taq* polimeraza ima i 5' → 3' egzonukleaznu aktivnost zbog toga razgradi, odnosno hidrolizira sonde kada tijekom elongacije “dođe“ do njih. Zato se *TaqMan*<sup>®</sup> sonde u literaturi zovu hidrolizirajuće sonde. Kada dođe do razgradnje sonde, reporterska fluorofora i prigušivač se više ne nalaze u neposrednoj blizini zbog čega prigušivač više ne “utišava“ fluorescenciju reportera te uređaj detektira fluorescenciju. Intenzitet fluorescencije koju uređaj mjeri tijekom svakog ciklusa je proporcionalna količini nastalih PCR produkata i raste sa svakim ciklusom (Buckingham, 2019; [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)).

### 3.3.1. Genotipizacija polimorfizama *CES1* rs2244613 i rs8192935

Za genotipizaciju istraživanih polimorfizama *CES1* (rs2244613 i rs8192935) primjenjuje se *TaqMan*<sup>®</sup> metoda lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu koja omogućava umnožavanje fragmenta DNA koji sadrži istraživani alel i detekciju SNP-ova. Svaki *TaqMan*<sup>®</sup> *Pre-designed SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD) sadrži specifičan par neobilježenih početnica i dvije fluorescentno obilježene *TaqMan*<sup>®</sup> sonde. Jedna sonda je komplementarna alelu divljeg tipa (*wt*, od engl. *wild type*), dok je druga komplementarna varijantnom tipu alela (*mut*, od engl. *mutant*). Nadalje, jedna sonda na svom 5' kraju ima VIC<sup>®</sup>, a druga FAM<sup>®</sup> boju. Tijekom PCR reakcije dolazi do umnožavanja fragmenta DNA koji sadrži istraživani alel i, ako osoba sadrži oba alela divljeg tipa, uređaj će tijekom cijelog PCR-a detektirati samo fluorescenciju sonde koja se veže za divlji tip. S druge strane, ako osoba sadrži oba varijantna alela, bilježit će se samo fluorescencija sonde koja se veže za varijantni alel. U oba slučaja sonda koja nije komplementarna alelu se neće vezati za njega i neće biti razgrađena zbog čega njezin fluorescentni signal neće biti detektiran. Međutim, ako osoba istovremeno sadrži alel divljeg tipa i varijantni alel, tada će uređaj detektirati fluorescenciju obje sonde.

Za analizu svakog pojedinog polimorfizma korišten je odgovarajući *TaqMan*<sup>®</sup> *Predesigned SNP Genotyping Assay* (Tablica 4.).

Oprema:

- uređaj za PCR u stvarnom vremenu: 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- automatska pipeta s pripadajućim sterilnim nastavcima volumena 0,5 – 10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta s pripadajućim sterilnim nastavcima volumena 10 – 100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilna mikropraveta volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- vrtložna miješalica Biosan V-1 (Biosan, Latvija)
- mikrocentrifuga MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- mikropravete volumena 0,2 mL s poklopcima (Applied Biosystems, SAD)
- mikrotitarske pločice (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikropravete
- optička pokrovna folija za mikrotitarske pločice (Applied Biosystems, SAD)
- centrifuga za mikrotitarske pločice Eppendorf Centrifuge 5810R (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi:

- *TaqMan*<sup>®</sup> *Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- *TaqMan*<sup>®</sup> *Predesigned SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- sterilna destilirana voda za PCR

**Tablica 4.** Pregled istraživanih polimorfizama *TaqMan*<sup>®</sup> metodom.

Gen	Oznaka polimorfizma (dbSNP)	Nukleotidna promjena	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Predesigned SNP Genotyping Assay ID</i>	Nukleotid	Reporterska fluorofora
<i>CES1</i>	rs2244613	c.1168-33A>C	C__11290377_10	A ( <i>wt</i> )	VIC <sup>®</sup>
				C ( <i>mut</i> )	FAM <sup>®</sup>
<i>CES1</i>	rs8192935	c.257+885T>C	C__26935203_10	T ( <i>wt</i> )	VIC <sup>®</sup>
				C ( <i>mut</i> )	FAM <sup>®</sup>

## Postupak:

Pripremiti reagense prema uputama proizvođača, lagano ih promiješati par sekundi na vrtložnoj miješalici i kratko centrifugirati u mikrocentrifugi kako bi se sadržaj spustio na dno epruvete. Potom pripremiti reakcijske smjese za PCR za oba istraživana polimorfizma prema uputama proizvođača, u dvije sterilne mikroeprovete volumena 1,5 mL pipetira zadani volumen *TaqMan® Universal PCR Master Mix*-a i odgovarajućeg *TaqMan® SNP Genotyping Assay*-a (Tablica 5.). Mikroeprovetu lagano protrest rukom i kratko centrifugirati na mikrocentrifugi. Na stalak postaviti „stripove“ mikroeproveta volumena 0,2 mL u kojima se rade razrjeđenja izdvojenih DNA u omjeru 1:10 kako bi konačna količina DNA u reakcijskoj smjesi bila 1 – 20 ng. Nakon obilježavanja mikroeproveta, u svaku se najprije otpipetira 30 µL sterilne destilirane vode za PCR i potom 3 µL odgovarajuće otopine DNA. Prije pipetiranja svaki uzorak DNA je potrebno kratko promiješati na vrtložnoj miješalici i ukoliko je potrebno, uzorak se može kratko centrifugirati na mikrocentrifugi kako bi se sadržaj spustio na dno epruvete zbog lakšeg pipetiranja. U svaku predviđenu jažicu mikrotitarske pločice pipetirati 13,75 µL reakcijske smjese i 11,25 µL razrjeđenja DNA. Za svaki istraživani polimorfizam potrebno je napraviti negativnu i pozitivnu kontrolu. Kontrole se pripremaju na isti način kao i uzorci, jedino se u negativnu kontrolu umjesto DNA dodaje 11,25 µL destilirane vode, a u pozitivnu 11,25 µL kontrolne DNA poznatog genotipa. Jedna pozitivna kontrola odgovara divljem tipu (*wt*, od engl. *wild type*), a druga varijantnom tipu (*het*, od engl. *heterozygous* ili *mut*, od engl. *mutant*). Mikrotitarska pločica se potom pokrije optičkom folijom i centrifugira u centrifugi za mikrotitarske pločice 5 sekundi pri 3000 okretaja u minuti. Pločica se stavi u ABI 7500 Real-Time PCR System uređaj te se pokrene odgovarajući program. Uvjeti PCR reakcije izvedeni su iz uputa proizvođača (Tablica 6.). Prije same analize na programu je potrebno imenovati uzorke u jažicama.

**Tablica 5.** Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju polimorfizama *CESI* (rs2244613 i rs8192935) *TaqMan*<sup>®</sup> metodom.

Sastojci reakcijske smjese za PCR	Volumen (μL)*
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>Universal PCR Master Mix</i> (1x)	12,5
<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>SNP Genotyping Assay</i> (1x)	1,25
razrijeđenje DNA (1-20 ng)	11,25
<b>Ukupni volumen reakcijske smjese:</b>	<b>25 μL</b>

\* Navedeni volumeni odgovaraju reakcijskoj smjesi za analizu jednog uzorka. Prilikom genotipizacije više uzoraka, volumen svakog sastojka je potrebno pomnožiti s brojem uzoraka koji se analiziraju (uključujući i kontrole).

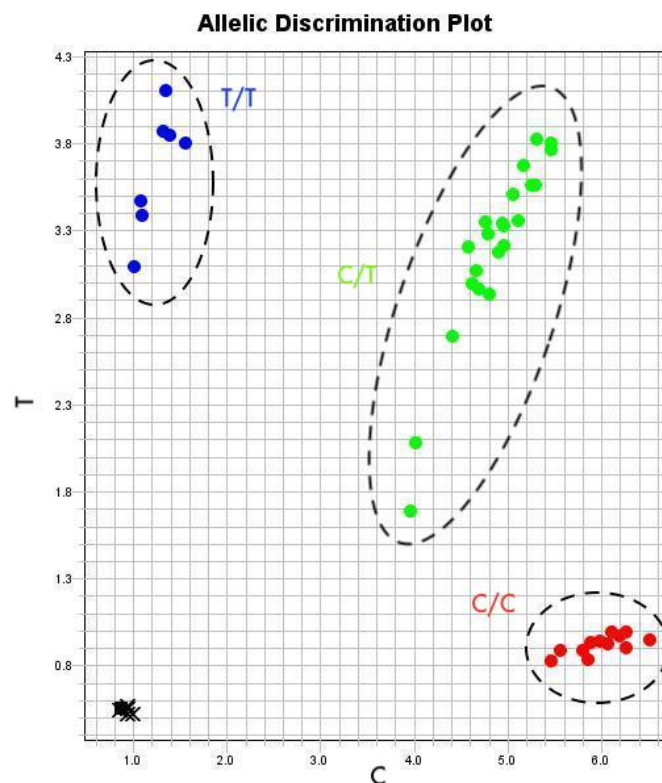
**Tablica 6.** Uvjeti za genotipizaciju polimorfizama *CESI* (rs2244613 i rs8192935) na ABI 7500 Real-Time PCR System uređaju.

	<i>Pre-PCR Read</i>	Inicijacija	PCR (denaturacija i amplifikacija) <b>50 ciklusa</b>	<i>Post-PCR Read</i>
Temperatura i trajanje faze	60°C, 1'	50°C, 2' 95°C, 10'	95°C, 15" 60°C, 1'	60°C, 1'

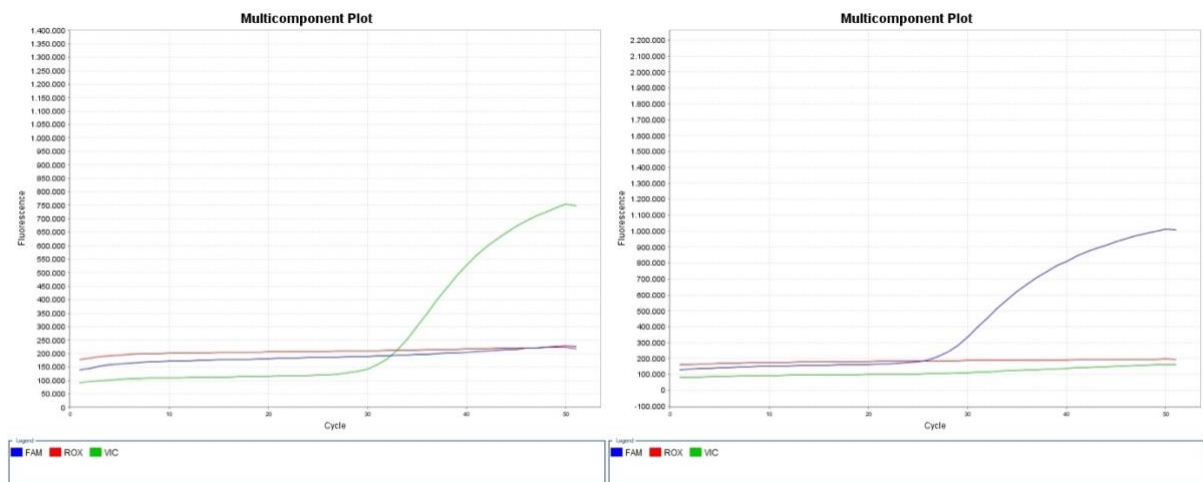
#### Interpretacija rezultata:

Nakon završetka PCR-a računalni program 7500 Software verzija 2.3 (Applied Biosystems, SAD) analizira detektirane fluorescentne signale metodom alelne diskriminacije. Na temelju izmjerene fluorescencije u svakoj jažici, program odredi genotip svakog uzorka i rezultate prikazuje u obliku dijagrama raspršenja (od engl. *scatter plot*), točnije dijagrama alelne diskriminacije (od engl. *allelic discrimination plot*) (Slika 4.). X-os predstavlja intenzitet fluorescencije jedne fluorofore (npr. VIC<sup>®</sup>), a y-os intenzitet fluorescencije druge fluorofore (npr. FAM<sup>®</sup>), tj. svaka os predstavlja jedan istraživani tip alela (divlji ili varijantni). Svaki

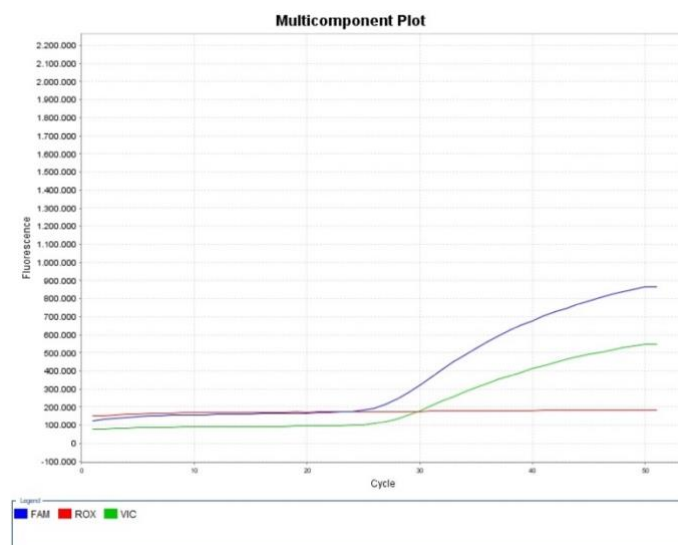
uzorak je prikazan kao jedna točka, a sve točke su grupirane u tri odvojene skupine. Skupine kojima pripadaju uzorci u kojih je detektirana samo jedna fluorescentna boja (ili VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>®</sup>) predstavljaju homozigote, dok skupina u koje su detektirane obje fluorofore (i VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup>) predstavlja heterozigote. Na taj način možemo razlučiti tri genotipa – homozigot alela divljeg tipa, heterozigot i homozigot varijantnog alela. Negativne kontrole se na dijagramu prikazuju kao crni kvadratići smješteni blizu ishodišta. Također, za svaki uzorak program izradi i amplifikacijsku krivulju (od engl. *amplification plot*) koja prikazuje ovisnost intenziteta izmjerene fluorescencije o broju ciklusa iz koje se lako uočava porast određene fluorofore, tj. fluorofora na temelju čega se određuje genotip (Slika 5. i 6.).



**Slika 4.** Dijagram alelne diskriminacije za polimorfizam *CES1* rs8192935. Plave točke predstavljaju homozigotne nositelje alela divljeg tipa (*wt*), zelene točke heterozigote, a crvene točke homozigotne nositelje varijantnog alela (*mut*). Crni kvadrat smješten kod ishodišta predstavlja negativnu kontrolu, a znak X uzorke neodređenog genotipa.



**Slika 5.** Detekcija samo jednog fluorescentnog signala (VIC<sup>®</sup> (lijevo) ili FAM<sup>®</sup> (desno)) ukazuje na homozigotni genotip. Prikaz amplifikacijskih krivulja za polimorfizam *CESI* rs2244613 – lijeva krivulja prikazuje A/A (*wt*) genotip, a desna C/C (*mut*) genotip.



**Slika 6.** Detekcija oba fluorescentna signala (i VIC<sup>®</sup> i FAM<sup>®</sup>) ukazuje na heterozigotni genotip. Prikaz amplifikacijske krivulje za polimorfizam *CESI* rs2244613 koja prikazuje A/C genotip.

### 3.4. Analiza negenetičkih čimbenika

Negenetički čimbenici ispitanika su prikupljeni iz bolničkog informacijskog sustava. Prikupljeni su sljedeći podaci kao mogući rizični čimbenici: spol, dob, doza dabigatrana, BMI (indeks tjelesne mase, od engl. *body mass index*), hipertenzija, bubrežna bolest, bolest jetre, prethodni tromboembolijski događaj, šećerna bolest, kongestivno zatajenje srca, krvožilna bolest, hipotireoza, hipertireoza, primjena drugih antikoagulansa ili NSAID u terapiji kao i primjena konkomitantne terapije koja povećava rizik od krvarenja ili tromboembolijskih događaja.

Većina negenetičkih čimbenika, čiju smo povezanost analizirali, su rizični čimbenici koji čine sastavni dio bodovnih sustava (od engl. *score*) CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc koji se koristi za procjenu rizika moždanog udara i tromboembolije u pacijenata s fibrilacijom atriya, i HAS-BLED koji se koristi za procjenu rizika od velikog krvarenja u pacijenata s fibrilacijom atriya na antikoagulantnoj terapiji (Lip i sur., 2010; Pisters i sur., 2010). Imena bodovnih sustava predstavljaju akronim rizičnih čimbenika te je svaki rizični čimbenik vrednovan s 1 ili 2 boda (Tablica 7.). Prema smjernicama Europskoga kardiološkog društva CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc zbroj 0 u muškaraca, odnosno 1 u žena upućuje na nizak rizik, zbroj 1 u muškaraca na umjeren rizik te zbroj  $\geq 2$  na visok rizik od tromboembolijskog događaja. S druge strane, HAS-BLED zbroj 0 – 2 upućuje na nizak rizik, a zbroj  $\geq 3$  na visok rizik od krvarenja ([www.academic.oup.com](http://www.academic.oup.com)).

Prema klasifikaciji Svjetske zdravstvene organizacije prekomjerna tjelesna masa je definirana kao BMI između 25 i 29,9 kg/m<sup>2</sup>, a pretilost kao BMI veći ili jednak od 30 kg/m<sup>2</sup>. U osoba s poželjnom tjelesnom masom BMI iznosi 18,5 – 24,9 kg/m<sup>2</sup> ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).



**Tablica 7.** Rizični čimbenici za moždani udar i koji čine bodovne sustave CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc i HAS-BLED (Lip i sur., 2010; Pisters i sur., 2010).

Čimbenik rizika		Bodovi	Klinička značajka		Bodovi
<b>C</b>	Kongestivno zatajenje srca	1	<b>H</b>	Hipertenzija	1
<b>H</b>	Hipertenzija	1	<b>A</b>	Poremećena bubrežna ili jetrena funkcija	1 ili 2
<b>A</b>	Dob $\geq 75$ godina	2	<b>S</b>	Moždani udar	1
<b>D</b>	<i>Diabetes mellitus</i>	1	<b>B</b>	Krvarenje	1
<b>S</b>	Moždani udar/TIA/TE	2	<b>L</b>	Nestabilni INR	1
<b>V</b>	Krvožilna bolest	1	<b>E</b>	Starija dob (> 65 godina)	1
<b>A</b>	Dob 65 – 74 godine	1	<b>D</b>	Konkomitantna primjena drugih lijekova koji povećavaju rizik od krvarenja (antiagregacijski lijekovi ili NSAID) ili alkohola	1 ili 2
<b>S</b>	Spol (ženski spol)	1			
Najveći mogući zbroj bodova		9	Najveći mogući zbroj bodova		9

CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc (od engl. *Congestive heart failure, Hypertension, Age  $\geq 75$  years, Diabetes mellitus, Stroke, Vascular disease, Age 65-74 years, Sex category (female gender)*); HAS-BLED (od engl. *Hypertension, Abnormal renal or liver function, Stroke, Bleeding history or predisposition, Labile INR, Elderly (> 65 years), Drugs or alcohol concomitantly*); INR – internacionalni normalizirani omjer; NSAID – nesteroidni protuupalni lijek (od engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*); TIA – tranzitorna ishemijska ataka; TE – tromboembolija

### 3.5. Analiza interakcija lijek-lijek

Za istraživanje mogućih klinički značajnih interakcija dabigatrana i drugih lijekova u terapiji primijenjena je Lexicomp® baza podataka (Lexicomp® Clinical Decision Support System, Wolters Kluwer, Nizozemska) ([www.wolterskluwer.com](http://www.wolterskluwer.com)).

### 3.6. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka upotrijebljen je RStudio programski jezik za statističko računanje, verzija: 2023.06.2+561. Normalnost razdiobe ispitana je Shapiro-Wilkovim testom.

Numeričke varijable poput dobi, indeksa tjelesne mase (BMI, od engl. *body mass index*) te CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc i HAS-BLED zbrojeva iskazane su kao aritmetička sredina (standardna devijacija) ili medijan (interkvartilni raspon) ovisno o tome prate li normalnu razdiobu ili ne. Kategoričke varijable prikazane su kao apsolutna i relativna frekvencija (u obliku razlomka).

Moguće odstupanje učestalosti alela istraživanih polimorfizama od Hardy-Weinbergove ravnoteže ispitano je  $\chi^2$  (hi-kvadrat) testom.

Povezanost polimorfizama i negenetičkih rizičnih čimbenika s rizikom od krvarenja ili tromboembolijskoga događaja ispitana je Fisherovim egzaktnim testom. Iznimno je prisutnost razlike u učestalosti alela između skupine kod koje je došlo do krvarenja i skupine kod koje nije došlo do krvarenja ispitana  $\chi^2$  testom. Razina statističke značajnosti u svim je analizama iznosila 0,05. Rezultati su prikazani u obliku omjera izgleda (OR, od engl. *odds ratio*), 95 %-tnog intervala pouzdanosti (CI, od engl. *confidence interval*) i p-vrijednosti.

Za analizu povezanosti polimorfizama s kliničkim ishodima terapije korištena su četiri genetička modela: aditivni, dominantni, recesivni i heterozigotni. Aditivni genetički model uspoređuje sva tri genotipa međusobno: homozigotni nositelji alela divljeg tipa vs. heterozigoti vs. homozigotni nositelji varijantnog alela. Takav model pretpostavlja kako se rizik od neželjenih učinaka povećava s brojem varijantnih alela. Ako heterozigoti (koji imaju jedan varijantni alel) imaju  $r$  puta veći rizik od neželjenih učinaka u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa, tada homozigotni nositelji varijantnog alela (koji imaju dva varijantna alela) imaju dva puta veći ( $2r$ ) rizik u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa. Dominantnim genetičkim modelom uspoređuju se nositelji (ispitanici s jednim ili oba varijantna alela) i nenositelji varijantnog alela te takav model pretpostavlja kako prisutnost barem jednog varijantnog alela povećava rizik od neželjenih učinaka, dok heterozigoti i homozigotni nositelji varijantnog alela imaju jednaku šansu razvoja neželjenih učinaka koja je veća u odnosu na homozigotne nositelje alela divljeg tipa. Recesivnim modelom uspoređuju se homozigotni nositelji varijantnog alela (ispitanici s dva varijantna alela) i ispitanici s jednim varijantnim alelom ili bez varijantnog alela te takav model pretpostavlja kako samo prisutnost oba varijanta alela povećava rizik od neželjenih učinaka. Heterozigotnim modelom uspoređuju se heterozigoti i homozigoti (točnije homozigotni nositelji varijantnog alela i homozigotni nositelji alela divljeg tipa). Takav model pretpostavlja kako heterozigotni nositelji varijantnog alela imaju povećan rizik od razvoja neželjenih učinaka u odnosu na homozigote (Horita i Kaneko, 2015; Lewis, 2002).

## **4. REZULTATI**

#### 4.1. Demografska i klinička obilježja ispitanika

U istraživanje je ukupno uključeno 96 pacijenata, 41 žena i 55 muškaraca, različitih dijagnoza u dobi od 21 do 93 godine na terapiji dabigatraneteksilatom. Međutim, u konačnu statističku analizu uključeno je 90 pacijenata, odnosno šest pacijenata je isključeno na temelju isključnih kriterija poput terapije kraće od tri mjeseca, pojave krvarenja prije uvođenja dabigatrana u terapiju ili nedostatka podataka. Uzorci i klinički podatci su preliminarni rezultati veće studije prikupljeni i analizirani razdoblju od siječnja 2021. do kolovoza 2023. godine. Kao klinički ishod terapije promatrana je pojava krvarenja ili tromboembolijskih događaja. Demografski i klinički podaci svih ispitanika prikupljeni su na temelju njihovih medicinskih dokumentacija i prikazani su u Tablici 8.

U većine ispitanika je primjenjivana standardna doza od 150 mg (dva puta dnevno) ili manja doza od 110 mg (dva puta dnevno) s udjelima 58/85 i 27/85. Iznimno je u dva ispitanika primijenjena prilagođena doza: jedan je ispitanik uzimao dozu od 75 mg (dva puta dnevno), a drugi dozu od 110 mg (dva puta dnevno) uz pauzu svaki treći dan.

Od rizičnih čimbenika najzastupljeniji su BMI  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup> (56/69), drugi lijek koji povećava rizik od krvarenja u terapiji (69/89), dob  $\geq 65$  godina (62/90), hipertenzija (57/89) i prethodni tromboembolijski događaj (45/89).

Krvarenje se pojavilo u 27 pacijenata (27/90): anemija je zabilježena u 11 pacijenata (11/27), gastrointestinalna krvarenja u 11 pacijenata (11/27), epistaksa u tri pacijenata (3/27), hematomi u pet pacijenata (5/27), predoziranje u sedam pacijenata (7/27), krvarenje desni u jednog pacijenata (1/27) i vaginalno krvarenje u jedne pacijentice (1/27).

Tromboembolijski događaj je zabilježen u osam pacijenata (8/90). Među prijavljenim tromboembolijskim događajima su cerebrovaskularni inzult, duboka venska tromboza i ishemija donjih ekstremiteta.

**Tablica 8.** Demografska i klinička obilježja svih ispitanika.

<b>DEMOGRAFSKA I KLINIČKA OBILJEŽJA (N = 90)</b>	
Dob [medijan (IQR)]	69 (62 – 78)
BMI, kg/m <sup>2</sup> [ $\bar{x}$ (SD)]	29 (25,8 – 31,9)
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc [medijan (IQR)]	4 (3 – 6)
HAS-BLED [medijan (IQR)]	3 (2 – 4)
Spol – žene / muškarci [N (udio)]	38 (38/90) / 52 (52/90)
Doza – 110 mg bid / 150 mg bid [N (udio)]	27 (27/85) / 58 (58/85)
<hr/>	
Hipertenzija [N (udio)]	57 (57/89)
Bubrežna bolest [N (udio)]	25 (25/83)
Bolest jetre [N (udio)]	8 (8/89)
Prethodni tromboembolijski događaj [N (udio)]	45 (45/89)
Dob ≥ 65 godina [N (udio)]	62 (62/90)
Dob ≥ 75 godina [N (udio)]	29 (29/90)
Drugi antikoagulans ili NSAID u terapiji [N (udio)]	12 (12/89)
Drugi lijek koji povećava rizik od krvarenja u terapiji [N (udio)]	69 (69/89)
Drugi lijek koji povećava rizik od tromboembolijskih događaja u terapiji [N (udio)]	32 (32/89)
<i>Diabetes mellitus</i> [N (udio)]	16 (16/89)
Kongestivno zatajenje srca [N (udio)]	12 (12/89)
Krvožilna bolest [N (udio)]	38 (38/89)
Hipotireoza [N (udio)]	10 (10/89)
Hipertireoza [N (udio)]	2 (2/89)
BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup> [N (udio)]	56 (56/69)

**RIZIČNI ČIMBENICI**

bid – dvaput dnevno; BMI – indeks tjelesne mase; IQR – interkvartilni raspon; N – broj ispitanika; SD – standardna devijacija;  $\bar{x}$  – aritmetička sredina

## 4.2. Povezanost polimorfizama *CES1* s krvarenjem i tromboembolijom

Povezanost polimorfizma *CES1* rs2244613 s kliničkim ishodima nije bilo moguće ispitati s obzirom da učestalost alela tog polimorfizma odstupa od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

Povezanost polimorfizma *CES1* rs8192935 s kliničkim ishodima terapije ispitana je putem četiri genetička modela: aditivnog, dominantnog, recesivnog i heterozigotnog. Rezultati raspodjele pacijenata prema genotipovima te analize povezanosti polimorfizma i rizika od neželjenih učinaka prikazani su u Tablici 9. i 10., dok je u Tablici 11. prikazana učestalost alela polimorfizma *CES1* rs8192935 te rezultati ispitivanja prisutnosti razlike u učestalosti alela između skupine ispitanika kod koje je opažen i skupine kod koje nije opažen neželjeni klinički ishod. Analiza povezanosti nije dokazala povezanost polimorfizma *CES1* rs8192935 s rizikom od krvarenja, odnosno tromboembolijskog događaja niti u jednom od četiri genetička modela.

Neravnoteža vezanosti (LD) istraživanih polimorfizama ispitana je pomoću LDpair alata Nacionalnih instituta za zdravlje ([www.ldlink.nih.gov](http://www.ldlink.nih.gov)). Iako su oba polimorfizma u neravnotežnoj vezi, utjecaj haplotipova na kliničke ishode terapije nije mogao biti ispitan budući da je polimorfizam *CES1* rs2244613 odstupao od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

## 4.3. Povezanost negenetičkih čimbenika s krvarenjem i tromboembolijom

Negenetički čimbenici čiji je potencijalni utjecaj ispitan su: spol, doza dabigatrana, prekomjerna tjelesna masa ili pretilost (definirana kao  $BMI \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ), hipertenzija (definirana kao sistolički arterijski tlak  $> 160 \text{ mmHg}$ ), oštećena bubrežna funkcija (definirana kao  $eGFR < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$  izračunat prema CKD-EPI jednadžbi ili koncentracija kreatinina u serumu  $> 109 \text{ }\mu\text{mol/L}$ ), prethodni tromboembolijski događaj (tromboembolija, moždani udar ili tranzitorna ishemijska ataka), starija životna dob ( $\geq 65$ , odnosno  $\geq 75$  godina), konkomitantna primjena drugog antikoagulansa, inhibitora agregacije trombocita ili nesteroidnog protuupalnog lijeka, interakcije dabigatrana s drugim lijekovima koji potencijalno povećavaju rizik od krvarenja ili tromboembolijskog događaja, dijabetes, kongestivno zatajenje srca, krvožilna bolest, hipotireoza i hipertireoza.

Rezultati analize povezanosti negenetičkih čimbenika s rizikom od neželjenih učinaka prikazani su u Tablici 12. Debljim tiskom (od engl. *bold*) označene su vrijednosti kod kojih je dosegnuta razina značajnosti.

Pozitivna povezanost s rizikom od krvarenja je vidljiva sa ženskim spolom, nižom dozom lijeka (110 mg) i bubrežnom bolesti, a negativna povezanost s interakcijama lijek-lijek koje povećavaju rizik od tromboembolijskog događaja. Nije vidljiva povezanost niti jednog negenetičkog čimbenika s rizikom od tromboembolijskih događaja.

**Tablica 9.** Broj i udio pacijenata prema genotipu *CES1* rs8192935.

<b>Polimorfizam (dbSNP)</b>	<b>Genotip</b>	<b>Broj i udio pacijenata</b>	<b>Pacijenti (N) s krvarenjem/TE</b>
<b>rs8192935</b> (c.257+885T>C)	TT	7 (7/90)	3 / 0
	CT	47 (47/90)	13 / 3
	CC	36 (36/90)	11 / 5

**Tablica 10.** Povezanost polimorfizma *CESI* rs8192935 s rizikom od krvarenja, odnosno tromboembolijskog događaja.

Polimorfizam (dbSNP)	Testirani genetički model	Rizik od krvarenja		Rizik od tromboembolijskog događaja		
		OR (95% CI)	p-vrijednost*	OR (95% CI)	p-vrijednost*	
rs8192935 (c.257+885T>C)	Aditivni	TT (kontrola)			$\infty$	
		CT	0,52 (0,08 – 4,01)	0,649	(0,06 – $\infty$ )	0,347
		CC	0,59 (0,08 – 4,75)		$\infty$ (0,17 – $\infty$ )	
	Dominantni	TT (kontrola)	0,55 (0,09 – 4,01)	0,424	$\infty$ (0,13 – $\infty$ )	1,000
CT + CC						
Recesivni	TT+ CT (kontrola)	1,04 (0,37 – 2,87)	1,000	2,71 (0,49 – 18,67)	0,259	
	CC					
Heterozigotni	TT + CC (kontrola)	0,79 (0,29 – 2,15)	0,651	0,52 (0,08 – 2,89)	0,472	
	CT					

\* Fisherov egzakti test



**Tablica 11.** Učestalost alela polimorfizma *CESI* rs8192935 u istraživanom uzorku i rezultati ispitivanja prisutnosti razlike u učestalosti alela između skupine ispitanika kod koje je došlo i skupine kod koje nije došlo do neželjenog kliničkog ishoda.

<b>Alel</b>	<b>Svi ispitanici (N = 90)</b>	<b>Ispitanici u kojih je došlo do krvarenja (N = 27)</b>	<b>Ispitanici u kojih nije došlo do krvarenja (N = 63)</b>	<b><math>\chi^2</math> test; p-vrijednost*</b>	<b>Ispitanici u kojih je došlo do TE (N = 8)</b>	<b>Ispitanici u kojih nije došlo do TE (N = 81)</b>	<b>p-vrijednost<sup>†</sup></b>
<b>T</b>	61 (33,9 %)	19 (35,2 %)	42 (33,3 %)	0,058; 0,810	3 (18,75 %)	58 (35,4 %)	0,269
<b>C</b>	119 (66,1 %)	35 (64,8 %)	84 (66,7 %)		13 (81,25 %)	106 (64,6 %)	

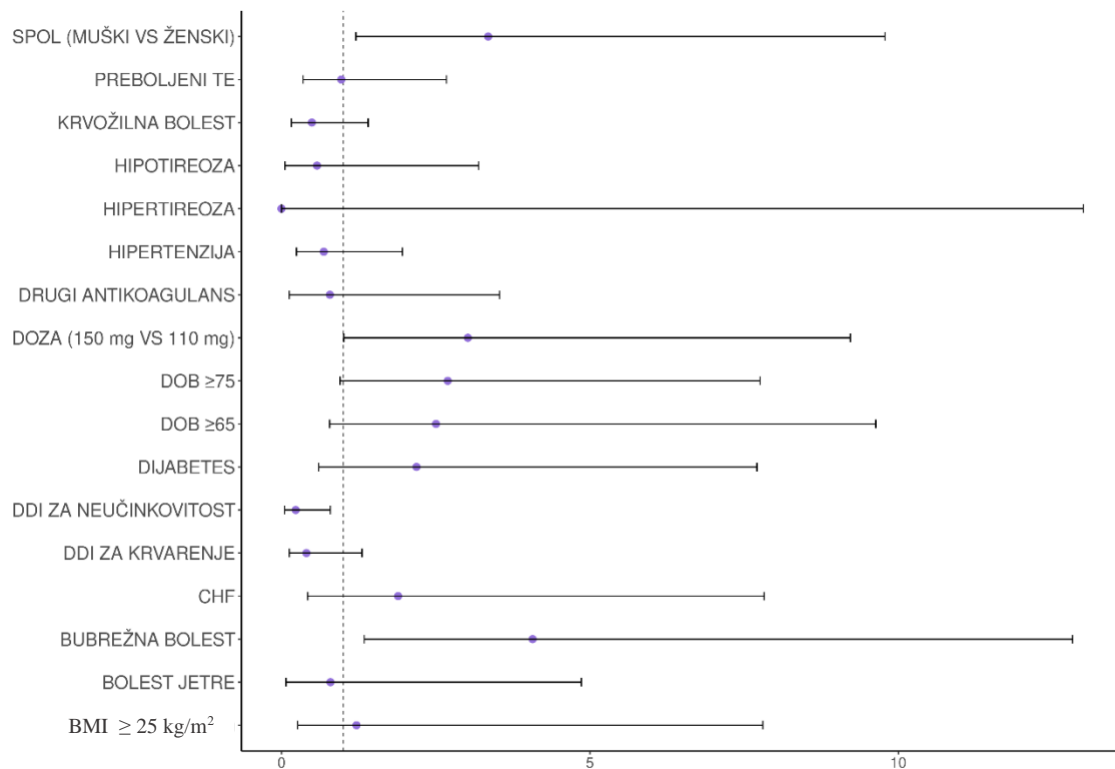
\*  $\chi^2$  test

† Fisherov egzaktni test

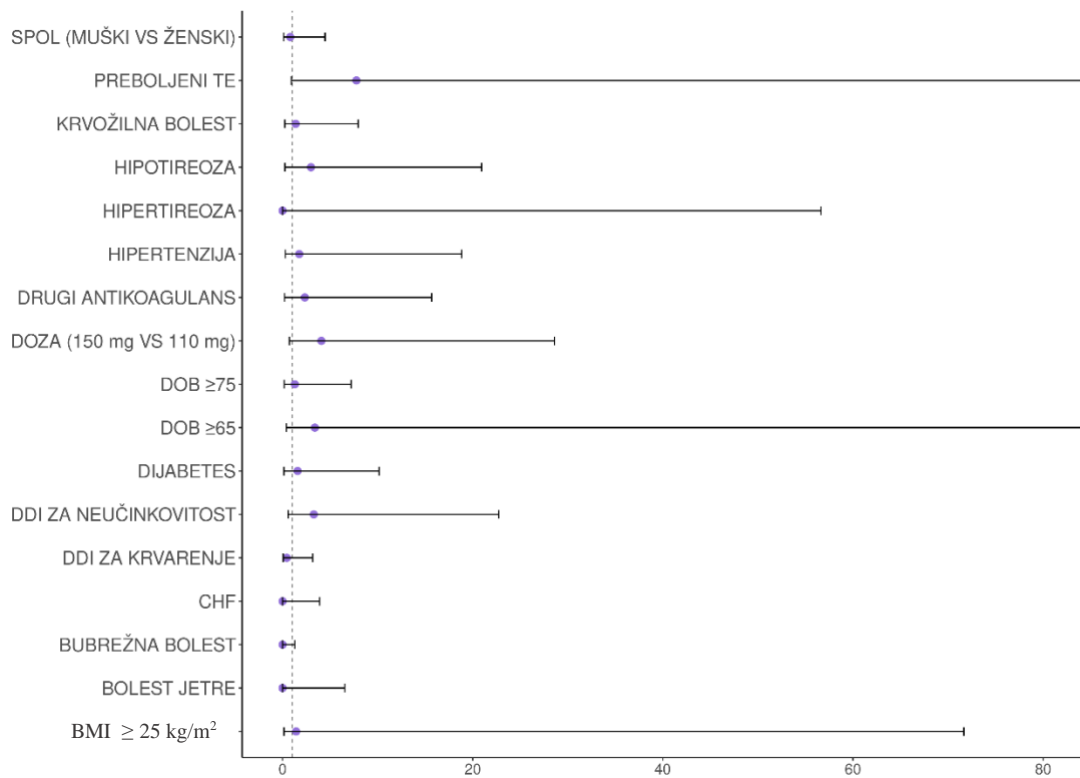
**Tablica 12.** Povezanost negenetičkih rizičnih čimbenika s rizikom od krvarenja, odnosno tromboembolijskih događaja.

Čimbenik rizika	Rizik od krvarenja		Rizik od tromboembolijskog događaja	
	OR (95 % CI)	p-vrijednost*	OR (95 % CI)	p-vrijednost*
Ženski spol	<b>3,35 (1,21 – 9,78)</b>	<b>0,011</b>	0,81 (0,12 – 4,47)	1,000
Doza 110 mg	<b>3,02 (1,01 – 9,22)</b>	<b>0,037</b>	4,09 (0,72 – 28,61)	0,103
BMI ≥ 25 kg/m <sup>2</sup>	1,22 (0,26 – 7,80)	1,000	1,43 (0,15 – 71,66)	1,000
Hipertenzija	0,68 (0,24 – 1,96)	0,471	1,75 (0,29 – 18,84)	0,706
Bubrežna bolest	<b>4,07 (1,34 – 12,82)</b>	<b>0,008</b>	0,00 (0,00 – 1,29)	0,098
Bolest jetre	0,79 (0,07 – 4,86)	1,000	0,00 (0,00 – 6,55)	1,000
Preboljeni tromboembolijski događaj	0,97 (0,35 – 2,67)	1,000	7,77 (0,93 – 364,44)	0,058
Dob ≥ 65 godina	2,51 (0,78 – 9,64)	0,136	3,40 (0,40 – 160,40)	0,427
Dob ≥ 75 godina	2,69 (0,95 – 7,76)	0,049	1,29 (0,19 – 7,21)	0,709
Drugi antikoagulans ili NSAID u terapiji	0,78 (0,13 – 3,53)	1,000	2,34 (0,20 – 15,68)	0,294
DDI koji povećava rizik od krvarenja	0,40 (0,13 – 1,31)	0,097	0,45 (0,08 – 3,17)	0,372
DDI koji povećava rizik od tromboembolijskog događaja	<b>0,23 (0,05 – 0,79)</b>	<b>0,014</b>	3,28 (0,59 – 22,74)	0,130
<i>Diabetes mellitus</i>	2,19 (0,60 – 7,71)	0,224	1,59 (0,14 – 10,15)	0,631
Kongestivno zatajenje srca	1,89 (0,42 – 7,83)	0,322	0,00 (0,00 – 3,89)	0,591
Krvožilna bolest	0,49 (0,16 – 1,41)	0,165	1,38 (0,24 – 7,95)	0,719
Hipotireoza	0,58 (0,06 – 3,20)	0,717	2,99 (0,25 – 20,94)	0,220
Hipertireoza	0,00 (0,00 – 13,00)	1,000	0,00 (0,00 – 56,64)	1,000

BMI – indeks tjelesne mase (od engl. *body mass index*); DDI – interakcije lijek-lijek (od engl. *drug-drug interactions*); NSAID – nesteroidni protuupalni lijek (od engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*); \* Fisherov egzaktni test



**Slika 7.** Dijagram omjera izgleda za ispitivanje povezanosti rizičnih čimbenika s rizikom od krvarenja.



**Slika 8.** Dijagram omjera izgleda za ispitivanje povezanosti rizičnih čimbenika s rizikom od tromboembolijskog događaja.

#### 4.4. Potencijalne interakcije lijek-lijek

Kako većina ispitanika u svojoj terapiji osim dabigatrana ima još nekoliko lijekova, u svakog od njih istražene su moguće interakcije lijek-lijek koristeći Lexicomp® bazu podataka. Potencijalno klinički značajne interakcije dabigatrana i lijekova iz terapije ispitivanih pacijenata su izdvojene i prikazane u Tablici 13.

U tablici je naveden i broj pacijenata koji su imali krvarenja, odnosno tromboembolijski događaj, a koji u terapiji imaju lijek koji potencijalno stupa u značajnu interakciju s dabigatranom.

**Tablica 13.** Prikaz izdvojenih lijekova iz terapije ispitanika koji pokazuju značajnu razinu interakcije u kombinaciji s dabigatranom

Lijek	ATK	Razina značajnosti interakcija*	Mehanizam i ishod DDI	Pacijenti (N) s krvarenjem/TE događajem
enoksaparin	B01AB05	X	dabigatran potencijalno pojačava antikoagulantni učinak drugih antikoagulanasa i može povećati rizik od krvarenja	0 / 0
acetilsalicilna kiselina	B01AC06	D	potencijalno pojačava neželjene toksične učinke dabigatrana i povećava rizik od krvarenja	2 / 0
antacidi	A02A	D	potencijalno smanjuju plazmatsku koncentraciju dabigatrana i njegov antikoagulantni učinak dabigatrana	3 / 0
ibuprofen	M01AE01	D	potencijalno pojačava neželjene toksične učinke dabigatrana i povećava rizik od krvarenja	1 / 0
klopidogrel	B01AC04	D	potencijalno povećava neželjene toksične učinke dabigatrana, povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja	0 / 1
tikagrelor	B01AC24	D	potencijalno inhibira P-gp čime može povećati antikoagulantni učinak, plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja, klinička značajnost interakcije ovisi o bubrežnoj funkciji	1 / 1

**Tablica 13. (nastavak)** Prikaz izdvojenih lijekova iz terapije ispitanika koji pokazuju značajnu razinu interakcije u kombinaciji s dabigatranom

Lijek	ATK	Razina značajnosti interakcija*	Mehanizam i ishod DDI	Pacijenti (N) s krvarenjem/TE događajem
amiodaron	C01BD01	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	4 / 0
amlodipin	C08CA01	C	potencijalno smanjuje terapijsku učinkovitost dabigatrana što može uzrokovati povećan rizik tromboembolijskih događaja	4 / 5
bisoprolol	C07AB07	C	potencijalno inhibira P-gp zbog čega dolazi do povećanja plazmatske koncentracije dabigatrana	10 / 3
karvedilol	C07AG02	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	2 / 0
levetiracetam	N03AX14	C	potencijalno smanjuje terapijski učinak dabigatrana i povećava rizik od krvarenja	0 / 0
omega-3 masne kiseline	C10AX06	C	potencijalno povećavaju antikoagulantni učinak dabigatrana i rizik od krvarenja jer utječu na funkciju trombocita i druge čimbenike koagulacije	3 / 0
paroksetin	N06AB05	C	potencijalno može pojačati antikoagulantni učinak, plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja jer ima antitrombocitna svojstva	1 / 0
propafenon	C01BC03	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	2 / 0

**Tablica 13. (nastavak)** Prikaz izdvojenih lijekova iz terapije ispitanika koji pokazuju značajnu razinu interakcije u kombinaciji s dabigatranom

Lijek	ATK	Razina značajnosti interakcija*	Mehanizam i ishod DDI	Pacijenti (N) s krvarenjem/TE događajem
ranolazin	C01EB18	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno povećava plazmatsku koncentraciju dabigatrana i rizik od krvarenja, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	0 / 0
simvastatin	C10AA01	C	potencijalno inhibira P-gp čime pojačava antikoagulantni učinak dabigatrana i rizik od krvarenja	0 / 0
verapamil	C08DA01	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno može povećati plazmatsku koncentraciju dabigatrana, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	3 / 0
ciklosporin	L04AA01	C	inhibitor P-gp zbog čega potencijalno može povećati plazmatsku koncentraciju dabigatrana, značajnost interakcije je povećana u pacijenata s oštećenom bubrežnom funkcijom	1 / 0

\* X – izbjegavati kombinaciju, D – razmotriti promjenu terapije, C – veći nadzor pacijenta; ATK – anatomsko terapijsko kemijska klasifikacija lijekova; DDI – interakcije lijek-lijek; TE – tromboembolijski

## **5. RASPRAVA**

Zbog analitičkih poteškoća s *TaqMan*<sup>®</sup> *SNP Genotyping Assay*-em, nije bilo moguće genotipizirati polimorfizam rs2244613 kod svih ispitanika, točnije genotipizacija je uspješno provedena kod njih 73. S obzirom na navedeni analitički problem, ispitivanje mogućeg odstupanja učestalosti alela ispitivanih polimorfizama od Hardy-Weinbergove ravnoteže (HWE, od engl. *Hardy-Weinberg equilibrium*) rezultiralo je sa značajnim odstupanjem polimorfizma rs2244613 zbog čega njegova daljnja statistička analiza nije bila moguća. Polimorfizam rs8192935 je genotipiziran kod svih ispitanika i zadovoljio je HWE prag, odnosno nije pronađeno odstupanje učestalosti alela od Hardy-Weinbergove ravnoteže što je preduvjet za daljnju analizu. Premda su oba polimorfizma u neravnotežnoj vezi ( $D' = 0,9487$ ;  $R^2 = 0,3106$ ), zbog nemogućnosti daljnje obrade polimorfizma rs2244613, nije bilo moguće ispitati utjecaj haplotipova polimorfizama na kliničke ishode terapije.

Rezultati testiranih genetičkih modela u provedenom istraživanju nisu utvrdili statistički značajnu povezanost istraživanog polimorfizama *CES1* rs8192935 s kliničkim ishodima terapije što je u skladu s rezultatima drugih dosadašnjih studija. Većina dosad provedenih istraživanja koja su ispitivala utjecaj polimorfizama rs2244613 i rs8192935 na farmakokinetiku/farmakodinamiku dabigatrana i/ili kliničke ishode liječenja pronašla su značajan utjecaj isključivo na farmakokinetičke parametre. U ispitanika bijele rase koji nose varijantni alel zabilježeno smanjenje farmakokinetičkih parametara poput vršne i najniže koncentracije dabigatrana u krvi, dok je u ispitanika azijske rase koji nose varijantni alel pronađeno njihovo značajno povećanje (Tablica 3.). Razlog tomu je različita učestalost alela istraživanih polimorfizama među različitim rasama. Primjerice najzastupljeniji alel polimorfizma rs2244613 (ujedno alel divljeg tipa) povezan s normalnom funkcijom enzima u bijelaca je A i njegovom promjenom u varijantni alel C opaža se smanjena funkcija *CES1*, dok je kod azijata najzastupljeniji alel C (alel divljeg tipa) i njegovom promjenom u varijantni alel A opaža se povećana funkcija *CES1* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Dosad su samo dvije studije pronašle povezanost polimorfizma rs2244613 i rizika od krvarenja. Najprije su Paré i sur. (2013) kod ispitanika bijele rase pronašli kako nositelji varijantnog alela imaju značajno smanjen rizik od krvarenja, a kasnije su Ji i sur. (2021) na ispitanicima azijske rase pronašli kako isti polimorfizam povećava rizik od ne-velikih krvarenja. Li i sur. (2022) proveli su meta-analizu na temelju 10 istraživanja ( $n = 2777$ ) provedenih na ispitanicima bijele i azijske rase s ciljem ispitivanja utjecaja polimorfizma rs2244613 na koncentraciju dabigatrana u krvi i rizik od krvarenja. Pronašli su kako nositelji alela C imaju značajno nižu najnižu plazmatsku koncentraciju dabigatrana i smanjen rizik od krvarenja u odnosu na nenositelje (A/A). Još jedna



meta-analiza provedena je od strane Shi i sur. (2023) koji su istraživali učinak nekoliko polimorfizama na farmakokinetiku i pojavu krvarenja kod ispitanika na terapiji DOAK-ima. Za analizu je uzeto u obzir 13 studija (n = 1.543) te je od *CES1* polimorfizama ispitan utjecaj samo rs2244613. Zaključeno je kako nositelji varijantnog alela A imaju značajno veći rizik od krvarenja u odnosu na nenositelje (C/C). Za razliku od polimorfizma rs2244613, ni u jednom pregledanom istraživanju nije pronađen utjecaj polimorfizma rs8192935 na kliničke ishode terapije.

U ovom istraživanju najveći broj ispitanika su heterozigoti polimorfizma rs8192935 (52,2 %), potom slijede homozigotni nositelji varijantnog alela (40 %) te je najmanje ispitanika homozigotni nositelj alela divljeg tipa (7,8 %). Uočava se kako je učestalost varijantnog alela C veća u odnosu na alel divljeg tipa T. Takva dobivena učestalost alela i genotipova odgovara očekivanoj učestalosti za europsku populaciju gdje je alel T, odnosno alel divljeg tipa, manje zastupljen u odnosu na alel C, odnosno varijantni alel ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Između skupine ispitanika kod kojih je opažen i skupine kod koje nije opažen neželjeni klinički ishod nije pronađena značajna razlika u učestalosti alela.

Negenetički čimbenici, čiju smo povezanost analizirali, obuhvaćaju i rizične čimbenike koji čine sastavni dio bodovnih sustava CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc i HAS-BLED. Osim toga istraživano je i utjecaj prekomjerne tjelesne mase i pretilosti na kliničke ishode terapije, povezanost hipotireoze i hipertireoze zbog utjecaja razine hormona štitnjače na hemostazu, primijenjena doza s obzirom da rizik od neželjenih učinaka ovisi o njoj te moguće interakcije s drugim lijekovima iz terapije za koje postoje dokazi o potencijalnom povećavanju rizika od krvarenja ili neučinkovitosti.

U RE-LY studiji otkriveno je kako je dabigatran u dozi od 110 mg (dva puta dnevno) jednako učinkovit kao i varfarin u prevenciji moždarnog udara i sistemske embolije u ispitanika s fibrilacijom atrijske, a ima manji rizik od velikog krvarenja u odnosu na varfarin, dok je za dozu od 150 mg (dva puta dnevno) pokazano da je učinkovitija od varfarina, ali da je učestalost velikih krvarenja usporediva s varfarinom ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)). Budući da je rizik od neželjenih učinaka dabigatrana ovisan o dozi, očekivano je kako će veća učestalost krvarenja biti u skupini pacijenata koji primaju višu dozu (150 mg) nego u skupini koja prima nižu dozu (110 mg), međutim provedena analiza u ovom radu je pokazala suprotno. Pronađeno je kako su pacijenti koji su primali nižu dozu imali značajno povišen rizik od krvarenja (p = 0,037). Potencijalno objašnjenje za takav rezultat može biti što pacijenti na nižoj dozi imaju veći

početni rizik od krvarenja, odnosno imaju veći broj rizičnih čimbenika zbog čega im liječnici na početku liječenja i propisuju nižu dozu. U ovom istraživanju medijan zbroja rizičnih čimbenika koji povećavaju rizik od krvarenja (HAS-BLED) u 27 pacijenata koji su primali nižu dozu iznosio je 3,5 (od maksimalnih 9), dok je u 58 pacijenata na višoj dozi iznosio 2. Dakle, pacijenti na nižoj dozi su uistinu imali više rizičnih čimbenika za krvarenje što ide u prilog povećanom riziku od krvarenja koja je u njih zabilježena. Iz analize povezanosti doze i rizika od kliničkih ishoda izostavljena su tri ispitanika čija doza nije bila poznata i dva ispitanika koja su primala drugačiju dozu od ostatka skupine. Kod jednog ispitanika na nižoj dozi, točnije dozi od 75 mg dva puta dnevno, zabilježena je pojava krvarenja. Ispitanik je homozigotni nositelj alela divljeg tipa (T/T) polimorfizma rs8192935 i homozigotni nositelj varijantnog alela (C/C) polimorfizma rs2244613 što se u radovima povezuje sa sniženim rizikom od krvarenja. S obzirom da boluje od fibrilacije atrijske, određen mu je HAS-BLED zbroj koji iznosi 5 (od maksimalnih 9), zbog čega je najvjerojatnije na početku liječenja namjerno stavljen na najnižu dostupnu dozu kako bi se rizik od krvarenja što je više moguće smanjio. Međutim, očito je i ta najniža doza za ispitanika zapravo previsoka zbog značajnog utjecaja negenetičkih čimbenika. Kod drugog ispitanika koji je primao dozu lijeka od 110 mg dva puta dnevno uz pauzu svaki treći dan, nije došlo do krvarenja ni tromboembolijskog događaja.

Krvarenje je zabilježeno u 17 žena i 10 muškaraca. Statistička analiza pokazala je značajnu povezanost između rizika od krvarenja i osoba ženskoga spola ( $p = 0,011$ ) što je u skladu s otprije poznatim spoznajama (Lähteenmäki i sur., 2021; Avgil Tsadok i sur., 2015). Reilly i sur. (2014) su, korištenjem uzoraka iz RE-LY studije, pokazali kako je koncentracija dabigatrana u žena bila otprilike 30 % viša u odnosu na muškarce. Prema Lähteenmäki i sur. (2021) postoje dokazi o razlikama u funkciji trombocita i aktivnosti faktora zgrušavanja između muškoga i ženskoga spola što potencijalno objašnjava zašto je u žena pojava krvarenja češća.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali značajnu povezanost između smanjene bubrežne funkcije i rizika od krvarenja ( $p = 0,008$ ), 13 pacijenata u kojih je došlo do krvarenja su imali oštećenu bubrežnu funkciju. Ta povezanost je već otprije poznata s obzirom kako se otprilike 80 % lijeka nepromijenjeno izlučuje putem bubrega. Kod smanjene bubrežne funkcije lijek se sporije izlučuje iz organizma, odnosno produljuje mu se poluvijek zbog čega raste rizik od krvarenja. Iz tog razloga je, prije uvođenja dabigatrana u terapiju, potrebno procijeniti bubrežnu

funkciju i prema njoj prilagoditi dozu, točnije smanjiti dozu ako je bubrežna funkcija blago do umjereno oštećena ([www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)).

Nadalje, dokazana je značajna povezanost interakcija dabigatrana i lijekova koji povećavaju rizik od tromboembolijskog događaja s rizikom od krvarenja ( $p = 0,014$ ). Kod ispitanika kod kojih je prisutna interakcija koja povećava rizik od neučinkovitosti lijeka, šanse za pojavu tromboembolijskog događaja su 3,3 puta veće dok je istovremeno šansa za pojavu krvarenja 77 % manja ( $OR_{TE} = 3,28$ ;  $OR_K = 0,23$ ).

Kod ostalih čimbenika nije dokazana značajna povezanost s rizikom od krvarenja, dok kod nijednoga nije pronađena značajna povezanost s rizikom od tromboembolijskih događaja najvjerojatnije zbog premale veličine uzorka.

Iako su ispitanici u prosjeku imali sedam lijekova u terapiji, nije pronađena značajna povezanost između rizika od krvarenja, odnosno tromboembolijskih događaja i interakcija dabigatrana s lijekova koji utječu na njegovu farmakokinetiku i farmakodinamiku. Prema podacima iz Tablice 13., u kojoj su izdvojeni svi lijekovi iz terapija ispitanika koji pokazuju značajnu interakciju s dabigatranom, jedino se ističe bisoprolol kojeg je u terapiji imalo ukupno 49 pacijenata, od kojih je deset imalo krvarenje. Premda bismo očekivali povezanost konkomitantne terapije s drugim antikoagulansima, antiagregacijskim ili nesteroidnim protuupalnim lijekovima i rizikom od krvarenja, što su i pokazale druge studije poput Lähteenmäki i sur. (2021) te Said i sur. (2020), ispitivana povezanost nije dosegla razinu značajnosti u ovom istraživanju najvjerojatnije zbog premale veličine uzorka i premalog broja takvih lijekova u terapiji kod ispitanika. Pet takvih lijekova (enoksaparin, klopidogrel, tikagrelor, acetilsalicilna kiselina i ibuprofen) je pronađeno kod svega 13 ispitanika od kojih su tri imala neželjeni klinički ishod, točnije krvarenje.

Niske koncentracije hormona štitnjače pomiču hemostatsku ravnotežu ka hipokoagulabilnom stanju čime povećavaju rizik od krvarenja, dok visoke koncentracije hormona pomiču ravnotežu prema hiperkoagulabilnosti čime povećavaju rizik od tromboembolija (Elbers i sur., 2018). U ovom je istraživanju deset ispitanika (10/89) bolovalo od hipotireoze koja je povezana s povećanim rizikom od krvarenja, međutim kod svega dva ispitanika je došlo do pojave krvarenja. Ispitivana povezanost hipotireoze i rizika od krvarenja nije pokazala statističku značajnost najvjerojatnije zbog premalog ispitivanog uzorka.

Otprije je poznato kako je pretilost jedan od glavnih rizičnih čimbenika za razvoj brojnih kardiovaskularnih bolesti, uključujući trombotske i tromboembolijske bolesti. Istraživanja pokazuju kako pretilost uzrokuje kroničnu upalu, oslabljenu fibrinolizu i prekomjernu sekreciju protrombotskih adipokina što su glavni mehanizmi koji dovode do tromboze ili tromboembolije kod pretilih osoba (Blokhin i Lentz, 2013; [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). S druge strane, nekoliko istraživanja provedenih na pacijentima starije životne dobi s fibrilacijom atrijske pretanje koji su liječeni dabigatranom, pronašla su značajnu povezanost BMI-a i rizika od krvarenja. Tako su primjerice Li i sur. (2020) na uzorku od 509 ispitanika pronašli značajnu povezanost povišenog BMI-a i rizika od krvarenja pri čemu je svako povećanje BMI-a za  $1 \text{ kg/m}^2$  povezano s 12 %-tnim porastom rizika od krvarenja. Coates i sur. (2021) su u 777 pretilih ispitanika s tjelesnom masom većom od 120 kg, pronašli malu, ali značajnu povezanost primjene dabigatrana i rizika od gastrointestinalnih krvarenja. Nadalje, Huang i sur. (2022) su također u pacijenata s BMI-em većim od  $40 \text{ kg/m}^2$  (ili tjelesnom masom većom od 120 kg) pronašli kako je primjena dabigatrana povezana s povišenom rizikom od krvarenja (u usporedbi s varfarinom). Suprotno spomenutim istraživanjima, Lee i sur. (2017) su na uzorku od 842 pacijenta pronašli kako pothranjeni pacijenti ( $\text{BMI} < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ) imaju veći rizik od velikih krvarenja u odnosu na pacijente s poželjnom i prekomjernom tjelesnom masom. Zbog proturječnih rezultata istraživanja, utjecaj BMI-a na rizik od krvarenja u pacijenata s fibrilacijom atrijske pretanje liječenih dabigatranom, ali i drugim DOAK-ima, od danas nije u potpunosti razjašnjen. Većina ispitanika (81,2 %) u ovom istraživanju imala je BMI veći od  $25 \text{ kg/m}^2$ , točnije od ukupno 69 ispitanika čiju smo vrijednost mogli odrediti, 30 (43,5 %) ih je imalo prekomjernu tjelesnu masu, a 26 (37,7 %) je bilo pretilo. Prilikom ispitivanja povezanosti BMI-a i rizika od neželjenih kliničkih ishoda, ispitanici u podijeljeni u dvije skupine: ispitanici s poželjnom tjelesnom masom (kontrola) i ispitanici s prekomjernom tjelesnom masom i pretilošću. U ispitivanoj skupini krvarenje je zabilježeno kod 15, a tromboembolijski događaj kod šest ispitanika. Analiza povezanosti povišenog BMI-a ( $\geq 25 \text{ kg/m}^2$ ) i rizika od krvarenja, odnosno tromboembolijskog događaja pokazala je kako osobe s povišenim BMI-em imaju 1,2 puta veće šanse za krvarenje, odnosno 1,4 puta veće šanse za tromboembolijski događaj u odnosu na osobe s poželjnim BMI ( $\text{OR}_K = 1,22$ ;  $\text{OR}_{TE} = 1,43$ ), međutim statistički značajna povezanost povišenog BMI-a i rizika od neželjenih kliničkih ishoda nije dokazana.

Glavno ograničenje ovoga istraživanja je relativno mali broj ispitanika, te ispitanicima nisu mjerene koncentracije dabigatrana u krvi kao što je primjerice napravljeno u drugim istraživanjima. Provođenjem takve farmakokinetičko-farmakogenetičke studije dobili bismo

više informacija i širu sliku o utjecaju polimorfizama *CESI* na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijeka. Nadalje, bitno ograničenje je i neuspješna farmakogenetička analiza polimorfizma *CESI* rs2244613 zbog greške proizvođača. Još jedno ograničenje jest što nisu uzeti u obzir i polimorfizmi gena *ABCB1* za koje postoje značajni dokazi o utjecaju na učinkovitost i sigurnost dabigatrana, ali s obzirom na mali broj ispitanika, ovo ograničenje nije značajno.

U budućnosti je potrebno provesti opsežnije istraživanje s većim brojem ispitanika kako bi se potvrdio utjecaj genetičkih varijanti *CESI* (ali i drugih farmakogena) na kliničke ishode terapije dabigatranom s ciljem prepoznavanja rizičnih pacijenata i optimizacije terapije te sa svrhom izbjegavanja neželjenih kliničkih ishoda.

## **6. ZAKLJUČCI**

Ovaj rad rezultirao je sljedećim saznanjima:

1. Nije dokazana povezanost polimorfizama *CES1* rs2244613 i rs8192935 s rizikom od krvarenja, odnosno tromboembolijskog događaja tijekom primjene dabigatrana.
2. Potvrđena je povezanost ženskog spola i smanjene bubrežne funkcije s povećanim rizikom od krvarenja tijekom primjene dabigatrana.
3. Pronađena je značajna povezanost niže doze dabigatrana (110 mg) i rizika od krvarenja kod pacijenata s većim brojem rizičnih čimbenika za krvarenje.
4. Potvrđena je značajna povezanost interakcija dabigatrana i lijekova koji povećavaju rizik od tromboembolijskog događaja sa smanjenim rizikom od krvarenja.
5. Nije potvrđena značajna povezanost nijednog negenetičkog čimbenika s rizikom od tromboembolijskog događaja tijekom primjene dabigatrana.

## **7. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**



ABCB1	o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice B 1 (od engl. <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i> ), poznatiji i kao MDR1 i P-gp
ACEI	inhibitori angiotenzin konvertaze (od engl. <i>angiotensin-converting enzyme inhibitors</i> )
ADHD	poremećaja pozornosti s hiperaktivnošću (od engl. <i>attention deficit hyperactivity disorder</i> )
APTV	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AUC	površina ispod krivulje koncentracija – vrijeme (od engl. <i>area under the curve</i> )
bid	dvaput dnevno (od lat. <i>bis in die</i> )
BMI	indeks tjelesne mase (od engl. <i>body mass index</i> )
CES1	karboksil-esteraza 1, metabolički enzim dominantno eksprimiran u jetri
<i>CES1A1</i>	izoforma, tj. originalna kopija <i>CES1</i>
<i>CES1A2</i>	funkcionalna duplikacija <i>CES1</i> , točnije hibrid <i>CES1A1</i> i <i>CES1P1</i> , poznatija i kao <i>CES1P1VAR</i>
<i>CES1A3</i>	nefunkcionalni pseudogen poznatiji i kao <i>CES1P1</i>
<i>CES1VAR</i>	varijanta <i>CES1A1</i> koja sadrži segment <i>CES1P1</i> , poznatija i kao <i>CES1A1c</i>
<i>CES1P1VAR</i>	funkcionalna varijanta pseudogena <i>CES1P1</i> koja kodira enzim CES1, poznatija i kao <i>CES1A2</i>
<i>CES1P2</i>	nefunkcionalni pseudogen
CES2	karboksil-esteraza 2, metabolički enzim dominantno eksprimiran u crijevima
CHA <sub>2</sub> DS <sub>2</sub> -VASc	bodovni sustav za procjenu rizika moždanog udara i tromboembolije u pacijenata s fibrilacijom atrijske
CI	interval pouzdanosti (od engl. <i>confidence interval</i> )
CKD-EPI	preporučena jednadžba za procjenu GFR kod odraslih (od engl. <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i> )

CPIC	Konzorcij za kliničku primjenu farmakogenomike (od engl. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i> )
CPNDS	Kanadska farmakogenomska mreža za sigurnu primjenu lijekova (od engl. <i>Canadian Pharmacogenomics Network for Drug Safety</i> )
CrCL	klirens kreatinina (od engl. <i>creatinine clearance</i> )
CYP	natporodica metaboličkih enzima citokroma P450
C/D	omjer koncentracije i doze, koncentracija ujednačena prema dozi (od engl. <i>concentration/dose</i> )
$C_{max}$	vršna koncentracija lijeka, najveća koncentracija lijeka u krvi nakon primjene (od engl. <i>peak concentration</i> )
$C_{trough}$	najniža koncentracija lijeka, koncentracija lijeka u krvi prije sljedeće doze (od engl. <i>trough concentration</i> )
dbSNP	baza podataka polimorfizama jednog nukleotida (od engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i> )
DDI	interakcije lijek-lijek (od engl. <i>drug-drug interactions</i> )
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DOAK	direktni oralni antikoagulansi, skupina lijekova u koja uključuje dabigatraneteksilat, rivaroksaban, apiksaban, edoksaban i betriksaban
DPWG	Nizozemska radna grupa za farmakogenetiku (od engl. <i>Dutch Pharmacogenetics Working Group</i> )
D'	pokazatelj razdvajanja alela dvije varijante koji poprma vrijednosti između 0 i 1 (što je vrijednost veća, povezanost između alela je jača, aleli se ne razdvajaju već se zajedno nasljeđuju). Ako je $D' > 0,8$ , smatra se kako su polimorfizmi u potpunom LD-u i kako se skoro uvijek nasljeđuju zajedno.
eGFR	procijenjena brzina glomerularne filtracije (od engl. <i>estimated glomerular filtration rate</i> ), pretraga za procjenu bubrežne funkcije
EMA	Europska agencije za lijekove (od engl. <i>European Medicines Agency</i> )
FAM <sup>®</sup>	plava fluorescentna boja

FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (od engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
FIIa	aktivirani faktor II, poznatiji i kao trombin
GWAS	cjelogenomska studija povezanosti (od engl. <i>genome-wide association study</i> )
HAS-BLED	bodovi sustav za procjenu rizika od velikog krvarenja u pacijenata s fibrilacijom atrijske na antikoagulantnoj terapiji
<i>het</i>	heterozigot
HWE	Hardy-Weinberova ravnoteža (od engl. <i>Hardy-Weinberg equilibrium</i> )
IQR	interkvartilni raspon (od engl. <i>interquartile range</i> )
kb	kilobaza (1kb = 1000 parova baza (pb))
LD	neravnoteža vezanosti alela, odnosno nenasumična povezanost alela različitih lokusa (od engl. <i>linkage disequilibrium</i> )
LOF	varijanta koja uzrokuje gubitak funkcije enzima (od engl. <i>loss-of-function variant</i> )
MAF	učestalost <i>minor</i> alela (od engl. <i>minor allele frequency</i> )
MDR1	protein višestruke rezistencije na lijekove 1 (od engl. <i>multidrug resistance protein 1</i> ), poznatiji i kao ABCB1 (od engl. <i>ATP-binding cassette subfamily B member 1</i> ) i P-gp (P-glikoprotein)
<i>mut</i>	varijantni tip alela (od engl. <i>mutant</i> )
M1	intermedijarni metabolit dabigatraneteksilata koji nastaje hidrolizom etilne esterske veze putem CES1 u jetri
M2	intermedijarni metabolit dabigatraneteksilata koji nastaje hidrolizom karbamatne esterske veze putem CES2 u crijevima
NSAID	nesteroidni protuupalni lijek (od engl. <i>nonsteroidal anti-inflammatory drug</i> )
NVAF	nevalvularna fibrilacija atrijske (od engl. <i>non-valvular atrial fibrillation</i> )

OCT1	organski kationski prijenosnik 1 (od engl. <i>organic cation transporter 1</i> )
P-gp	prijenosnik P-glikoprotein, poznatiji i kao ABCB1 i MDR1
qPCR	lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (od engl. <i>real-time polymerase chain reaction</i> ), poznatija i kao kvantitativni PCR (od engl. <i>quantitative PCR</i> )
RNPGx	Francuska nacionalna mreža za farmakogenetiku (od franc. <i>Réseau francophone de pharmacogénétique</i> )
R <sup>2</sup>	mjera povezanosti alela dvije varijante koja ovisi o učestalosti alela, poprima vrijednosti između 0 (= aleli nisu povezani) i 1 (= aleli su u potpunosti povezani što omogućava točno predviđanje alela jedne varijante ako je poznat alel druge varijante)
SD	standardna devijacija (od engl. <i>standard deviation</i> )
<i>SLC22A1</i>	gen koji kodira OCT1 (od engl. <i>solute carrier family 22 member 1</i> )
SmPC/SPC	sažetak opisa svojstava lijeka (od engl. <i>summary of product characteristics</i> )
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (od engl. <i>single nucleotide polymorphism</i> )
Sp1	transkripcijski faktor (od engl. <i>Specificity Protein 1</i> )
TV	trombinsko vrijeme
t <sub>max</sub>	vrijeme potrebno za postizanje vršne koncentracije lijeka u plazmi nakon njegove primjene
t <sub>1/2</sub>	poluvijek, vrijeme potrebno kako bi se količina lijeka u organizmu smanjila za 50 % tijekom eliminacije (od engl. <i>half-life</i> )
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza
VIC <sup>®</sup>	zelena fluorescentna boja
VTE	venska tromboembolija
<i>wt</i>	alel divljeg tipa (od engl. <i>wild type</i> )
$\bar{x}$	aritmetička sredina

## **8. LITERATURA**

Avgil Tsadok M, Jackevicius CA, Rahme E, Humphries KH, Pilote L. Sex Differences in Dabigatran Use, Safety, And Effectiveness In a Population-Based Cohort of Patients With Atrial Fibrillation. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*, 2015, 8, 593-599.

Blokhin IO, Lentz SR. Mechanisms of thrombosis in obesity. *Curr Opin Hematol*, 2013, 20, 437-444.

BMI Classification Percentile and Cut Off Points, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 7. 9. 2023.

Božina N, Pejnović L. Farmakogenetika u kliničkoj praksi – preporuke i smjernice Smjernice za kliničku praksu. *Paediatr Croat*, 2013, 57, 318-330.

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

Buckingham L. Nucleic Acid Amplification. U: Molecular Diagnostics: Fundamentals, Methods, and Clinical Applications (3<sup>th</sup> Edition). Philadelphia, F.A. Davis Company, 2019, str. 142-178.

*CES1* Gene, 2023., <https://www.genecards.org>, pristupljeno 3. 10. 2022.

Chen F, Zhang B, Parker RB, Laizure SC. Clinical implications of genetic variation in carboxylesterase drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2018, 14, 131-142.

Coates J, Bitton E, Hendje A, Delate T, Olson KL, Knowles C, Ly S, Fink KM, Clark NP. Clinical outcomes of dabigatran use in patients with non-valvular atrial fibrillation and weight >120 kg. *Thromb Res*, 2021, 208, 176–180.

Cooper GM, Hausman RE. Detekcija nukleinskih kiselina i proteina. U: Stanica – Molekularni pristup (5. izdanje). Lauc G, urednik, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 127-129.

Cullell N, Carrera C, Muiño E, Torres N, Krupinski J, Fernandez-Cadenas I. Pharmacogenetic studies with oral anticoagulants. Genome-wide association studies in vitamin K antagonist and direct oral anticoagulants. *Oncotarget*, 2018, 9, 29238-29258.

dbSNP baza podataka, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 2. 5. 2023.

dbSNP: *CESI*, 2023., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 10. 6. 2023.

dbSNP: *CESI* rs2244613 (Allele Frequency), 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 20. 7. 2023.

dbSNP: *CESI* rs8192935 (Allele Frequency), 2022., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, pristupljeno 25. 7. 2023.

de With M, van Doorn L, Maasland DC, Mulder TAM, Oomen-de Hoop E, Mostert B, Homs MYV, El Bouazzaoui S, Mathijssen RHJ, van Schaik RHN, Bins S. Capecitabine-induced hand-foot syndrome: A pharmacogenetic study beyond DPYD. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159, 114232.

Di L. The Impact of Carboxylesterases in Drug Metabolism and Pharmacokinetics. *Curr Drug Metab*, 2019, 20, 91-102.

Dimatteo C, D'Andrea G, Vecchione G, Paoletti O, Cappucci F, Tiscia GL, Buono M, Grandone E, Testa S, Margaglione M. Pharmacogenetics of dabigatran etexilate interindividual variability. *Thromb Res*, 2016, 144, 1-5.

Elbers LPB, Fliers E, Cannegieter SC. The influence of thyroid function on the coagulation system and its clinical consequences. *J Thromb Haemost*, 2018, 16, 634-645.

ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), 2020., <https://academic.oup.com>, pristupljeno: 15. 7. 2023.

Foerster KI, Hermann S, Mikus G, Haefeli WE. Drug-Drug Interactions with Direct Oral Anticoagulants. *Clin Pharmacokinet*, 2020, 59, 967–980.

Ganoci L. Utjecaj farmakogenetičkih varijacija *CYP2D6* i *ABCB1* na liječenje pripravkom risperidone s produljenim oslobađanjem. Disertacija, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2019.

Gouin-Thibault I, Delavenne X, Blanchard A, Siguret V, Salem JE, Narjoz C, Gaussem P, Beaune P, Funck-Brentano C, Azizi M, Mismetti P, Lorient MA. Interindividual variability in dabigatran and rivaroxaban exposure: contribution of ABCB1 genetic polymorphisms and interaction with clarithromycin. *J Thromb Haemost*, 2017, 15, 273–283.

Gronich N, Stein N, Muszkat M. Association Between Use of Pharmacokinetic-Interacting Drugs and Effectiveness and Safety of Direct Acting Oral Anticoagulants: Nested Case-Control Study. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110, 1526-1536.

Hamzic S, Kummer D, Milesi S, Mueller D, Joerger M, Aebi S, Amstutz U, Largiader CR. Novel Genetic Variants in Carboxylesterase 1 Predict Severe Early-Onset Capecitabine-Related Toxicity. *Clin Pharmacol Ther*, 2017, 102, 796–804.

Her L, Zhu HJ. Carboxylesterase 1 and Precision Pharmacotherapy: Pharmacogenetics and Nongenetic Regulators. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48, 230-244.

Hogg K, Weitz JI. Blood Coagulation and Anticoagulant, Fibrinolytic, and Antiplatelet Drugs. U: Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics (13<sup>th</sup> Edition). Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, urednici, McGraw-Hill Education, 2017, str. 594.

Horita N, Kaneko T. Genetic model selection for a case-control study and a meta-analysis. *Meta Gene*, 2015, 5, 1-8.

Huang CW, Duan L, An J, Sim JJ, Lee MS. Effectiveness and Safety of Dabigatran in Atrial Fibrillation Patients with Severe Obesity: a Real-World Retrospective Cohort Study. *J Gen Intern Med*, 2022, 37, 2982-2990.



Ikonnikova A, Rodina T, Dmitriev A, Melnikov E, Kazakov R, Nasedkina T. The Influence of the *CES1* Genotype on the Pharmacokinetics of Enalapril in Patients with Arterial Hypertension. *J Pers Med*, 2022, 12, 580.

Ingelman-Sundberg M, Rodriguez-Antona C. Pharmacogenetics of drug-metabolizing enzymes: implications for a safer and more effective drug therapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360, 1563-1570.

Ji Q, Zhang C, Xu Q, Wang Z, Li X, Lv Q. The impact of ABCB1 and CES1 polymorphisms on dabigatran pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with atrial fibrillation. *Br J Clin Pharmacol*, 2021, 87, 2247-2255.

Johnson KA, Barry E, Lambert D, Fitzgerald M, McNicholas F, Kirley A, Gill M, Bellgrove MA, Hawi Z. Methylphenidate side effect profile is influenced by genetic variation in the attention-deficit/hyperactivity disorder-associated *CES1* gene. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2013, 23, 655–664.

Katara P, Yadav A. Pharmacogenes (PGx-genes): Current understanding and future directions. *Gene*, 2019, 718, 144050.

Lähteenmäki J, Vuorinen AL, Pajula J, Harno K, Lehto M, Niemi M, van Gils M. Pharmacogenetics of Bleeding and Thromboembolic Events in Direct Oral Anticoagulant Users. *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 110, 768–776.

LDpair Tool (National Institutes of Health), <https://ldlink.nih.gov>, pristupljeno 4. 8. 2023.

Lee CH, Lin TY, Chang SH, Chen CH, Hsu YJ, Hung KC, Wen MS. Body mass index is an independent predictor of major bleeding in non-valvular atrial fibrillation patients taking dabigatran. *Int J Cardiol*, 2017, 228, 771–778.

Lewis CM. Genetic association studies: design, analysis and interpretation. *Brief Bioinform*, 2002, 3, 146-153.

Lewis JP, Horenstein RB, Ryan K, O'Connell, JR, Gibson Q, Mitchell BD, Tanner K, Chai S, Bliden KP, Tantry US, Peer CJ, Figg WD, Spencer SD, Pacanowski MA, Gurbel PA, Shuldiner AR. The functional G143E variant of carboxylesterase 1 is associated with increased clopidogrel active metabolite levels and greater clopidogrel response. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23, 1–8.

Lexicomp® baza interakcije lijekova (Lexicomp® Clinical Decision Support System, Wolters Kluwer, Nizozemska), 2023., <https://www.wolterskluwer.com>, pristupljeno: 2. 7. 2023.

Li MH, Hu LH, Xiong YR, Yu Y, Zhou W, Wang T, Zhu LJ, Liu X, Bao HH, Cheng XS. Association between body mass index and the risk of bleeding in elderly patients with non-valvular atrial fibrillation taking dabigatran: a cohort study. *J Geriatr Cardiol*, 2020, 17, 193–201.

Li H, Zhang Z, Weng H, Qiu Y, Zubiaur P, Zhang Y, Fan G, Yang P, Vuorinen AL, Zuo X, Zhai Z, Wang C. Association between *CES1* rs2244613 and the pharmacokinetics and safety of dabigatran: Meta-analysis and quantitative trait loci analysis. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9, 959916.

Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest*, 2010, 137, 263-272.

Liu Y, Yang C, Qi W, Pei Z, Xue W, Zhu H, Dong M, Guo Y, Cong D, Wang F. The Impact of ABCB1 and CES1 Polymorphisms on Dabigatran Pharmacokinetics in Healthy Chinese Subjects. *Pharmgenomics Pers Med*, 2021, 14, 477–485.

Markowitz JS, Patrick KS. Differential pharmacokinetics and pharmacodynamics of methylphenidate enantiomers: does chirality matter? *J Clin Psychopharmacol*, 2008, 28, S54-S61.

McMillin GA, Wadelius M, Pratt VM. Pharmacogenetics. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Rifai N, Horvath AN, Wittwer CT, urednici, Missouri, Elsevier, 2018, str. 1156.

Nemoda Z, Angyal N, Tarnok Z, Gadoros J, Sasvari-Szekely M. Carboxylesterase 1 gene polymorphism and methylphenidate response in ADHD. *Neuropharmacology*, 2009, 57, 731-733.

Oh J, Lee S, Lee H, Cho JY, Yoon SH, Jang IJ, Yu KS, Lim KS. The novel carboxylesterase 1 variant c.662A>G may decrease the bioactivation of oseltamivir in humans. *PloS one*, 2017, 12, e0176320.

Paré G, Eriksson N, Lehr T, Connolly S, Eikelboom J, Ezekowitz MD, Axelsson T, Haertter S, Oldgren J, Reilly P, Siegbahn A, Syvanen AC, Wadelius C, Wadelius M, Zimdahl-Gelling H, Yusuf S, Wallentin L. Genetic determinants of dabigatran plasma levels and their relation to bleeding. *Circulation*, 2013, 127, 1404–1412.

Patrick KS, Straughn AB, Minhinnett RR, Yeatts SD, Herrin AE, DeVane CL, Malcolm R, Janis GC, Markowitz JS. Influence of ethanol and gender on methylphenidate pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther*, 2007, 81, 346–353.

PCR Setup - Six Critical Components to Consider (Thermo Fisher Scientific), <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 1. 2. 2023.

Personalized medicine, 2023., <https://www.genome.gov>, pristupljeno 16. 11. 2022.

PharmGKB: dabigatran, Variant Annotations, <https://www.pharmgkb.org>, pristupljeno 10. 4. 2023.

PharmGKB: CES1, Variant Annotations, <https://www.pharmgkb.org>, pristupljeno: 13. 6. 2023.

Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest*, 2010, 138, 1093-1100.

Pradaxa - Sažetak opisa svojstava lijeka (SmPC), 2022., <https://www.ema.europa.eu>, pristupljeno 10. 12. 2022.

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (5<sup>th</sup> Edition), 2016., QIAGEN, Hilden, Njemačka

Qian Y, Markowitz JS. Natural Products as Modulators of CES1 Activity. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48, 993-1007.

Rasmussen HB, Bjerre D, Linnet K, Jürgens G, Dalhoff K, Stefansson H, Hankemeier T, Kaddurah-Daouk R, Taboureau O, Brunak S, Houmann T, Jeppesen P, Pagsberg AK, Plessen K, Dyrborg J, Hansen PR, Hansen PE, Hughes T, Werge T, INDICES Consortium. Individualization of treatments with drugs metabolized by CES1: combining genetics and metabolomics. *Pharmacogenomics*, 2015, 16, 649–665.

Rasmussen HB, Madsen MB, Hansen PR, INDICES Consortium. Nomenclature for alleles of the human carboxylesterase 1 gene. *Pharmacogenet Genomics*, 2017, 27, 78-80.

Rasmussen HB, Madsen MB; INDICES Consortium. Carboxylesterase 1 genes: systematic review and evaluation of existing genotyping procedures. *Drug Metab Pers Ther*, 2018, 33, 3-14.

Raymond J, Imbert L, Cousin T, Dufлот T, Varin R, Wils J, Lamoureux F. Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review. *J Pers Med*, 2021, 11, 37.

Real-Time PCR Handbook (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific), 2014., <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 1. 2. 2023.

Real-Time vs. Digital PCR vs. Traditional PCR (Thermo Fisher Scientific), <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 1. 2. 2023.

Reilly PA, Lehr T, Haertter S, Connolly SJ, Yusuf S, Eikelboom JW, Ezekowitz MD, Nehmiz G, Wang S, Wallentin L, RE-LY Investigators. The effect of dabigatran plasma concentrations and patient characteristics on the frequency of ischemic stroke and major bleeding in atrial fibrillation patients: the RE-LY Trial (Randomized Evaluation of Long-Term Anticoagulation Therapy). *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63, 321–328.

Rendić S, Medić-Šarić M. Hidrolaze. U: Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 109-123.

Roden DM, Van Driest SL, Mosley JD, Wells QS, Robinson JR, Denny JC, Peterson JF. Benefit of Preemptive Pharmacogenetic Information on Clinical Outcome. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103, 787-794.

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

Roşian AN, Iancu M, Trifa AP, Roşian ŞH, Mada C, Gocan CP, Niţă T, Istratoaie S, Boarescu PM, Buzoianu AD. An Exploratory Association Analysis of *ABCB1* rs1045642 and *ABCB1* rs4148738 with Non-Major Bleeding Risk in Atrial Fibrillation Patients Treated with Dabigatran or Apixaban. *J Pers Med*, 2020, 10, 133.

Said A, Keeney S, Matka M, Hafeez A, George J, Halalau A. Concomitant use of direct oral anticoagulants and aspirin versus direct oral anticoagulants alone in atrial fibrillation and flutter: a retrospective cohort. *BMC Cardiovasc Disord*, 2020, 20, 263.

Shi J, Wang X, Eyler RF, Liang Y, Liu L, Mueller BA, Zhu HJ. Association of Oseltamivir Activation with Gender and Carboxylesterase 1 Genetic Polymorphisms. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2016a, 119, 555–561.

Shi J, Wang X, Nguyen J, Wu AH, Bleske BE, Zhu HJ. Sacubitril Is Selectively Activated by Carboxylesterase 1 (CES1) in the Liver and the Activation Is Affected by *CES1* Genetic Variation. *Drug Metab Dispos*, 2016b, 44, 554-559.

Shi J, Wang X, Nguyen JH, Bleske BE, Liang Y, Liu L, Zhu HJ. Dabigatran etexilate activation is affected by the CES1 genetic polymorphism G143E (rs71647871) and gender. *Biochem Pharmacol*, 2016c, 119, 76–84.

Shi J, Wu T, Wu S, Chen X, Ye Q, Zhang J. Effect of Genotype on the Pharmacokinetics and Bleeding Events of Direct Oral Anticoagulants: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Pharmacol*, 2023, 63, 277-287.

Shnayder NA, Petrova MM, Shesternya PA, Savinova AV, Bochanova EN, Zimnitskaya OV, Pozhilenkova EA, Nasyrova RF. Using Pharmacogenetics of Direct Oral Anticoagulants to Predict Changes in Their Pharmacokinetics and the Risk of Adverse Drug Reactions. *Biomedicines*, 2021, 9, 451.

Singh A, Gao M, Beck MW. Human carboxylesterases and fluorescent probes to image their activity in live cells. *RSC Med Chem*, 2021, 12, 1142-1153.

Stage C, Jürgens G, Guski LS, Thomsen R, Bjerre D, Ferrero-Miliani L, Lyauk YK, Rasmussen HB, Dalhoff K, INDICES Consortium. The impact of *CES1* genotypes on the pharmacokinetics of methylphenidate in healthy Danish subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 2017a, 83, 1506–1514.

Stage C, Jürgens G, Guski LS, Thomsen R, Bjerre D, Ferrero-Miliani L, Lyauk YK, Rasmussen HB, Dalhoff K, INDICES Consortium. The Pharmacokinetics of Enalapril in Relation to *CES1* Genotype in Healthy Danish Volunteers. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2017b, 121, 487–492.

Stöllberger C. Drug interactions with new oral anticoagulants in elderly patients. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2017, 10, 1191-1202.

Sychev DA, Levanov AN, Shelekhova TV, Bochkov PO, Denisenko NP, Ryzhikova KA, Mirzaev KB, Grishina EA, Gavrilov MA, Ramenskaya GV, Kozlov AV, Bogoslovsky T. The impact of *ABCB1* (rs1045642 and rs4148738) and *CES1* (rs2244613) gene polymorphisms on dabigatran equilibrium peak concentration in patients after total knee arthroplasty. *Pharmgenomics Pers Med*, 2018, 11, 127-137.

Sychev D, Skripka A, Ryzhikova K, Bochkov P, Shevchenko R, Krupenin P, Ivashchenko D, Kogay V, Listratov A, Krainyaya A, Gurinovich O, Sokolova A, Napalkov D, Fomin V. Effect of *CES1* and *ABCB1* genotypes on the pharmacokinetics and clinical outcomes of dabigatran etexilate in patients with atrial fibrillation and chronic kidney disease. *Drug Metab Pers Ther*, 2020, 35.

Tarkiainen EK, Backman JT, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Schwab M, Niemi M. Carboxylesterase 1 polymorphism impairs oseltamivir bioactivation in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92, 68-71.

Tarkiainen EK, Holmberg MT, Tornio A, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Carboxylesterase 1 c.428G>A single nucleotide variation increases the antiplatelet effects of clopidogrel by reducing its hydrolysis in humans. *Clin Pharmacol Ther*, 2015a, 97, 650–658.

Tarkiainen EK, Tornio A, Holmberg MT, Launiainen T, Neuvonen PJ, Backman JT, Niemi M. Effect of carboxylesterase 1 c.428G > A single nucleotide variation on the pharmacokinetics of quinapril and enalapril. *Br J Clin Pharmacol*, 2015b, 80, 1131–1138.

Teft WA, Welch S, Lenehan J, Parfitt J, Choi YH, Winkquist E, Kim RB. OATP1B1 and tumour OATP1B3 modulate exposure, toxicity, and survival after irinotecan-based chemotherapy. *Br J Cancer*, 2015, 112, 857–865.

Thompson LE, Davis BH, Narayan R, Goff B, Brown TM, Limdi NA. Personalizing Direct Oral Anticoagulant Therapy for a Diverse Population: Role of Race, Kidney Function, Drug Interactions, and Pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther*, 2023, 113, 585-599.

Tissue expression of CES1, 2023., <https://www.proteinatlas.org>, pristupljeno 5. 10. 2022.

Tseng AS, Patel RD, Quist HE, Kekic A, Maddux JT, Grilli CB, Shamoun FE. Clinical Review of the Pharmacogenomics of Direct Oral Anticoagulants. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2018, 32, 121–126.

Vuga I, Šupraha Goreta S, Margetić S. Direktni oralni antikoagulacijski lijekovi. *Farmaceutski glasnik : glasilo Hrvatskog farmaceutskog društva*, 2018, 74, 633-652.

Wang X, Wang G, Shi J, Aa J, Comas R, Liang Y, Zhu HJ. CES1 genetic variation affects the activation of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacogenomics J*, 2016, 16, 220–230.

Wang X, Rida N, Shi J, Wu AH, Bleske BE, Zhu HJ. A Comprehensive Functional Assessment of Carboxylesterase 1 Nonsynonymous Polymorphisms. *Drug Metab Dispos*, 2017, 45, 1149-1155.

Wang D, Zou L, Jin Q, Hou J, Ge G, Yang L. Human carboxylesterases: a comprehensive review. *Acta Pharm Sin B*, 2018, 8, 699-712.

Westfall TC, Macarthur H, Westfall DP. Adrenergic Agonists and Antagonists. U: Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics (13<sup>th</sup> Edition). Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC, urednici, McGraw-Hill Education, 2017, str. 191-223.

Xiao FY, Luo JQ, Liu M, Chen BL, Cao S, Liu ZQ, Zhou HH, Zhou G, Zhang W. Effect of carboxylesterase 1 S75N on clopidogrel therapy among acute coronary syndrome patients. *Sci Rep*, 2017, 7, 7244.

Zubiaur P, Saiz-Rodríguez M, Ochoa D, Navares-Gómez M, Mejía G, Román M, Koller D, Soria-Chacartegui P, Almenara S, Abad-Santos F. Effect of Sex, Use of Pantoprazole and Polymorphisms in SLC22A1, ABCB1, CES1, CYP3A5 and CYP2D6 on the Pharmacokinetics and Safety of Dabigatran. *Adv Ther*, 2020, 37, 3537–3550.

Zehnder JL. Lijekovi za liječenje poremećaja koagulacije. U: Temeljna i klinička farmakologija. Katzung BG, urednik; Trkulja V, Klarica M, Šalković-Petrišić M, urednici hrvatskog izdanja, Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 618.

Zhu HJ, Patrick KS, Yuan HJ, Wang JS, Donovan JL, DeVane CL, Malcolm R, Johnson JA, Youngblood GL, Sweet DH, Langaee TY, Markowitz JS. Two CES1 gene mutations lead to dysfunctional carboxylesterase 1 activity in man: clinical significance and molecular basis. *Am J Hum Genet*, 2008, 82, 1241–1248.

Zhu HJ, Markowitz JS. Activation of the antiviral prodrug oseltamivir is impaired by two newly identified carboxylesterase 1 variants. *Drug Metab Dispos*, 2009, 37, 264-267.

Zhu HJ, Wang X, Gawronski BE, Brinda BJ, Angiolillo DJ, Markowitz JS. Carboxylesterase 1 as a determinant of clopidogrel metabolism and activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344, 665-672.



Zhu Z, Qian C, Su C, Tao H, Mao J, Guo Z, Zhu X, Pan J. The impact of ABCB1 and CES1 polymorphisms on the safety of dabigatran in patients with non-valvular atrial fibrillation. *BMC Cardiovasc Disord*, 2022, 22, 481.

## **9. SAŽETAK**

Dabigatran je aktivni oblik prolijeka dabigatraneteksilata koji pripada skupini direktnih oralnih antikoagulansa (DOAK) te djeluje kao izravni oralni inhibitor trombina. Ranija istraživanja su pokazala značajnu interindividualnu varijabilnost u plazmatskim koncentracijama dabigatrana zbog čega je u kasnijim studijama istraživana utjecaj genetičkih i negenetičkih čimbenika na farmakokinetiku dabigatrana i kliničke ishode liječenja. Provođenjem cjelogenomske studije povezanosti otkriveno je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP) dva gena, *CES1* i *ABCB1*, za koje do danas postoji najviše dokaza kako njihove genetičke varijante utječu na farmakokinetiku dabigatrana i potencijalno mogu dovesti do pojave neželjenih štetnih učinaka. Stoga je cilj ovoga istraživanja istražiti utjecaj dva polimorfizma *CES1* (rs2244613 i rs8192935) na kliničke ishode terapije dabigatranom, točnije vidjeti doprinose li povećanom riziku od neželjenih učinaka. Osim genetičkih čimbenika, istraživana je i utjecaj negenetičkih čimbenika te interakcija lijek-lijek. Istraživanje je provedeno kao dio uspostavnoga istraživačkog projekta „Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova (PGx CardioDrug)“ Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-UIP-2020-02-8189). Genotipizacija istraživanih polimorfizama provedena je TaqMan<sup>®</sup> metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu na ABI 7500 Real-Time PCR System uređaju. Na temelju medicinske dokumentacije ispitanika prikupljeni su klinički značajni parametri poput dobi, spola, doze lijeka, indeksa tjelesne mase, komorbiditeta, eGFR, serumske koncentracije kreatinina i konkomitantne terapije. U istraživanju je sudjelovalo 96 ispitanika (41 žena i 55 muškaraca) u dobi od 21 do 93 godine na terapiji dabigatraneteksilat. Šest ispitanika je isključeno iz statističke analize na temelju isključivih kriterija. Krvarenje se pojavilo u 27 ispitanika (30 %), a tromboembolijski događaj u osam ispitanika (8,9 %). Polimorfizam *CES1* rs2244613 isključen je iz statističke obrade zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Statističkom analizom nije pronađena značajna povezanost polimorfizama *CES1* rs8192935 i rizika od krvarenja, odnosno tromboembolijskih događaja što je u skladu s rezultatima drugih ranije provedenih istraživanja. S druge strane, pronađena je statistički značajna povezanost ženskoga spola, niže doze lijeka (110 mg) i oštećene bubrežne funkcije te interakcija dabigatrana i lijekova koji potencijalno smanjuju njegovu učinkovitost s rizikom od krvarenja. S obzirom kako je glavno ograničenje ovoga istraživanja premali broj ispitanika, u budućnosti je potrebno provesti opsežniju studiju s većim uzorkom kako bi se potvrdila povezanost genetičkih varijanti *CES1* s kliničkim ishodima terapije i potencijalna klinička korist genetičkih testiranja s ciljem prepoznavanja rizičnih skupina pacijenata i optimizacije terapije.

## **9. SUMMARY**

Dabigatran is an active form of prodrug dabigatran etexilate and acts as an oral direct thrombin inhibitor which is why it belongs to the novel group of anticoagulants called direct oral anticoagulants (DOACs). Previous research showed notable interindividual variability in plasma levels of dabigatran which is why the effect of genetic and nongenetic factors on the pharmacokinetics of dabigatran and clinical outcomes was investigated. Genome-wide association studies revealed several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of two genes, *CES1* and *ABCBI*, for which there is the most evidence that their genetic variants affect the pharmacokinetics of dabigatran and can potentially lead to adverse effects. The aim of this research is to investigate the impact of *CES1* polymorphisms (rs2244613 and rs8192935) on the clinical outcomes of dabigatran therapy. Besides genetic factors, we also studied the impact of nongenetic factors and drug-drug interactions. The research was conducted as part of the installation research project of the Croatian Science Foundation "Pharmacogenomics in Prediction of Cardiovascular Drugs Adverse Reaction (PGx CardioDrug)". Genotyping of variants was performed by real-time PCR using TaqMan<sup>®</sup> SNP Assays on ABI 7500 Real-Time PCR System. Furthermore, for each patient, a clinically relevant data such as age, gender, dose, BMI, comorbidities, eGFR, serum creatinine level and concomitant therapy was collected from their clinical documentation. 96 patients treated with dabigatran participated in this study (41 women and 55 men, age 21-93). Six patients were excluded from statistical analysis due to exclusion criteria. Bleeding occurred in twenty-seven patients (30 %), whereas only eight patients experienced a thromboembolic event (8,9 %). *CES1* rs2244613 polymorphism was excluded from statistical analysis due to deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. We found no significant association between *CES1* rs8192935 variant and risk of bleeding or thromboembolic events which is consistent with previous studies. A statistically significant association of female gender, lower dose (110 mg), impaired renal function and interactions between dabigatran and drugs that potentially reduce its effectiveness with the risk of bleeding was found. Since the main limitation of this study is a small sample size, in the future it is necessary to conduct a more comprehensive study on a larger sample to confirm the association of *CES1* variants with clinical outcomes, as well as the potential clinical benefit of genetic testing with the aim of identifying patients at higher risk and optimizing therapy.

**10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA  
KARTICA / BASIC DOCUMENTATION  
CARD**

# Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Kolegij: Specijalna područja kliničke biokemije  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

## ULOGA POLIMORFIZAMA GENA *CES1* U KLINIČKOJ MEDICINI

Ivana Prpić

### SAŽETAK

Dabigatran je aktivni oblik prolijeka dabigatraneteksilata koji pripada skupini direktnih oralnih antikoagulanasa (DOAK) te djeluje kao izravni oralni inhibitor trombina. Ranija istraživanja su pokazala značajnu interindividualnu varijabilnost u plazmatskim koncentracijama dabigatrana zbog čega je u kasnijim studijama istraživana utjecaj genetičkih i negenetičkih čimbenika na farmakokinetiku dabigatrana i kliničke ishode liječenja. Provođenjem cjelogenomske studije povezanosti otkriveno je nekoliko polimorfizama jednog nukleotida (SNP) dva gena, *CES1* i *ABCBI*, za koje do danas postoji najviše dokaza kako njihove genetičke varijante utječu na farmakokinetiku dabigatrana i potencijalno mogu dovesti do pojave neželjenih štetnih učinaka. Stoga je cilj ovoga istraživanja istražiti utjecaj dva polimorfizma *CES1* (rs2244613 i rs8192935) na kliničke ishode terapije dabigatranom, točnije vidjeti doprinose li povećanom riziku od neželjenih učinaka. Osim genetičkih čimbenika, istraživana je i utjecaj negenetičkih čimbenika te interakcija lijek-lijek. Istraživanje je provedeno kao dio uspostavnoga istraživačkog projekta „Uloga farmakogenomike u predviđanju nuspojava kardiovaskularnih lijekova (PGx CardioDrug)“ Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ-UIP-2020-02-8189). Genotipizacija istraživanih polimorfizama provedena je TaqMan<sup>®</sup> metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu na ABI 7500 Real-Time PCR System uređaju. Na temelju medicinske dokumentacije ispitanika prikupljeni su klinički značajni parametri poput dobi, spola, doze lijeka, indeksa tjelesne mase, komorbiditeta, eGFR, serumske koncentracije kreatinina i konkomitantne terapije. U istraživanju je sudjelovalo 96 ispitanika (41 žena i 55 muškaraca) u dobi od 21 do 93 godine na terapiji dabigatraneteksilat. Šest ispitanika je isključeno iz statističke analize na temelju isključnih kriterija. Krvarenje se pojavilo u 27 ispitanika (30 %), a tromboembolijski događaj u osam ispitanika (8,9 %). Polimorfizam *CES1* rs2244613 isključen je iz statističke obrade zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Statističkom analizom nije pronađena značajna povezanost polimorfizama *CES1* rs8192935 i rizika od krvarenja, odnosno tromboembolijskih događaja što je u skladu s rezultatima drugih ranije provedenih istraživanja. S druge strane, pronađena je statistički značajna povezanost ženskoga spola, niže doze lijeka (110 mg) i oštećene bubrežne funkcije te interakcija dabigatrana i lijekova koji potencijalno smanjuju njegovu učinkovitost s rizikom od krvarenja. S obzirom kako je glavno ograničenje ovoga istraživanja premali broj ispitanika, u budućnosti je potrebno provesti opsežniju studiju s većim uzorkom kako bi se potvrdila povezanost genetičkih varijanti *CES1* s kliničkim ishodima terapije i potencijalna klinička korist genetičkih testiranja s ciljem prepoznavanja rizičnih skupina pacijenata i optimizacije terapije.

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

Rad sadrži: 96 stranica, 8 grafičkih prikaza, 13 tablica i 99 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: *CES1*, dabigatran, farmakogenetika, interakcije lijek-lijek, neželjeni klinički ishodi, polimorfizmi jednog nukleotida (SNP)

Mentori: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Livija Šimičević**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta

Ocjenjivači: **Dr. sc. Dunja Rogić**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta  
**Dr. sc. Livija Šimičević**, viša asistentica Sveučilišta u Zagrebu Medicinskog fakulteta  
**Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta

Rad prihvaćen: rujan 2023.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Master of Medical Biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Course: Special Areas of Clinical Chemistry  
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### THE ROLE OF *CES1* GENE POLYMORPHISMS IN CLINICAL MEDICINE

Ivana Prpić

#### SUMMARY

Dabigatran is an active form of prodrug dabigatran etexilate and acts as an oral direct thrombin inhibitor which is why it belongs to the novel group of anticoagulants called direct oral anticoagulants (DOACs). Previous research showed notable interindividual variability in plasma levels of dabigatran which is why the effect of genetic and nongenetic factors on the pharmacokinetics of dabigatran and clinical outcomes was investigated. Genome-wide association studies revealed several single nucleotide polymorphisms (SNPs) of two genes, *CES1* and *ABCB1*, for which there is the most evidence that their genetic variants affect the pharmacokinetics of dabigatran and can potentially lead to adverse effects. The aim of this research is to investigate the impact of *CES1* polymorphisms (rs2244613 and rs8192935) on the clinical outcomes of dabigatran therapy. Besides genetic factors, we also studied the impact of nongenetic factors and drug-drug interactions. The research was conducted as part of the installation research project of the Croatian Science Foundation "Pharmacogenomics in Prediction of Cardiovascular Drugs Adverse Reaction (PGx CardioDrug)". Genotyping of variants was performed by real-time PCR using TaqMan® SNP Assays on ABI 7500 Real-Time PCR System. Furthermore, for each patient, a clinically relevant data such as age, gender, dose, BMI, comorbidities, eGFR, serum creatinine level and concomitant therapy was collected from their clinical documentation. 96 patients treated with dabigatran participated in this study (41 women and 55 men, age 21-93). Six patients were excluded from statistical analysis due to exclusion criteria. Bleeding occurred in twenty-seven patients (30%), whereas only eight patients experienced a thromboembolic event (8,9%). *CES1* rs2244613 polymorphism was excluded from statistical analysis due to deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. We found no significant association between *CES1* rs8192935 variant and risk of bleeding or thromboembolic events which is consistent with previous studies. A statistically significant association of female gender, lower dose (110 mg), impaired renal function and interactions between dabigatran and drugs that potentially reduce its effectiveness with the risk of bleeding was found. Since the main limitation of this study is a small sample size, in the future it is necessary to conduct a more comprehensive study on a larger sample to confirm the association of *CES1* variants with clinical outcomes, as well as the potential clinical benefit of genetic testing with the aim of identifying patients at higher risk and optimizing therapy.

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

Thesis includes: 96 pages, 8 figures, 13 tables and 99 references. Original is in Croatian language.

Keywords: *CES1*, dabigatran, pharmacogenetics, drug-drug interactions, adverse clinical outcomes, single nucleotide polymorphisms (SNP)

Mentor: **Dunja Rogić, Ph.D.** / Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Livija Šimičević, Ph.D.** / Senior Assistant, University of Zagreb School of Medicine

Reviewers: **Dunja Rogić, Ph.D.** / Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Livija Šimičević, Ph.D.** / Senior Assistant, University of Zagreb School of Medicine

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

The thesis was accepted: September 2023.