

Verifikacija metoda genotipizacije polimorfizama u genima za CYP2C9 i CYP2C19

Radica, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:462376>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-21**



Repository / Repozitorij:

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



Katarina Radica

**Verifikacija metoda genotipizacije polimorfizama
u genima za CYP2C9 i CYP2C19**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Suvremene biokemijske tehnike Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen u Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Sandre Šuprahe Gorete i suvoditeljstvom nasl. doc. dr. sc. Marija Štefanovića.

Za provođenje istraživanja korištena je oprema nabavljena kroz infrastrukturni znanstveni projekt „Modernizacija i proširenje znanstveno-istraživačke djelatnosti Kliničkog zavoda za kemiju pri KBC Sestre milosrdnice“ (KK.01.1.1.02-0014) Europskoga fonda za regionalni razvoj.

The study was carried out on equipment purchased through the grant KK.01.1.1.02-0014 of the European Regional Development Fund.

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Sandri Šuprahi Goreti i nasl. doc. dr. sc. Mariju Štefanoviću na mentoriranju ovog rada te Tomislavu Pavičiću, specijalistu med. biokemije i lab. medicine na pomoći u izradi rada.

SADRŽAJ

1	Uvod	1
1.1	Farmakogenomika	1
1.2	Citokrom P450.....	2
1.3	Strukturne značajke aktivnog mjesta CYP450	3
1.4	Katalitički ciklus CYP450	4
1.5	CYP2C9.....	7
1.6	CYP2C19.....	8
1.7	Metode određivanja farmakogenetskih polimorfizama	9
1.8	Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja	10
1.9	Verifikacija kvalitativnih postupaka ispitivanja	14
2	Obrazloženje teme	18
3	Materijali i metode.....	19
3.1	Izolacija DNA.....	19
3.2	Određivanje koncentracije i čistoće DNA	20
3.3	Metode određivanja genotipa CYP2C9 i CYP2C19.....	21
3.3.1	Roche Diagnostics LightCycler® 480 II	21
3.3.2	Metoda određivanja genotipa CYP2C9	22
3.3.3	Metoda određivanja genotipa CYP2C19	25
3.4	Provođenje verifikacije.....	28
3.4.1	Ispitivanje analitičke nepreciznosti metode.....	28
3.4.2	Ispitivanje analitičke točnosti metode.....	28
3.4.3	Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom.....	29
3.4.4	Ispitivanje granice detekcije	29
4	Rezultati i rasprava	30
4.1	Ispitivanje analitičke nepreciznosti.....	30
4.2	Ispitivanje analitičke netočnosti.....	32
4.3	Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom.....	36
4.4	Ispitivanje granice detekcije	38
5	Zaključak	40
6	Popis kratica, oznaka i simbola.....	41
7	Literatura.....	42
8	Sažetak / Summary	46

1 Uvod

1.1 Farmakogenomika

Farmakogenomika je područje koje proučava interakciju gena i odgovora na lijek, odnosno doprinos gena varijabilnosti učinkovitosti i toksičnosti lijeka (Johnson, 2001).

Razlikujemo dvije farmakogenomske razine: farmakodinamičku i farmakokinetičku. Farmakodinamička razina farmakogenomike proučava povezanost gena s učinkom i mehanizmom djelovanja lijeka, a farmakokinetička razina proučava utjecaj gena na koncentraciju lijeka i njegovih metabolita na mjestima molekularnog djelovanja (Greenberg i Cronstein, 2015; Ghodke-Puranik i Lamba, 2017).

U nekim slučajevima razina aktivnosti enzima uključenog u metabolizam lijeka može se odrediti prije primjene lijeka. Razlikujemo *normalne* (engl. *normal metabolizers*), *spore* (engl. *poor metabolizers*), *srednje brze* (engl. *intermediate metabolizers*), *brze* (engl. *rapid metabolizers*) i *ultrabrze* (engl. *ultra-rapid metabolizers*) metabolizatore. Kod *sporih* i *srednje brzih* metabolizatora, lijek se sporije metabolizira i izlučuje, zbog čega se u tijelu dulje zadržava, što može dovesti do toksičnog učinka. Kod takvih se osoba stoga smanjuje doziranje lijeka. Kod *brzih* i *ultrabrzih* metabolizatora dolazi do prebrze pretvorbe lijeka u svoje metabolite, što onemogućuje postizanje terapijske koncentracije. Kod ovih je osoba potrebno primjenjivati lijek u višoj dozi nego kod normalnih metabolizatora (Hahn i Roll, 2021).

Znanje o genetičkim polimorfizmima receptora i ciljnih meta djelovanja lijeka, mnogo je manje u usporedbi sa enzimima uključenim u metabolizam lijekova, iako istraživanja pokazuju da mnogi geni koji kodiraju mete djelovanja lijekova iskazuju genetske polimorfizme (Dasgupta i Wahed, 2013).

Identifikacija genskih markera povezanih s odgovorom na lijek ne dovodi uvijek do klinički korisnog prediktora zbog negenetičkih faktora koji također utječu na odgovor na lijek poput: dobi, spola, prehrane, upotrebe drugih lijekova, alkohola ili droga. Individualni odgovor na lijek uvelike ovisi npr. o varijacijama u ekspresiji enzima koji sudjeluju u metabolizmu lijeka ili transporterima kojima se lijek doprema na mjesto djelovanja. No, taj odgovor također ovisi i o epigenetičkim regulatornim mehanizmima kao što su metilacija deoksiribonukleinske kiseline

(engl. deoxyribonucleic acid, DNA) i microRNA modulacija, ili čak o svim mikroorganizmima koji žive u simbiozi s čovjekom tj. o mikrobioti i svim genima mikrobiote odnosno o mikrobiomu. Naime, mikrobiom probavnog sustava može utjecati na ekspresiju jetrenih enzima uključenih u metabolizam lijeka, no i lijek može utjecati na sastav mikrobioma (Haga, 2017; Antal i sur. 2019; Li i sur., 2019).

Genetski čimbenici odgovora na lijek za razliku od drugih faktora ostaju stalni kroz životni vijek pojedinca i stoga potencijalno imaju veliku kliničku značajnost. Stoga je identifikacija genskog doprinosa u odgovoru na lijek jedno od obećavajućih i najaktivnijih područja u genomici (Lu i sur., 2013; McCallum i sur., 2014).

1.2 Citokrom P450

Citokrom (CYP) P450 je enzimski sustav koji obuhvaća veliki broj različitih hem-tiolatnih enzima koji su prisutni u biljkama, životinjama i mikroorganizmima. Superporodici CYP450 pripada više od 12 000 strukturno opisanih enzima. CYP450 enzimi su monooksigenaze, ali mogu djelovati i kao oksidaze, peroksidaze i reduktaze. Molekulska masa im iznosi oko 57kDa i građeni su od oko 500 aminokiselinskih ostataka, sadrže jedan ekvivalent skupine hema po polipeptidnom lancu. Zajednička značajka svih CYP450 enzima je da su hem proteini kod kojih je apoprotein aksijalno koordiniran na atom željeza porfirinskog prstena putem sumpora iz cisteina. Neki dijelovi strukture, poput mjesta vezanja molekuskog kisika na enzim i mjesta na kojem se nalazi hem skupina, ostali su očuvani tijekom evolucije. Zbog očuvanosti trodimenzijske strukture, CYP450 enzimi dijele osnovne značajke mehanizma pri provođenju katalitičke funkcije. Klasifikacija pojedinih CYP450 enzima temelji se na sličnosti slijeda aminokiselina. Kod enzima CYP450 koji pripadaju istoj porodici sličnost aminokiselinskog slijeda iznosi više ili jednako 40 %, unutar potporodice sličnost iznosi više od 55 %, a između pojedinačnih enzima (izoenzima) iznosi više od 98 %. U čovjeka je identificirano 57 funkcionalnih CYP450 enzima koji su podijeljeni u 18 porodica i 44 potporodice. Pet enzima (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4) kataliziraju 90-95 % reakcija u kojima su supstrati lijekovi, od čega 35 % se odnosi samo na CYP3A4.

Enzimi CYP450 nalaze se u brojnim tkivima u čovjeku, ali najveća im je aktivnost u jetri. CYP450 kataliziraju gotovo 90 % svih oksidativnih reakcija i kao produkt većinom nastaju netoksični alkoholi i fenoli. Osim oksidativnih procesa, CYP450 kataliziraju i reduksijske

procesu, ali pritom moraju biti zadovoljeni određeni uvjeti poput anaerobnih, odnosno hipoksičnih uvjeta, odgovarajući redoks potencijal supstrata i sama prisutnost odgovarajućeg donora elektrona. CYP450 enzimi čine integralni dio membranskih proteina i sastavni su dio strukture membrane mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma i drugih membrana. Katalitička svojstva im ovise i o svojstvima drugih dijelova membrane, osobito fosfolipidnog sloja te i fluidnosti i naboju membrane s obzirom da o tim čimbenicima ovisi membranska pokretljivost proteina. Također, CYP450 u membranama mogu tvoriti komplekse sastavljene od 6-10 proteina, (tzv. rotamere), što olakšava transport metabolita između enzima. Razlike u načinu vezanja na endoplazmatski retikulum rezultiraju različitostima u katalitičkoj aktivnosti enzima. Protoporfirin IX smješten je u lumenu enzima i orijentiran je prema površini membrane, stoga hidrofobni supstrati na mjesto vezanja dolaze kroz membranu, a hidrofilni dolaze iz citosola (Rendić i Medić-Šarić, 2013; Munro i sur., 2018).

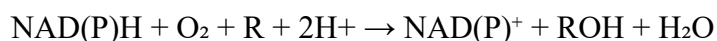
1.3 Strukturne značajke aktivnog mjesta CYP450

Aktivno mjesto enzima CYP450 nalazi se unutar lumena enzima te postoje šupljine koje povezuju aktivno mjesto s površinom proteina. Razlike u mreži šupljina među različitim CYP450 enzimima upućuju na različitu selektivnost prema ligandima (Urban i sur., 2018). U aktivnom mjestu nalazi se protoporfirin IX koji u središtu ima atom željeza i čini hem. U nativnom enzimu, željezo se nalazi u Fe^{3+} stanju i može ostvariti 5 ili 6 ligandskih veza od kojih 4 ostvaruje sa dušikovim atomima pirolnih prstenova i one leže u ravnini, dok su peta i šesta veza usmjerene okomito na tu ravninu. Peta veza je nekovalentna Fe-S- protein veza koja se ostvaruje putem atoma sumpora iz cisteinskog ostatka. Kod membranski vezanih CYP450 to je Cys564, a kod topljivih Cys357. Arginin na položaju 562 ostvaruje vodikovu i/ili ionsku interakciju s propionskim dijelom hema, dok hidrofobne interakcije koje se ostvaruju s aminokiselinskim ostacima na položajima 557, 559, 560, 565 i 566 drže hem na aktivnom mjestu. Šesta veza može biti ili s OH-skupinom, molekulom vode, molekulom kisika ili s nekom drugom endogenom ili egzogenom molekulom koja ima heteroatom u strukturi zbog čega je prisutnost heteroatoma u strukturi molekule uvjet da bi ona mogla biti supstrat enzima CYP450. Atom željeza u središtu molekule hema može se povratno oksidirati i reducirati između Fe^{3+} i Fe^{2+} stanja te se smatra da su mu katalitičke značajke znatno uvećane kelatnim vezama unutar protoporfirinskog prstena i

samim vezanjem kompleksa Fe-protoporfirin IX na specifične apoproteine u tzv. hidrofobnom džepu (Rendić i Medić-Šarić 2013; Munro i sur., 2018).

1.4 Katalitički ciklus CYP450

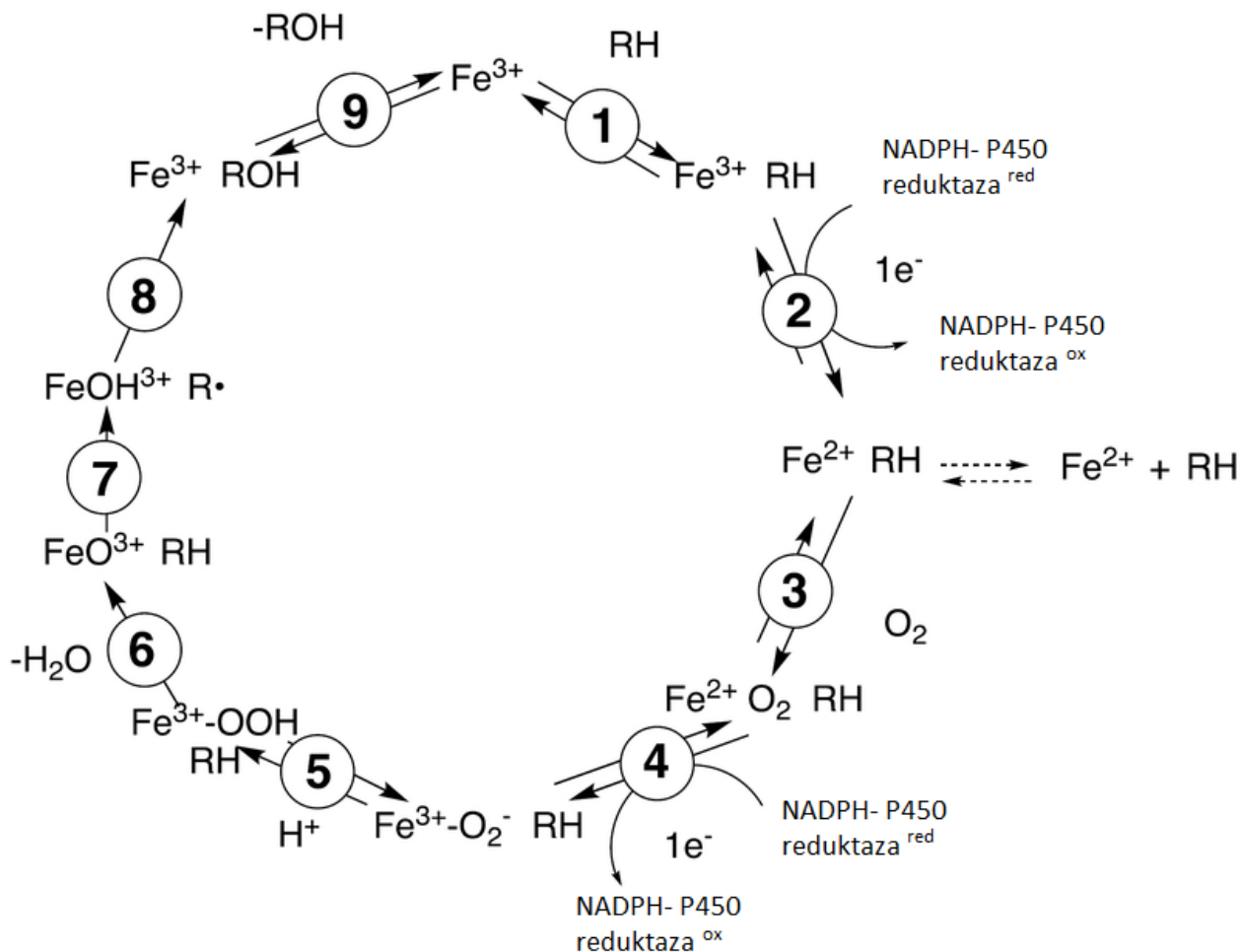
Osnovna reakcija koju CYP450 kataliziraju je reakcija monooksigenacije koja se zbirno prikazuje kao:



gdje je R supstrat, a ROH hidroksilirani produkt. Elektroni potrebni za katalitički ciklus CYP450 enzima mogu potjecati iz raznih izvora, ne moraju nužno potjecati od NAD(P)H, no mora postojati mehanizam transporta elektrona na hemsko željezo CYP450. Kod eukariota elektroni većinom potječu od oksidacije NAD(P)H diflavin reduktazom tj. citokrom P450 reduktazom (CPR). CPR je diflavinski enzim sa dvije velike domene od kojih se na jednu veže FAD/NADP(H), a na drugu FMN. NAD(P)H dostavlja elektrone u obliku hidridnih iona na FAD domenu i reducira je u hidrokinonsko stanje. Potom se dva elektrona prevode na FMN domenu koja jedan po jedan elektron prenosi na hemsko željezo CYP450 reducirajući ga. Alternativni izvor elektrona za pokretanje reakcije može biti vodikov peroksid ili neke organske molekule koje mogu reagirati s CYP450 i generirati katalitički sposobne specije henskog željeza. (Behrendorff, 2021, Munro i sur., 2018) Glavna značajka katalitičkog ciklusa CYP450 je sposobnost henskog željeza da nakon vezanja supstrata na enzim, sudjeluje u oksido-reduktivnim reakcijama čime se jedan atom kisika iz molekulskog kisika ugrađuje u molekulu supstrata, a drugi reducira u molekulu vode. Mehanizam reakcije identičan je među svim CYP450 enzimima, a pojedinačne međusobne razlike očituju se u specifičnosti prema supstratima i stereoselektivnosti. CYP450 kataliziraju više oksidativnih reakcija, a to su: hidroksilacija aromatskog ili alifatskog ugljika, epoksidacija dvostruke veze, oksigenacija heteroatoma i N-hidroksilacija, kod kojih se kisik ugrađuje u supstrat bez drugih strukturnih promjena, potom dealkilacija heteroatoma kod koje nakon oksigenacije dolazi do pregradnje i odvajanja amina i aldehida ili ketona u koje je ugrađen atom kisika, prijenos oksidativne skupine kod koje nakon oksigenacije supstrata dolazi do pregradnje i gubitka heteroatoma, potom cijepanje estera kod kojeg se atom kisika ugrađuje u skupinu koja se odvaja u obliku aldehida i dehidrogenacija kod

koje se odvajaju dva vodikova atoma iz molekule supstrata pri čemu nastaje dvostruka veza, a atom kisika se reducira u vodu. Osim navedenih reakcija CYP450 mogu katalizirati i reakcije redukcije i izomerizacije. Reakcije katalitičkog ciklusa (Slika 1.) podijeljene su u 9 koraka:

1. vezanje supstrata
2. prva redukcija
3. vezanje molekulskog kisika
4. druga redukcija (sa ili bez posredovanja citokroma b5, ovisno o samom enzimu)
5. kidanje kovalentne veze molekule kisika
6. odvajanje molekule vode
7. nastanak radikala
8. nastanak hidroksiliranog supstrata
9. oslobađanje produkta.



Slika 1. Katalitički ciklus CYP450 (preuzeto iz Guengerich, 2018)

Korake reakcije možemo pojasniti na sljedeći način:

- 1) Vežanje supstrata na enzim (Fe^{3+}) - supstrat se veže za enzim u blizini hema zbog čega dolazi do konformacijskih promjena aktivnog mjesta i uklanjanja molekule vode sa položaja šestog liganda. Ovisno o CYP450 enzimu može, ali i ne mora doći do promjene spina elektrona željeza.
- 2) Prva redukcija - zbog vežanja supstrata dolazi do snižavanja redoks potencijala enzima pa dolazi do prijenosa prvog elektrona s NAD(P)H na enzim i redukcije željeza u hemu iz Fe^{3+} u Fe^{2+} .
- 3) Vežanje molekuskog kisika - molekula kisika veže se na Fe^{2+} i nastaje nestabilni kompleks $\text{Fe}^{2+}\text{-O}_2$ koji može prijeći u stabilniji feri oblik tj. $\text{Fe}^{3+}\text{-O}_2^-$. Postoji mogućnost i odvijanja autooksidacije feri oblika uz nastajanje superoksid aniona i prekida reakcije (3a).
- 4) Druga redukcija - dolazi do prijenosa drugog elektrona koji može dolaziti ili s NADPH- P450- reduktaze, citokroma b5 ili s feredoksina pri čemu nastaje perokso skupina. Brzina ovog koraka reakcije određuje ukupnu brzinu cijele reakcije.
- 5) i 6) Kidanje kovalentne veze molekule kisika i nastajanje vode - dolazi do protonacije perokso skupine protonima iz vode ili iz aminokiselinskih ostataka. Pritom jedan atom kisika s dva protona tvori vodu, a drugi atom kisika ulazi u sastav $[\text{FeO}]^{3+}$ kompleksa. Cijepanje kisika može se odvijati heterolitičkim ili homolitičkim mehanizmom što ovisi o svojstvima supstrata i reakciji koju enzim katalizira. Moguća je razgradnja nestabilnog $[\text{FeO}]^{3+}$ kompleksa otpuštanjem vodikovog peroksida čime dolazi do prekida reakcije (5a), ali moguća je i razgradnja $[\text{FeO}]^{3+}$ kompleksa redukcijom s dva elektrona (6a).
- 7) Nastanak radikala - vodikov atom iz molekule supstrata prenosi se na $[\text{FeO}]^{3+}$ pri čemu nastaje supstrat-radikal i hidroksil-radikal $[\text{FeO}]^{3+}$ koji mogu također sudjelovati i u drugim reakcijama, ali mogu i inaktivirati sam enzim.
- 8) Nastanak hidroksiliranog supstrata - supstrat-radikal na sebe veže hidroksil-radikal i kao produkt nastaje hidroksilirani supstrat u kompleksu s feri oblikom enzima.
- 9) Oslobođanje produkta - hidroksilirani produkt oslobađa se s aktivnog mjesta enzima jer je afinitet enzima prema hidroksiliranom supstratu niži nego prema nehidroksiliranom supstratu.

Koraci ciklusa mogu varirati ovisno o izvoru elektrona i tipu supstrata (Rendić i Medić-Šarić, 2013; Munro i sur., 2018). U neaktivnom stanju, na feri željezo veže se molekula vode te se enzim nalazi u niskospinskom stanju. Vežanjem supstrata, voda se otpušta i enzim prelazi u stanje visokog spina što je aktivno stanje te postaje penta-koordinirano. Voda i supstrat vežu se na različita mjesta na enzimu te se produkt reakcije može vezati na isto vezno mjesto kao i voda. Vežanjem supstrata i produkta na svoja vezna mjesta može se regulirati aktivnost enzima (Guengerich, 2018).

1.5 CYP2C9

CYP2C9 bitan je enzim u metabolizmu lijekova, sačinjava čak 18 % CYP450 enzima u mikrosomima čovjeka. Sudjeluje u metabolizmu 25 % klinički administriranih lijekova uključujući S-varfarin, fentoin, losartan, tolbutamid, karbamazepin, nesteroidne protuupalne lijekove (engl. *nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, NSAIDS). U genu koji kodira enzim CYP2C9 nađeni su genetski polimorfizmi koji rezultiraju u značajnim interindividualnim razlikama u brzini metabolizma lijeka. Kod CYP2C9 razlikujemo *normalne*, *spore* i *srednje brze* metabolizatore. Divlji tip, CYP2C9*1 zabilježen je kod otprilike dvije trećine bijelaca. Najčešći polimorfizmi, CYP2C9*2 i CYP2C9*3, posljedica su zamjene po jednog nukleotida koji dovode do supstitucije aminokiseline i promijenjene funkcije enzima. Kod polimorfizma CYP2C9*2 dolazi do zamjene C u T na položaju 430 u eksonu 3 što rezultira izmjenom arginina za cistein, a kod CYP2C9*3 dolazi do zamjene A u C na položaju 1075 u eksonu 7 čega je posljedica zamjena izoleucina leucinom. Osobe koje u svom genotipu (i fenotipu koji iz njega prizlazi) ekspimiraju defektne alele nazivaju se *spori metabolizatori* i skloniji su nuspojavama pri primjeni lijekova koji se metaboliziraju putem CYP2C9. Prevalencija ekspresije dva defektna alela, dakle CYP2C9*2/CYP2C9*2, CYP2C9*2/CYP2C9*3 ili CYP2C9*3/CYP2C9*3, u bjelačkoj populaciji je manje od 2,5 %, dok su heterozigoti (u kombinaciji divlji tip/defektni alel) prisutni kod skoro jedne trećine bjelačke populacije. Polimorfizmi CYP2C9*2 i CYP2C9*3 nisu učestali u azijskoj i afričkoj populaciji, no među tim populacijama zabilježeni su drugi aleli koji se također povezuju sa smanjenom aktivnosti CYP2C9 enzima. Primjerice u afričkoj populaciji prisutni su CYP2C9*8, CYP2C9*5, CYP2C9*6 i CYP2C9*11. Prisutnost već samo jednog defektnog alela dovodi do smanjene biotransformacije lijekova metaboliziranih CYP2C9, s time da CYP2C9*3 ima veći utjecaj na smanjenje enzimске aktivnosti od CYP2C9*2. S obzirom da

dosta lijekova koji se metaboliziraju putem CYP2C9 imaju usku terapijsku širinu (primjerice varfarin ili fenitoin), određivanje genotipa ili fenotipa CYP2C9 prije primjene farmakoterapije smatra se opravdanim (vidi poglavlje 1.7), (Lazar i Fuhr, 2004; Shao i Ito, 2020). Dokazi upućuju da je CYP2C9 najvažniji genetski čimbenik za inicijalnu antikoagulantnu kontrolu kod terapije lijekovima koji se pretežito metaboliziraju ovim metaboličkim putem (npr. kumarini). Sveukupni utjecaj genotipa CYP2C9 na doziranje varfarina procjenjuje se na 6-19 % (Daly, 2014). Ne postoji standardni test za određivanje fenotipa CYP2C9, ali glavni supstrati koji se mogu koristiti u fenotipizaciji su tolbutamin, fenitoin, flurbiprofen, losartan i varfarin.

1.6 CYP2C19

CYP2C19 enzim značajan je u metabolizmu lijekova, doprinosi 16 % ukupnog jetrenog sadržaja ukupnih CYP450 enzima i gen koji ga kodira vrlo je polimorfan. Uključen je u metabolizam brojnih lijekova poput citaloprama, klomipramina, klopidogrela, diazepama, omeprazola, S-mefentoina, bigvanina i R-varfarina. U CYP2C19 genu je identificirano više od 2000 polimorfizama zamjene jednog nukleotida te je zabilježeno više od 40 alelnih varijanti CYP2C19 koje se povezuju s približno 35 izoformi enzima. Kod CYP2C19 ovisno o kombinaciji prisutnih alela koji čine genotip (i dovode do fenotipa), razlikujemo *normalne*, *spore*, *srednje brze*, *brze* i *ultrabrze* metabolizatore. Kombinacije alela koje uzrokuju pojedini fenotip su sljedeće: *normalni* metabolizatori: CYP2C19*1/*1; *spori* metabolizatori: *2/*2, *2/*3, *3/*3; *srednje brzi* metabolizatori: *1/*2, *1/*3, *2/*17, *3/*17; *brzi*: *1/*17; *ultra brzi*:*17/*17. CYP2C19*2 i CYP2C19*3 najučestaliji su polimorfizmi, rezultiraju neaktivnošću enzima, odnosno njihovi nositelji su *spori* metabolizatori, dok CYP2C19*17 uzrokuje pojačanu aktivnost enzima. Kod CYP2C19*2 dolazi do zamjene G u A na položaju 681 u eksonu 5 čime nastaje aberantno mjesto kidanja (engl. *splice site*), dok kod CYP2C19*3 dolazi do zamjene G u A na položaju 636 u eksonu 4 što rezultira sa preuranjenim stop kodonom. Oba polimorfizma rezultiraju neaktivnim enzimom. CYP2C19*2 i CYP2C19*3 aleli rijetki su u bjelačkoj populaciji, a učestaliji u azijskoj. Otprilike 15-25 % populacije južnoistočne Azije su CYP2C19 spori metabolizatori. CYP2C19*2 i CYP2C19*3 heterozigoti također imaju smanjenu aktivnost enzima. Metabolizmom CYP2C19 neki lijekovi se aktiviraju, dok drugi lijekovi njegovim djelovanjem gube aktivnost, stoga utjecaj CYP2C19 na terapiju ovisi i o samom lijeku. Primjerice, CYP2C19 sudjeluje u aktivaciji antikoagulansa klopidogrela i antimalarika progvanila, što znači da smanjena aktivnost enzima

CYP2C19 dovodi do smanjene aktivacije lijeka i nedovoljnog terapijskog učinka, zbog čega je potrebno prilagoditi terapiju te izbor terapije. Kod lijekova kod kojih sudjeluje u inaktivaciji, prisutnost defektnog gena produžuje plazmatsko poluvrijeme života lijeka, primjerice homozigoti za CYP2C19*2 imaju plazmatsko poluvrijeme života diazepama - 84 sata, heterozigoti CYP2C19*2/CYP2C19*1 - 64 sata, a homozigoti za divlji tip - 20 sati. Općenito, ukoliko je pacijent spori metabolizator preporuka je da se inicijalna doza lijeka prepolovi, a da se lijekovi kod kojih je CYP2C19 nužan za aktivaciju- ne primjenjuju (Shao i Ito, 2020; Klein i sur., 2019). Određivanje genotipa CYP2C19 može pomoći izbjeći toksične učinke lijeka te povećati vjerojatnost uspješne terapije (Nebert i Zhang, 2019).

1.7 Metode određivanja farmakogenetskih polimorfizama

Genotipizacija je proces određivanja DNA sekvence, odnosno genotipa, pojedinca na određenim položajima u genomu, dok se fenotipizacijom određuje detektibilna ekspresija pojedinog genotipa što utječe na manifestaciju fenotipa, no u praksi zbog utjecaja okolišnih faktora na ekspresiju gena, fenotip ne mora uvijek korelirati s genotipom. Fenotipizacija se provodi administracijom pojedinih ksenobiotika čiji je metabolički put poznat te popratnom analizom krvi i/ili urina (Ing Lorenzini i sur, 2021.).

Analitičke metode kojima se provodi genotipizacija su: lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) uz polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP), alel-specifični PCR (engl. *allele-specific polymerase chain reaction*, AS-PCR), TaqMan PCR, LightCycler® real-time PCR FRET uz analizu krivulje taljenja (vidi poglavlje 1.8), Southern blot, DNA mikročip (engl. *DNA microarray*) te sekvenciranje npr. pirosekvenciranje, sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*, NGS). Navedene metode međusobno se razlikuju prema trajanju analize, složenosti izvođenja analize, osjetljivosti te u samoj cijeni provedbe analize.

PCR-RFLP jednostavna je, ali dugotrajna metoda i obuhvaća umnažanje određenog slijeda DNA pomoću PCR-a, restrikcijsko kidanje specifičnom endonukleazom i elektroforetsko razdvajanje i detekciju nastalih fragmenata.

AS-PCR omogućuje detekciju polimorfizama zamjene jednog nukleotida koristeći specifične početnice koje su dizajnirane na način da je amplifikacija DNA moguća jedino u slučaju potpune komplementarnosti 3' kraja početnice i DNA kalupa. Detekcija se može vršiti elektroforezom,

hibridizacijom specifičnih obilježenih sonda ili analizom krivulje taljenja. U usporedbi s drugim metodama koje se koriste za detekciju polimorfizama zamjene jednog nukleotida, AS-PCR spada u jeftinije metode. Izvedba same metode je jednostavna.

TaqMan PCR je vrsta PCR-a u stvarnom vremenu koja koristi dvije različite alel-specifične fluorescirajuće sonde. Svaka sonda obilježena je s dva fluorofora: reporterom i prigušivačem (engl. *quencher*). Do fluorescencije pri valnoj duljini koju uređaj bilježi, dolazi jedino ukoliko se donorski i akceptorski fluorofor razdvoje ulaskom DNA polimeraze na mjesto vezanih proba, što se događa pri amplifikaciji DNA. Provedba metode je jednostavna, rizik od kontaminacije je nizak zahvaljujući tome što se reakcija i detekcija vrše bez potrebe za otvaranjem reakcijske smjese.

Southern blot metoda kombinira prijenos elektroforetski razdvojenih fragmenata DNA na najlonsku ili nitroceluloznu membranu s hibridizacijom specifičnim sondama. Može se koristiti za detekciju točkastih mutacija, ali i većih strukturnih promjena DNA poput insercija, delecija i translokacija. Glavno ograničenje ove metode je velika količina DNA koja je potrebna za provedbu analize.

DNA mikročip tehnologija je koja koristi stakalce na koje je vezan veliki broj pojedinačnih oligonukleotida, a temelji se na hibridizaciji komplementarnih slijedova DNA. Kreirajući slijedove DNA specifične za pojedine mutacije, omogućuje se primjena u genotipizaciji. Radi se o cjenovno skupljoj metodi za koju je potrebna posebna oprema.

Kod pirosekvenciranja sintetizira se novi lanac DNA na osnovu kalupne DNA te se svaka vrsta nukleotida dodaje pojedinačno. Ugradnjom nukleotida dolazi do oslobađanja pirofosfata kojeg sulfirilaza prevodi u ATP. Luciferaza koristi nastali ATP i pritom dolazi do oslobađanja svjetlosti što uređaj bilježi.

Koristeći NGS može se paralelno sekvencirati milijune DNA fragmenata. Prije samog sekvenciranja potrebno je pripremiti gensku knjižnicu i provesti klonalnu amplifikaciju. Sekvenciranje omogućuje najdetaljniju genetičku informaciju, ali se ujedno radi o cjenovno najskupljim i najzahtjevnijim metodama. (Darawi i sur., 2013; Kockum i sur., 2023).

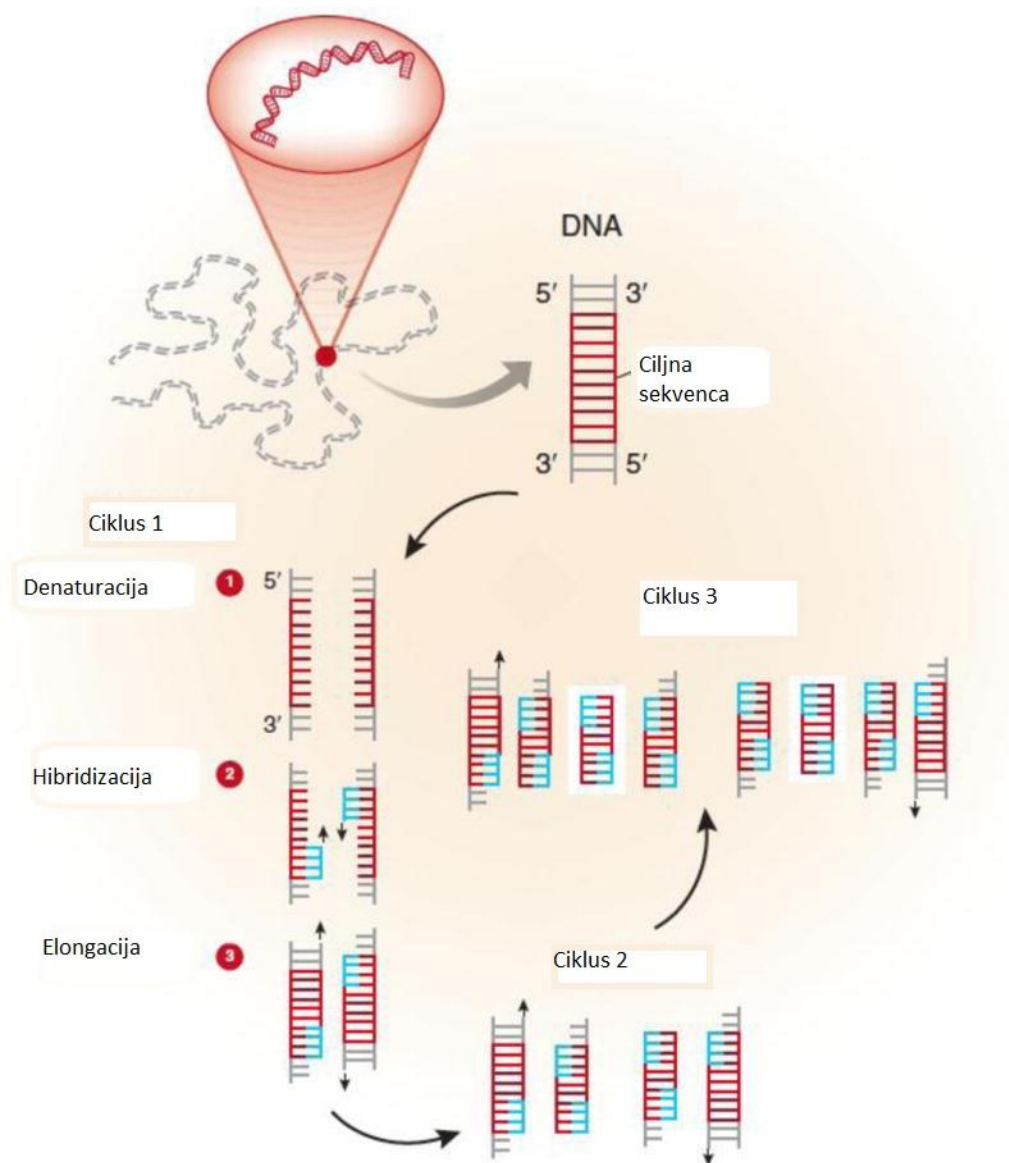
1.8 Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja

Roche Diagnostics LightCycler® tehnologija koju koristi uređaj Roche Diagnostics LightCycler® 480 II, kombinira lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu s praćenjem fluorescencije u stvarnom vremenu te analizu krivulje taljenja. Primjenjuje se u mnogim područjima molekularne patologije, uključujući onkologiju, nasljedne bolesti te infektivne bolesti (Lyon i Wittwer, 2009).

Lančana reakcija polimeraze (PCR) enzimaska je metoda koja omogućava umnažanje specifičnih dijelova DNA. Za svaki PCR potrebni su: početnice, nukleotidi, DNA polimeraza te kalupna DNA. Kalupna DNA je DNA uzorka koja sadrži ciljnu sekvencu koju želimo umnožiti. Početnice su kratki fragmenti DNA točno određene sekvence komplementarne ciljnoj DNA koji služe kao početnice odakle DNA polimeraza započinje sintetizirati novu DNA. DNA polimeraza može dodavati nukleotide samo na već postojeću 3'-OH skupinu što omogućava da se umnoži samo onaj dio DNA koji je omeđen početnicama. Sve potrebne komponente stavljaju se u istu smjesu koja se unosi u PCR uređaj koji variranjem temperature dovodi do umnažanja DNA. PCR reakcija odvija se u tri koraka:

1. Denaturacija dvolančane DNA (što se postiže zagrijavanjem poviše temperature taljenja uslijed pucanja vodikovih veza između lanaca DNA)
2. Hibridizacija početnica (koja se odvija pri nižoj temperaturi u odnosu na denaturaciju)
3. Elongacija početnica djelovanjem DNA polimeraze

Po završetku jednog ciklusa, proces se ponavlja. Svakim ponavljanjem količina kopija DNA se udvostručuje, što znači da se umnoženi produkt reakcije iznosi 2^n , gdje je n broj ciklusa. Slika 2. prikazuje shematski prikaz PCR reakcije (Garibyan i Avashia, 2013.; www.ncbi.nlm.nih.gov).

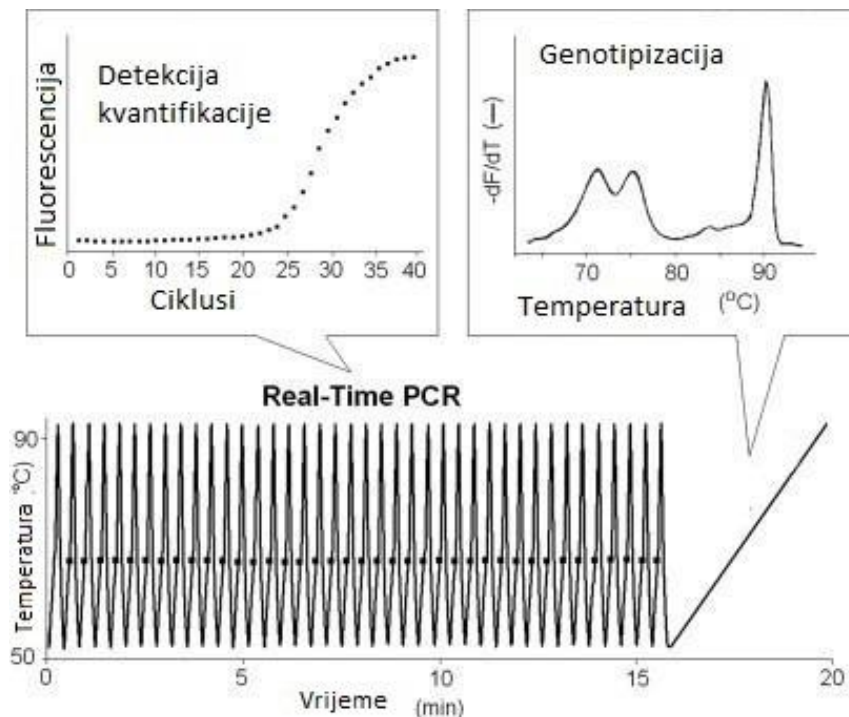


Slika 2. Shematski prikaz PCR reakcije (preuzeto i prilagođeno prema Garibyan i Avashia, 2013)

Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (real-time PCR) modifikacija je uobičajene PCR reakcije koja omogućava praćenje PCR reakcije u stvarnom vremenu. Real-time PCR analizatori istovremeno amplificiraju i vrše detekciju, smanjujući rizik od kontaminacije. Metoda je osjetljivija, preciznija, točnija i brža od obične PCR reakcije te omogućava kvantifikaciju produkta u odnosu na ishodišnu količinu DNA. Praćenje reakcije vrši se praćenjem fluorescencije koja kod metode koja se primjenjuje na Roche Diagnostics LightCycler® 480 II potječe od hibridizacijske sonde obilježene s dva fluorofora: donorskim fluoroforom i akceptorskim

fluoroforom. Kada donorski fluorofor apsorbira svjetlosnu energiju, pobuđuje se i povratkom u osnovno stanje emitira svjetlost različite valne duljine od one koju je primio, ukoliko je akceptorski fluorofor u blizini, dolazi do apsorpcije emitirane svjetlosne energije odnosno do fluorescentnog rezonantnog prijenosa energije (FRET, engl. Fluorescence Resonance Energy Transfer), čime se akceptorski fluorofor pobuđuje i povratkom u svoje osnovno stanje emitira svjetlost na drugoj valnoj duljini koju uređaj mjeri. Do prijenosa energije između donorskog i akceptorskog fluorofora može doći samo ukoliko su u neposrednoj blizini, odnosno ukoliko je došlo do hibridizacije proba na jednolančanu DNA. Svakim ciklusom nastaje sve više molekula DNA, što znači da se svakim ciklusom fluorescencija povećava (Lyon i Wittwer, 2009; Garibyan i Avashia, 2013; Artika i sur., 2022).

Analiza krivulje taljenja provodi se po završetku PCR reakcije zagrijavanjem smjese, čime dolazi do denaturacije DNA, nakon čega se temperatura spušta i dolazi do renaturacije, ali i hibridizacije fluorescentno obilježenih sonde. Time nastaju homodupleksi (sonde i nastali produkt su u potpunosti komplementarni) i heterodupleksi (sonde i nastali produkti nisu u potpunosti komplementarni) koji se uočavaju povišenjem temperature zbog različitih temperatura taljenja (temperatura pri kojoj je 50 % DNA denaturirano). Heterodupleksi se denaturiraju na nižoj temperaturi od homodupleksa zbog sekvence nukleotida koja nije u potpunosti komplementarna. Odvajanjem sonde od DNA dolazi do gašenja fluorescencije koju uređaj bilježi. Krivulje taljenja prikazuju ovisnost fluorescencije o temperaturi, a temperatura taljenja odgovara točki infleksije na krivulji. Krivulju taljenja možemo transformirati u krivulju ovisnosti negativne derivacije fluorescencije po temperaturi ($-dF/T$) o temperaturi (T), tada točka taljenja odgovara vrhu (ili vrhovima) krivulje (Lyon i Wittwer, 2009). Slika 3. Prikazuje praćenje ciklusa reakcije PCR u stvarnom vremenu te analizu krivulje taljenja nastalog produkta.



Slika 3. Prikaz real-time PCR-a i pripadne analize krivulje taljenja (preuzeto i prilagođeno prema Lyon i Wittwer, 2009)

1.9 Verifikacija kvalitativnih postupaka ispitivanja

Pojam validacije i verifikacije označava provjeru istinitosti tehničkih specifikacija proizvođača pregledom ili ispitivanjem dokumentacije i prikupljanjem objektivnih dokaza da su prethodno postavljeni zahtjevi ispunjeni. Validacijom se dokazuje služi li metoda svrsi kojoj je namjenjena te se određuju karakteristike i ograničenja metode. Parametri koji se najčešće ispituju validacijom su: istinitost, preciznost, selektivnost (mjera mogućnosti određivanja željenog analita u matrici), granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost (područje unutar kojeg su rezultati izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku), radno područje (raspon između gornje i donje koncentracijske granice analita u uzorku koju je moguće odrediti), robusnost (otpornost postupka na male namjerne promjene parametara metode), ponovljivost i mjerna nesigurnost. Verifikacija podrazumijeva provjeru istinitosti tehničkih specifikacija proizvođača koje proizvođač navodi na osnovu provedenog procesa validacije i potrebno ju je provesti kada se validirana metoda po prvi puta uvodi u laboratorij i kada se promijene neki uvjeti u laboratoriju koji utječu na metodu (primjerice promjena analizatora). Verifikacija svih postupaka ispitivanja korištenih u

medicinskom laboratoriju jedan je od zahtjeva norme za akreditaciju medicinskih laboratorija HR ISO 15189 koja određuje tehničke zahtjeve nužne za akreditaciju (osoblje, uvjete smještaja i okoliša, laboratorijsku opremu, procese prije ispitivanja, procese ispitivanja, osiguranje kvalitete, procese poslije ispitivanja, izvještavanje o rezultatima, izdavanje nalaza). Akreditacija laboratorija formalni je dokaz osposobljenosti za obavljanje poslova iz područja ispitivanja i mjerenja prema međunarodnim standardima što daje povjerenje u rezultate te povećava konkurentnost laboratorija na tržištu. Cilj verifikacije je osiguravanje kvalitete u medicinskom laboratoriju. Svaki laboratorij treba kreirati vlastiti protokol za verifikaciju postupka ispitivanja te definirati kriterije prihvatljivosti rezultata verifikacije, pritom koristeći specifikacije koje navodi proizvođač testa, kriterije prihvatljivosti organizatora vanjske procjene kvalitete te koristeći podatke iz relevantne literature ili vlastite kriterije temeljene na kliničkoj važnosti. Postupak verifikacije kvalitativnog postupka mora obuhvatiti postupak provjere preciznosti i točnosti. Provjera referentnog intervala, što je u slučaju kvalitativnog testa granična vrijednost, provodi se prema potrebi.

Preciznost označava bliskost slaganja između mjerenja istog analita u istom uzorku u ponovljenim mjerenjima. Obično se ispituje u dva uvjeta mjerenja: u kratkom razdoblju uz sudjelovanje jednog operatera pod što ujednačenijim uvjetima, dakle ista proizvodna serija reagensa, ista kalibracija, temperaturni uvjeti, vrijeme u danu, ili u dužem razdoblju odnosno kroz više dana uz sudjelovanje više operatera u različitim uvjetima. Ispitivanje u kratkom razdoblju daje uvid u kratkotrajne varijacije izmjerenih rezultata, dok ispitivanje u dužem razdoblju odražava uvjete rutinske primjene testa. Preciznost je moguće ispitivati koristeći komercijalne kontrolne uzorke koje preporučuje proizvođač testa, ali i komercijalnim kontrolnim uzorcima drugih proizvođača. Preporučljivo je koristiti se i kliničkim kontrolama, odnosno uzorcima zdravih osoba i uzorcima bolesnika, kako bi se u potpunosti oponašali uvjeti rutinskog rada i učinak matriksa na rezultate. Većina smjernica navodi da je 20 mjerenja minimalno za objektivnu procjenu preciznosti. Rezultati provjere preciznosti izražavaju se kao postotak podudarnosti s očekivanim rezultatom i uspoređuju se s unaprijed definiranim kriterijima prihvatljivosti.

Točnost opisuje koliko je rezultat mjerenja nekog analita blizak stvarnoj vrijednosti tog analita u uzorku. Kod kvalitativnog testa, odnosi se na statističku mjeru pravilne identifikacije ili isključenja određenog stanja tj. predstavlja udio pravilno klasificiranih rezultata, stvarno pozitivnih i stvarno negativnih, u populaciji na kojoj je mjerenje primijenjeno. Opisana je

pojmovima osjetljivosti i specifičnosti, pri čemu osjetljivost označava udio stvarno pozitivnih rezultata, a specifičnost udio stvarno negativnih rezultata. Provjera točnosti kvalitativnih testova moguća je uz pomoć kliničke dijagnoze ukoliko je dostupna, usporedba sa stvarnom koncentracijom analita izmjerenom kvantitativnom metodom ili usporedbom s drugom kvalitativnom metodom koja je u upotrebi i u tom slučaju verifikacijom određujemo jakost usporedivosti metoda. Smjernice Clinical and Laboratory Standards Institute-a navode da je za procjenu osjetljivosti ispitivane metode potrebno minimalno 50 pozitivnih uzoraka (s pozitivnom dijagnozom ili pozitivnih prema kvantitativnoj metodi) te 50 negativnih uzoraka (s negativnom kliničkom dijagnozom ili negativnih prema kvantitativnom testu). Navedeni broj uzoraka za usporedbu često je teško zadovoljiti zbog financijskih razloga ili zbog rijetke pojavnosti pozitivnih uzoraka u nekim slučajevima te se zbog toga minimalni broj uzoraka za usporedbu s drugom kvalitativnom metodom definira ovisno o statističkom testu koji će se primjenjivati. Sami uzorci koji se koriste za usporedbu trebali bi uključivati reprezentativnu populaciju kliničkih stanja koja se očekuju u kliničkoj praksi, različite spolove te dob. Ukoliko se provjera točnosti kvalitativnog testa provodi usporedbom s kvantitativnom metodom potrebno je da je ta metoda verificirana i da ima zadovoljavajuće rezultate za mjereni analit u uzorcima vanjske procjene kvalitete ili međulaboratorijske usporedbe. Provjera točnosti kvalitativnog testa usporedbom s kvalitativnom metodom koja je trenutno u praksi je učestaliji pristup. U tom slučaju rezultati dobiveni objema metodama uspoređuju se pomoću Cohenovog *kappa* koeficijenta tj. *Inter-rater agreement kappa* statističkog testa koji definira snagu usporedivosti. Uzorci koji će se testirati trebaju što više odgovarati populaciji koja će se rutinski određivati, prije testiranja treba biti osigurana stabilnost uzoraka, a vrijeme od uzorkovanja do testiranja treba što više odgovarati stvarnim uvjetima te se mjerenje objema metodama treba raditi u otprilike isto vrijeme. Ispitivanje je potrebno provesti na minimalno 30 uzoraka, pri čemu treba uključiti barem 10 uzoraka za svaku očekivanu kategoriju, kako bi se mogao izračunati *kappa* koeficijent. Poželjno je da se ispitivanje provodi kroz više dana kako bi što više odražavalo tipične laboratorijske uvjete. Nepodudarne rezultate potrebno je ponovno testirati uz istodobno ponovljeno testiranje nekoliko uzoraka koji su bili podudarni. Ukoliko su rezultati ponovno nepodudarni preporučuje se provjera trećom metodom ili kliničkom dijagnozom te se uzima rezultat treće metode.

Provjera granične vrijednosti kvalitativnog testa nije obavezan dio verifikacijskog protokola. Granična vrijednost je ona vrijednost ispod koje se rezultat kvalitativnog testa smatra negativnim tj. iznad koje se smatra pozitivnim (Vukasović, 2016; Antonelli i sur., 2017).

2 Obrazloženje teme

U Odjelu za molekularnu dijagnostiku Kliničkog zavoda za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice instaliran je novi analizator Roche Diagnostics LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) za gensku kvantifikaciju, detekciju i analizu genske varijacije koji se može koristiti u određivanju genotipa CYP2C9 i CYP2C19. Roche Diagnostics LightCycler® 480 II zamijenio je dotadašnji analizator Roche Diagnostics LightCycler® v1.5 (Roche Diagnostics GmbH, Basel, Švicarska) te se postupak verifikacije novog uređaja provodi na osnovi usporedbe s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5.

Cilj ovog istraživanja je provesti postupak verifikacije novog sustava prije uvođenja u kliničku primjenu.

3 Materijali i metode

3.1 Izolacija DNA

Kao uzorak u analizi koristi se izolat DNA, stoga je izolacija DNA bila nužni korak pred provedbu analize. Izolaciju DNA smo proveli pomoću *High Pure PCR Template Preparation Kit*-a (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska), iz uzorka pune venske krvi izvađene u epruvetu s antikoagulansom K₂EDTA.

Laboratorijska oprema:

- termostat Hybex Microsample Incubator (SciGene, Sjedinjene Američke Države)
- vrtložna mješalica Variable Speed SA8 Vortex Mixer (Cole-Palmer Stuart, Sjedinjene Američke Države)
- mikrocentrifuga MicroCL 17 (Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države)
- automatske pipete volumena 10-100 µL i 100-1000 µL (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi i potrošni materijali:

- *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska), sadrži:
 - *Tissue Lysis Buffer* (4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA)
 - *Binding Buffer* (6 M gvanidin-HCl, 10 mM urea, 10 mM Tris-HCl, 20 % Triton X100)
 - Proteinaza K (liofilizat)
 - *Inhibitor Removal Buffer* (5 M gvanidin-HCl, 20 mM Tris-HCl; konačne koncentracije nakon dodatka etanola)
 - *Wash Buffer* (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl; konačne koncentracije nakon dodatka etanola)
 - *Elution Buffer* (10 mM Tris-HCl)
 - kolone za pročišćavanje *High Pure Filter Tubes*
 - plastične epruvete za prikupljanje eluata *Collection Tubes*
- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 100 µL i 1000 µL (Eppendorf, Njemačka)
- plastične jednokratne sterilne epruvete volumena 1,5 mL (Eppendorf, Njemačka)
- izopropanol 99,7 % (Merck, Njemačka)

- etanol apsolutni (T.T.T., Hrvatska)
- voda za PCR (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- menzura volumena 100 mL

Protokol:

- **Priprema reagensa**

1. U bočicu s liofiliziranom proteinazom K dodati 4,5 mL vode za PCR i otopiti liofilizat.
2. U bočicu s *Inhibitor Removal Bufferom* dodati 20 mL apsolutnog etanola.
3. U bočicu s *Wash Bufferom* dodati 80 mL apsolutnog etanola.

- **Izolacija DNA**

1. Miješa se 200 μ L *Binding buffera* i 40 μ L proteinaze K i inkubira u trajanju od 10 minuta pri temperaturi od 70°C
2. Smjesa se dodaje u 200 μ L uzoraka pune krvi
3. Dodaje se 100 μ L izopropanola, dobro se promiješa, prebacuje se u *High Purefilter tube* i centrifugira jednu minutu na 8000g
4. Eluat se baca, dodaje se 500 μ L *Removal Buffera*, centrifugiranje u trajanju jedne minute pri 8000g
5. Eluat se baca, dodaje se 500 μ L *Wash Buffera*, centrifugiranje u trajanju jedne minute pri 8000g
6. Eluat se baca, dodaje se 500 μ L *Wash Buffera*, centrifugiranje u trajanju jedne minute pri 8000g
7. Eluat se baca, centrifugiranje u trajanju 10 sekunda pri 13000g
8. Eluat se baca, dodaje se 200 μ L *Elution Buffera*, centrifugiranje u trajanju jedne minute pri 8000g
9. Eluat sadrži pročišćenu izoliranu DNA

Nakon izolacije DNA potrebno je odrediti njenu koncentraciju.

3.2 Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Koncentracija i čistoća izolirane DNA određena je mikrovolumnim spektrofotometrom. U uzorku od 1 μ L izolirane DNA mjeri se apsorbancija na 230, 260 i 280 nm. Apsorpcijski maksimum DNA je na valnoj duljini od 260 nm, stoga je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 260 nm razmjerna koncentraciji DNA. Apsorpcijski maksimum proteina, odnosno aromatskih

aminokiselina, je na 280 nm, dok je apsorpcijski maksimum Gvanidin- HCl-a koji se koristi u izolaciji DNA pri 230 nm. Omjer apsorbancija A260/A280 i A260/A230 ukazuje na čistoću izolirane DNA te su prihvatljivi uzorci DNA s omjerom A260/A280 koji iznosi 1,7 – 2,0 i omjerom A260/A230 koji iznosi 1,8 – 2,4.

Laboratorijska oprema:

- mikrovolumni spektrofotometar DS-11 FX+ (DeNovix, Sjedinjene Američke Države)
- vrtložna mješalica Variable Speed SA8 Vortex Mixer (Cole-Palmer Stuart, Sjedinjene Američke Države)
- automatska pipeta volumena 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi i potrošni materijali:

- plastični jednokratni sterilni nastavci za pipete s filterom volumena 10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- *Elution Buffer*, sadržan u *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- staničevina

Protokol:

1. 2 µL *Elution Buffera* pipetira se na mjerno polje u svrhu postavljanja bazne linije (engl. *blank*) spektrofotometra te se izvrši mjerenje.
2. Staničevinom se obriše mjerno polje.
3. Na mjerno polje pipetira se 1 µL prethodno vorteksiranog uzorka DNA te se izvrši mjerenje
4. Mjerno polje prebriše se staničevinom.

3.3 Metode određivanja genotipa CYP2C9 i CYP2C19

Određivanje genotipa CYP2C9 i CYP2C19 provedeno je uz korištenje LightMix® Kit CYP2C9*2 and CYP2C9*3 (TIB Molbiol, Njemačka) i LightMix® Kit CYP2C9*2 and CYP2C9*3 (TIB Molbiol, Njemačka) na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska).

3.3.1 Roche Diagnostics LightCycler® 480 II



Slika 4. Roche Diagnostics Roche Diagnostics LightCycler® 480 II
(preuzeto s www.diagnostics.roche.com)

Roche Diagnostics LightCycler® 480 II analizator (prikazan na Slici 4.) može se koristiti u genskoj kvantifikaciji, detekciji, apsolutnoj kvantifikaciji, u određivanju relativne kvantifikacije/analize genske ekspresije, u analizi genske varijacije koristeći metodu analize krivulje taljenja ili metodu analize završne točke uz primjenu odgovarajućih proba te za analizu metilacije koristeći analizu krivulje taljenja visoke rezolucije. Roche Diagnostics LightCycler® tehnologija kombinira PCR, praćenje fluorescencije u pravom vremenu i analizu krivulje taljenja. Praćenjem fluorescencije u svakom ciklusu, moguće je pratiti umnažanje nukleinske kiseline u svakom ciklusu, moguće je odrediti količinu nastalog ciljnog produkta (kvantifikacija), dok se praćenjem fluorescencije pri mijenjanju temperature u analizi krivulje taljenja može provesti kvalitativna analiza, odnosno odrediti genotip uzorka (genotipizacija).

3.3.2 Metoda određivanja genotipa CYP2C9

Iz uzorka izolata DNA, varijacije u CYP2C9 genu detektirali smo metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja, koristeći LightMix® Kit CYP2C9*2 i CYP2C9*3 (TIB Molbiol, Njemačka) i Roche Diagnostics LightCycler® 480 II koji razlikuje alele CYP2C9*1, CYP2C9*2 i CYP2C9*3. Dva fragmenta humanog gena CYP2C9 duljine 374 bp i 180 bp umnažaju se koristeći specifične početnice. Alel *2 detektira se koristeći SimpleProbe® oligomer (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) koji se detektira u kanalu 530, a alel*3 detektira se koristeći LightCycler® Red 640 (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)

obilježenim probama te se detektira u kanalu 640. Potrebno je koristiti kontrolnu DNA u svrhu točne usporedbe s uzorcima nepoznatog genotipa te negativnu kontrolu.

Reagensi i potrošni materijali:

- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 10 μ L i 100 μ L (Eppendorf, Njemačka)
- pločice s 96 reakcijskih jažica LightCycler® 480 II Multiwell (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) 30
- adhezivna folija LightCycler® 480 II Sealing Foil (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- LightMix kit CYP2C9 (TIB Molbiol, Njemačka)
 - Specifične početnice i hibridizacijske sonde
 - CYP2C9*2 genotipizirajući standard divljeg tipa
 - CYP2C9*2 genotipizirajući standard heterozigotnog tipa
 - CYP2C9*2 genotipizirajući standard mutiranog homozigotnog tipa
 - CYP2C9*3 genotipizirajući standard divljeg tipa
 - CYP2C9*3 genotipizirajući standard heterozigotnog tipa
 - CYP2C9*3 genotipizirajući standard mutiranog homozigotnog tipa

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)

- LightCycler® FastStart Enzyme (oznaka: 1a) – Taq polimeraza
- LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe (oznaka: 1b), 10x konc. – reakcijski pufer Tris-HCl, smjesa dNTP-ova, 10 mM MgCl₂
- otopina MgCl₂, 25 mM
- voda za PCR

Protokol:

- **Priprema otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda:**
 1. U bočicu sa specifičnim početnicama i hibridizacijskim sondama dodati 66 μ L vode za PCR
 2. Vorteksirati
 3. Kratko centrifugirati kako bi se spustile zaostale kapi sa stijenki bočice
- **Priprema otopina genotipizirajućih standarda:**
 1. U svaku od bočica s genotipizirajućim standardom dodati 80 μ L i lagano promiješati pipetom 10 puta

2. Vorteksirati
3. Kratko centrifugirati kako bi se spustile zaostale kapi sa stijenki bočice

Priprema reakcijske smjese: (navedeni postupak opisuje pripremu jedne reakcijske smjese, odnosno potrebne volumene za genotipizaciju jednog uzorka DNA ili genotipizirajućeg standarda)

U jažicu treba otpipetirati:

1. 9,8 μL vode za PCR
2. 1,2 μL otopine Mg^{2+} , 25mM
3. 2,0 μL pripremljene otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda
4. 2,0 μL LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
5. 5,0 μL otopine izolirane DNA ili pripremljene otopine genotipizirajućeg standarda

PCR reakcija provedena je na analitičkom sustavu LightCycler® 480 II uz korištenje pripadajućeg programa. Uvjeti PCR reakcije su sljedeći: početna denaturacija na 95°C tijekom 10 min, nakon čega slijedi 45 ciklusa umnažanja koji su se sastojali od denaturacije DNA na 95°C tijekom 5 s, sljepljivanja klica na 60°C tijekom 10 s i produljenja klica na 72°C tijekom 15 s. Fluorescencija u svrhu praćenja količine nastalog produkta mjerena je tijekom faze sljepljivanja klica. Nakon 45 ciklusa umnažanja, provedena je denaturacija umnožene DNA na 95°C tijekom 30 s, a zatim renaturacija DNA na 40°C tijekom 2 min kada je došlo do hibridizacije fluorescentno obilježenih sonda i umnožene DNA. Nakon toga je provedeno postupno zagrijavanje do 85°C uz kontinuirano mjerenje fluorescencije. Pritom, ovisno o prisutnom genotipu, dolazi do denaturacije DNA pri točno određenim temperaturama taljenja. Nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40°C tijekom 30 s. Dobivene krivulje taljenja transformirane su u krivulje ovisnosti negativne derivacije fluorescencije po temperaturi ($-dF/dT$) o temperaturi (T). Na kanalu 530 očitavaju se rezultati za alel *2, temperatura koja odgovara točki taljenja za divlji tip (*1/*1) iznosi 59°C, a za mutirani tip (*2/*2) 50°C, dok kod heterozigota (*1/*2) uočavamo na krivulji obe točke taljenja, jednu pri temperaturi 50°C, a drugu pri 59°C. Dopušteno odstupanje u rezultatima na kanalu 530 je +/- 9°C. Na kanalu 640 očitavaju se rezultati za alel *3, temperatura koja odgovara točki taljenja za divlji tip (*1/ *1) iznosi 49°C, a za mutirani tip (*3/*3) 59°C, dok kod heterozigota (*1/*3) uočavamo na krivulji obe točke taljenja, jednu pri

temperaturi od 49°C, a drugu pri 59°C. Dopušteno odstupanje u rezultatima na kanalu 640 je +/- 10°C. Primjer tipičnih rezultata i tumačenje tipa metabolizatora prikazano u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz mogućih rezultata analize genotipa CYP2C9

*2 Kanal 530 Točka taljenja		*3 Kanal 640 Točka taljenja		CYP2C9 aleli	Tip metabolizatora
-	59°C	49°C		*1/ *1	Divlji tip
50°C	59°C	49°C	-	*1/ *2	Srednji
	59°C	49°C	59°C	*1/ *3	Srednji
50°C	-	49°C	-	*2/ *2	Spori
	59°C	-	59°C	*3/ *3	Spori
50°C	59°C	49°C	59°C	*2/ *3	Spori
50°C		49°C	59°C	*2/ duplo mutirana	Spori
50°C			59°C	Nije zabilježena	Spori
-	-	-	-	PCR greška	

3.3.3 Metoda određivanja genotipa CYP2C19

Iz uzorka izolata DNA, varijacije u CYP2C19 genu detektirali smo metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu uz analizu krivulje taljenja, koristeći LightMix® Kit CYP2C19*2 i CYP2C19*3 (TIB Molbiol, Njemačka) i Roche Diagnostics LightCycler® 480 II analizator koji razlikuje alele CYP2C19*2 i CYP2C19*3. Dva fragmenta humanog gena CYP2C19 duljine 133 bp i 164 bp umnažaju se koristeći specifične početnice. Alel *2 detektira se koristeći SimpleProbe® oligomer koji se detektira na kanalu 530, a alel*3 detektira se koristeći Roche Diagnostics LightCycler® 480 II Red 640 označene probe te se detektira u kanalu 640. Potrebno je koristiti kontrolnu DNA u svrhu točne usporedbe s uzorcima nepoznatog genotipa te negativnu kontrolu.

Reagensi i potrošni materijali:

- plastični jednokratni nastavci za pipete s filterom volumena 10 µL i 100 µL (Eppendorf, Njemačka)

- pločice s 96 reakcijskih jažica LightCycler® 480 II Multiwell (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska) 30
- adhezivna folija LightCycler® 480 II Sealing Foil (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)
- LightMix kit CYP2C19 (TIB Molbiol, Njemačka)
 - Specifične početnice i hibridizacijske sonde
 - CYP2C19*2 genotipizirajući standard divljeg tipa
 - CYP2C19*2 genotipizirajući standard heterozigotnog tipa
 - CYP2C19*2 genotipizirajući standard mutiranog homozigotnog tipa
 - CYP2C19*3 genotipizirajući standard divljeg tipa
 - CYP2C19*3 genotipizirajući standard heterozigotnog tipa
 - CYP2C19*3 genotipizirajući standard mutiranog homozigotnog tipa

LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics GmbH, Švicarska)

- LightCycler® FastStart Enzyme (oznaka: 1a) – Taq polimeraza
- LightCycler® FastStart Reaction Mix HybProbe (oznaka: 1b), 10x konc. – reakcijski pufer Tris-HCl, smjesa dNTP-ova 10 mM MgCl₂
- otopina MgCl₂, 25 mM
- voda za PCR

Protokol:

- **Priprema otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sonda:**
 1. U bočicu sa specifičnim početnicama i hibridizacijskim sondama dodati 66 µL vode za PCR
 2. Vorteksirati
 3. Kratko centrifugirati kako bi se spustile zaostale kapi sa stijenki bočice
- **Priprema otopina genotipizirajućih standarda:**
 1. U svaku od bočica s genotipizirajućim standardom dodati 80 µL i lagano promiješati pipetom 10 puta
 2. Vorteksirati
 3. Kratko centrifugirati kako bi se spustile zaostale kapi sa stijenki bočice

Priprema reakcijske smjese: (navedeni postupak opisuje pripremu jedne reakcijske smjese, odnosno potrebne volumene za genotipizaciju jednog uzorka DNA ili genotipizirajućeg standarda)

U jažicu treba otpipetirati:

1. 9,4 μL vode za PCR
2. 1,6 μL otopine Mg^{2+} , 25mM
3. 2,0 μL pripremljene otopine specifičnih početnica i hibridizacijskih sondi
4. 2,0 μL LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe
5. 5,0 μL otopine izolirane DNA ili pripremljene otopine genotipizirajućeg standarda

PCR reakcija provedena je na analitičkom sustavu LightCycler® 480 II uz korištenje pripadajućeg programa. Uvjeti PCR reakcije su sljedeći: početna denaturacija na 95°C tijekom 10 min, nakon čega slijedi 45 ciklusa umnažanja koji su se sastojali od denaturacije DNA na 95°C tijekom 5 s, sljepljivanja klica na 60°C tijekom 10 s i produljenja klica na 72°C tijekom 15 s. Fluorescencija u svrhu praćenja količine nastalog produkta mjerena je tijekom faze sljepljivanja klica. Nakon 45 ciklusa umnažanja, provedena je denaturacija umnožene DNA na 95°C tijekom 20 s, a zatim renaturacija DNA na 40°C tijekom 20 s kada je došlo do hibridizacije fluorescentno obilježenih sondi i umnožene DNA. Nakon toga je provedeno postupno zagrijavanje do 85°C uz kontinuirano mjerenje fluorescencije. Pritom, ovisno o prisutnom genotipu, dolazi do denaturacije DNA pri točno određenim temperaturama taljenja. Nakon taljenja DNA uređaj je ohlađen na 40°C tijekom 30 s. Dobivene krivulje taljenja transformirane su u krivulje ovisnosti negativne derivacije fluorescencije po temperaturi ($-\text{dF}/\text{dT}$) o temperaturi (T). Na kanalu 530 očitavaju se rezultati za alel *2, temperatura koja odgovara točki taljenja za divlji tip (*1/*1) iznosi 54,4°C, a za mutirani tip (*2/*2) 48,6°C, dok kod heterozigota (*1/*2) uočavamo na krivulji obe točke taljenja, jednu pri temperaturi 48,4°C, a drugu pri 54,5°C. Dopušteno odstupanje u rezultatima na kanalu 530 je +/- 6°C. Na kanalu 640 očitavaju se rezultati za alel *3, temperatura koja odgovara točki taljenja za divlji tip (*1/*1) iznosi 53,4°C, a za mutirani tip (*3/*3) 60,8°C, dok kod heterozigota (*1/*3) uočavamo na krivulji obe točke taljenja, jednu pri temperaturi od 53,4°C, a drugu pri 60,8°C. Dopušteno odstupanje u rezultatima na kanalu 640 je +/- 8°C. Primjer tipičnih rezultata i tumačenje tipa metabolizatora prikazano u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz mogućih rezultata analize genotipa CYP2C19

*2	*3		
Kanal 530	Kanal 640	CYP2C19 aleli	Tip
Točka taljenja	Točka taljenja		metabolizatora

-	54,4°C	53,4°C	-	*1/ *1	Divlji tip
48,6°C	54,4°C	53,4°C	-	*1/ *2	Srednji
-	54,4°C	53,4°C	60,8°C	*1/ *3	Srednji
48,6°C	-	53,4°C	-	*2/ *2	Spori
-	54,4°C	-	60,8°C	*3/ *3	Spori
48,6°C	54,4°C	53,4°C	60,8°C	*2/ *3	Spori
48,6°C	-	-	60,8°C	Nije zabilježena	Spori
-	-	-	-	PCR greška	

3.4 Provođenje verifikacije

3.4.1 Ispitivanje analitičke nepreciznosti metode

Analitička nepreciznost za genotipizaciju polimorfizama alela *2 i *3 gena CYP2C9 i CYP2C19 ispitana je u pet neovisnih *run*-ova, odnosno pet ponavljanja dvije serije (5+5) različitih naizmjenično poredanih genotipova kroz pet radnih dana. Korišteni su komercijalni kontrolni uzorci proizvođača s poznatim ciljnim vrijednostima divljeg tipa (CYP2C9*2WT, CYP2C9*3WT, CYP2C19*2WT i CYP2C19*WT Standard) i heterozigota (CYP2C9*2HT, CYP2C9*3HT, CYP2C19*2HT i CYP2C19*3HT Standard). Analitička nepreciznost izračunata je prema sljedećem izrazu:

$$\text{Analitička nepreciznost (\%)} = 100 \% - (\% \text{ podudarnosti s ciljnim vrijednostima})$$

3.4.2 Ispitivanje analitičke točnosti metode

Analitička osjetljivost za genotipizaciju polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 ispitana je u pet neovisnih *run*-ova unutar pet radnih dana određivanjem pet uzoraka s poznatom pozitivnom ciljnom vrijednosti komercijalnog kontrolnog uzorka proizvođača mutiranih homozigota za svaki od alela (CYP2C9*2MT, CYP2C9*3MT, CYP2C19*2MT i CYP2C19*3MT Standard)

Analitička specifičnost ispitana je usporedbom pet uzoraka s poznatom negativnom ciljnom vrijednosti u pet neovisnih *run*-ova unutar pet radnih dana. Za uzorak poznate negativne ciljne vrijednosti korištena je slijepa proba, odnosno voda kao kontrola bez kalupa DNA.

Analitička netočnost, osjetljivost i specifičnost izračunate su prema sljedećem izrazu:

$$\text{Analitička netočnost (\%)} = [1 - (\text{SP} + \text{SN}) / (\text{SP} + \text{SN} + \text{LP} + \text{LN})] \times 100 \%$$

$$\text{Analitička osjetljivost (\%)} = (\text{SP} / [\text{SP} + \text{LN}]) \times 100 \%$$

$$\text{Analitička specifičnost (\%)} = (\text{SN} / [\text{SN} + \text{LP}]) \times 100 \%$$

gdje je SP- broj stvarno pozitivnih uzoraka, SN- broj stvarno negativnih rezultata, LP- broj lažno pozitivnih uzoraka, LN- broj lažno negativnih uzoraka.

3.4.3 Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Ponovljivost je ispitana na seriji od 10 uzoraka različitih genotipova usporedbom rezultata dobivenih na novom uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II s rezultatima dobivenih na starom uređaju Roche Diagnostics LightCycler® v1.5. Podaci o rezultatima dobivenim ranije na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® v1.5 preuzeti su iz Baze pacijenata Odijela za molekularnu dijagnostiku. Podudarnost je izračunata prema sljedećem izrazu:

$$\text{Podudarnost (\%)} = \text{N rezultata dobivenih starim analitičkim sustavom} / \text{N rezultata dobivenih novim analitičkim sustavom} \times 100 \%$$

3.4.4 Ispitivanje granice detekcije

Granicu detekcije određivali smo ispitivanjem uspješnosti PCR reakcije u seriji razrjeđenja od poznate početne koncentracije do 0,5ng te 0,4ng kako bi se ustvrdila minimalna količina DNA dostatna za izvođenje reakcije.

4 Rezultati i rasprava

4.1 Ispitivanje analitičke nepreciznosti

Kriterij prihvaćanja, koji je unaprijed definiran, za analitičku nepreciznost iznosi 0 %. Sve četiri metode analize genotipizacije polimorfizma na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II su zadovoljile kriterij. Ispitivanjem analitičke nepreciznosti dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 3.

Tablica 3. Ispitivanje analitičke nepreciznosti za metode genotipizacije polimorfizama CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2 i CYP2C19*3 na analitičkom uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II.

CYP2C9*2			
Ponavljanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
2	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
3	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
4	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
5	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
CYP2C9*3			
Ponavljanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA

2	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
3	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
4	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
5	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
CYP2C19*2			
Ponavljjanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
2	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
3	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
4	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
5	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*2	*1/*2	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			
CYP2C19*3			
Ponavljjanje	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Podudarnost
1	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
2	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA

3	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
4	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
5	*1/*1	*1/*1	DA
	*1/*3	*1/*3	DA
Podudarnost: 10/10 (100 %)			
Analitička nepreciznost: 0 %			

4.2 Ispitivanje analitičke netočnosti

Unaprijed definirani kriteriji prihvaćanja za analitičku osjetljivost i analitičku specifičnost iznose 100 %, dok je kriterij prihvaćanja za analitičku netočnost 0 %. Sve četiri metode analize na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II su zadovoljile kriterij. Ispitivanjem analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti i analitičke netočnosti dobiveni su rezultati koji su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Ispitivanje analitičke osjetljivosti, specifičnosti i netočnosti za metode genotipizacije polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 na analitičkom uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II.

CYP2C9*2				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg

MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost (%)		100 %		
Analitička specifičnost (%)		100 %		
Analitička netočnost (%)		0 %		
CYP2C9*3				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT	*3/*3	*3/*3	/	/

standard				
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost (%)		100 %		
Analitička specifičnost (%)		100 %		
Analitička netočnost (%)		0 %		
CYP2C19*2				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*2/*2	*2/*2	/	/

H ₂ O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		
Lažno negativni (LN)		0		
Analitička osjetljivost (%)		100 %		
Analitička specifičnost (%)		100 %		
Analitička netočnost (%)		0 %		
CYP2C19*3				
Uzorak	Analitička osjetljivost		Analitička specifičnost	
	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost	Ciljna vrijednost	Dobivena vrijednost
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
MT standard	*3/*3	*3/*3	/	/
H ₂ O	/	/	neg	neg
Stvarno pozitivni (SP)		5		
Lažno pozitivni (LP)		0		
Stvarno negativni (SN)		5		

Lažno negativni (LN)	0
Analitička osjetljivost (%)	100 %
Analitička specifičnost (%)	100 %
Analitička netočnost (%)	0 %

4.3 Ispitivanje ponovljivosti drugom metodom

Kriterij prihvaćanja, koji je unaprijed definiran, za ponovljivost drugom metodom iznosi 100 %. Sve četiri metode analize genotipizacije polimorfizma na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II su zadovoljile kriterij. Ispitivanjem ponovljivosti drugom metodom su dobiveni rezultati koji su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Ispitivanje ponovljivosti usporedbom rezultata genotipizacije polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 s Roche Diagnostics LightCycler® 480 II s rezultatima s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5.

CYP2C9*2			
#	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® 480 II	Podudarnost
1.	*1/*1	*1/*1	DA
2.	*1/*1	*1/*1	DA
3.	*1/*2	*1/*2	DA
4.	*1/*2	*1/*2	DA
5.	*1/*1	*1/*1	DA
6.	*2/*2	*2/*2	DA
7.	*1/*1	*1/*1	DA
8.	*1/*2	*1/*2	DA
9.	*1/*1	*1/*1	DA
10.	*2/*2	*2/*2	DA
Podudarnost rezultata: 10/10 (100 %)			
CYP2C9*3			

#	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® 480 II	Podudarnost
1.	*1/*1	*1/*1	DA
2.	*1/*3	*1/*3	DA
3.	*1/*1	*1/*1	DA
4.	*1/*3	*1/*3	DA
5.	*1/*1	*1/*1	DA
6.	*1/*1	*1/*1	DA
7.	*3/*3	*3/*3	DA
8.	*1/*3	*1/*3	DA
9.	*3/*3	*3/*3	DA
10.	*1/*1	*1/*1	DA
Podudarnost rezultata: 10/10 (100 %)			
CYP2C19*2			
#	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® 480 II	Podudarnost
1.	*1/*1	*1/*1	DA
2.	*1/*1	*1/*1	DA
3.	*1/*2	*1/*2	DA
4.	*1/*2	*1/*2	DA
5.	*1/*2	*1/*2	DA
6.	*2/*2	*2/*2	DA
7.	*2/*2	*2/*2	DA
8.	*2/*2	*2/*2	DA
9.	*1/*2	*1/*2	DA
10.	*1/*1	*1/*1	DA
Podudarnost rezultata: 10/10 (100 %)			
CYP2C19*3			
#	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® v1.5	Rezultati s Roche Diagnostics LightCycler® 480 II	Podudarnost

1.	*1/*1	*1/*1	DA
2.	*1/*1	*1/*1	DA
3.	*1/*1	*1/*1	DA
4.	*1/*1	*1/*1	DA
5.	*1/*1	*1/*1	DA
6.	*1/*1	*1/*1	DA
7.	*1/*1	*1/*1	DA
8.	*1/*1	*1/*1	DA
9.	*1/*1	*1/*1	DA
10.	*1/*1	*1/*1	DA
Podudarnost rezultata: 10/10 (100 %)			

4.4 Ispitivanje granice detekcije

Prema proizvođaču, granica detekcije za metode analize genotipizacije CYP2C9 i CYP2C19, iznosi 1,0 ng DNA. Rezultati ispitivanja granice detekcije iznose 0,8 ng za CYP2C9 i 1,0 ng za CYP2C19, što odgovara podacima koje navodi proizvođač. Ispitivanjem granice detekcije dobiveni su rezultati koji su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Ispitivanje granice detekcije za genotipizaciju polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 na uređaju Roche Diagnostics LightCycler® 480 II.

CYP2C9*2, CYP2C9*3			
Volumen (DNA+ H ₂ O) (μL)	Razrjeđenje	Količina DNA (ng)	Uspješnost reakcije
3+3	1:2	24,8	DA
3+9	1:4	12,4	DA
3+21	1:8	6,2	DA
3+45	1:16	3,1	DA
3+93	1:32	1,6	DA
3+189	1:64	0,8	DA

3+381	1:128	0,4	NE
Granica detekcije: 0,8 ng DNA			
CYP2C19*2, CYP2C19*1			
Volumen (DNA+ H ₂ O) (μ L)	Razrjeđenje	Količina DNA (ng)	Uspješnost reakcije
3+3	1:2	31,8	DA
3+9	1:4	15,9	DA
3+21	1:8	8,0	DA
3+45	1:16	4,0	DA
3+93	1:32	2,0	DA
3+189	1:64	1,0	DA
3+381	1:128	0,5	NE
Granica detekcije: 1,0 ng DNA			

5 Zaključak

Rezultati vrednovanja mjernog postupka za genotipizaciju polimorfizama alela *2 i *3 gena CYP2C9 te alela *2 i *3 gena CYP2C19 na analitičkom uređaju Roche Diagnostics LightCycler® u potpunosti zadovoljava unaprijed definirane analitičke kriterije kvalitete, stoga se mjerni postupak može prihvatiti za rutinski rad.

6 Popis kratica, oznaka i simbola

AS-PCR - alel-specifična lančana reakcija polimeraze (engl. *allele-specific polymerase chain reaction*)

CPR - citokrom P450 reduktaza

CYP, CYP450 - citokrom P450

DNA - deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

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

NGS - sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*)

PCR - lančana reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

RFLP - polimorfizam dužine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*)

7 Literatura

Antal I, Jelić M, Sila S, Kolaček S, Tambić Andrašević A. Ljudska mikrobiota i mikrobiom. *Acta Med Croatica*, 2019, 73, 3-11

Antonelli G, Padoan A, Aita A, Sciacovelli L, Plebani M. Verification or validation, that is the question. *J Lab Precis Med*, 2017, 2, 58-58.

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

Behrendorff JBYH. Reductive Cytochrome P450 Reactions and Their Potential Role u Bioremediation. *Front Microbiol*, 2021, 12, 649273

Daly AK. Pharmacogenomics of Warfarin. U: Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Sandosh Padmanabhan S, urednik, Cambridge, Academic Press, 2014, str. 497-507.

Darawi MN, Ai-Vyrn C, Ramasamy K, Hua PPJ, Pin TM, Kamaruzzaman SB, Majeed ABA. Allele-specific polymerase chain reaction for the detection of Alzheimer's disease-related single nucleotide polymorphisms. *BMC Med Genet*, 2013, 14, 27.

Dasgupta A, Wahed A. Pharmacogenomics. U: Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control. Dasgupta A, Wahed A, urednici, Amsterdam, Elsevier, 2014, str. 353-362.

Gariyban L, Avashia N. Polymerase Chain Reaction. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, 133(3), 1–4.

Ghodke-Puranik YA, Lamba JK. Pharmacogenomics. U: Innovative Approaches in Drug Discovery. Patwardhan B. i Chaguturu R., urednici, Cambridge, Academic Press, 2017, str. 195-234.

Guengerich FP. Mechanisms of Cytochrome P450-Catalyzed Oxidations. *ACS catalysis*, 2018, 8(12), 10964–10976.

Haga SB. Precision Medicine and Challenges in Research and Clinical Implementation. U: Principles of Gender-Specific Medicine (3. izdanje), Legato MJ, urednica, Cambridge, Academic Press, 2017, str. 717-732.

Hahn M, Roll SC. The Influence of Pharmacogenetics on the Clinical Relevance of Pharmacokinetic Drug–Drug Interactions: Drug–Gene, Drug–Gene–Gene and Drug–Drug–Gene Interactions, *Pharmaceuticals*, 2021, 14(5), 487.

Ing Lorenzini K, Desmeules AD, Rollason V, Bertin S, Besson M, Daali Y, Samer CF. CYP450 Genotype-Phenotype Concordance Using the Geneva Micrococktail in a Clinical Setting, *Front Pharmacol*, 2021, 12, 730637.

Greenberg JD, Cronstein BN. Pharmacogenomics in rheumatology. U: Rheumatology (6. izdanje). Hochberg MC, Silman A J, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, urednici, Maryland Heights, Mosby, 2015, str. 406-409.

Johnson JA. Drug Target Pharmacogenomics. *Am J PharmacoGenomics*, 2001, 1(4), 271–281.

Klein MD, Williams AK, Lee CR, Stouffer GA. Clinical Utility of CYP2C19 Genotyping to Guide Antiplatelet Therapy in Patients With an Acute Coronary Syndrome or Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(4), 647–652.

Kockum I, Huang J, Stridh P. Overview of Genotyping Technologies and Methods. *Curr Protoc*, 2023, 3(4).

Lazar A, Fuhr U. Applications of genotyping and phenotyping for clinically-relevant polymorphisms of drug metabolizing enzymes and drug transporters. U: Handbook of Analytical Separations (5. izdanje). Hempel G, urednik, Amsterdam, Elsevier Science B.V., 2004, str. 321-353.

Li D, Tolleson WH, Yu D, Chen S, Guo L, Xiao W, Tong W, Ning B. MicroRNA-Dependent Gene Regulation of the Human Cytochrome P450. U: Pharmacoepigenetics. Cacabelos R, urednik, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 129-138.

Lu Y, Li X, Feng S, Li Y, Zeng X, Li M, Liu X, Wu R. Modeling the Pharmacogenetic Architecture of Drug Response. U: Pharmacogenomics. Lam YWF, Cavallari LH, urednici, Cambridge, Academic Press, 2013, str. 295-308.

Lyon E, Wittwer CT. LightCycler Technology in Molecular Diagnostics. *J Mol Diagn*, 2009, 11(2), 93–101.

McCallum L, Lip S, Padmanabhan S. Pharmacodynamic Pharmacogenomics. U: Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine. Sandosh Padmanabhan S, urednik, Cambridge, Academic Press, 2014, str. 365-383.

Munro AW, McLean KJ, Grant JL, Makris TM. Structure and function of the cytochrome P450 peroxygenase enzymes. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46(1), 183–196.

NCBI Polymerase Chain Reaction (PCR), 2017.,
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>, pristupljeno 20.06.2023.

Nebert DW, Zhang G. Pharmacogenomics. U: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (7. izdanje). Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, urednici, Cambridge, Academic Press, 2019, str. 445-486.

Rendić S, Medić-Šarić M. Mehanizam lijekova i odabranih ksenobiotika, Zagreb: Medicinska naklada, 2013. str. 132-153.

Roche Diagnostics LightCycler® 480 II System, <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/instruments/lightcycler-480II-ins-445.html>, pristupljeno 15.06.2023.

Shao Z, Ito S. Pharmacogenomics. U: Handbook of Analytical Separations. Hempel G, urednik, Amsterdam, Elsevier Science B.V., 2020, str. 321-353.

Urban P, Lautier T, Pompon D, Truan G. Ligand Access Channels Cytochrome P450 Enzymes: A Review. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6), 1617.

Vukasović I. Upravljanje kvalitetom u medicinskom laboratoriju, tumačenje zahtjeva u revidiranom upitniku za samoprocjenu. Zagreb, Medicinska naklada, 2016, str. 73-88.

8 Sažetak / Summary

Citokrom P450 enzimi važni su metabolizmu lijekova, posebice CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 koji kataliziraju 90-95 % reakcija u kojima su lijekovi supstrati. S obzirom da su geni za CYP2C9 i CYP2C19 polimorfni, u nekim slučajevima je preporuka odrediti genotip prije početka terapije kako bi se osigurala djelotvornost i smanjio rizik od nuspojava prilagođavajući terapiju ovisno o tipu metabolizatora pacijenta. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice došlo je do promjene analitičkog sustava za genotipizaciju polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 je u upotrebu uveden Roche Diagnostics LightCycler® 480 II. Cilj ovog rada je bio verificirati analitičke značajke mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 prije početka upotrebe analitičkog analizatora u rutinskom radu. Provedeno je ispitivanje analitičke nepreciznosti, analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti, analitičke točnosti, granica detekcije te usporedivost s drugom metodom. Rezultati vrednovanja mjernog postupka za genotipizaciju polimorfizama gena CYP2C9 i CYP2C19 u potpunosti su zadovoljili unaprijed određene analitičke kriterije kvalitete, stoga se uređaj može uvesti u rutinski rad.

Cytochrome P450 enzymes are important in drug metabolism, especially CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 which take part in 90-95 % of reactions in which drugs act as substrates. Since CYP2C9 and CYP2C19 genes are polymorphic, sometimes it is recommended to determine the genotype before starting therapy to ensure efficacy and to reduce the risk of side effects by adjusting therapy depending on the patient's metabolizer type. In University Hospital Center Sestre Milosrdnice, Department of Clinical Chemistry, Roche Diagnostics LightCycler® 480 II has been introduced as a new analytical system for genotyping CYP2C9 and CYP2C19. The aim of this study was to evaluate analytical characteristics of genotyping polymorphism CYP2C9 and CYP2C19. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical accuracy, detection limit and repeatability with another method were tested. The results of the evaluation of the measurement procedure for genotyping the polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 genes have fully met the predetermined analytical quality criteria, therefore the new analytical system can be introduced for routine work.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Samostalni kolegij Suvremene biokemijske tehnike
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Verifikacija metoda genotipizacije polimorfizama u genima za CYP2C9 i CYP2C19

Katarina Radica

SAŽETAK

Citokrom P450 enzimi važni su metabolizmu lijekova, posebice CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 koji kataliziraju 90-95 % reakcija u kojima su lijekovi supstrati. S obzirom da su geni za CYP2C9 i CYP2C19 polimorfni, u nekim slučajevima je preporuka odrediti genotip prije početka terapije kako bi se osigurala djelotvornost i smanjio rizik od nuspojava prilagođavajući terapiju ovisno o tipu metabolizatora pacijenta. U Kliničkom zavodu za kemiju Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice došlo je do promjene analitičkog sustava za genotipizaciju polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 je u upotrebu uveden Roche Diagnostics LightCycler® 480 II. Cilj ovog rada je bio verificirati analitičke značajke mjernih postupaka genotipizacije polimorfizama CYP2C9 i CYP2C19 prije početka upotrebe analitičkog analizatora u rutinskom radu. Provedeno je ispitivanje analitičke nepreciznosti, analitičke osjetljivosti, analitičke specifičnosti, analitičke točnosti, granica detekcije te usporedivost s drugom metodom. Rezultati vrednovanja mjernog postupka za genotipizaciju polimorfizama gena CYP2C9 i CYP2C19 u potpunosti su zadovoljili unaprijed određene analitičke kriterije kvalitete, stoga se uređaj može uvesti u rutinski rad.

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

Rad sadrži: 46 stranica, 4 grafička prikaza, 6 tablica i 30 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Farmakogenomika, CYP2C9, CYP2C19

Mentori: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mario Štefanović, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Ivana Čelap, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Mario Štefanović, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Independent course Suvremene biokemijske tehnike
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Verification of Methods for Genotyping Polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19

Katarina Radica

SUMMARY

Cytochrome P450 enzymes are important in drug metabolism, especially CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4 which take part in 90-95 % of reactions in which drugs act as substrates. Since CYP2C9 and CYP2C19 genes are polymorphic, sometimes it is recommended to determine the genotype before starting therapy to ensure efficacy and to reduce the risk of side effects by adjusting therapy depending on the patient's metabolizer type. In University Hospital Center Sestre Milosrdnice, Department of Clinical Chemistry, Roche Diagnostics LightCycler® 480 II has been introduced as a new analytical system for genotyping CYP2C9 and CYP2C19. The aim of this study was to evaluate analytical characteristics of genotyping polymorphism CYP2C9 and CYP2C19. Analytical imprecision, analytical sensitivity, analytical specificity, analytical accuracy, detection limit and repeatability with another method were tested. The results of the evaluation of the measurement procedure for genotyping the polymorphisms of CYP2C9 and CYP2C19 genes have fully met the predetermined analytical quality criteria, therefore the new analytical system can be introduced for routine work.

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

Thesis includes: 46 pages, 4 figures, 6 tables and 30 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Pharmacogenomics, CYP2C9, CYP2C19

Mentors: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Štefanović, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Sandra Šupraha Goreta, Ph.D.**, *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Ivana Čelap, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mario Štefanović, Ph.D., *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2023.