

Farmakogenetički polimorfizmi CYP2C9 u populaciji istočne Hrvatske

Skaramuca, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:125332>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

IVA SKARAMUCA
FARMAKOGENETIČKI
POLIMORFIZMI *CYP2C9* U
POPULACIJI ISTOČNE HRVATSKE
DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

IVA SKARAMUCA
FARMAKOGENETIČKI
POLIMORFIZMI *CYP2C9* U
POPULACIJI ISTOČNE HRVATSKE
DIPLOMSKI RAD

OSIJEK, 2020.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, Kliničkog bolničkog centra Osijek.

Mentor rada: doc. dr. sc. Saška Marczy

Rad ima 36 listova, 6 tablica i 9 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem prvenstveno mentorici, doc.dr.sc. Saški Marczy na pruženoj prilici, povjerenju, strpljenju, brojnim savjetima i velikodušnoj pomoći pri izradi ovog rada. Svojim pristupom mi je znatno uljepšala ovaj period diplomiranja te probudila ljubav prema molekularnoj biologiji. Iznimno sam joj zahvalna na svemu.

Zahvaljujem i obitelji, bez koje ništa ne bi bilo moguće, koja je bila cijelo vrijeme uz mene, ogroman oslonac i bodrila me je da nikad ne odustanem te se uvijek ponosila sa mnom i vjerovala u mene. Nadam se da vas nisam razočarala.

Zahvaljujem i kolegama te prijateljima što su mi uljepšali ovaj period u životu, uvijek bili spremni pomoći te me bodrili u radu.

Na kraju, zahvaljujem svim profesorima koji su mi u ovih pet godina prenijeli barem dio svog znanja.

SADRŽAJ

SADRŽAJ	I
POPIS KRATICA	III
1. UVOD	1
1.1. Farmakogenomika i farmakogenetika	1
1.2. Genski polimorfizmi	1
1.3. Sustav citokroma P450.....	3
1.4. Gen <i>CYP2C9</i> i enzim <i>CYP2C9</i>	4
1.4.1. Klinički značaj polimorfizama <i>CYP2C9</i>	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	10
3. ISPITANICI I METODE	11
3.1. Ustroj studije	11
3.2. Ispitanici i uzorci.....	11
3.3. Metode	11
3.3.1. Izolacija genomske DNA	11
3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA.....	13
3.3.3. Genotipizacija <i>CYP2C9*2</i> i <i>CYP2C9*3</i> metodom <i>real-time</i> PCR	14
3.3.4. Analiza krivulja taljenja	17
3.3.5. Statistička obrada podataka	18
4. REZULTATI	19
4.1. Analiza rezultata genotipizacije <i>CYP2C9*2</i> i <i>CYP2C9*3</i>	19
4.2. Raspodjela ispitanika po dobi i spolu.....	21
4.3. Raspodjela genotipova i učestalost alelnih varijanti <i>CYP2C9</i> u populaciji istočne Hrvatske	21
4.4. Usporedba učestalosti alelnih varijanti gena <i>CYP2C9</i> između populacije istočne Hrvatske i drugih populacija	22
4.5. Usporedba učestalosti genotipova <i>CYP2C9</i> između populacije istočne Hrvatske i drugih populacija.....	24
5. RASPRAVA	26
6. ZAKLJUČAK	29

7. SAŽETAK	30
8. SUMMARY	31
9. LITERATURA	32
10. ŽIVOTOPIS	36

POPIS KRATICA

A	adenin
CAR	engl. <i>constitutive androstane receptor</i>
CYP	citokrom
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina (engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EM	normalan brzi metabolički fenotip (engl. <i>extensive metabolizer</i>)
G	gvanin
IM	intermedijarni metabolički fenotip (engl. <i>intermediate metabolizer</i>)
INR	internacionalni normalizirani omjer (engl. <i>international normalised ratio</i>)
KBC	klinički bolnički centar
MALDI-TOF	engl. <i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight</i>
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PM	spori, slabi metabolički fenotip (engl. <i>poor metaboliser</i>)
PSR	engl. <i>Parameter Specific Reagents</i>
PXR	engl. <i>pregnane X receptor</i>
RFLP	engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>
S1P	sfingozin 1-fosfat
SNP	engl. <i>single nucleotid polymorphism</i>
UM	izrazito brzi metabolički fenotip (engl. <i>ultrarapid metabolizer</i>)
UV-Vis	engl. <i>ultraviolet-visible</i>
VKORC1	vitamin K reduktaza kompleks, podjedinica 1
95% CI	95%-tni interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)

1. UVOD

1.1. Farmakogenomika i farmakogenetika

Učinkovitost lijeka rezultat je međudjelovanja genske predispozicije, bioloških čimbenika (spol, dob, funkcija jetre i bubrega) i načina života pojedinca (prehrana, pušenje, alkohol, tjelesna aktivnost itd.). Genske čimbenike predstavljaju promjene, polimorfizmi, u genima čiji su produkti (enzimi, receptori, transporter, ciljne molekule) uključeni u biotransformaciju lijekova. Istraživanjem i procjenom djelovanja genskih polimorfizama cijelog genoma na učinak lijeka bavi se farmakogenomika dok je predmet proučavanja farmakogenetike veza između promjene u pojedinim genima i odgovora pacijenta na lijek (1).

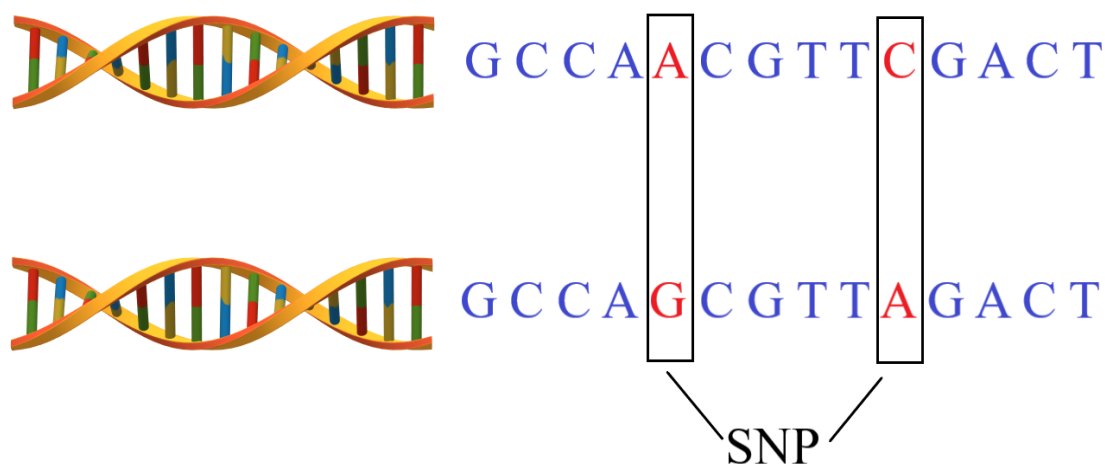
Farmakogenetička testiranja omogućuju liječnicima predviđanje odgovora pojedinca na terapiju lijekom. Na osnovu genotipa dobivenog farmakogenetičkim testiranjem može se procijeniti metabolički fenotip. Zahvaljujući farmakogenetičkim znanstvenim studijama danas je poznat odnos između genotipa i metaboličkog fenotipa za brojne kombinacije gen-lijek (2). U kliničkoj su praksi ta saznanja osnova za odabir odgovarajućeg lijeka i odgovarajuće doze kako bi se postigao optimalan terapijski odgovor bez neželjenih nuspojava (3).

Primjena farmakogenomike/farmakogenetike u kliničkoj praksi još uvijek ne doseže svoj puni potencijal. Unatoč raspravama po pitanju isplativosti ističe se potreba za farmakogenetičkim testiranjima zbog mogućnosti procjene optimalne doze lijeka (4). Poznavanje farmakogenetičkog profila bolesnika omogućava izbjegavanje neželjenog štetnog odgovora na lijek ili izbjegavanje terapije nedjelotvornim lijekovima (5). Edukacija te izrada jasnih smjernica i preporuka ključni su koraci k uspješnoj primjeni farmakogenetike u kliničkoj praksi (6).

1.2. Genski polimorfizmi

Ukoliko se usporede sekvence genomske DNA dviju osoba, mogu se uočiti varijacije na različitim mjestima dužinom čitavog genoma. U genske polimorfizme ubrajaju se manje promjene u DNA kao što su supstitucije, delecije, insercije te ponavljanja. Ovakve promjene mogu utjecati na trodimenzionalnu strukturu, ekspresiju i aktivnost proteina kodiranih ovim genima. Polimorfizmi jednog nukleotida (engl. *single nucleotid polymorphism*, SNP) ili

točkaste mutacije najčešći su oblik genskih polimorfizama (7). Oni nastaju uslijed zamjene jedne dušične baze drugom bazom u slijedu genomske DNA pri čemu dolazi do nepravilnog sparivanja nukleotidnih baza, na primjer, gvanina s timinom umjesto citozinom (8). Uslijed toga, jedna osoba će imati, na primjer, bazu adenin (A) na određenoj poziciji, dok će druga osoba imati bazu gvanin (G) na istoj poziciji u genomu (Slika 1.) (7). Teoretski, ukoliko se takva promjena javlja u barem 1 % ukupne populacije smatra se SNP-om. SNP-ovi pokazuju široku rasprostranjenost u genomu, a mogu se javljati u kodirajućim i nekodirajućim regijama. SNP koji se nalaze u kodirajućim regijama klasificiraju se kao istoznačne, zamjenske ili besmislene mutacije. Istoznačne mutacije nemaju utjecaja na strukturu i funkciju proteinskog produkta dok zamjenske mutacije imaju za posljedicu promjenu u strukturi i funkciji produkta zbog promjene u slijedu aminokiselina u proteinu. Ukoliko zamjenom jednog para nukleotida drugim nastane STOP kodon, sintetizira se nefunkcionalni proteinski produkt. Budući da su najčešći izvor genetske različitosti među pojedincima, SNP-ovi imaju važnu ulogu ne samo u primjeni farmakogenetike nego i u primjeni i razvoju personalizirane/precizne medicine koja kompleksnim interdisciplinarnim pristupom osim procjene učinkovitosti farmakoterapije obuhvaća i prevenciju te dijagnozu bolesti (8).



Slika 1. Polimorfizam jednog nukleotida (SNP). Sliku izradila autorica.

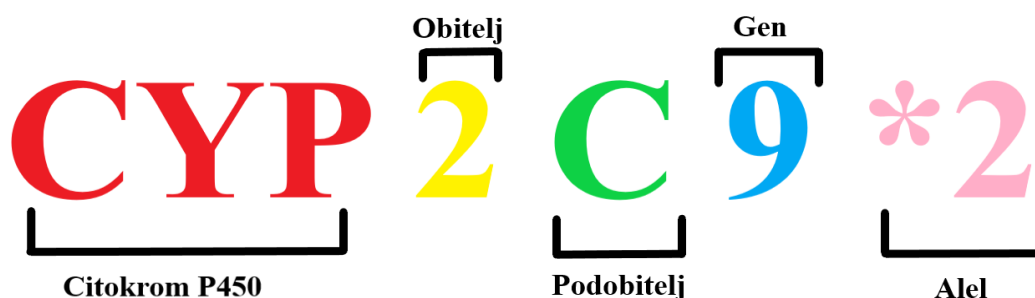
Za identifikaciju alelnih varijanti gena, koje se sastoje od jednog ili više genskih polimorfizama, koriste se metode molekularne biologije poput lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), PCR-a u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*), gel elektroforeza, MALDI-TOF (engl. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of*

Flight) spektrometrije, tehnologije mikročipova (engl. *Microarray*) i sekvenciranje. Uzorak je najčešće puna krv uzorkovana u epruvete s antikoagulansom K-EDTA ili citratom. Uzorci s heparinom su neprihvatljivi budući da on inhibira PCR reakciju (9).

1.3. Sustav citokroma P450

Metabolizam lijekova odgovoran je za pretvorbu lijekova u spojeve topljive u vodi koji se lakše izlučuju, no može biti odgovoran i za pretvorbu lijekova u aktivne spojeve i toksične metabolite. U metabolizmu lijekova razlikujemo reakcije prve i druge faze. Reakcije prve faze su oksidacija, redukcija i hidroliza. Reakcije druge faze su konjugacijske reakcije: glukuronidacija, metilacija, sulfacija i acetilacija. Veliku većinu reakcija prve faze kataliziraju enzimi iz citokrom P450 sustava koji koriste kisik i NADPH kao ko-supstrate. Ti su enzimi odgovorni za 75 % ukupnog metabolizma lijekova (10).

Ranije studije o metabolizmu lijekova opisivale su NADPH ovisnu oksidaciju različitih spojeva u mikrosomima jetre, a enzim koji je odgovoran za tu oksidaciju kasnije je opisan kao molekula koja sadrži željezo s apsorpcijskim pikom pri 450 nanometara, odnosno citokrom P450. U početku se pretpostavljalo da se radi o jednom enzimu, no pojavili su se dokazi o sve većem broju izoformi pa je tako razvijen sustav nomenklature gdje su genetske porodice bile označene rimskim, a kasnije arapskim brojkama, podvrste slovima te pojedinačni geni arapskim brojkama (Slika 2.) (10).



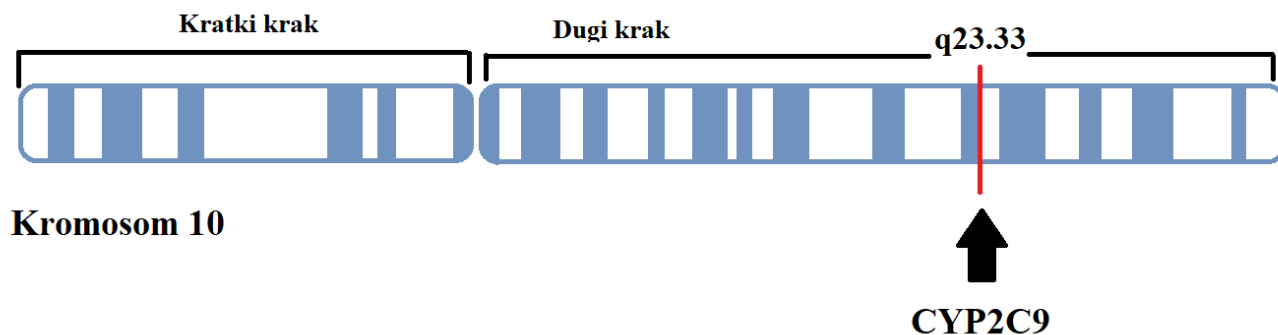
Slika 2. Citokrom P450 nomenklatura. Sliku izradila autorica.

Citokrom P450 enzimi su hemoproteini, u najvećoj količini prisutni u stanicama jetara i epitelnim stanicama crijeva te u manjoj količini u svim drugim tkivima. Nalaze se većinom u membranama glatke endoplazmatske mrežice i imaju ključnu ulogu u detoksikaciji ksenobiotika, staničnom metabolizmu i homeostazi (11). Budući da prenose elektrone na kisik i kataliziraju oksidaciju organskih spojeva, oni pripadaju oksigenazama. Obično su oni "monooksigenaze" ili "oksigenaze mješovite funkcije" (12). CYP enzimi mogu se transkripcijski aktivirati različitim ksenobioticima i endogenim supstratima, putem mehanizama ovisnih o receptorima. Inhibicija CYP enzima glavni je mehanizam interakcije lijekova pa tako mnogi kemoterapijski lijekovi mogu uzrokovati interakcije lijekova zahvaljujući svojoj sposobnosti da inhibiraju ili induciraju CYP enzimski sustav (11). Najveću ekspresiju u jetri imaju CYP 3A4, 2C9, 2C8, 2E1 i 1A2. Na ekspresiju svakog CYP-a utječe kombinacija mehanizama i faktora, uključujući genske polimorfizme, indukciju ksenobioticima, regulaciju citokinima, hormonima kao i čimbenike poput dobi i spola (13).

Projektom Humanog genoma identificirano je 57 ljudskih CYP enzima koji su klasificirani u 18 obitelji i 43 podobitelji na temelju sličnosti u sekvenci. Najvažniju ulogu u metabolizmu lijekova, ksenobiotika i određenih endogenih molekula imaju CYP obitelji 1, 2 i 3 (14). Za CYP enzime opisano je više od 2000 mutacija, a za određene nukleotidne polimorfizme utvrđeno je da imaju velik utjecaj na metaboličku aktivnost CYP enzima tako da pojedine alelne varijante tih polimorfizama uzrokuju jedan od oblika metaboličkih fenotipova: spori ili slabi metabolički fenotip (engl. *poor metabolizer*, PM), intermedijarni fenotip (engl. *intermediate metabolizer*, IM), normalan ili brzi fenotip (engl. *extensive metabolizer*, EM) ili fenotip izrazito brzog metabolizma (engl. *ultrarapid metabolizer*, UM) (13).

1.4. Gen *CYP2C9* i enzim *CYP2C9*

Enzim *CYP2C9* je citokrom P450 koji sudjeluje u prvoj fazi metabolizma lijekova i ima glavnu ulogu u oksidaciji ksenobiotika i endogenih spojeva (15). Gen *CYP2C9* jedan je od nekoliko *CYP2C* gena smještenih na kromosomu 10q23.33 (Slika 3.). U regiji veličine 500 kb nalaze se četiri gena raspoređena u redosljedu *CYP2C8-CYP2C9-CYP2C19-CYP2C18*. Gen *CYP2C9*, kao i ostali geni iz *CYP2* obitelji, sastoji se od 9 egzona i 8 introna (16). Primarno je *CYP2C9* eksprimiran u jetri te je njegova razina ekspresije druga najveća po redu među CYP izoformama. Samo je enzim *CYP3A4* kvantitativno jače izražen u ljudskoj jetri (15).



Slika 3. Lokacija *CYP2C9* gena na kromosomu 10q23.33. Sliku izradila autorica.

Otkriće rendgenske kristalne strukture enzima *CYP2C9* znatno je doprinijelo razumijevanju odnosa njegove strukture i funkcije. Rendgenska kristalna struktura *CYP2C9* u kompleksu s flurbiprofenom u katalitički povoljnoj orijentaciji dala je važan uvid u vezanje kiselih supstrata, odnosno pokazala je ključnu ulogu Arg108 u vezanju flurbiprofena (17). Nadalje, opisana je i kristalna struktura nevezanog *CYP2C9* i *CYP2C9* u kompleksu s varfarinom. Takva struktura dala je uvid u moguće interakcije između *CYP2C9* i varfarina te otkrila novo vezno mjesto što je sugeriralo na to da *CYP2C9* može istovremeno vezati više liganda. Analizom strukture zaključeno je da *CYP2C9* može podležiti alosteričnim promjenama pri vezanju s varfarinom (15).

CYP2C9 podliježe inhibiciji širokim spektrom lijekova. Neki od njih su opći inhibitori citokroma P450 poput cimetidina i ketokonazola, ali postoji niz snažnijih i specifičnijih inhibitora koji su korisni u laboratorijskim i kliničkim ispitivanjima, kao što je sulfafenazol koji se koristi za utvrđivanje uloge *CYP2C9* u metabolizmu *in vitro* (17). Ostali inhibitori uključuju flukonazol, vorikonazol i amiodaron. Amiodaron se često propisuje u kombinaciji s varfarinom zbog njegovih antiaritmičkih učinaka, međutim postoji rizik od interakcije između ta dva lijeka. Takvi inhibitori nazivaju se selektivnim ili kompetitivnim inhibitorima (18).

CYP2C9 može se inducirati mehanizmima koji uključuju različite nuklearne receptore, uključujući PXR (engl. *pregnane X receptor*, PXR), CAR (engl. *constitutive androstane receptor*, CAR), glukokortikoidni receptor, estrogenski receptor i receptor vitamina D. PXR je najbolje okarakteriziran receptor koji može inducirati *CYP2C9*. Rifampicin je dobro poznati ligand ljudskog PXR-a, a drugi ligandi identificirani ubrzo nakon otkrića PXR-a uključuju hiperforin, klotrimazol i nifedipin (17).

1.4.1. Klinički značaj polimorfizama *CYP2C9*

Gen *CYP2C9* podložan je genskim polimorfizmima čija učestalost uvelike varira među različitim etničkim populacijama, a do sada je zabilježeno 60 alelnih varijanti od kojih su mnoge pokazale izmjenjene aktivnosti u usporedbi s alelom divljeg tipa, odnosno alelnom varijantom *1 (19). Dvije alelne varijante, *CYP2C9**2 (rs1799853) i *CYP2C9**3 (rs1057910) daju enzime sa značajno smanjenom aktivnošću. Osobe koje su nosioci jednog ili oba od ova dva alela imaju fenotip sporog metabolizma *CYP2C9* supstrata budući da sporije oksidiraju lijekove u odnosu na osobe koje imaju alelnu varijantu *CYP2C9**1 (20). Alelnu varijantu *CYP2C9**2 karakterizira izmjena 430C>T u egzonu 3 što dovodi do supstitucije aminokiselina Arg144Cys. Alelna varijanta *CYP2C9**3 za posljedicu ima izmjenu 1075A>C u egzonu 7 što uzrokuje supstituciju aminokiselina Ile359Leu u katalitičkom mjestu enzima (16). Ove alelne varijante povezane su sa smanjenom katalitičkom aktivnošću prema nekoliko supstrata uključujući varfarin, tolbutamid i losartan (21). Do sada poznati aleli *CYP2C9* posljedica su polimorfizama jednog nukleotida (17).

Kumarinski antikoagulansi

Što se tiče kliničke značajnosti *CYP2C9* polimorfizama, najbolje je proučen odnos između genotipa *CYP2C9* i doziranja varfarina (17). Antikoagulansi su učinkoviti lijekovi za liječenje i prevenciju tromboembolijskih poremećaja, a djeluju tako da održavaju internacionalni normalizirani omjer INR (engl. *international normalized ratio*, INR), mjeru trombotskog statusa, unutar terapijskog raspona 2-3. Najčešće se propisuje varfarin (22). Odabir odgovarajuće doze varfarina često predstavlja izazov zbog njegove nepredvidljive farmakokinetike i farmakodinamike, uskog terapijskog indeksa i interindividualne varijabilnosti u odgovoru na standardnu dozu što može dovesti do brzog porasta INR-a. To rezultira različitim komplikacijama, uglavnom krvarenjem u obliku ekhimoze te gastrointestinalnog ili intrakranijalnog krvarenja. Nizak INR, ispod 2, može dovesti do tromboembolije (23). Varfarin se primjenjuje kao racemična smjesa S i R enantiomera. S-varfarin je 2-5 puta jači od R-varfarina i gotovo se isključivo metabolizira pomoću enzima *CYP2C9* u jetri. Varfarin djeluje kao antikoagulans inhibirajući kompleks vitamin K reduktaze (engl. *vitamin K epoxid reductase complex subunit 1*, VKORC1) i blokira regeneraciju reduciranog vitamina K koji je neophodan za aktivaciju specifičnih faktora

koagulacije (24). Za alelne varijante *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* dokazano je da imaju samo 5-12 % aktivnosti alelne varijante *CYP2C9*1* što dovodi do sporijeg metabolizma varfarina (23). Pojedinci koji naslijede jednu ili dvije kopije *CYP2C9*2* ili *CYP2C9*3* izloženi su većem riziku od krvarenja tijekom terapije varfarinom te su im potrebne niže doze i potrebno im je više vremena za postizanje stabilnog INR-a (25).

Preparati sulfonilureje

Gliklazid i glimepirid su preparati sulfonilureje koji se koriste u liječenju dijabetes melitusa tipa 2 neovisnog o inzulinu. Enzim *CYP2C9* ima važnu ulogu u metabolizmu i dispoziciji ovih lijekova. Studije pokazuju da pojedinci koji su nositelji alelnih varijanti *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* znatno slabije metaboliziraju preparate sulfonilureje u odnosu na nositelje alelne varijante *CYP2C9*1*. U skladu s tim moguće je da su takve osobe sklonije riziku od neželjenih reakcija na ove lijekove kao što su hipoglikemija i alergijske reakcije na preparate sulfonilureje (26).

Nesteroidni protuupalni lijekovi

Flurbiprofen je nesteroidni protuupalni lijek koji se koristi za liječenje osteoartritisa i reumatoidnog artritisa, a djeluje tako da smanjuje bol i upalu. On povećava rizik od kardiovaskularnih nuspojava poput infarkta miokarda i moždanog udara, ali i gastrointestinalnih nuspojava kao što su krvarenje, ulceracija i perforacija, što može biti smrtonosno. Flurbiprofen se primarno metabolizira putem *CYP2C9* do svojeg inaktivnog metabolita 4'-hidroksilflurbiprofena. Osobe koje imaju smanjenu aktivnost enzima *CYP2C9* imaju veći rizik od nuspojava (27). Diklofenak je također nesteroidni protuupalni lijek koji se metabolizira pomoću enzima *CYP2C9* i često se propisuje za liječenje artritisa i ankilozatnog spondilitisa. Terapijska upotreba diklofenaka povezana je sa štetnim posljedicama kao što su depresija, kardiovaskularne bolesti, gastrointestinalno krvarenje i hepatotoksičnost. Istraživanja pokazuju da su alelne varijante *CYP2C9*3* i *CYP2C9*13* povezane sa smanjenom unutarnjom eliminacijom diklofenaka (28).

Fenitoin

Fenitoin je najčešće korišten antikonvulziv za sprječavanje epileptičnih napadaja. Ima uski terapijski indeks te 10-20 % pacijenata doživi štetne neurološke nuspojave poput nistagmusa, poteškoća u govoru i gubitka ravnoteže (29). Metabolizam fenitoina je kompleksan. Fenitoin ima nelinearan farmakokinetički profil zbog zasićenja oksidacijskog puta dvama oksidativnim jetrenim enzimima, CYP2C9 i CYP2C19. CYP2C9 metabolizira 90 % fenitoina, dok CYP2C19 metabolizira preostalih 10 %. Genski polimorfizam *CYP2C9* može reducirati metabolizam fenitoina za 25-50 % kod pacijenata koji imaju alelne varijante *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* u odnosu na osobe koji su nositelji alelne varijante *CYP2C9*1*. Te osobe imaju povećan rizik od nuspojava i povećanja koncentracije fenitoina u krvi kod primjene uobičajenih dnevnih doza od 5 do 10 mg/kg fenitoina (30).

Valproati

Valproična kiselina jedan je od prvih izbora antiepileptične terapije i uspješno se primjenjuje u liječenju generaliziranih i djelomičnih napadaja. Koristi se i u adjuvantnoj terapiji psihijatrijskih poremećaja poput shizofrenije i bipolarnog poremećaja. Većina pacijenata dobro podnosi terapiju, a teške nuspojave poput supresije koštane srži, koagulopatije i hepatotoksičnosti su rijetke. Valproična kiselina lijek je niskog terapijskog raspona. CYP2C9 pokazao se kao glavni katalizator hidroksilacije i desaturacije u metabolizmu valproične kiseline. Pedijatrijski pacijenti osjetljiviji su na nuspojave od odraslih. Snižena doza preporučuje se za pedijatrijske pacijente s genotipom *CYP2C9 *1/*2* i *CYP2C9 *1/*3*. Za pedijatrijske pacijente s genotipovima *CYP2C9 *2/*2*, *CYP2C9 *2/*3* i *CYP2C9 *3/*3* preporuča se alternativna antiepileptična terapija koja ne uključuje valproate zbog njihove smanjene mogućnosti metaboliziranja valproata (31).

Siponimod

Siponimod je oralni selektivni modulator sfingozin 1-fosfatnih receptora (engl. *sphingosine-1 phosphate*, S1P) podtipova 1 i 5 koji je razvijen za liječenje multiple skleroze. Siponimod ima velik afinitet prema S1P5 receptorima koji se nalaze na oligodendrocitima u svim fazama razvoja pa tako ima važnu ulogu u diferencijaciji i preživljenju oligodendrocita. Siponimod je razvijen za liječenje multiple skleroze i intracerebralnog krvarenja, a odobren je

od strane Američke agencije za hranu i lijekove za liječenje relapsirajućih formi multiple skleroze. Siponimod se metabolizira u dvije faze s tim da hidroksilaciju u prvoj fazi katalizira enzim CYP2C9 (32). Preporučena doza održavanja siponimoda za osobe genotipa *CYP2C9**1/*1, *1/*2 i *2/*2 je 2 mg dnevno, a za nositelje genotipa *1/*3 i *2/*3 1 mg dnevno. Siponimod je kontraindiciran za nositelje genotipa *CYP2C9**3/*3 zbog znatno povišene razine siponimoda u plazmi (33).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

- provesti genotipizaciju farmakogenetičkih polimorfizama rs1799853 (*2) i rs1057910 (*3) gena *CYP2C9*
- odrediti učestalost alelnih varijanti i genotipova *CYP2C9* u populaciji istočne Hrvatske.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ustroj istraživanja

Rad je osmišljen kao presječno istraživanje (34).

3.2. Ispitanici i uzorci

Skupinu ispitanika sačinjavalo je 70 dobrovoljnih davatelja krvi, zdravih nesrodnih ispitanika opće populacije istočne Hrvatske. Uzorci krvi prikupljeni su u periodu od ožujka 2015. do ožujka 2017. godine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek. Uzorkovana je puna periferna krv u standardizirane epruvete s antikoagulansom EDTA. Ispitanici su pisanim putem u obrascu obaviještenog pristanka dali svoj pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Ispitanici su bili informirani o svrsi i metodologiji istraživanja, povjerljivosti podataka te pravu na informaciju o rezultatima testiranja. Prilikom formiranja istraživane skupine nije bilo diskriminacije prema dobi, spolu, etničkoj pripadnosti ili bilo kojem drugom kriteriju. Rezultati testiranja su anonimnog i agregiranog karaktera.

Za istraživanje je pribavljeno odobrenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

3.3. Metode

3.3.1. Izolacija genomske DNA

Genomska DNA izolirana je iz uzoraka pune periferne krvi ispitanika prema uputama proizvođača komercijalnog seta High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka). Princip je metode da enzim proteinaza K, uz pomoć pufera za razgradnju, razgradi proteine stanične membrane i tako omogućiti izlazak DNA iz jezgre.

Materijal: 200 μL uzorka krvi, High Pure PCR Template Preparation set (Slika 4.), izopropanol, apsolutni etanol, destilirana H_2O .

Pribor: mikropipete (volumena do 20 μL , do 200 μL , do 1000 μL), sterilni nekoristeni nastavci, plastične tubice volumena 1,5 mL i 2,0 mL (sterilne, nekoristene), mikrocentrifuga (2000 – 14200 o/min) s regulacijom temperature, grijač/*shaker* za 20 x 2 mL tubice, zamrzivač (-20 °C), hladnjak (+4 °C), nitrilne rukavice bez pudera.

Postupak: U sterilne tubice od 1,5 mL stavimo 200 μL uzorka krvi, 200 μL pufera za razgradnju (Binding Buffer) i 40 μL vodene otopine proteinaze K te dobro promiješamo i inkubiramo na 70 °C 10 minuta. Zatim se doda 100 μL izopropanola, dobro se promiješa te tako promiješani sadržaj izolacijske smjese prebaci u tubicu s filterom koju smo stavili u kolektor tubicu. Zatim slijedi centrifugiranje pri brzini 8000 x g u trajanju od 1 minute. Zatim tubicu s filterom premjestimo u novu, čistu kolektor tubicu i dodajemo 500 μL pufera za uklanjanje inhibitora (Inhibitor Removal Buffer). Ponovimo centrifugiranje pri brzini 8000 x g u trajanju od 1 minute. Nakon centrifugiranja tubicu s filterom premještamo u novu kolektor tubicu i dodajemo 500 μL pufera za ispiranje (Wash Buffer). Centrifugiramo 1 minutu pri brzini 8000 x g i zatim ponovimo postupak ispiranja s 500 μL pufera za ispiranje. Ponovno centrifugiramo 1 minutu pri brzini 8000 x g. Nakon toga ostatke pufera uklanjamo centrifugom pri brzini 14000 x g u trajanju od 10 sekundi. Nadalje, DNA eluiramo tako da tubicu s filterom stavimo u novu, sterilnu tubicu i dodamo 200 μL elucijskog pufera (Elution Buffer) kojeg smo prethodno zagrijali na 70 °C i centrifugiramo 1 minutu pri brzini 8000 x g. Sada sterilna tubica sadrži eluiranu DNA koju možemo na kraće razdoblje pohraniti na temperaturi od +2 do +8 °C ili ju skladištimo na temperaturi -20 °C za kasnije analize.



Slika 4. Reagensi potrebni za izolaciju genomske DNA. Fotografirala autorica.

3.3.2. Određivanje koncentracije i čistoće DNA

Da bi se odredila koncentracija i čistoća DNA, uzorci izolirane DNA analizirani su spektrofotometrijski. Izmjerena je vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm koja se koristi za izračun koncentracije DNA uzorka. Informacije o tome je li izolirana DNA čista ili onečišćena saznajemo iz omjera apsorbancije OD_{260}/OD_{280} koji bi kod čiste DNA trebao biti između 1,8 i 2,0. Povećana vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 230 nm ukazuje na kontaminaciju DNA organskim spojevima i puferkim solima, dok povećana vrijednost apsorbancije pri valnoj duljini od 280 nm ukazuje na kontaminaciju DNA proteinima.

Materijal: elucijski pufer iz seta za izolaciju DNA, uzorci genomske DNA

Pribor: Spektrofotometar SpectraMax QuickDrop UV-Vis, mikropipeta volumena do 10 μ L, sterilni nekoristeni nastavci, nitrilne rukavice bez pudera

Postupak: Na optičku podlogu spektrofotometra pipetom se nanese volumen od 2 μL uzorka DNA. Spektrofotometar zatim prikaže vrijednost apsorbancija pri valnim duljinama 230 nm, 260 nm i 280 nm te koncentraciju DNA. Pri prvom mjerenju odredi se vrijednost apsorbancija za elucijski pufer u kojem su otopljeni uzorci DNA što u daljnjim mjerenjima služi kao slijepa proba.

3.3.3. Genotipizacija *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3 metodom *real-time* PCR

Genotipizacija *CYP2C9* alelnih varijanti *1, *2 i *3 provođena je metodom PCR-a u stvarnom vremenu i analizom krivulje taljenja. Komercijalni set korišten za genotipizaciju *CYP2C9* sadrži specifične početnice za amplifikaciju odsječaka DNA duljine 374 pb i 180 pb, specifičnu SimpleProbe (HybProbe) oligomernu probu obilježenu fluoresceinom za detekciju alela *CYP2C9**2 i specifičnu probu obilježenu s fluoroforom LightCycler Red 640 za detekciju alela *CYP2C9**3. Probe se komplementarno vežu na ciljni slijed DNA unutar kojeg se nalazi odgovarajući polimorfizam.

Materijal: komercijalni set LightMix *CYP2C9**2/*3 (TIB Molbiol, Berlin, Njemačka), komercijalni set LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka), uzorci genomske DNA ispitanika.

Sastav LightMix *CYP2C9**2/*3 seta:

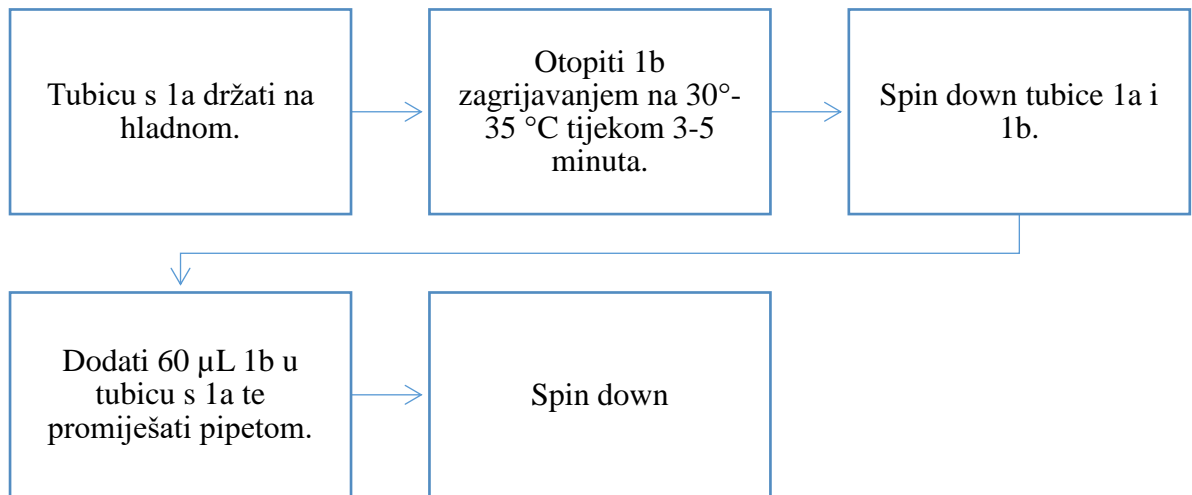
PSR (engl. *Parameter Specific Reagents*) koji sadrži početnice i probe, kontrolne DNA za *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3

Sastav LightCycler FastStart DNA Master HybProbe seta:

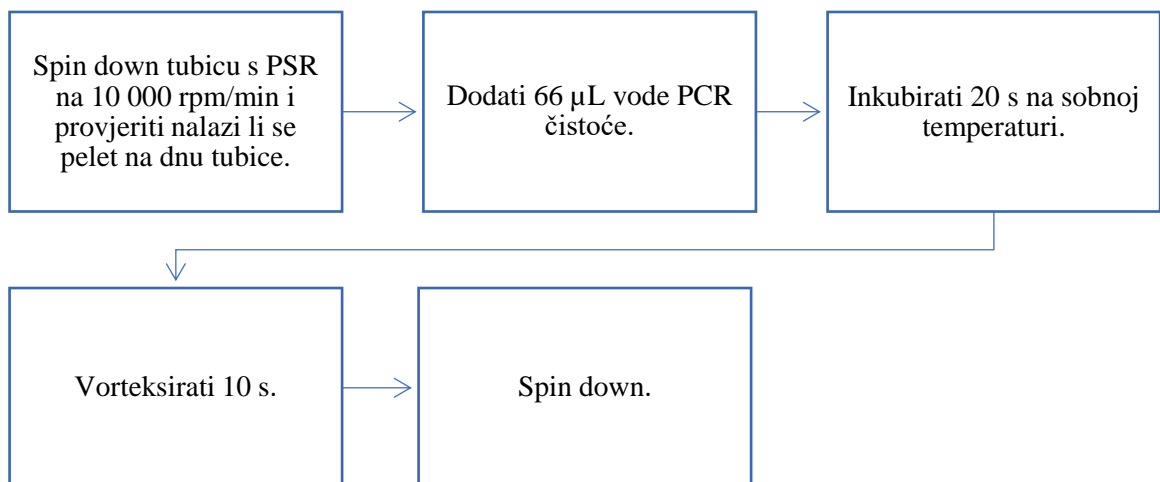
H_2O PCR čistoće, MgCl_2 , LC FastStart DNA Master (1a + 1b), FastStart Taq DNA polimeraza

Pribor: Real-time PCR uređaj LightCycler 1.2 (Roche), PCR kabinet za sterilan rad (Aura PCR, Bioair Euroclone Division), centrifuga LC Carousel Centrifuge (Roche), *short-spin* centrifuga, mikropipete (10 μL , 100 μL , 200 μL , 1000 μL), mikroeprovete PCR čistoće, kapilare, filter nastavci PCR čistoće, alu folija, nitrilne zaštitne rukavice bez pudera.

Postupak: Potrebno je prvo pripremiti LC FastStart DNA Master Hybprobe i LightMix CYP2C9*2/*3 setove prema uputama na Slici 5 i 6.



Slika 5. Protokol za pripremu LC FastStart DNA HybProbe seta.



Slika 6. Protokol za pripremu LightMix CYP2C9*2/*3 seta.

Za pripremu PCR reakcijske smjese potrebno je 9 µl Master Miksa po kapilari te 3 µL uzorka DNA. Ukupan volumen PCR reakcijske smjese iznosi 12 µL. Master Miks priprema se prema uputi u Tablici 1.

Tablica 1. Prikaz potrebnih komponenti i volumena za pripremu Master Miksa.

Komponenta	Volumen
H ₂ O PCR čistoće	5,88 µL x broj uzoraka
MgCl ₂	0,72 µL x broj uzoraka
PSR	1,20 µL x broj uzoraka
LC FastStart DNA Master	1,20 µL x broj uzoraka

PCR reakcijska smjesa pripremi se u mikroepuveti. Po 12 µL reakcijske smjese razdijeli se u kapilare koje se smjeste u LC Carousel centrifugu gdje se reakcijska smjesa spusti na dno kapilara. Zatim se u kapilare stavljaju u real-time PCR uređaj LightyCycler 1.2. Pokreće se program za real-time PCR i analizu umnoženog produkta DNA koji je prikazan u Tablici 2.

Tablica 2. Program za real-time PCR i analizu umnoženog produkta DNA.

Temperatura (°C)	Trajanje (hh:mm:ss)	Brzina grijanja/hlađenja (°C/s)	Korak
95	00:10:00	20	Denaturacija
95	00:00:05	20	Amplifikacija
60	00:00:10	20	
72	00:00:15	20	
95	00:00:20	20	Krivulja taljenja
40	00:00:20	20	
85	00:00:00	0.2	
40	00:00:30	20	Hlađenje

3.3.4. Analiza krivulja taljenja

Za analizu rezultata odabere se opcija kompenzacije boje. Podaci za *CYP2C9**3 očitavaju se na kanalu 640, za *CYP2C9**2 na kanalu 530 te za *CYP2C9**1 na oba kanala (530 i 640). Točka taljenja za *CYP2C9**2 je pri 50 °C (530), za *CYP2C9**3 točka taljenja je pri 59 °C (640) dok su točke taljenja za *CYP2C9**1 na 59 °C (530) i 49 °C (640). Dopuštena su odstupanja temperature taljenja do $\pm 2,5$ °C s tim da razlika (ΔT_m) između temperatura taljenja na kanalu 530 treba biti 9 °C, a 10 °C na kanalu 640. Negativna kontrola ne pokazuje signal. Dobiveni rezultati interpretiraju se na način prikazan u Tablici 3.

Tablica 3. Interpretacija rezultata genotipizacije *CYP2C9*.

*2 (530) T _m (°C)		*3 (640) T _m (°C)		<i>CYP2C9</i> aleli	Metabolički fenotip
-	59	49	-	*1/*1 (divlji tip)	Brzi
50	59	49	-	*1/*2	Intermedijarni
-	59	49	59	*1/*3	Intermedijarni
50	-	49	-	*2/*2	Spori
-	59	-	59	*3/*3	Spori
50	59	49	59	*2/*3	Spori
50	-	49	59	*2/dupla mutacija	Spori
50	-	-	59	Nikad uočeno	Spori
-	-	-	-	PCR greška	Ponoviti test
ΔT_m 9 °C		ΔT_m 10 °C			

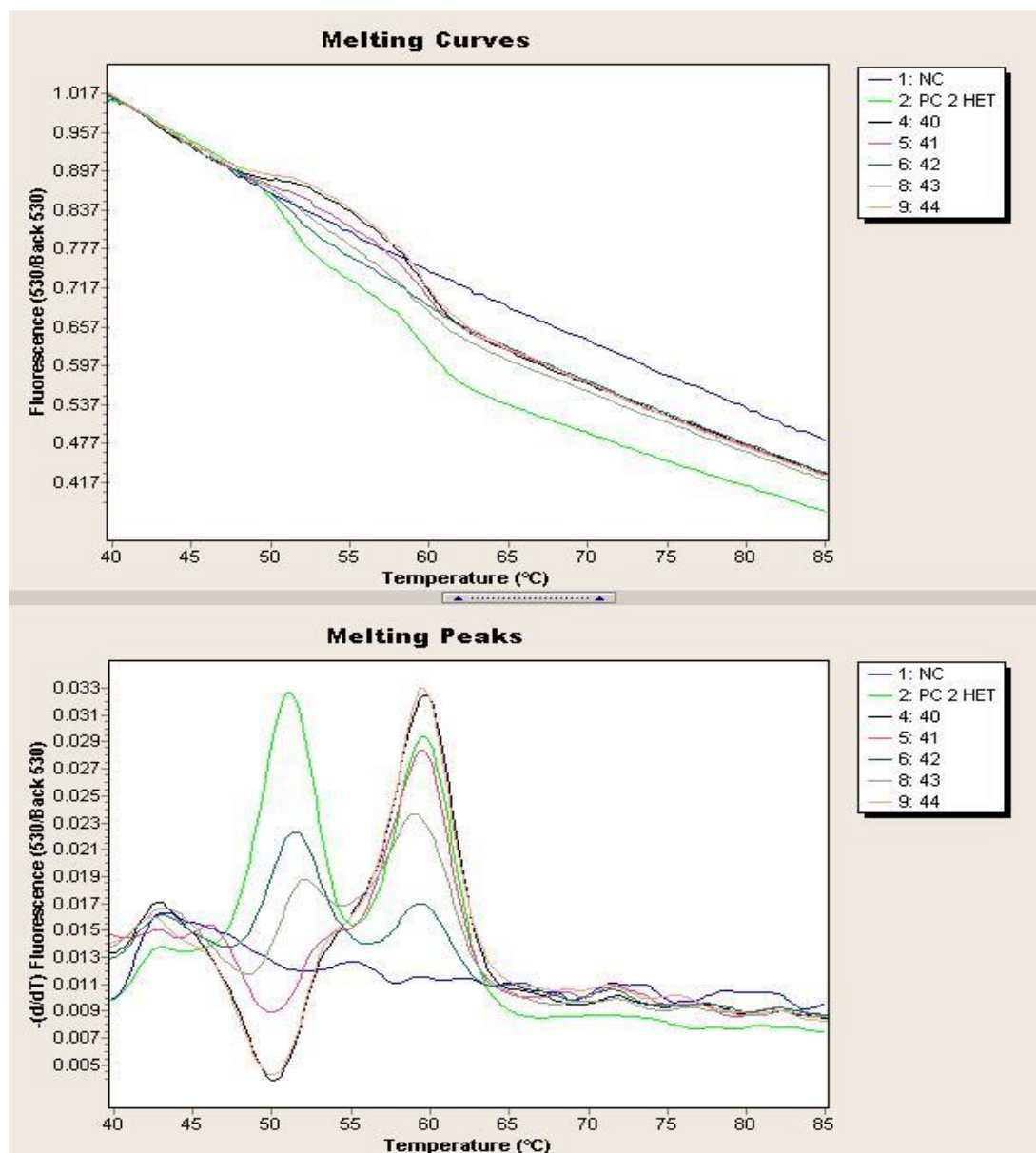
3.3.5. Statistička obrada podataka

Učestalost alelnih varijanti gena *CYP2C9* određena je direktnim brojanjem. Deskriptivna statistika rezultata učinjena je s obzirom na grupiranje prema dobi i spolu ispitanika uz uporabu programa Microsoft Excel 2019. Razlike u frekvenciji alelnih varijanti i genotipa između ispitivane skupine i drugih populacija ispitane su uporabom Fischerovog egzaktnog testa. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc Statistical Software verzija 19.4.0 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2020) Usporedba raspodjele alela i genotipa između populacijskih skupina opisana je omjerom izgleda (engl. *odds ratio*, OR) i 95 %-tnim intervalom pouzdanosti (95 % CI, engl. *confidence interval*) s razinom značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

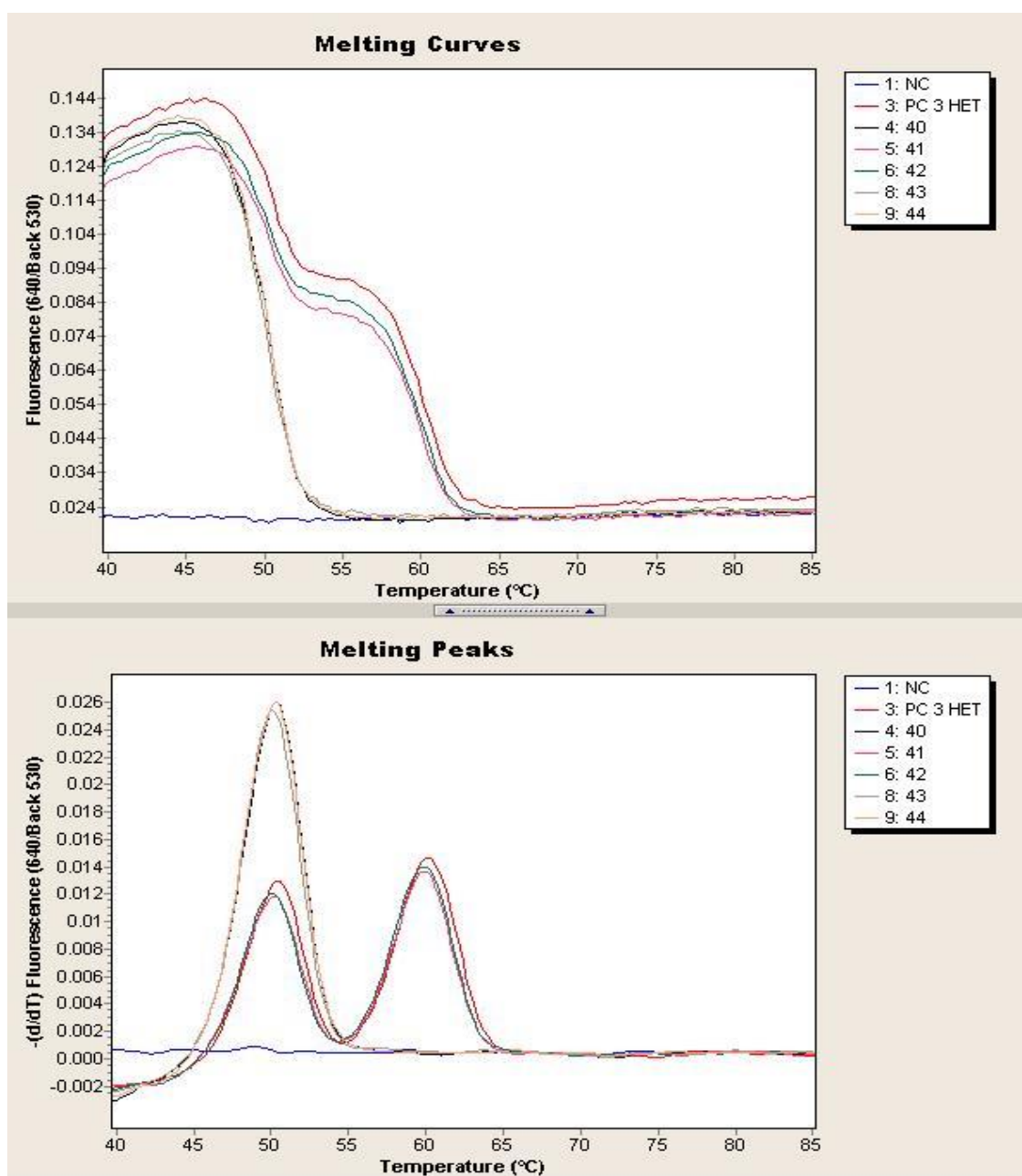
4.1. Analiza rezultata genotipizacije *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3*

Zadovoljeni su uvjeti za analizu krivulje taljenja budući da odstupanja T_m nisu bila veća od $\pm 2,5$ °C i razlike ΔT_m na svakom kanalu su bile u okviru dopuštenog odstupanja. Na Slici 7. prikazan je primjer očitavanja rezultata na kanalu 530 za određivanje prisustva alelne varijante *CYP2C9*2*.



Slika 7. Očitavanje rezultata na kanalu 530 za uzorke 40-44 uz prisustvo negativne kontrole (NC) i pozitivne kontrole (alel *2).

Na Slici 8. prikazano je očitavanje rezultata na kanalu 640 za određivanje prisustva alelne varijante *CYP2C9*3*.



Slika 8. Očitavanje rezultata na kanalu 640 za uzorke 40-44 uz prisustvo negativne kontrole (NC) i pozitivne kontrole (alel *3).

Na slikama 7. i 8. „Melting Curves“ prikazuje promjenu fluorescencije u ovisnosti o temperaturi pri čemu nagli pad fluorescencije označava temperaturu taljenja (T_m). „Melting Peaks“ daje prikaz promjene negativne derivacije fluorescencije u ovisnosti o temperaturi koja se na mjestima naglog pada fluorescencije očituje kao skok (peak).

4.2. Raspodjela ispitanika po dobi i spolu

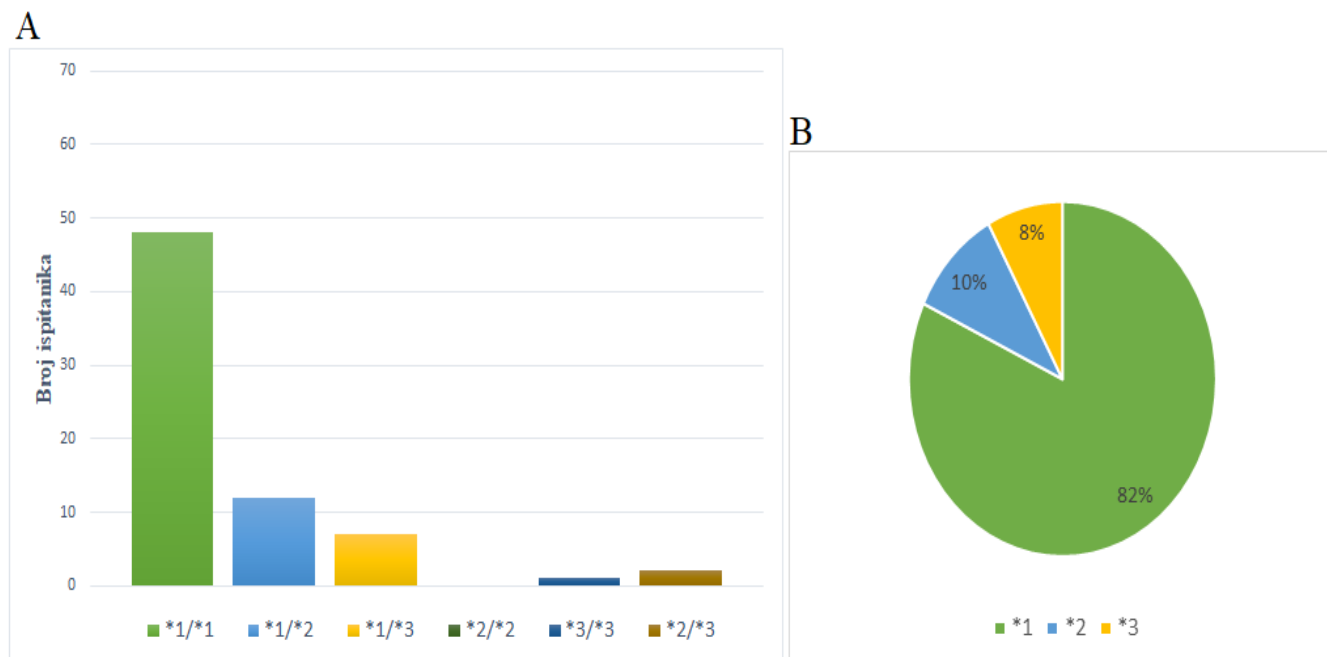
Ispitivana skupina sastojala se od ukupno 70 dobrovoljnih darivatelja krvi koji predstavljaju populaciju istočne Hrvatske, od kojih je muškaraca 56 (80 %) i žena 14 (20 %) (Tablica 4).

Tablica 4. Raspodjela ispitanika po dobi i spolu.

Broj ispitanika	70	
Spol	M	Ž
Broj (%)	56 (80)	14 (20)
Dob (godine)	43,57 (10,58)	41,43 (10,38)
Aritmetička sredina (standardna devijacija)	43,14 (10,50)	

4.3. Raspodjela genotipova i učestalost alelnih varijanti *CYP2C9* u populaciji istočne Hrvatske

Raspodjela genotipova i učestalost alelnih varijanti *CYP2C9* gena prikazana je na Slici 9. Najviše ispitanika, njih 48 (69 %), su homozigoti za divlji tip **1/*1*, 12 ispitanika (17 %) ima genotip **1/*2*, 7 ispitanika (10 %) ima genotip **1/*3* i 2 ispitanika (3 %) imaju genotip **2/*3*. Samo 1 ispitanik (1 %) je homozigot **3/*3*, dok nijedan ispitanik nema genotip **2/*2*.



Slika 9. Raspodjela genotipova (A) i učestalost alelnih varijanti (B) gena *CYP2C9* u populaciji istočne Hrvatske.

4.4. Usporedba učestalosti alelnih varijanti gena *CYP2C9* između populacije istočne Hrvatske i drugih populacija

Usporedbom učestalosti alelnih varijanti gena *CYP2C9* u istočnoj Hrvatskoj s literaturnim podacima za druge populacije (Tablica 5.) možemo vidjeti da nema statistički značajne razlike između populacije istočne Hrvatske te populacija Sjeverne Indije (35), Jordana (36), Italije (37), Hrvatske (38), Grčke (39) te Rumunjske (40). Statistički značajna razlika uočena je u odnosu na populaciju Kosova (41) za alelne varijante *1 i *2. Alelna varijanta *1 statistički je značajno ($P = 0,01$) učestalija u populaciji istočne Hrvatske ($OR = 1,83$, 95 % $CI = 1,13-2,94$), dok je alelna varijanta *2 statistički značajno ($P = 0,03$) učestalija u populaciji Kosova ($OR = 0,52$, 95 % $CI = 0,29-0,95$). Statistički značajna razlika uočena je u odnosu na populaciju Kine (42) za sve alelne varijante *CYP2C9*. Alelna varijanta *1 statistički je značajno ($P < 0,001$) učestalija u populaciji Kine ($OR = 0,19$, 95 % $CI = 0,12-0,30$), alelna varijanta *2 statistički je značajno ($P < 0,001$) učestalija u populaciji istočne Hrvatske ($OR = 1399,45$, 95 % $CI = 83,02-23589,84$), te alelna varijanta *3 statistički je značajno ($P = 0,03$) učestalija u populaciji istočne Hrvatske ($OR = 2,05$, 95 % $CI = 1,09-3,84$).

Tablica 5. Usporedba učestalosti alelnih varijanti gena *CYP2C9* u različitim populacijama.

Alelna varijanta <i>CYP2C9</i>	alel *1	alel *2	alel *3
	učestalost alela: broj (%)		
Istočna Hrvatska	115 (82)	14 (10)	11 (8)
	učestalost alela; broj (%) P*		
Sjeverna Indija	152 (85,4) 0,45	8 (4,5) 0,07	18 (10,1) 0,56
Jordan	419 (79,7) 0,55	71 (13,5) 0,32	36 (6,8) 0,71
Italija	560 (77,8) 0,26	90 (12,5) 0,48	70 (9,7) 0,63
Kosovo	335 (71,58) 0,01	82 (17,52) 0,03	51 (10,9) 0,34
Hrvatska	1682 (77,87) 0,29	313 (14,49) 0,17	165 (7,64) 0,87
Grčka	447 (78,97) 0,48	73 (12,9) 0,39	46 (8,13) 0,99
Rumunjska	527 (79,4) 0,49	75 (11,3) 0,77	62 (9,3) 0,75
Kina	5860 (96) < 0,001	0 (0) < 0,001	244 (4) 0,03

*Fisherov egzaktni test

4.5. Usporedba učestalosti genotipova *CYP2C9* između populacije istočne Hrvatske i drugih populacija

Usporedbom učestalosti genotipova *CYP2C9* u istočnoj Hrvatskoj s ranije objavljenim podacima za druge populacije (Tablica 6.) možemo vidjeti da nema statistički značajne razlike između populacije istočne Hrvatske te populacija Sjeverne Indije (35), Jordana (36), Italije (37), Hrvatske (38), Grčke (39) te Rumunjske (40). U populaciji Kosova (41) statistički je značajno ($P = 0,01$) manja učestalost genotipa $*1/*1$ u odnosu na populaciju istočne Hrvatske ($OR = 2,18$, 95 % $CI = 1,24-3,84$). Genotip $*1/*1$ je statistički značajno ($P < 0,001$) učestaliji u populaciji Kine (42) ($OR = 0,20$, 95 % $CI = 0,12-0,33$), nego u populaciji istočne Hrvatske. Genotip $*1/*2$ je statistički značajno ($P < 0,001$) učestaliji u populaciji istočne Hrvatske ($OR = 1304,49$, 95 % $CI = 76,32-22295,29$) u odnosu na učestalost u populaciji Kine. Genotip $*2/*3$ je statistički značajno ($P = 5 \times 10^{-4}$) učestaliji u populaciji istočne Hrvatske ($OR = 222,81$, 95 % $CI = 10,60-4685,21$), nego u populaciji Kine.

Tablica 6. Usporedba učestalosti genotipova *CYP2C9* u različitim populacijama.

Genotip <i>CYP2C9</i>	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*3/*3	*2/*3
Metabolički fenotip	EM	IM	IM	PM	PM	PM
	učestalost genotipa: broj (%)					
Istočna Hrvatska	48 (69)	12 (17)	7 (10)	0 (0)	1 (1)	2 (3)
	učestalost genotipa: broj (%) P*					
Sjeverna Indija	64 (71,9) 0,73	7 (7,9) 0,09	17 (19,1) 0,12	0 (0) -	0 (0) 0,44	1 (1,1) 0,58
Jordan	165 (40)	57 (21,67) 0,51	32 (12,17) 0,83	5 (1,9) 0,59	0 (0) 0,21	4 (1,52) 0,61
Italija	223 (61,9) 0,34	62 (17,2) > 0,99	52 (14,5) 0,45	10 (2,8) 0,38	5 (1,4) >0,99	8 (2,2) 0,67
Kosovo	117 (50) 0,01	62 (26,50) 0,12	39 (16,66) 0,19	8 (3,42) 0,21	4 (1,71) > 0,99	4 (1,71) 0,62
Hrvatska	645 (59,72) 0,17	254 (23,52) 0,24	138 (12,78) 0,58	19 (1,76) 0,62	3 (0,28) 0,22	21 (1,94) 0,65
Grčka	176 (62,19) 0,34	57 (20,14) 0,62	38 (13,43) 0,55	4 (1,41) > 0,99	0 (0) 0,20	8 (2,83) > 0,99
Rumunjska	209 (63) 0,41	62 (18,7) 0,87	47 (14,1) 0,44	2 (0,6) > 0,99	3 (0,9) 0,54	9 (2,7) > 0,99
Kina	2798 (91,68) < 0,001	0 (0) < 0,001	250 (8,19) 0,51	0 (0) -	4 (0,13) 0,11	0 (0) 5x10⁻⁴

*Fisherov egzaktni test

5. RASPRAVA

Interindividualna varijabilnost u odgovoru na lijekove čest je klinički problem, a može sezati od neuspješnog djelovanja lijeka do neželjenih štetnih nuspojava. Dokazano je da se takve individualne varijacije nasljeđuju i da su uzrokovane genskim varijacijama enzima koji metaboliziraju lijekove (8). Primjena farmakogenomike u predviđanju štetnih nuspojava lijekova sve je potrebna u kliničkoj praksi. Predviđanje odgovora pojedinog pacijenta na lijek može spriječiti neželjene nuspojave koje su povezane s genskim varijacijama (43). Sve je veći broj otkrivenih polimorfizama u genima koji kodiraju enzime za metabolizam lijekova, a u ovom radu opisan je značaj polimorfizama gena *CYP2C9* te provedeno istraživanje učestalosti njegovih alelnih varijanti *1, *2 i *3, te genotipova prisutnih u populaciji istočne Hrvatske.

U ovom istraživanju skupinu ispitanika sačinjavalo je 70 dobrovoljnih davatelja krvi iz istočne Hrvatske čiji su uzorci krvi prikupljeni u periodu od ožujka 2015. do ožujka 2017. godine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek. Genotipizacija *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3 provedena je u Laboratoriju za molekularnu i HLA dijagnostiku, Odjela laboratorijske dijagnostike i kliničke transfuzijske medicine, Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu, KBC-a Osijek. Nakon provedene genotipizacije u populaciji istočne Hrvatske uočena je najveća učestalost alelne varijante *CYP2C9**1 (79 %), te genotipa *1/*1 (64 %). Učestalost genotipa *1/*2 iznosila je 19 %, genotipa *1/*3 10 %, dok su znatno slabije zastupljeni genotipovi *3/*3 (2 %) i *2/*3 (5 %). Genotip *2/*2 nije bio zastupljen.

Istraživanje Chaudhary N. i sur. provedeno na populaciji sjeverne Indije pokazuje najveću učestalost alelne varijante *1, što je u skladu s ovim istraživanjem, ali je u odnosu na ovo istraživanje u populaciji sjeverne Indije veća zastupljenost alelne varijante *3, te manja zastupljenost alelne varijante *2. Što se tiče genotipova, u populaciji sjeverne Indije najveća je zastupljenost genotipa *1/*1, dok genotipovi *2/*2 i *3/*3 nisu zastupljeni. U odnosu na populaciju istočne Hrvatske, istraživanje Chaudhary N. i sur. pokazuje veću učestalost genotipova *1/*1 i *1/*3, dok je učestalost genotipova *1/*2, *2/*3 i *3/*3 veća u populaciji istočne Hrvatske (35).

U populacijama Jordana (36), Italije (37), Hrvatske (38), Grčke (39) i Rumunjske (40) najveća je učestalost alela *1, zatim *2 te *3 što je u skladu s ovim istraživanjem. U odnosu na istraživanje Yousef AM. i sur. koje je provedeno na populaciji Jordana, učestalost alelnih varijanti *1 i *3 je nešto veća u populaciji istočne Hrvatske, dok je učestalost alelne varijante *2 veća u populaciji Jordana (36). U istraživanjima Scordo M.G. i sur. (37), Arvanitidis K. i sur. (39) te Buzoianu A. D. i sur. (40) u populacijama Italije, Grčke i Rumunjske uočene su nešto veće učestalosti alelnih varijanti *2 i *3 u odnosu na ovo istraživanje, dok je alelna varijanta *1 učestalija u populaciji istočne Hrvatske u odnosu na spomenuta istraživanja. U odnosu na istraživanje Ganoci L. i sur. na cjelokupnoj populaciji Hrvatske, veća učestalost uočava se za alel *1 i *3, a manja za alel *2 u populaciji istočne Hrvatske (38).

U populaciji Jordana i Italije nešto veća učestalost uočena je za genotipove *1/*2 i *1/*3 i u odnosu na ovo istraživanje, dok je učestalost genotipova *1/*1, *3/*3 te *2/*3 veća u ovom istraživanju u odnosu na istraživanja Yousef AM. i sur. i Scordo M.G. i sur. S obzirom da genotip *2/*2 nije uočen u populaciji istočne Hrvatske, veća je učestalost tog genotipa u populacijama Italije i Jordana (36,37).

U istraživanjima Ganoci L. i sur., Arvanitidis K. i sur. te Buzoianu A. D. i sur. uočava se nešto veća učestalost genotipova *1/*2 i *1/*3 u odnosu na ovo istraživanje te genotipa *2/*2 koji u populaciji istočne Hrvatske nije zastupljen. Učestalost genotipova *1/*1 i *2/*3 je neznatno veća u populaciji istočne Hrvatske u odnosu na populaciju Grčke, Rumunjske i cjelokupne Hrvatske, kao i genotipa *3/*3, koji u populaciji Grčke nije uočen (38,39,40).

U istraživanju Krasniqi V. i sur. na populaciji Kosova uočava se najveća učestalost alelne varijante *1 te genotipa *1/*1, međutim postoji statistički značajna razlika između učestalosti alela *1 i *2 kao i genotipa *1/*1 u usporedbi s ovim istraživanjem. Značajno je veća učestalost genotipa *1/*1 u ovom istraživanju te je nešto veća učestalost genotipa *2/*3. Učestalosti genotipova *1/*2, *1/*3, *2/*2 te *3/*3 su veće u populaciji Kosova (41).

U istraživanju Gaikwad T. i sur. koji su predstavili podatke za Kinu i druge azijske zemlje, najveća je učestalost alela *1 u populaciji Kine, zatim alela *3, dok alel *2 nije zastupljen. Postoji statistički značajna razlika između učestalosti sve tri alelne varijante u usporedbi s ovim istraživanjem. Što se tiče genotipova, statistički značajna razlika uočava se za genotipove *1/*1, *1/*2 i *2/*3 u usporedbi s ovim istraživanjem. U populaciji Kine najveća

je učestalost genotipa $*1/*1$, dok nijedna osoba nema genotipove $*1/*2$ i $*2/*3$ pa je posljedično veća učestalost tih genotipova u populaciji istočne Hrvatske (42).

Od svih navedenih istraživanja na raznim europskim populacijama, u usporedbi s ovim istraživanjem, najviše se razlikuju rezultati istraživanja na populaciji Kosova gdje je uočena statistički značajna razlika u učestalosti pojedinih genotipova i alela gena *CYP2C9*.

Od neeuropskih zemalja, najveća razlika uočava se između ovog istraživanja i istraživanja u populaciji Kine i to za učestalosti svih alela i pojedinih genotipova *CYP2C9* za koje je utvrđena statistički značajna razlika.

U populaciji istočne Hrvatske prema rezultatima učestalosti genotipova *CYP2C9* u ovom istraživanju udio brzog metaboličkog fenotipa je 69 % (*CYP2C9*1/*1*), intermedijarnog metaboličkog fenotipa 27 % (*CYP2C9*1/*2* + *CYP2C9*1/*3*), a udio sporih metabolizatora je 4 % (*CYP2C9*2/*2* + *CYP2C9*3/*3* + *CYP2C9*2/*3*). Slično rezultatima našeg istraživanja, u svim spomenutim populacijama najveća je učestalost brzog metaboličkog fenotipa s tim da je najveća u populaciji Kine (91,68 %), a najmanja u populaciji Kosova (50 %). Brzi metabolički fenotip ima veću učestalost i u populaciji Sjeverne Indije (71,9 %) u odnosu na populaciju istočne Hrvatske, dok je u populaciji istočne Hrvatske učestaliji u odnosu na populacije Jordana, Italije, Grčke, Hrvatske te Rumunjske. Intermedijarni metabolički fenotip drugi je po učestalosti u svim populacijama, ali u odnosu na ovo istraživanje učestalost ovog fenotipa veća je u populaciji Jordana, Italije, Kosova, Grčke, Hrvatske i Rumunjske. Učestalost intermedijarnog metaboličkog fenotipa jednaka je u populaciji sjeverne Indije kao i u populaciji istočne Hrvatske, dok je učestalost ovog fenotipa znatno manja u Kini (8,19 %) u odnosu na ovo istraživanje. U populacijama Italije, Kosova, Grčke te Rumunjske veća je učestalost sporog metaboličkog fenotipa u odnosu na ovo istraživanje. U odnosu na populaciju Jordana i Hrvatske, nešto veća učestalost sporog metaboličkog fenotipa je u populaciji istočne Hrvatske u odnosu na populaciju sjeverne Indije gdje je učestalost ovog fenotipa 1,1 % te Kine gdje je učestalost ovog fenotipa 0,13 %.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata o učestalosti alela i genotipova gena *CYP2C9* u populaciji istočne Hrvatske mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. U skupini od 70 ispitanika, koji predstavljaju populaciju istočne Hrvatske, najveća je učestalost alelne varijante divljeg tipa, *CYP2C9*1* (82 %) dok je učestalost alelnih varijanti *CYP2C9*2* 10 % i *CYP2C9*3* 8 %.
2. U ispitivanoj skupini najzastupljeniji je genotip divljeg tipa, *CYP2C9 *1/*1* sa učestalošću 69 %, zatim slijedi genotip *CYP2C9 *1/*2* sa 17 % i *CYP2C9 *1/*3* sa 10 %. Najslabije su zastupljeni genotipovi **2/*3* (3 %) i **3/*3* (1 %) dok genotip **2/*2* nije prisutan u populaciji istočne Hrvatske.
3. Između populacije istočne Hrvatske te populacija sjeverne Indije, Jordana, Italije, Hrvatske, Grčke i Rumunjske usporedbom učestalosti alelnih varijanti i genotipova *CYP2C9* nije uočena statistički značajna razlika. Statistički značajna razlika uočena je za alele *CYP2C9*1* i *CYP2C9*2* između populacije istočne Hrvatske u odnosu na populacije Kosova i Kine, nadalje za genotip *CYP2C9 *1/*1* u odnosu na Kosovo i Kinu te za genotipove **1/*2* i **2/*3* u odnosu na populaciju Kine.

7. SAŽETAK

CILJ ISTRAŽIVANJA: Genotipizacija farmakogenetičkih polimorfizama rs1799853 (*2) i rs1057910 (*3) gena *CYP2C9* i određivanje učestalosti alelnih varijanti i genotipova *CYP2C9* u populaciji istočne Hrvatske.

NACRT STUDIJE: Presječno istraživanje.

ISPITANICI I METODE: Skupina ispitanika sastojala se od 70 dobrovoljnih davatelja krvi (56 muškaraca, 14 žena) kojima je uzorak krvi prikupljen u periodu od ožujka 2015. do ožujka 2017. godine u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu KBC-a Osijek. Genomska DNA izolirana je iz uzoraka pune krvi s antikoagulansom. Prije genotipizacije, čistoća i koncentracija DNA određena je spektrofotometrijski. Genotipizacija *CYP2C9**2 i *CYP2C9**3 provedena je metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) analizom krivulje taljenja visoke rezolucije. Provedena je usporedba učestalosti alela i genotipova *CYP2C9* s drugim populacijama. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc.

REZULTATI: U skupini od 70 ispitanika, 48 ispitanika (69 %) su homozigoti za divlji tip *1/*1, 12 ispitanika (17 %) ima genotip *1/*2, 7 ispitanika (10 %) ima genotip *1/*3, 2 ispitanika (3 %) imaju genotip *2/*3, 1 ispitanik (1 %) je homozigot *3/*3, dok nijedan ispitanik nema genotip *2/*2. Učestalost *CYP2C9**1 iznosi 82 %, *CYP2C9**2 10 %, *CYP2C9**3 8 %.

ZAKLJUČAK: U populaciji istočne Hrvatske najučestalija je alelna varijanta *CYP2C9**1 te genotip *CYP2C9**1/*1. Između populacije istočne Hrvatske i populacija sjeverne Indije, Jordana, Italije, Hrvatske, Grčke i Rumunjske nije uočena statistički značajna razlika. Statistički značajna razlika postoji između populacije istočne Hrvatske i populacija Kosova i Kine.

KLJUČNE RIJEČI: farmakogenetika; citokrom P450; polimorfizmi *CYP2C9*

8. SUMMARY

Pharmacogenetic polymorphisms of *CYP2C9* in population of East Croatia

OBJECTIVES: Genotyping of pharmacogenetic polymorphisms rs1799853 (*2) and rs1057910 (*3) of the *CYP2C9* gene and determination of the frequency of allelic variants and genotypes of *CYP2C9* for the population of east Croatia.

STUDY DESIGN: Cross-sectional study.

PARTICIPANTS AND METHODS: Group of participants consisted of 70 voluntary blood donors (56 men, 14 women) whose blood sample was collected in the period from March 2015 to March 2017 at the Clinical Institute of Transfusion Medicine, University Hospital Osijek. Genomic DNA was isolated from whole blood samples with EDTA anticoagulant. Before genotyping, purity and concentration of DNA were determined spectrophotometrically. Genotyping of *CYP2C9**2 and *CYP2C9**3 was performed by real-time PCR with high-resolution melting curve analysis. The frequency of *CYP2C9* alleles and genotypes was compared with previously published results for other populations. Statistical program MedCalc was used for statistical analysis.

RESULTS: In the group of 70 participants, 48 participants (69 %) were homozygotes for wild type *1/*1, 12 participants (17 %) had genotype *1/*2, 7 participants (10 %) had genotype *1/*3, 2 participants (3 %) had genotype *2/*3, 1 participant (1 %) was homozygous *3/*3, while no one of the participants had the genotype *2/*2. The allelic frequency of *CYP2C9**1 was 82 %, *CYP2C9**2 10 % and *CYP2C9**3 8 %.

CONCLUSION: In the population of east Croatia, the most common is the allelic variant *CYP2C9**1 and the genotype *CYP2C9**1/*1. No statistically significant difference was observed between the population of east Croatia and the populations of northern India, Jordan, Italy, Croatia, Greece and Romania. There is a statistically significant difference between the population of eastern Croatia and the populations of Kosovo and China.

KEY WORDS: pharmacogenetics; cytochrome P450; *CYP2C9* polymorphism

9. LITERATURA

1. Grbović L, Radenković M, Đokić J, Gojković-Bukarica Lj, Dragović JG. Nove farmakoterapijske strategije: farmakogenetika i genska terapija. *Vojnosanitetski pregled*. 2007;64(10):707-713.
2. Haga SB, Mills R. A review of consent practices and perspectives for pharmacogenetic testing. *Pharmacogenomics*. 2016; 17(14): 1595–1605.
3. Weitzel KW, Cavallari LH, Lesko LJ. Preemptive Panel-Based Pharmacogenetic Testing: The Time is Now. *Pharm Res*. 2017;34(8):1551-1555.
4. Goldberg JF. Do You Order Pharmacogenetic Testing? Why? *J Clin Psychiatry*. 2017;78(8):1155-1156.
5. Krebs K, Milani L. Translating pharmacogenomics into clinical decisions: do not let the perfect be the enemy of the good. *Hum Genomics*. 2019;13(1):39.
6. Just KS, Turner RM, Dolžan V, Cecchin E, Swen JJ, Gurwitz D, i sur. Educating the next generation of pharmacogenomics experts: global educational needs and concepts. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(2):313-316.
7. Kocal GC, Baskin Y. Polymorphisms in Pharmacogenetics of Personalized Cancer Therapy. *Genetic Polymorphisms*. 2017.
8. Katara P. Single nucleotide polymorphism and its dynamics for pharmacogenomics. *Interdiscip Sci*. 2014;6(2):85-92.
9. Topić E, Primorac D. Farmakogenomika: značenje za medicine u sljedećim desetljećima. *Zbornik sveučilišta Libertas*. 2019;4(4):231-251.
10. Pinto N, Dolan ME. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*. 2011;12(5):487-497.
11. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Current Drug Targets*. 2018;19:38-54.
12. Guengerich FP, Waterman MR, Egli M. Recent Structural Insights into Cytochrome P450 Function. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(8):625-640.
13. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013;138(1):103-141.

14. Preissner SC, Hoffmann MF, Preissner R, Dunkel M, Gewiess A, Preissner S. Polymorphic cytochrome P450 enzymes (CYPs) and their role in personalized therapy. *PLoS One*. 2013;8(12):e82562.
15. Van Booven D, Marsh S, McLeod H, Whirl Carillo M, Sangkuhl K, Klein TE, i sur. Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(4):277-281.
16. Pratt VM, Cavallari LH, Del Tredici AL, Hachad H, Ji Y, Moyer AM, i sur. Recommendations for Clinical CYP2C9 Genotyping Allele Selection: A Joint Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2019;21(5):746-755.
17. Daly AK, Rettie AE, Fowler DM, Miners JO. Pharmacogenomics of CYP2C9: Functional and Clinical Considerations. *J Pers Med*. 2017;8(1):1.
18. Cho MA, Yoon JG, Kim V, Kim H, Lee R, Lee MG, i sur. Functional Characterization of Pharmacogenetic Variants of Human Cytochrome P450 2C9 in Korean Populations. *Biomol Ther (Seoul)*. 2019;27(6):577-583.
19. Jin Y, Borell H, Gardin A, Ufer M, Huth F, Camenisch G. In vitro studies and in silico predictions of fluconazole and CYP2C9 genetic polymorphism impact on siponimod metabolism and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018;74(4):455-464.
20. Sausville LN, Gangadhariah MH, Chiusa M, Mei S, Wei S, Zent R, i sur. The Cytochrome P450 Slow Metabolizers CYP2C9*2 and CYP2C9*3 Directly Regulate Tumorigenesis via Reduced Epoxyeicosatrienoic Acid Production. *Cancer Res*. 2018;78(17):4865-4877.
21. Maekawa K, Adachi M, Matsuzawa Y, Zhang Q, Kuroki R, Saito Y, i sur. Structural Basis of Single-Nucleotide Polymorphisms in Cytochrome P450 2C9. *Biochemistry*. 2017;56(41):5476-5480.
22. Al-Eitan LN, Almasri AY, Khasawneh RH. Effects of CYP2C9 and VKORC1 polymorphisms on warfarin sensitivity and responsiveness during the stabilization phase of therapy. *Saudi Pharm J*. 2019;27(4):484-490.
23. Biswas M, Bendkhale SR, Deshpande SP, Thaker SJ, Kulkarni DV, Bhatia SJ, i sur. Association between genetic polymorphisms of CYP2C9 and VKORC1 and safety and efficacy of warfarin: Results of a 5 years audit. *Indian Heart J*. 2018;70(Suppl 3): S13-S19.
24. Shaw K, Amstutz U, Kim RB, Lesko LJ, Turgeon J, Michaud V, i sur. Clinical Practice Recommendations on Genetic Testing of CYP2C9 and VKORC1 Variants in Warfarin Therapy. *Ther Drug Monit*. 2015;37(4):428-436.

25. Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90(4):625-629.
26. Yang F, Xiong X, Liu Y, Zhang H, Huang S, Xiong Y, i sur. CYP2C9 and OATP1B1 genetic polymorphisms affect the metabolism and transport of glimepiride and gliclazide. *Sci Rep.* 2018;8(1):10994.
27. Dean L. Flurbiprofen Therapy and CYP2C9 Genotype. *Medical Genetics Summaries.* 2019.
28. Zi J, Liu D, Ma P, Huang H, Zhu J, Wei D, i sur. Effects of CYP2C9*3 and CYP2C9*13 on Diclofenac Metabolism and Inhibition-based Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2010;25(4):343–350.
29. Fohner AE, Ranatunga DK, Thai KK, Lawson BL, Rischx N, Oni-Orisan A, i sur. Assessing the clinical impact of CYP2C9 pharmacogenetic variation on phenytoin prescribing practice and patient response in an integrated health system. *Pharmacogenet Genomics.* 2019;29(8):192-199.
30. Silvado CE, Terra VC, Twardowschy CA. CYP2C9 polymorphisms in epilepsy: influence on phenytoin treatment. *Pharmgenomics Pers Med.* 2018;11:51-58.
31. Monostory K, Nagy A, Tóth K, Búdi T, Kiss A, Déri M, i sur. Relevance of CYP2C9 Function in Valproate Therapy. *Curr Neuropharmacol.* 2019;17(1):99-106.
32. Goodman AD, Anadani N, Gerwitz L. Siponimod in the treatment of multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs.* 2019;28(12):1051-1057.
33. Huth F, Gardin A, Umehara K, He H. Prediction of the Impact of Cytochrome P450 2C9 Genotypes on the Drug-Drug Interaction Potential of Siponimod With Physiologically-Based Pharmacokinetic Modeling: A Comprehensive Approach for Drug Label Recommendations. *Clin Pharmacol Ther.* 2019;106(5):1113-1124.
34. Marušić M. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
35. Chaudhary N, Kabra M, Gulati S, Gupta YK, Pandey RM, Bhatia BD. Frequencies of CYP2C9 polymorphisms in North Indian population and their association with drug levels in children on phenytoin monotherapy. *BMC Pediatr.* 2016;16:66.
36. Yousef AM, Bulatova NR, Newman W, Hakooz N, Ismail S, Qusa H, i sur. Allele and genotype frequencies of the polymorphic cytochrome P450 genes (CYP1A1, CYP3A4, CYP3A5, CYP2C9 and CYP2C19) in the Jordanian population. *Mol Biol Rep.* 2012;39(10):9423-9433.

37. Scordo MG, Caputi AP, D'Arrigo C, Fava G, Spina E. Allele and genotype frequencies of CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 in an Italian population. *Pharmacol Res.* 2004;50(2):195-200.
38. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population, *Drug Metabol Pers Ther* 2017; 32(1):11–21.
39. Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, i sur. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007;21(4):419-426.
40. Buzoianu AD, Trifa AP, Mureșanu DF, Crișan S. Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 -1639 G>A polymorphisms in a population from South-Eastern Europe. *J Cell Mol Med.* 2012;16(12):2919-2924.
41. Krasniqi V, Dimovski A, Qorraj Bytyqi H, Eftimov A, Šimičević L, Božina N. Genetic polymorphisms of CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A5 in Kosovar population. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2017;68:180-184.
42. Gaikwad T, Ghosh K, Shetty S. VKORC1 and CYP2C9 genotype distribution in Asian countries. *Thromb Res.* 2014;134(3):537-544.
43. Zhou ZW, Chen XW, Sneed KB, Yang YX, Zhang X, He ZX, i sur. Clinical association between pharmacogenomics and adverse drug reactions. *Drugs.* 2015;75(6):589-631.

10. ŽIVOTOPIS

IME I PREZIME: Iva Skaramuca

DATUM I MJESTO ROĐENJA: 24. listopada 1996., Vinkovci, Republika Hrvatska

ADRESA: Pavla Šubića 10, 32100 Vinkovci

E-POŠTA: iva.skaramuca5@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2011. – 2015. Jezična gimnazija u Srednjoj školi Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci

2015. – 2018. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska

dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u

Osijeku