

Utjecaj polimorfizama gena za uridin-difosfo-glukuronil transferazu na interakcije lamotrigina i valproata

Klarica Domjanović, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:033078>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Iva Klarica Domjanović

**UTJECAJ POLIMORFIZAMA
GENA ZA URIDIN-DIFOSFO-
GLUKURONIL TRANSFERAZU
NA INTERAKCIJE
LAMOTRIGINA I VALPROATA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Iva Klarica Domjanović

**INFLUENCE OF URIDINE
DIPHOSPHATE
GLUCURONOSYLTRANSFERASE
GENE POLYMORPHISMS ON
LAMOTRIGINE AND VALPROATE
DRUG INTERACTIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Ovaj je doktorski rad izrađen u *Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb*, pod vodstvom *doc. dr. sc. Mile Lovrić*, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Od srca zahvaljujem mentorici, doc. dr. sc. Mili Lovrić, na stručnom vodstvu, svoj pruženoj pomoći, izuzetno korisnim savjetima, te na predanosti i ogromnom strpljenju i uloženom vremenu za vrijeme izrade ovoga doktorskog rada.

Zahvalila bih se članovima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Zrinki Mirković, Maji Mezak-Herceg te posebno Lani Ganoci, med.biokem., spec. na pruženoj pomoći.

Nadalje bih se zahvalila izv.prof. dr.sc Vladimiru Trkulji, dr.med na pruženoj pomoći i korisnim savjetima.

Također, zahvale mom mužu i obitelji koji su bili potpora u ostvarenju ovoga rada kojima ovaj rad i posvećujem

Anti, Ani, Marijanu i Marku.

UTJECAJ POLIMORFIZAMA GENA ZA URIDIN-DIFOSFO-GLUKURONOZIL
TRANSFERAZU NA INTERAKCIJE LAMOTRIGINA I VALPROATA

IVA KLARICA DOMJANOVIĆ
Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku,
Klinički bolnički centar Zagreb

SAŽETAK

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati ulogu polimorfizama nekih enzima UGT i CYP te transportera ABC u interindividualnoj varijabilnosti bioraspoloživosti lamotrigina i valproata. Uključeno je 205 pacijenata s dijagnosticiranom epilepsijom, podijeljenih u skupinu na monoterapiji lamotriginom (n=131) te skupinu na terapiji lamotriginom i valproatom (n=74). Koncentracija lamotrigina u serumu određena je metodom HPLC, dok je za koncentraciju valproične kiseline primijenjena enzim-imunokemijska metoda. Genotipizacija *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G, *UGT1A4* 70C>A, *ABCB1* 1236C>T, *ABCG2* 421C>A, je provedena metodom PCR u stvarnom vremenu koristeći testove TaqMan®. Koncentracije lamotrigina, prilagođene prema dobi, spolu, indeku tjelesne mase, bile su oko 2,4 puta veće u pacijenata na politerapiji s valproatom. Nije dokazan ukupan učinak varijantnih alela *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G i *UGT1A4* 70 C>A, *ABCB1* 1236C>T, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 na koncentracije lamotrigina i valproata. Uočena je značajna interakcija između alela *ABCG2* 421A u pacijenata na konkomitantnoj terapiji s lamotriginom i valproatom. Alel *ABCG2* 421A (vs. CC) povezan je sa 61% većom koncentracijom lamotrigina (P=0,019), dok je u pacijenata na monoterapiji lamotriginom alel 421A povezan s nešto manjom koncentracijom (vs. CC, P=0,085) ukazujući na značajnu razliku učinka alela *ABCG2* 421A ovisnu o primjenjenom lijeku (P=0,004). Koncentracije lamotrigina su značajno više u pacijenata na konkomitantnoj primjeni valproata bez obzira na genotip *ABCG2* 421C>A. Međutim taj utjecaj je dva puta veći u pacijenata nositelja alela *ABCG2* 421A (GMR=4,29) u odnosu na pacijente s genotipom 421CC (GMR=2,15).

Ključne riječi: lamotrigin, valproat, UGT, CYP, *ABCG2*, *ABCB1*, interakcija

Mentor: Doc.dr. sc. Mila Lovrić

Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Nada Božina

Izv. prof. dr. sc. Ana Galov

Izv. prof. dr. sc. Lidija Bach Rojecky

INFLUENCE OF URIDINE DIPHOSPHATE GLUCURONOSYL
TRANSFERASE GENE POLYMORPHISMS ON LAMOTRIGINE AND
VALPROATE DRUG INTERACTIONS

IVA KLARICA DOMJANOVIĆ

University Hospital Centre Zagreb, Department of Laboratory Diagnostics, Zagreb, Croatia

ABSTRACT

The aim of the proposed research was to investigate the role of UGTs, CYPs and ABCs transporter polymorphisms in interindividual variability of lamotrigine and valproate bioavailability. A total of 205 patients were enrolled, 131 treated with lamotrigine alone and 74 treated with lamotrigine and valproate. Determination of drug concentrations was performed by HPLC with diode array detector for lamotrigine and by immunoassay method for valproate. Genotyping of *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G, *UGT1A4* 70C>A, *ABCB1* 1236C>T, *ABCG2* 421C>A, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 was performed by real time PCR method, using TaqMan[®] assays. Lamotrigine trough concentrations, adjusted for age, sex, body mass index, dose, were around 2.4-fold higher in patients co-treated with valproate. There was no overall effect of variant allele of *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G, *UGT1A4* 70 C>A, *ABCB1* 1236C>T, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 either on lamotrigine or valproate trough or trough/dose corrected concentrations. But there appeared a significant interaction between A-allele carriage in lamotrigine-valproate-treated subjects. *ABCG2* 421A-allele carriage (vs. CC) was associated with 61% higher lamotrigine trough (P=0.019), whereas in lamotrigine-only-treated subjects, A-allele carriage was associated with somewhat lower trough (vs. CC p=0.085) indicating a significant (P=0.004) two-fold difference in A-allele effect between treatment subsets. Valproate was associated with significantly higher lamotrigine troughs regardless of the *ABCG2* genotype, but the effect appeared two-fold higher in *ABCG2* 421 A-allele carriers (GMR 4.29) than in 421CC-subjects (GMR 2.15).

Keywords: lamotrigine, valproate, UGT, CYP, *ABCG2*, *ABCB1*, interaction

Supervisor: Mila Lovrić, PhD

Reviewers: Nada Božina, PhD, Associate Professor

Ana Galov, PhD, Associate Professor

Lidija Bach Rojecky, PhD, Associate Professor

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Hipoteza i ciljevi istraživanja.	4
2. Literaturni pregled.....	6
2.1. Liječenje epilepsije	6
2.1.1. Lamotrigin.....	9
2.1.2. Valproat	12
2.2. Farmakogenetika	15
2.2.1. Farmakogenetika I. faze metabolizma lijekova	16
2.2.2. Farmakogenetika II. faze metabolizma lijekova	19
2.3. Transportni proteini	26
2.4. Farmakogenetika lamotrigina	29
2.5. Farmakogenetika valproične kiseline	30
3. Materijali i metode	31
3.1 Materijali	31
3.1.1. Ispitanici.....	31
3.1.2. Analitički materijal	32
3.2. Metode	32
3.2.1. Određivanje koncentracije antiepileptika	32
3.2.2. Genotipizacija	34
3.2.2.1. Izdavanje DNA	35
3.2.2.2. TaqMan metoda PCR u stvarnom vremenu	35
3.2.2.3. Genotipizacija <i>UGT1A4</i> *3 metodom PCR-RFLP	37
3.2.3. Statističke metode	45
3.2.3.1. Veličina uzorka i jačina testa	45
3.2.3.2. Statistika	45

4. Rezultati	48
4.1. Osobine ispitanika	48
4.1.1. Temeljna svojstva	48
4.1.2. Učinak valproata na raspoloživost lamotrigina.....	48
4.1.3. Učestalost pojedinih polimorfizama	50
4.2. Utjecaj genskih polimorfizama za enzime UGT i transportere ABC na izmjerene koncentracije lamotrigina i na interakciju lamotrigin-valproat	52
4.2.1. Prikaz podataka: koncentracije lamotrigina ovisno o terapiji i genskom polimorfizmu za enzime UGT i transportne proteine ABC.....	52
4.2.2. Analiza	55
4.3. Utjecaj genskih polimorfizama za enzime CYP2C9, CYP2C19, UGT i transportere MDR1/ABCB1 i ABCG2 na ravnotežne izmjerene koncentracije valproata	70
5. Rasprava	74
5.1 Utjecaj genskih polimorfizama za transportere ABCG2 i MDR1/ABCB1	75
5.2 Utjecaj genskih polimorfizama za enzime UGT i P450 (CYP)	81
5.3 Ograničenja i važnost provedene studije.	85
6. Zaključci.....	88
7. Literaturne reference	89
8. Životopis.....	107

1. UVOD

Interindividualna varijabilnost u odgovoru na primijenjeni lijek predstavlja važan klinički problem, jer uz željene učinke, mogu se pojaviti i različite neželjene posljedice, poput razvoja ozbiljnih nuspojava ili izostanka učinkovitosti. Biološki učinak lijeka na organizam ovisi o prirodi samog lijeka (npr. prisutnosti funkcionalnih skupina čijim se promjenama mijenja lipofilnost/hidrofilnost molekule, elektronskim svojstvima, stereokemijskoj građi, veličini i obliku molekule). Sudbinu lijeka u organizmu određuju različiti procesi kojima se lijek podvrgava, a koji uključuju apsorpciju, raspodjelu, metabolizam i izlučivanje (u literaturi poznati pod skraćenicom ADME). U navedenim procesima važnu ulogu imaju transportni proteini i metabolički enzimi kodirani polimorfnim genima zbog čega uočavamo varijabilnost u njihovoj ekspresiji i funkciji što u konačnici može rezultirati značajnom varijabilnosti farmakokinetičkih parametara.

Koncept "personalizirana medicina" je u posljednjem desetljeću sve prisutniji u medicinskoj praksi. Istraživanje genske osnove interindividualnih varijabilnosti u odgovoru na farmakoterapiju pod zajedničkom nazivom farmakogenetika/farmakogenomika relativno je novo područje kliničkih istraživanja. Iako spoznaja o genskoj varijabilnosti ima korijene u 60-im godinama dvadesetog stoljeća tek je razvoj molekularnih dijagnostičkih metoda i projekt ljudskog genoma omogućio opsežna farmakogenetička istraživanja. Osnovno načelo farmakogenetike je relativno jednostavno. Gensko nasljeđe neke osobe, fenotipski izraženo u strukturi, obliku ili koncentraciji proteina, može modificirati djelovanje lijeka na višestruke načine.

S boljim razumijevanjem interindividualnih razlika na razini DNA sekvence, unaprijeđena je naša sposobnost povezivanja učinaka nekog lijeka s određenim varijantama gena. Sve je to rezultiralo i većim fokusiranjem farmaceutske industrije, akademske zajednice, zdravstvenih profesionalaca te regulatornih tijela na istraživanja genetičke osnove varijabilnosti odgovora na farmakoterapiju.

Razvoj analitičke kemije pridonio je preciznom mjerenju koncentracija lijeka u različitim biološkim uzorcima što značajno doprinosi određivanju optimalne, individualne doze lijeka. Terapijsko praćenje koncentracija lijeka (engl. *Therapeutic drug monitoring* – TDM) često predstavlja jedino sredstvo za objektivizaciju terapije, jer je u mnogim slučajevima, zbog nedostatka drugih mjerljivih parametara teško ocijeniti samo djelovanje lijeka. Drugi problem su nuspojave i djelotvornost koje je također teško predvidjeti i izbjeći ako ne postoje jasni mjerljivi čimbenici.

U svrhu individualizacije terapije, postoje sve veći naponi za razvoj lijekova prikladnih za specifične podskupine bolesnika. Niz je primjera, koji govore o prednostima individualiziranog pristupa u odabiru lijeka i doze u odnosu na pristup koji se temelji na rezultatima farmakokinetičkih studija na populacijskoj razini. Farmakogenomika predstavlja važnu kariku "personalizirane medicine" s naglaskom na genomske i epigenomske čimbenike koji utječu na farmakokinetiku i farmakodinamiku, a bitna je i u razumijevanju interakcija lijekova. Dok je naše znanje o epigenomici kao modulatoru učinkovitosti farmakoterapije još uvijek u razvojnoj fazi, velika količina znanja o utjecaju genomskih čimbenika već je dostupna. Smatra se da genetička varijabilnost kao čimbenik doprinosi od 25% - 50% u ukupnoj neočekivanoj reakciji na lijek (Median i sur., 2012.). Može negativno utjecati na učinkovitost lijeka te povećati rizik razvoja nuspojava.

Genomski podaci su postali važni u procjeni djelotvornosti i sigurnosti lijeka i u regulatornom procesu njihovog odobrenja. Stoga se informacije o genomskim biljezima sve više uključuju u informacije o lijeku. Regulatorna tijela uvođenjem farmakogenomičkih informacija u Sažetke opisa svojstava lijeka (engl. *Summaries of product characteristics - SmPCs*) nastoje istaknuti ulogu i važnost genomskih varijabilnosti u farmakoterapiji. Također se navodi kojoj kategoriji te farmakogenetičke informacije pripadaju, tj. smatra li se farmakogenetičko testiranje obveznim, da li ima ulogu preporuke ili je samo informativnog karaktera.

Integriranje genomskih biomarkera u kliničke i druge studije, kao i podaci o metodologijama koje se koriste moraju slijediti određene principe koji uvažavaju i razmatraju utjecaj biomarkera na studiju i ishode analiza s intencijom maksimizacije koristi za pacijenta. Važan naglasak u asocijacijskim studijama je i na fenotipskim podacima koji trebaju udovoljiti međunarodnim standardiziranim kriterijima. Povezivanje farmakogenomike s farmakovigilancijom ima značajnu ulogu i u praćenju pojavnosti postmarketinških nuspojava.

Intenzivna istraživanja na području farmakogenetike/farmakogenomike rezultirala su za određeni broj lijekova uputama i smjernicama kako nalaz genetičke analize translatirati u preporuke i smjernice primjenjive u kliničkoj praksi. U području antiepileptika smjernice su izdate samo za lijek fenitoin i enzim CYP2C9, te karbamazepin vezano uz polimorfizme sustava HLA (PharmaGKB, 2017.). Međutim farmakogenetička istraživanja za lamotrigin i valproate još uvijek nisu rezultirala dostatnim dokazima za primjenu u kliničkoj praksi što je potaknulo i ovo istraživanje.

Epilepsija je često teško neurološko stanje koje zahvaća ljude svih dobnih skupina, rasa i socijalnih klasa. Trenutno u svijetu od epilepsije boluje preko 50 milijuna ljudi (WHO,

2017.). Epilepsija nije uniformno stanje te se sastoji od različitih tipova napadaja i epileptičkih sindroma. Epilepsiju karakterizira pojava napadaja koji nastaju zbog epizoda visokofrekventivnih izbijanja impulsa iz skupine neurona u mozgu. Abnormalno izbijanje započinje lokalno, ali se može širiti na okolna područja. O lokaciji primarnog izbijanja i opsegu širenja ovisit će i simptomi napadaja koji mogu biti u rasponu od kratkotrajnog poremećaja pažnje do potpuno razvijenog konvulzivnog napadaja koji traje nekoliko minuta.

Klasična klasifikacija napadaja temelji se na njihovim kliničkim i elektroencefalografskim obilježjima prema Internacionalnoj klasifikaciji epileptičkih napadaja iz 1989 g. (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989.). Zbog stalnih novih saznanja o toj bolesti, navedena klasifikacija je podložna stalnim promjenama. Epilepsija razlikuje dvije osnovne kategorije napada, parcijalne i generalizirane, iako postoje preklapanja i brojni podtipovi. Obje kategorije mogu biti jednostavne (bez gubitka svijesti) ili kompleksne (s gubitkom svijesti). Parcijalni napadaji su oni u kojima izbijanje počinje u jednom zarištu i često ostaje lokalizirani. Simptomi ovise o tome koje je područje zahvaćeno i uključuje nevoljne mišićne kontrakcije, abnormalne senzorne fenomene te promjene raspoloženja i ponašanja. Kompleksni parcijalni napadaji ubrajaju se među najčešće oblike epilepsije. Generalizirani napadaji zahvaćaju cijeli mozak i rezultiraju trenutnim gubitkom svijesti. Dvije osnovne vrste generaliziranih napadaja su tonično-klonični napadaji (*grand mal*) i apsans (*petit mal*). Tonično-klonični napadaj započinje snažnom kontrakcijom cijele muskulature, zaustavlja se disanje, dolazi do salivacije, mokrenja i defekacije. Tonična faza traje oko jednu minutu, nakon čega slijedi niz silovitih, sinkroniziranih trzaja (klonična faza). Apsansi se pojavljuju najčešće u djece, manje su dramatični od tonično-kloničnih napadaja, ali događaju se češće (više napadaja tijekom jednog dana). Obično bolesnik prestaje s aktivnošću kojom se bavio (npr. zaustavljajući se u pola rečenice), bez motoričkih poremećaja, nesvjestan svoje okoline. Posebno teška vrsta epilepsije u djece je *Lennox-Gastaut*, popraćena progresivnom metalnom retardacijom. Epilepsija često nema prepoznatljivog uzorka, iako se može razviti zbog oštećenja mozga nakon traume, infekcije, tumora ili zbog drugih neuroloških bolesti, uključujući nasljedne neurološke sindrome (Rang i sur., 2006.).

Trenutno na tržištu postoji cijeli niz lijekova za liječenje epilepsije, koji uključuje lijekove sa različitim mehanizmom djelovanja, farmakokinetikom, djelotvornošću i tolerancijom, stoga je izbor pravog lijeka za liječenje epilepsije trajni izazov. Iako je dostupan veliki broj antiepileptika i dalje jedna četvrtina pacijenata nema učinkovitu terapiju. Liječenje epilepsije monoterapijom je učinkovito u 60-70% novo-dijagnosticiranih bolesnika.

Dodavanjem novog antiepileptika uz već postojeću terapiju postiže se učinkovita kontrola napadaja samo u polovice preostalih 30-40% bolesnika. Glavni izazov u primjeni politerapije su potencijalne interakcije. Prema literaturnim navodima 6% pacijenata je iskusilo intoksikaciju antiepilepticima zbog interakcije lijekova (Patsolas i sur., 2002.).

U svakodnevnoj kliničkoj praksi pri praćenju koncentracija antiepileptika uočava se značajna varijabilnost u njihovim koncentracijama. Među različitim čimbenicima, polimorfizam enzima odgovornih za metabolizam različitih antiepileptika nametnuo se kao jedna od važnih odrednica varijabilnosti bioraspoloživosti antiepileptika. Najviše interakcija antiepileptika uočeno je na metaboličkoj razini jer većina antiepileptika utječe na aktivnost metaboličkih enzima. Između ostalih klinički su važne interakcije lamotrigina (LTG) s valproičnom kiselinom (VPA). Valproična kiselina inhibira aktivnost enzima odgovornih za metabolizam lamotrigina i tako povećava koncentraciju lamotrigina u plazmi do 211% (May i sur., 1999.) što ukazuju na potrebu za terapijskim praćenjem koncentracija lijeka.

Bioraspoloživost lamotrigina u politerapiji s valproatom određena je prvenstveno metabolizmom lamotrigina i valproata koji uključuje glukoronidacijski put posredovan enzimima uridin-difosfo-glukuronozil transferazama (UGT) među kojima su najvažniji UGT1A4 i UGT2B7 (Rowland i sur., 2006.), a koji pokazuju značajnu genetičku varijabilnost. Metabolizam valproata je manjim dijelom ovisan i o funkciji enzima citokroma P450(CYP). Nadalje, značajnu ulogu u raspodijeli oba lijeka ima varijabilna funkcija transportnih proteina iz superporodice ABC.

1.1. Hipoteza i ciljevi istraživanja

Polimorfizam metaboličkih enzima UGT, CYP i transportnih proteina ABC može značajno utjecati na bioraspoloživost lamotrigina i valproata a time i na dometa interakcija ova dva lijeka primjenjena u bolesika s epilepsijom.

Zbog značajne interindividualne varijabilnosti u koncentracijama lamotrigina i valproata, te varijabilnosti dometa interakcija ova dva lijeka, primijenjena u konkomitantnoj terapiji za liječenje epilepsije, glavni cilj ovog istraživanja je:

- ispitati ulogu genskih polimorfizama *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G, *UGT1A4* 70C>A, *ABCB1* 1236 C>T i *ABCG2* 421 C>A u interindividualnoj varijabilnosti bioraspoloživosti lamotrigina i valproata te u njihovoj interakciji

Pojedinačni ciljevi:

- odrediti koncentracije lamotrigina u ispitanika na mono i politerapiji s valproičnom kiselinom
- ispitati učestalost pojedinih alela i genotipova *UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G, *UGT1A4* 70C>A, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2, *CYP2C19**17, *ABCB1* 1236 C>T i *ABCG2* 421 C>A
- prikazati odnos primjenjene doze i koncentracije na kraju doznog intervala (engl. *trough*, koncentracija u plazmi ispitanika prije sljedeće doze) prema genotipu enzima UGT i transportera ABC
- statističkim metodama testirati povezanost pojedinih alela i genotipova s vrijednostima koncentracija lamotrigina i valproata u mono i politerapiji, također i u odnosu na kovarijate: dob, spol, indeks tjelesne mase i druge lijekove
- ispitati povezanost polimorfizama *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 s koncentracijama valproata.

Metode koje su primijenjene u istraživanju su metode genotipizacije temeljene na lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu, te metode za određivanje koncentracija lijekova tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) za lamotigin i imunokemijska metoda za valproate.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. LIJEČENJE EPILEPSIJE

Termini antiepileptici i antikonvulzivi upotrebljavaju se kao sinonimi, a označavaju lijekove koji se koriste za liječenje epilepsije i nespecifičnih poremećaja s konvulzijama. Neki antiepileptici se također koriste i za liječenje drugih stanja osim epilepsije, uključujući migrenu, neuropatsku bol, bipolarni poremećaj, anksioznost i mnoga druga stanja. Iako postoje brojni dostupni antiepileptici na tržištu, još uvijek je jedna četvrtina bolesnika rezistentna na terapiju (Kwan i sur., 2011.). Stoga postoji potreba za učinkovitijim i specifičnijim antiepilepticima. U tijeku su brojne kliničke studije u kojima se ispituju novi potencijalni antiepileptici s različitim mehanizmima djelovanja. Drugi izazov u primjeni antiepileptika su nuspojave. Kako je liječenje antiepilepticima dugotrajno, povećava se i potencijal nastanka nuspojava.

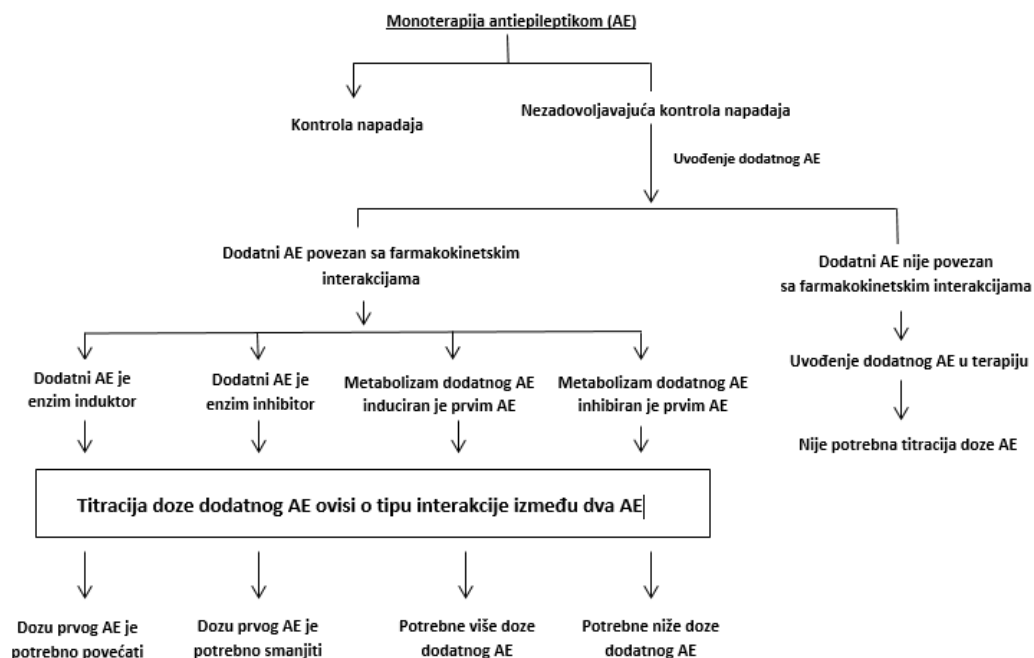
Antiepileptike možemo podijeliti u dvije osnovne skupine (Tablica 1.) s obzirom na godinu početka uporabe: „antiepileptici prve generacije tzv. stari antiepileptici“ i „antiepileptici druge generacije tzv. novi antiepileptici“ (Hajnšek i sur., 2010.).

Tablica 1. Podjela antiepileptika prema godini početka uporabe

„Stari“ antiepileptici	„Novi“ antiepileptici
Fenobarbiton (PB) 1912	Lamotrigin (LTG) 1991
Metilfenobarbiton (MPB) 1932	Gabapentin (GBP) 1993
Fenitoin (PHT) 1938	Topiramat (TPM) 1995
Acetazolamid (ACT) 1950	Levetiracetam (LEV) 2000
Etosuksimid (ETS, ESC) 1958	Pregabalin (PGB) 2004
Karbamazepin (CBZ) 1974.	Okskarbazepin (OXC) 2000
Piracetam (PCT) 1978	Zonisamid (ZON) 2005
Klonazepam (CNZ) 1974	
Valproati (VPA) 1963	

Većina antiepileptika prve generacije nema širok spektar djelovanja obzirom na tip epilepsije, ali ima dobru učinkovitost. Njihova uporaba je u velikoj mjeri ograničena zbog pojave velikog broja nuspojava i interakcija poglavito povećanjem doze lijeka. Antiepileptici druge generacije odlikuju se boljim farmakokinetским svojstvima, imaju manje nuspojava, ali kliničke studije ukazuju na manju učinkovitost u novodijagnosticiranih parcijalnih epilepsija (Hajnšek i sur., 2010.).

Izbor antiepileptika ovisi o učinku lijeka na epileptički napadaj, ali i o njegovim nuspojavama. Primjena antiepileptika zahtjeva poznavanje kinetike i dinamike lijeka te mehanizme mogućih interakcija. Terapija antiepilepticima predstavlja kompromis između terapijske djelotvornosti i neželjenih učinaka.



Slika 1. Interakcije antiepileptika u politerapiji (prilagođeno prema Patsalos i sur., 2003.)

Znanje o interakcijama lijekova i njihovim mehanizmima, odnosno svijest liječnika o mogućnosti interakcija i njezinim posljedicama, te poduzimanje preventivnih mjera može bitno pomoći u njihovom izbjegavanju. Prema mehanizmu nastanka, interakcije mogu biti farmakokinetičke i farmakodinamske. Farmakokinetičke interakcije mogu biti na razini: apsorpcije, raspodjele u različite odjeljke, metabolizma i izlučivanja lijeka, te mogu utjecati na učinkovitu koncentraciju na mjestu djelovanja lijeka. Uzroci mogu biti formiranje kompleksa, natjecanje za prijenosnike za unos ili indukcija/inhibicija metaboličkih enzima i prijenosnika za izbacivanje (Božina i sur., 2013.). Farmakodinamska interakcija se očituje promjenom učinka lijeka bez promjene njegove koncentracije na mjestu djelovanja, a posljedica je npr. kompetitivnog antagonizma na istom receptoru, antagonizma farmakološkog učinka drugog lijeka na različitim receptorima, funkcionalnog synergizma ili mehanizama koji dovode do istog ili suprotnog učinka (Francetić i sur., 2014.).

Najznačajnije farmakokinetičke interakcije među antiepilepticima su one koje su vezane za inhibiciju ili indukciju metaboličkih enzima (Slika 1). Najveća skupina interakcija

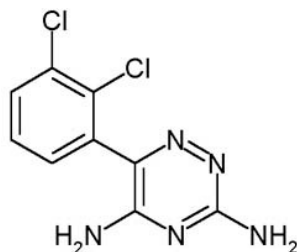
je posljedica enzimske indukcije. Karbamazepin, fenitoin i fenobarbital su potencijalni induktori enzima, koji mogu povećati aktivnost različitih citokroma P450 ili enzima UGT što rezultira ubrzanim metabolizmom i nižim koncentracijama lijeka, uključujući druge antiepileptike primjenjene u politerapiji. Na primjer, koncentracija valproične kiseline se smanjuje za 76%, 49% ili 66% u pacijenata s dodatnom terapijom fenobarbitalom, fenitoinom odnoso karbamazepinom (May i sur, 1985.). Karbamazepin, fenobarbital i fenitoin mogu inducirati metabolizam topiramata (Gidal i sur., 2002.), tiagabina (Samara i sur., 1998.), oksarmazepina i njegovog aktivnog monohidroksi-metabolita (Tartara i sur., 1993.). Induktori također mogu utjecati i na koncentraciju drugih lijekova, kao što su psihotropni lijekovi (Sapine i sur., 2002.), oralni kontraceptivi (Shorvon i sur., 2002.) i citostatiki (Vecht i sur., 2003.). Antiepileptici novije generacije ne induciraju enzime u značajnijoj mjeri, osim topiramata i oksarmazepina koji pokazuju slabiji stupanj indukcije. Jedna studija je pokazala da topiramat može sniziti koncentraciju lamotrigina (Wnuk i sur., 1999.), iako većina drugih studija to nije dokazala (Berry i sur., 2002.). Česte su i interakcije lijekova koje su posljedica inhibicije metaboličkih enzima. Valproična kiselina je najznačajniji inhibitor među antiepilepticima. Opisan je utjecaj na porast koncentracija fenobarbitala (Kapetanovic i sur., 1981.) i lamotrigina (Rambeck i sur 1993., May i sur., 1996.). Od antiepileptika novije generacije jedino felbamat pokazuje značajniju inhibiciju enzima, te može povisiti koncentracije valproične kiseline (Wagner i sur., 1994.), fenobarbitala (Reidenberg i sur., 1995.) i karbamazepin-10,11-epoksida (Albani i sur., 1999.).

Osim farmakokinetičkih interakcija među antiepilepticima, postoje i značajne farmakodinamske interakcije. Iako je interakcija lamotrigina i valproične kiseline složena i rezultira inhibicijom metabolizma lamotrigina, nekoliko studija je dokazalo značajan utjecaj na liječenje refraktornog kompleksnog parcijalnog napada, izostanka napadaja i drugih tipova napadaja. Međutim bolesnici koji primaju navedenu kombinaciju lijekova također mogu imati toksični učinak (Patsalos i sur., 2003.). Nadalje, farmakodinamska interakcija karbamazepina i lamotrigina može uzrokovati neurotoksične simptome, poput glavobolje, mučnine, vrtoglavice i ataksije što ukazuje na potrebu za smanjenjem doze karbamazepina (Besag i sur., 1998.).

Za brojne antiepileptike određen je optimalni raspon serumske koncentracije što može koristiti kao smjernica za individualizaciju terapije. Serumske koncentracije antiepileptika treba tumačiti fleksibilno s obzirom na bolesnika koji imaju optimalan odgovor na terapiju i izvan terapijskog raspona. Prilagodba doze mora biti vođena kliničkom slikom bez obzira na koncentracije lijeka u krvi. Terapijsko praćenje lijeka korisno je za procjenu

nezadovoljavajućeg odgovora na terapiju ili za prilagodbu doze kod promjenjene farmakokinetike (npr. prilikom uvođenja ili ukidanja interaktivog lijeka) (Neels i sur., 2004., Perucca, 2000.).

2.1.1. LAMOTRIGIN



Slika 2. Kemijska struktura lamotrigina

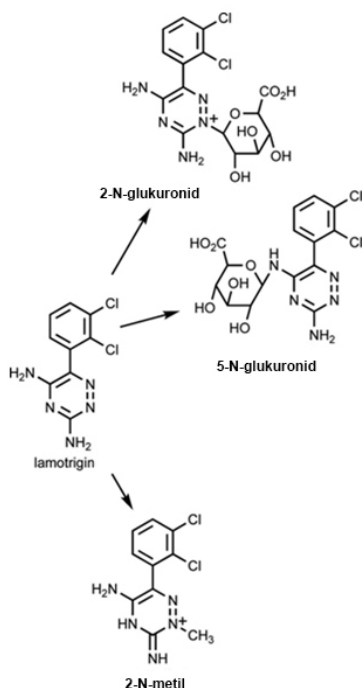
Lamotrigin je prvi put sintetiziran 1970-tih godina pri pokušaju sinteze spoja s antifolatnim učinkom jer se smatralo da je upravo antifolatni učinak temelj djelotvornosti nekih antikonvulziva (npr. fenitoina). Iako je antifolatni učinak lamotrigina bio slab, pokazao se djelotvornim u testovima antikonvulzivne aktivnosti (Messenheimer, 1995.). Kemijska struktura lamotrigina je feniltriazin (Slika 2.) i nije kemijski srodna niti jednom drugom antiepileptiku. Lamotrigin je u kliničkoj uporabi u svijetu više od 10 godina, a prvo odobrenje u Republici Hrvatskoj izdano je 1995. godine.

Lamotrigin je antiepileptik novije generacije koji se koristi za monoterapijsko ili dodatno liječenje parcijalne i generalizirane epilepsije, uključujući tonično-klonične napadaje te za napadaje povezane s *Lennox-Gastautovim* sindromom. Djelotvoran je i za apsans napadaje. Koristi se za liječenje bipolarnog poremećaja, te kao prevencija depresivnih epizoda u bolesnika s bipolarnim poremećajem kod kojih su dominantne depresivne epizode (Lamictal, Sažetak opisa svojstava lijeka, HALMED, 2016.). Primarni mehanizam djelovanja lijeka je inhibicija o voltaži ovisnih natrijevih kanala te posljedično stabiliziranje presinaptičke membrane. Također inhibira otpuštanje ekscitacijskih neurotransmitera, posebice glutamata (neurotransmiter koji ima ključnu ulogu u stvaranju epileptičnih napadaja) (Leach i sur., 1986.). Navedeni učinak razlog je njegove djelotvornosti u parcijalnoj epilepsiji. Smatra se da lamotrigin inhibira i o voltaži ovisne kalcijeve kanale, što bi objasnilo njegovu djelotvornost u primarnim generaliziranim napadajima, uključujući i apsanse (Porter i sur., 2011.).

Nakon oralne primjene lamotrigin se gotovo u potpunosti apsorbira (98%), te pokazuje lineranu kinetiku u terapijskim dozama od 30 - 450 mg. Apsorpcija lamotrigina neovisna je o hrani (Fitton i sur., 1995.), a maksimalna koncentracija (C_{max}) postiže se unutar 1 do 3 sata

nakon oralne primjene. Volumen raspodjele lamotrigina iznosi 0,9-1,2 L/kg (Cohen i sur., 1987., Ramsay i sur., 1991.), a vezanje za proteine plazme je oko 55% (Miller i sur., 1986.).

Lamotrigin se primarno metabolizira glukuronidacijom, djelovanjem UGT enzima, osobito izoenzimima UGT1A4 (Hiller i sur., 1999.), UGT1A1 (Posner i sur., 1989.) i UGT2B7 (Rowland i sur., 2006.). Konjugacijom glukuronske kiseline na dušikovim atomima triazinskog prstena nastaju neaktivni N-glukuronidni metaboliti (2-N i 5-N gluronidi). Oko 70% pojedinačne doze lamotrigina izlučuje se mokraćom (10% nepromijenjeno, 75-90% u obliku 2-N glukuronida, te u manjoj mjeri kao 5-N glukuronid) (Goa i sur., 1993.). Pronađen je i 2-N metil derivat (0,14%), a oko 2% metaboliziranog lamotrigina izlučuje se stolicom (Sidhu i sur., 2006.). (Slika 3.)

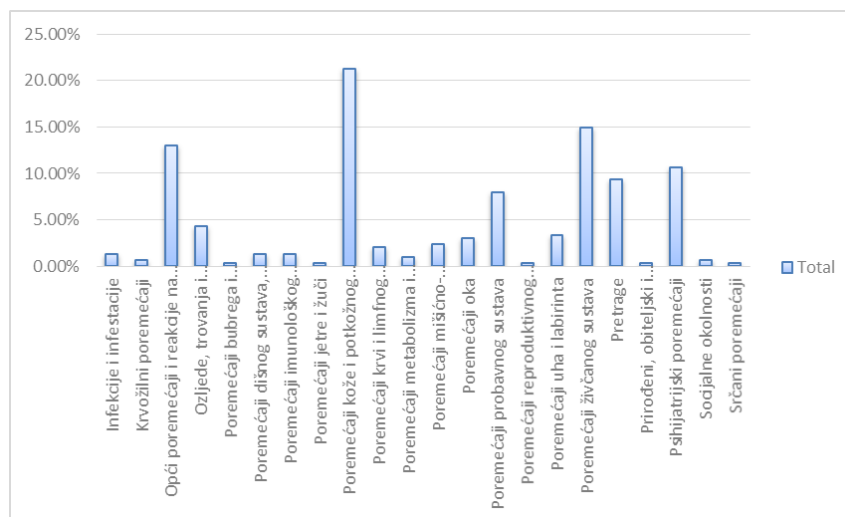


Slika 3. Metabolizam lamotrigina (prilagođeno prema Wei i sur., 2007.)

Polvrijeme izlučivanja lamotrigina u zdravih ispitanika iznosi od 22,8 do 37,4 h nakon jedne doze i kod ravnotežne koncentracije. (Rambeck i sur., 1993.). Izlučivanje se može značajno smanjiti (13,5 - 15 h) u bolesnika na politerapiji s antiepilepticima, induktorima metaboličkih enzima (npr. karbamazepin, fenitoin i fenobarbital), a može se i udvostručiti (do 60 h) u politerapiji s antiepilepticima inhibitorima enzima (npr. valproična kiselina.) uz porast koncentracije lamotrigina za 211% (May i sur., 1996., Almedia i sur., 2006. i Rambeck i sur.,

1993.). Izlučivanje lamotrigina ovisi o raznim čimbenicima poput dobi bolesnika, politerapije, trudnoće, naravi bolesti i dr. Zbog velike interindividualne varijabilnosti, smatra se da je potrebno individualizirati terapiju praćenjem koncentracije lamotrigina (Johannessen i sur., 2006.).

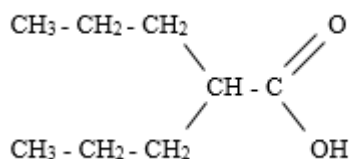
Nuspojave povezane s terapijom lamotiginom uglavnom su povezane sa središnjim živčanim sustavom, a najčešće su: vrtoglavica (50%), diplopija (33%), ataksija (24%), zamućen vid (23%) i pospanost (14%). Zabilježene su i kožne reakcije, koje su se općenito javljale tijekom prvih osam tjedana od početka liječenja lamotiginom. Većina osipa je blagog i ograničenog intenziteta, ali prijavljeni su i slučajevi izraženog osipa koji zahtijeva hospitalizaciju i prekid primjene lamotrigina. Teški osipi uključuju potencijalno po život opasne kliničke slike, kao što su Stevens–Johnsonov sindrom (SJS), toksična epidermalna nekroliza (TEN) i reakcija na lijek s eozinofilijom i sistemskim simptomima (engl. *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms* - DRESS); također poznat kao sindrom preosjetljivosti (HSS) (Goa i sur., 1993). Prema dostupnim bazama podataka Agencije za lijekove i medicinske proizvode Republike Hrvatske (HALMED), za lamotigin je ukupno prijavljeno 302 nuspojave u razdoblju od 01.01.2011.-21.10.2016. Prikazane nuspojave podijeljene su prema organskim sustavima (Slika 4). Nuspojave su najčešće vezane za: poremećaj kože i potkožnih tkiva (21,26%), poremećaj živčanog sustava (14,95%), opće poremećaje i reakcije na mjestu primjene (12,96%) u koje se ubraja umor i povećanje tjelesne temperature te psihijatrijske poremećaje (10,63%).



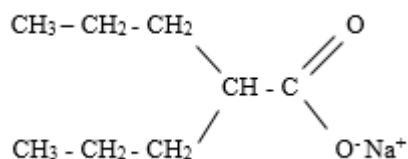
Slika 4. Nuspojave prijavljene u RH u razdoblju od 01.01.2011.-21.10.2016.

(izvor: nacionalna baza nuspojava HALMED-a)

2.1.2 VALPROAT



Slika 5. Kemijska struktura valproične kiseline



Slika 6. Kemijska struktura natrij valproata

Valproat je jednostavna monokarboksilna kiselina (masna kiselina), sintetizirana još 1881.g., ali se nije koristila u farmaciji sve dok 1963. nisu slučajno otkrivena njena antiepileptička svojstva (Plavšić i sur., 1992.). Valproat je prvi put odobren u Francuskoj 1967. u obliku kiseline i u obliku soli (natrij valproat) (Perucca, 2002.) dok je u Republici Hrvatskoj prvi put odobren 2001.g. Nakon apsorpcije, sve molekularne strukture se razgrađuju do iona valproata (Fagundes, 2008.). VPA se koristi za liječenje generaliziranih konvulzija kao što su toničko-kloničke (grand mal), apsans (petit mal), miokloničke i atoničke konvulzije te kod parcijalnih (fokalnih) konvulzija. VPA se koristi i za liječenje bipolarnog poremećaja i drugih neuroloških stanja kao što su migrena i neuropatska bol (Johannessen i sur., 2003.). Također se istražuje utjecaj VPA kao dodatne terapije u liječenju tumora i HIV-a, zbog njegovog inhibitornog djelovanja na histon-deacetilazu (Terbach i sur., 2009.). Iako je mehanizam djelovanja VPA detaljno istražen, uloga predloženih mehanizama djelovanja i dalje nije sasvim jasna. Nekoliko studija pokazalo je kako VPA potencira GABA-ergični (gama-aminomaslačna kiselina) inhibitorni učinak preko više mehanizama, kao što su: inhibicija razgradnje GABA-e inhibicijom GABA transaminaze i sukcinil semialdehid dehidrogenaze, povećanje sinteze GABA-e i smanjenje ponovne pohrane. Međutim, druge studije su pokazale kako pri terapijskim koncentracijama valproata, koncentracije GABA-e nisu promijenjene (Johannessen i sur., 2003.). VPA blokira ekscitacijske informacije putem NMDA receptora, (N-metil-D-aspartat) te blokira Na^+ , Ca^{2+} i K^+ kanale (Chateauvieux i sur., 2010.) iako prema nekim studijama nema uvjerljivih dokaza da pri terapijskim koncentracijama VPA blokira o voltaži ovisne natrijske kanale (Löscher, 2002.).

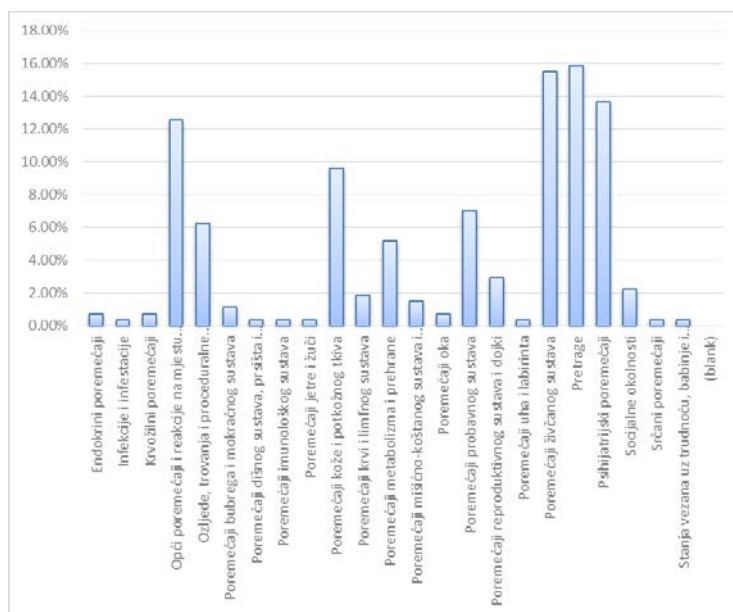
VPA se nakon oralne primjene u cijelosti apsorbira i ima 100 %-tnu biološku raspoloživost, a apsorpcija je osobito dobra kada se lijek uzima natašte. Maksimalne koncentracije se postižu 2 h nakon primjene, ovisno i o farmaceutskom obliku. Kod farmaceutskih oblika sa sporim otpuštanjem djelatne tvari, vrijeme do postizanja maksimalne

koncentracije iznosi 2 - 6 h. Oko 90% VPA u krvi veže se na albumine, a visoko vezanje na proteine plazme povezano je s različitim interakcijama. U fiziološkim uvjetima 90% VPA je u ioniziranom stanju, što doprinosi malom volumenu raspodjele, uglavnom u ekstracelularnoj tekućini. Povezanost doze i učinka, odnosno između koncentracije u plazmi i učinka, nije u potpunosti razjašnjena (Plavšić i sur., 1992., Porter i sur., 2011.).

VPA se metabolizira: (1) glukuronidacijom u jetri, (2) β -oksidacijom u mitohondrijima (oba puta se smatraju glavnima obzirom da se metabolizira oko 50% odnosno 40% primjenjene doze) i (3) oksidacijom s citkromom P450 (CYP) (metabolizira se oko 10% primjenjene doze) (Ghodke-Puranik i sur., 2013.). Samo 5% apsorbirane doze izlučuje se nepromijenjeno mokraćom. Metabolizmom VPA nastaje oko 50 različitih metabolita od kojih su neki odgovorni za antiepileptički učinak, a neki za toksični učinak (Silva i sur., 2008.). Studije *in vitro* na mikrosomima ljudske jetre su pokazale kako je proces metabolizma glukuronidacije posredovan UGT enzimima i to UGT 1A3, UGT 1A4, UGT 1A6, UGT 1A9, UGT 1A10 i UGT 2B7. Među važnije CYP enzime koji sudjeluju u metabolizmu VPA spadaju CYP 2C9, CYP 2A6 i CYP 2B6 (Kiang i sur., 2006.). Neka istraživanja su pokazala značajan utjecaj i enzima CYP 2C19 na farmakokinetiku valproata (Jiang i sur., 2009., Voso i sur., 2009.).

VPA dobro podnosi većina pacijenata, premda je u literaturi opisan široki spektar različitih nuspojava. Među najčešće nuspojave spadaju mučnina, tremor, povećanje tjelesne težine, gastrointestinalne smetnje, anemija, trombocitopenija, halucijancije, agresivnost i dr. (Depakine-chrono, Sažetak opisa svojstava lijeka, HALMED, 2017.). Moguća teratogenost i hepatotoksičnost su najozbiljnije nuspojave valproične kisline. U većini slučajeva oštećenja jetre pojavljuju se uglavnom tijekom prvih 6 mjeseci liječenja, a najviši rizik imaju dojenčad i djeca mlađa od tri godine s teškim konvulzivnim poremećajima, oštećenjem mozga i/ili kongenitalnim metaboličkim ili degenerativnim bolestima s mentalnom retardacijom, zbog nerazvijene jetrene funkcije. U odraslih je također opisana hepatotoksičnost, za koju se smatra da su odgovorni metaboliti 4-en i 2,4-dien-VPA koji nastaju oksidacijom putem enzima CYP (Bialer, 2007.). Teratogeni utjecaj VPA je dobro poznat, ali mehanizam nastanka nije u potpunosti razjašnjen. Kao potencijalni uzroci smatraju se utjecaji VPA na sintezu metionina, ciklus folne kiseline, povećanje oksidativnog stresa i inhibitornog učinka na histon-deacetilazu. Podaci pokazuju da izloženost valproatu može štetno utjecati na mentalni i fizički razvoj djece. Uzimanje folne kiseline prije trudnoće smanjuje rizik od oštećenja neuralne cijevi, pa se ta mjera često primjenjuje (Llyod, 2013.).

Prema dostupnim bazama podataka HALMED-a, za VPA je prijavljeno ukupno 271 nuspojava u radzdooblju od 01.01.2011.-21.10.2016. Prikazane nuspojave podijeljene su prema organskim sustavima (Slika 7). Nuspojave su najčešće vezane za područje pretraga (16%) u koje spada porast tjelesne težine, poremećaja živčanog sustava (15%), psihijatrijskih poremećaja (14%) i općih poremećaja i reakcija na mjestu primjene (13%) u koje spadaju interakcije sa drugim lijekovima i neučinkovitost lijeka.



Slika 7. Nuspojave prijavljene u RH u radzdooblju od 01.01.2011.-21.10.2016.

(izvor: nacionalna baza nuspojave HALMED-a)

Interakcije s drugim lijekovima najčešće nastaju na razini metabolizma ili vezanjem za bjelančevine plazme. Do sada je registrirano da valproična kiselina stupa u interakciju s 731 lijekom, od kojih se 21 interakcija smatra značajnom (Drugs.com, 2016.). Kiseline mogu promijeniti opseg vezanja za bjelančevine, npr. acetilsalicilna kiselina može istisnuti valproičnu kiselinu s albumina, posljedično povećavajući njezinu koncentraciju u plazmi (Sandson i sur., 2006.). S druge strane, VPA može istisnuti niz drugih tvari s bjelančevina, npr. fenitoin te posljedično povećati koncentraciju fenitioina (Tsanaclis i sur., 1980.). Nekoliko studija pokazalo je kako antibiotici karbapenem i imipenem značajno smanjuju serumsku koncentraciju VPA, posljedično smanjujući terapijsku aktivnost VPA. Mehanizam te interakcije još uvijek nije poznat (Lee i sur., 2012.).

2.2. FARMAKOGENETIKA

Pojam farmakogenetike nastao je 50-ih godina 20. stoljeća, nakon otkrića genetički determinirane toksične reakcije na antituberkulotik izoniazid i antimalarik primakin te konačno nakon istraživanja Wernera Kalowa i suradnika o sukcinilkolinskoj apneji. Uvođenje izoniazida značio je velik pomak u liječenju tuberkuloze. Nakon početne široke primjene uslijedila je spoznaja o nasljednoj varijabilnosti u metabolizmu odnosno usporenoj acetilaciji izoniazida, zbog smanjene aktivnosti enzima N-acetiltransferaze 2 (NAT2) (Evans i sur., 1964.). Nadalje, u istraživanjima varijabilnosti učinka depolarizirajućeg miorelaksansa sukcinilkolina uočen je ekstremni učinak u malog broja bolesnika nazvan sukcinilkolinska apnea. Reakcija je uzrokovana naslijeđenom hipofunkcionalnom inačicom butirilkolinesteraze (pseudokolinesteraza) s niskim afinitetom vezivanja supstrata. Prvi opisi temeljili su se na spektrofotometrijskim istraživanjima afiniteta enzima i supstrata, dok su kasnije uslijedile deskripcije više disfunkcionalnih varijanti gena za pseudokolinesterazu (Kalow i sur., 1952.). Termin „farmakogenetika“ prvi put upotrebljava Friedrich Vogel 1959. godine u svom članku „*Moderne Probleme der Humangenetik*“ (Vogel i sur., 1959.). Uz to 1962. godine Kalow objavljuje prvi udžbenik o farmakogenetici (*Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs*) (Kalow, 1962.). Razvojem znanstvene discipline farmakogenetike-farmakogenomike pojavile su se brojne asocijacijske studije o ulozi genetičke predispozicije na učinkovitost i neželjene nuspojave farmakoterapije. Rezultati istraživanja ističu, da se uz kliničke čimbenike kao što su dob, spol, konkomitantne bolesti i terapija, funkcija jetre i bubrega, čimbenike iz okoliša (hrana, navike poput pušenja i pijenja alkohola) i nasljedne farmakogenetičke varijacije uključuju u stvaranje algoritama za odabir najprikladnijeg lijeka i doze za svakog pojedinog bolesnika te identificiraju bolesnici s povećanim rizikom razvoja neželjenih nuspojava i prije početka terapije.

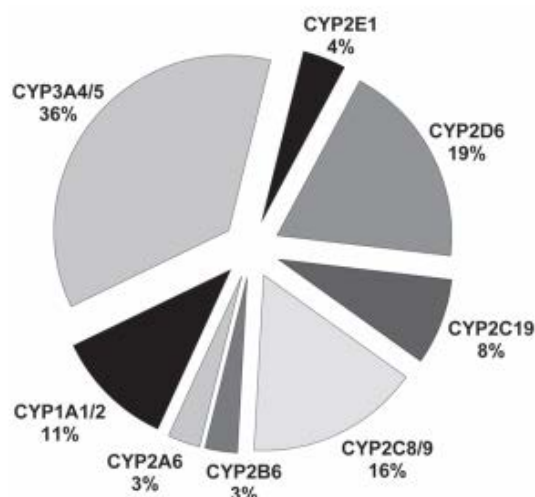
Važnost farmakogenetičkih informacija u informacijama o lijeku prepoznala je Europska Agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA). Sve je veći broj odobrenih lijekova od strane EMA-e koji sadrži informacije o farmakogenomici i to u području terapijske indikacije (3,5%), doziranju (4,4%) te kontraindikaciji (6,4%) (Ehmann i sur., 2015.). Dodatno, EMA je od 2003.g. izdala oko 15 različitih smjernica vezanih za farmakogenetiku u kojima je naglašeno kako bi farmakogenetika trebala biti integralni dio ranog razvoja lijekova (European Medicines Agency, 2012.). Radi brzine priljeva novih istraživačkih rezultata (nakon davanja odobrenja lijeku) postaje jasna potreba za sustavnim prikupljanjem, pregledom i uređenjem sažetih farmakogenetičkih informacija "na jednom

mjestu". Među prvim sustavnim bazama podataka o farmakogenetici osnovana je *Pharmacogenomics Knowledge Base* (PharmGKB) 2000. g. u sustavu Sveučilišta Stanford u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD), te je u međuvremenu prerasla u glavnu javno dostupnu specijaliziranu bazu publikacija i genetičko-kliničkih informacija o relevantnim odnosima gen-lijek (Whirl-Carrillo i sur., 2012.). Također, na nacionalnoj osnovi formiraju se društva, tako primjerice 2005.g. započinje s radom nizozemska farmakogenetička radna skupina (engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group - DPWG*) koja sustavnim proučavanjem i izradom smjernica te utjecajem na svoj nacionalni sustav zdravstva prednjači kako u spoznajnom tako i izvedbenom dijelu korištenja farmakogenetičkog znanja (Sven i sur., 2008.). Međunarodni konzorcij *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) osnovan je 2009.g. u sastavu Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) u SAD-u, koji prati i sumira globalno relevantne publicirane farmakogenetičke podatke te objavljuje dostupne smjernice s deklariranom razinom dokaza, koje u datom trenutku omogućuju najveću moguću razinu primjene dostupnog farmakogenetičkog znanja (Relling i sur., 2011.).

2.2.1. FARMAKOGENETIKA I. FAZE METABOLIZMA LIJEKOVA

Više od 70% različitih ksenobiotika lipofilnih svojstava, uključujući lijekove, metabolizira se oksidativnim procesima nazvanim reakcijama I. faze. Od toga, gotovo 90% svih oksidativnih reakcija kataliziraju citokromi P450, čija se superporodica gena i proteina označava simbolom CYP, koji kataliziraju oksidativnu biotransformaciju lipofilnih supstrata u polarnije metabolite. U humanom genomu je identificirano i strukturno definirano 57 gena koji kodiraju 57 funkcionalnih enzima (Rendić i sur., 2013a.).

Od ukupno 57 funkcionalnih enzima citokroma P450, pet enzima CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4/5 katalizira 90-95% reakcija u kojima kao supstrat sudjeluju lijekovi. Od toga gotovo 36% otpada na enzime CYP3A4/5 (Slika 8.). Za metabolizam lijekova, važna osobina navedenih enzima je izražen genetički polimorfizam, te inhibicija i indukcija enzimske aktivnosti lijekovima i drugim ksenobioticima.



Slika 8. Enzimi citokoma P450 koji najviše stupaju u interackije s lijekovima (Kasuba i sur., 2001.)

Genski polimorfizam određuje četiri različita fenotipa s obzirom na intezitet metabolizma (1) spori metabolizator (engl. *poor metabolizer*, PM), (2) srednje brzi metabolizator (engl. *intermediate metabolizer*, IM), (3) brzi metabolizator (engl. *extensive metabolizer*, EM) i (4) vrlo brzi metabolizator (engl. *ultra rapid metabolizer*, UM). U sporih metabolizatora, zbog izostanka funkcionalnih alela i posljedične neaktivnosti enzima postoji visok rizik razvoja nuspojava uz primjenu prosječnih doza lijeka. Srednje brzi metabolizatori mogu biti homozigoti za dva alela sa smanjenom aktivnosti ili su heterozigoti tj. nositelji jednog neaktivnog alela te mogu iskusiti nešto manje nuspojava od sporih metabolizatora. Fenotip brzog metabolizatora ima dva potpuno aktivna alela i očekivana je osobina najvećeg dijela populacije. Fenotip vrlo brzog metabolizatora rezultat je amplifikacije gena, ima osobinu ubrzane razgradnje lijekova. Pri primjeni prosječnih doza lijeka može izostati terapijski učinak (Božina i sur., 2013.).

Za kliničku praksu od najveće su važnosti polimorfizmi gena *CYP2C9*, *CYP2C19*, *CYP2D6* i *CYP3A4/5*. Polimorfizam enzima *CYP2C9* značajan je za kliničku farmakoterapiju zbog nekih važih lijekova - supstrata kao što su antikonvulzivi, antidiabetici, antikoagulanti i nesteroidni antireumatici. Pacijenati s fenotipom sporog metabolizatora za *CYP2C9*, mogu iskusiti toksične nuspojave (fenitoin) ili po život opasna krvarenja (varfarin). Poznato je preko 50 različitih alela enzima *CYP2C9* (<https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2c9.htm>, pogledao 22.11.2017.). Najznačajniji su i u literaturi najčešće opisani aleli *2 (R144C,3608C>T) i *3 (I359L,42614A>C), između ostalog i zbog njihove povezanosti sa smanjenim metabolizmom varfarina. Učestalost u bijeloj populaciji alela *2 je oko 12 % a

alela *3 je oko 8 % (McClain, 2008.). Informacije o polimorfizmu *CYP2C9* su među prvima čiji su značaj prepoznala regulatorna tijela, pa tako Američka agencija za lijekove i hranu (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) već 2004.g. na temelju genske varijabilnosti enzima *CYP2C9* i *VKORC1* (vitamin K-epoksid-reduktaza1) donosi prve preporuke o doziranju. Kasnije su te informacije uključila i druga regulatorna tijela uključujući i HALMED (SPC, Martefarin 3 mg i 5 mg tablete). *CYP2C9* je odgovoran za oko 90% metabolizma fenitoina, pri čemu nositelji haplotipova *CYP2C9**2 i *3 imaju značajno usporen metabolizam i visok rizik razvoja štetnih učinaka fenitoina (Booven i sur., 2010.). Tragom tih znanstvenih dokaza, na temelju genotipa *CYP2C9* izdate su preporuke o doziranju i za fenitoin.

Enzim *CYP2C19* doprinosi metabolizmu širokog spektra klinički važnih lijekova, poput antidepresiva, benzodiazepina mefenitoina, inhibitora protonske pumpe i antiagregacijskih lijekova (anitrombotici-klopidogrel). Poznato je preko 20 različitih alela (<https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2c19.htm> pogledao 22.12.2017.), od kojih su najvažniji *CYP2C19**2 (c.681G>A) i *CYP2C19**3 (c.636G>A) zbog povezanosti sa smanjenom enzimskom aktivnosti, dok je polimorfizam *CYP2C19**17 (c.-806C>T) povezan s pojačanom aktivnosti enzima. Aproksimativa učestalost u populaciji bijelaca alela *2 je 12%, alela *3 ispod 1%, a alela *17 oko 21% (Scott i sur., 2012.). Polimorfizam enzima *CYP2C19* pokazao se vrlo važnim prediktorom odgovora na terapiju antiagregacijskim lijekom klopidogrelom. S obzirom da je klopidogrel prolijek u pacijenata s akutnim koronarnim sindromom liječenih klopidogrelom, polimorfni enzim *CYP2C19* sa smanjenom enzimskom aktivnosti povezan je s povećanim rizikom kardiovaskularnih incidenata zbog slabije pretvorbe prolijeka u aktivni metabolit. Nasuprot tome pojačani učinak klopidogrela i povećan rizik od krvarenja, zbog ubrzane aktivacije prolijeka opisan je u nositelja alela *17 (Zabalza i sur., 2012.). Zbog kompleksnosti utjecaja polimorfizama *CYP2C19* na terapiju klopidogrelom konzorcij kliničke farmakogenetike - *CPIC* izdao je smjernicu za primjenu nalaza genotipizacije *CYP2C19* u optimizaciji terapije klopidogrelom (Scott i sur., 2013.). Također su, s obzirom na polimorfizam *CYP2C19*, izdane i smjernice za doziranje nekih tricikličkih antidepresiva koje uključuju i polimorfizam *CYP2D6*, jer ti lijekovi koriste oba metabolička puta (Hick i sur., 2013.).

2.2.2. FARMAKOGENETIKA II. FAZE METABOLIZMA LIJEKOVA

U II. fazu metabolizma lijekova spadaju reakcije konjugacije koje kataliziraju enzimi transferaze, a uključuju reakcije konjugacije s α -aminokiselinama i endogenim aminima, metilacije, acetilacije, sulfokonjugacije i glukuronidacije. U reakcijama konjugacije kao supstrati sudjeluju i endogene tvari (steroidni hormoni, žučne kiseline itd.). Produkti reakcije II. faze metabolizma su u većini slučajeva hidrofilniji, odnosno topljiviji u vodi, te se na taj način pospješuje njihovo izlučivanje iz organizma. Proces biotransformacije u fazi II. također pokazuje značajnu interindividualnu varijabilnost. Polimorfizmi N-acetiltransferaze (NAT), tiopurin-metiltransferaze (TPMT), glutation-S-transferaze, sulfotransferaze (SULT) i UGT značajno doprinose varijabilnosti metabolizma, što za posljedicu ima varijabilnu farmakokinetiku, ukupnu bioraspoloživost a time i učinkovitost lijekova-supstrata.

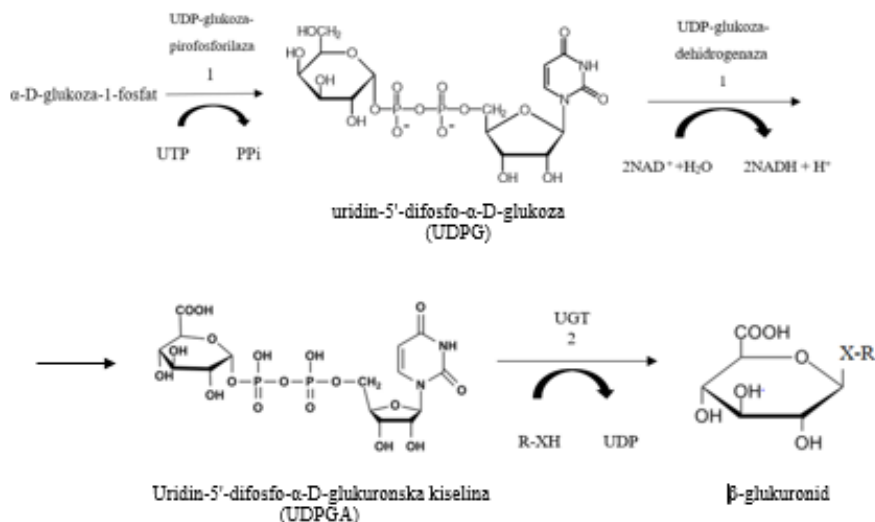
UGT enzimi pripadaju ključnim metaboličkim enzimima odgovornim za metabolizam različitih endogenih i egzogenih spojeva. Reakcije konjugacije katalizirane ovom superporodicom enzima, predstavljaju najvažniji put detoksifikacije za veliki broj lijekova, kemijskih tvari, kancerogena i drugih oksidirajućih metabolita budući da postoji stalan izvor konjugirajućeg agensa, glukuronske kiseline. U ljudi, otprilike 40-70% lijekova se metabolizira putem reakcije glukuronidacije (Jančova i sur., 2012.). Pojedinačni enzimi UGT pokazuju različitu (iako postoje preklapanja) selektivnost prema supstratima te se razlikuju u regulaciji ekspresije i genetičkom polimorfizmu (Seo i sur., 2010.). Enzimi UGT se nalaze u endoplazmatskom retikulumu stanica jetre i drugih tkiva (bubreg, probavni trakt, koža, mozak, gušterača i mukoza nosa) (Sneitz i sur., 2009.). U reakcijama glukuronidacije prenosi se glikozilna skupina s uridindifosfat-glukuronske kiseline (UDPGK) na različite endogene i egzogene supstrate i njihove metabolite. Reakcija konjugacije s UDPGK i nastanak glukuronida može se razmatrati u dva koraka (Slika 9).

- 1) Biosinteza UDPGK iz α -D-glukoze-1-fosfata koju katalizira UDP-glukoza-pirofosforilaza pri čemu se stvara veza šećer-nukleotid odnosno nastaje UDPG.

UDPG se zatim oksidira katalitičkim učinkom UDP-glukoza-dehidrogenaze u UDPGK. α -konfiguracija u strukturi UDPGK onemogućava hidrolizu učinkom β -glukuronidaze.

- 2) Prijenos glukuronozilnog ostatka nukleofilnom supstitucijom na supstrat (HXR) reakcijom koju katalizira UDP-glukuronoziltransferaza.

Nastali beta-D-glukuronid je hidrofilniji, te se lakše izlučuje iz organizma bubregom ili žuči (Jančova i sur, 2012.).



Slika 9. Reakcije glukuronidacije (Rendić i sur., 2013b.)

UGT enzimi svake porodice homologni su barem 40% u slijedu DNA, dok su UGT enzimi podporodica homologni u najmanje 60% DNA slijeda (Jančova i sur., 2012.). Na temelju sličnosti slijeda aminokiselina humani enzimi UGT su klasificirani u 4 porodice označene UGT1, UGT2, UGT3 i UGT8 (Tablica 2).

Tablica 2. Humani enzimi superporodice UDP-glukuronoziltransferaze (UGT)

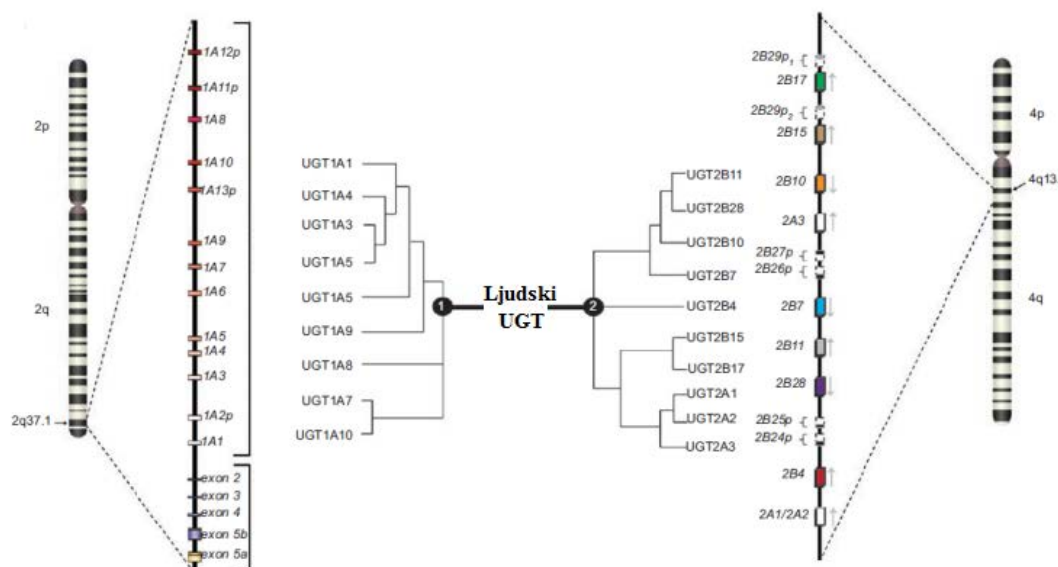
Superporodica	Porodica	Potporodica	Enzimi
UGT	UGT1	UGT1A	UGT1A3
			UGT1A4
			UGT1A5
			UGT1A6
			UGT1A7
			UGT1A8
			UGT1A9
			UGT1A10
	UGT2	UGT2A	UGT2A1
			UGT2A2
			UGT2A3
		UGT2B	UGT2B4
			UGT2B7
			UGT2B10

Tablica 2-nastavak

Superporodica	Porodica	Potporodica	Enzimi
UGT	UGT2	UGT2B	UGT2B11
			UGT2B15
			UGT2B17
			UGT2B28
	UGT3	UGT3A	UGT3A1
			UGT3A2
	UGT8	UGT8A	UGT8A1

Humani lokus gena *UGT1* nalazi se na kromosomu 2q37 koji se proteže na 200kb te se sastoji od 17 eksona (Slika 10.). Samo jedan od 13 različitih eksona na lokusu je povezan s četiri niža eksona (2-5), zajednička za sve *UGT1* izoforme. Od 13 eksona, devet ih kodira funkcionalne proteine (UGT1A1, UGT1A3-1A10) dok četiri odgovaraju pseudogenima (UGT1A2p, UGT1A11p, UGT1A12p i UGT1A13p) (Guillemette, 2003.).

Enzimi porodice UGT2 kodirani su zasebnim genima koji se sastoje od 6 eksona poslaganih niz kromosom 4q13 (Slika 10.), uz iznimku UGT2A1 i 2A2 koji su kodirani zajedničkim setom od 5 eksona i jednim jedinstvenim prvim eksonom. Dodatno se uz gen *UGT2B* nalazi pet homolognih pseudogena (UGT2B29p, UGT2B27p, UGT2B26p, UGT2B25p, UGT2B24p) (Mackenzie i sur., 2008.).



Slika 10. Prikaz gena *UGT1* i *UGT2* (prilagođeno prema Guillemette i sur., 2010.)

Za razliku od porodica UGT1 i UGT2 koje čine brojni enzimi koji su primarno uključeni u metabolizam ksenobiotika, porodica UGT8 čini samo jedan enzim, UGT8A1 koji ima ulogu biosinteze u živčanom sustavu. Enzim UGT8A1 kodira gen od 5 eksona na kromosomu 4q26 te katalizira prijenos galaktoze s UDP-galaktoze na ceramid (Meech i sur., 2012.). Porodicu UGT3 čine dva enzima, UGT3A1 i UGT3A2 koji kataliziraju prijenos N-acetilglukoamina s UDP N-acetilglukoamina na ursodeoksikolnu kiselinu. Enzime porodice UGT3 kodira gen od 7 eksona koji se nalaze na kromosomu 5q13.2 (Mackenzie i sur., 2008.).

Porodicu UGT1 čini 9 polimorfni enzima koji su locirani u jetri, probavnom traktu i žuči. Kataliziraju reakcije s endogenim supstratima (npr. bilirubinom), s tercijarnim aminima (npr. antihistaminici, antidepresivi i antipsihotici) i drugim tvarima.

Polimorfizam enzima UGT1A1

UGT1A1 je glavni enzim za konjugaciju bilirubina s glukuronskom kiselinom. Većina genetičkih promjena u genu *UGT1* koje su do sada opisane, povezane su s rijetkom mutacijom koja dovodi do dva teška slična oblika sindroma nekonjugirane hiperbilirubinemije (Crigler-Najjar tip I i II). Samo nekoliko mutacija je pronađeno u populaciji u dovoljno visokoj frekvenciji (>1%) kako bi se mogli klasificirati kao polimorfizmi. Među tim polimorfizmima, postoji dinukleotidno ponavljanje u TATA promotorskoj regiji *UGT1A1*. Razlike u broju ponavljanja A(TA)_nTAA u odnosu na divlji tip alela, n=6 *UGT1A1**1 čine 3 varijantna alela (n=5 *UGT1A1**33, n=7 *UGT1A1**28, n=8 *UGT1A1**34). Najčešći varijantni alel *UGT1A1**28 sastoji od 7 ponavljanja i povezan je sa blagim oblikom nasljednog sindroma nekonjugirane hiperbilirubinemije (Gillbertov sindrom) (Bosma i sur., 1995.). Prema detaljnoj analizi dostupnih literaturnih podataka, *UGT1A1* izoforma ima najmanju učestalost u azijskoj populaciji (0-3%), dok je učestalost u bjelačkoj populaciji 2-13%, te u Afrikanaca 16-19% (Guillemette, 2003.). Uočena je jaka poveznica između polimorfizama *UGT1A1**28 i *UGT1A1**1 sa brzinom glukuronidacije aktivnog metabolita irinotekana, SN-38, odgovornog za pojavu toksičnih nuspojava (leukopenija i proljev) (Iyer i sur., 1999.).

Polimorfizam enzima UGT1A4

Humani gen za enzim UGT1A4 je eksprimiran primarno u jetri, ali i u žučovodu, kolonu i tankom crijevu. Katalizira metabolizam primarnih i sekundarnih amina kao što su triciklički antidepresivi, antipsihotici i antikonvulzivi (Tukey i sur., 2000.). Gen za UGT1A4 je izrazito polimorfan te prema službenoj stranici za nomenklaturu *UGT* alela (<https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/>) pogledano, 04.04.

2018.), postoji preko 100 različitih pojedinačnih polimorfizama (SNP). Funkcija polimorfne kodirajuće regije gena za enzim UGT1A4 ovisna je prvenstveno o varijantama P24T (*UGT1A4**2) i L48V (*UGT1A4**3) koje su prvi puta opisane u literaturi 2004.g. (Ehmer i sur., 2004.).

UGT1A4 sudjeluje u metabolizmu tamoksifena (TAM) i njegovog aktivnog metabolita 4-OH tamoksifena. Studija Sun i sur., 2006., prva je koja je ispitala ulogu genskog polimorfizma *UGT1A4* na metabolizam TAM-a i njegovog aktivnog metabolita. Pokazala je povećanu aktivnost glukuronidacije u nositelja varijantnog alela *UGT1A4**3, dok za polimorfni alel *UGT1A4**2 nije dokazan utjecaj na aktivnost glukuronidacije. Isto je pokazala i druga studija koja je dodatno identificirala nove, iako rijetke varijacije *UGT1A4*: Asp⁵⁰, Gln⁵⁶, Phe¹⁷⁶, Asn²⁵⁰ i Leu²⁷⁶ koje mogu biti značajne obzirom da su povezane sa smanjenom aktivnosti enzima UGT1A4 za oba supstrata (Benoit-Biancamano i sur., 2009.).

Učestalost polimorfizma *UGT1A4* se razlikuje u različitim populacijama. Na primjer, u Japanaca nije pronađena varijacija P24T (Mori i sur., 2005., Saeki i sur., 2003.), dok je u Europi njezina učestalost dosta niska i iznosi oko 2% (Reimer i sur., 2014.) ili 6-8% (Benoit-Biancamano i sur., 2009. i Ehmer i sur., 2004.). Različita učestalost je zabilježena i za varijantu L48V od 8-9% (Benoit-Biancamano i sur., 2009., Ehmer i sur., 2004., Saeki i sur., 2005.) do 15% (Reimer i sur., 2014.) ili 22,4% (Gulcebi i sur., 2004.).

Polimorfizam enzima UGT1A7

Enzim UGT1A7 metabolizira široku paletu klinički važnih spojeva. Otkriveno je nekoliko različitih inačica gena *UGT1A7*, definirano je devet alela *UGT1A7**1-*9. Prema *in vitro* studijama polimorfni aleli *UGT1A7**3, *4, *5, *8, i *9 uz *UGT1A9**3 su identificirani kao aleli niske aktivnosti/glukuronidacije metabolita irinotekana SN-38 (Villeneuve i sur., 2003.). UGT1A7 je eksprimiran u ekstrahepatičkom tkivu (jednjak, koža, jezik, tonzile, grlo) te je povezan sa smanjenom glukuronidacijom kancerogenih metabolita nitrozamina koji se nalaze u duhanu što za posljedicu može imati povećani rizik nastanka raka grla uzrokovanog pušenjem raka (Guillemette, 2003.).

Polimorfizam enzima UGT1A9

UGT1A9 se pokazao kao jedan od najaktivnijih hepatičkih UGT enzima, odgovoran za metabolizam velikog broja supstrata uključujući nekoliko metabolita prokarcinogena benzo[a]pirena i SN-38, najvažnijeg metabolita citostatika irinotekana. Otkrivene su dvije polimorfne varijante gena *UGT1A9* i to *UGT1A9**2 C3Y i *UGT1A9**3 M33T. Istraživanja su

pokazala kako je glukuronidacija metabolita SN-38 smanjena u pacijenata koji su nositelji varijantnoga alela *UGT1A9*3* što može rezultirati toksičnim nuspojavama irinotekana (Villeneuve i sur., 2003.). Uz ranije identificirane polimorfizme *UGT1A9*, identificirana su dva dodatna SNP-a: *UGT1A9* 167Ala i *UGT1A9* 183 Gly (Olson i sur., 2009.).

Polimorfizam enzima UGT1A6, UGT1A8 i UGT1A10

Za enzime UGT1A8 i UGT1A10 se smatra da nemaju utjecaj na bioraspoloživost oralno primjenjenih lijekova (Mizuma, 2009.). UGT1A6 je uključen primarno u metabolizam jednostavnih fenola. Postoje tri SNP-a u kodirajućoj regiji gena *UGT1A6*. Divlji tip alela se označava *UGT1A6*1*, dok se polimorfni aleli nalaze na kodonu 181 (Thr¹⁸¹Ala) i imaju nomenklaturu *UGT1A6*4* te na kodonu 184 (Arg¹⁸⁴Ser) s oznakom alela *UGT1A6*3*. (Guillemette, 2003.). Prisutnost obadviju mutacija označava se *UGT1A6*2*, a fenotipski se izražava kao smanjena aktivnost u glukuronidaciji nekoliko fenolnih spojeva (Ciotti i sur., 1997.).

Polimorfizam enzima UGT2

Porodicu UGT2 čine dvije potporodice UGT2A i UGT2B s ukupno 10 enzima. Enzimi UGT2A (*UGT2A1*, *UGT2A2* i *UGT2A3*) su uglavnom eksprimirani u nazalnom epitelu (Sneitz i sur., 2009.) te nema podataka o njihovoj ulozi u metabolizmu lijekova (Stingl i sur., 2014.). Potporodicu UGT2B čini 7 enzima, među kojima su kodirajući geni *UGT2B17* i *UGT2B28* najčešće deletirani geni. Obzirom da je enzim UGT2B17 važan u metabolizmu testosterona, delecija gena za enzim ima za posljedicu povećanje serumske koncentracije testosterona te rizik od raka prostate, osteoporoze i osjetljivosti na inzulin (Zhu AZ i sur., 2015.). Za enzim UGT2B28 nema podataka o ulozi u metabolizmu lijekova (Stigl i sur., 2014.).

Polimorfizam enzima UGT2B15

Osim što je uključen u metabolizam biljnih derivata (kumarini, flavonoidi i antrakinoni), enzim UGT2B15 također je uključen u metabolizam ksenobiotika te endogenih spojeva poput dihidrotestosterona (DHT) (Levesque i sur., 1997., Green i sur., 1994.). Prema nomenklaturi enzima UGT, za enzim UGT2B15 postoji sedam genskih polimorfizama, od kojih je najviše istražen *UGT2B15*2* (Asp⁵⁸Tir) čija je prevalencija u bjelačkoj populaciji oko 50%. Za ostale alele *UGT2B15*3*, **4*, **5* i **6* nije ustanovljena funkcionalna značajnost (Divakaran i sur., 2014.). UGT2B15 ima značajnu ulogu u metabolizmu oksazepamima. Studije

in vitro su pokazale da u prisutnosti alela *UGT2B15*2* ima smanjenju mogućnost glukuronidacije (Court i sur., 2004.). Iako je pokazan utjecaj *UGT2B15*2* na farmakokinetiku oksazepama, nije dokazana značajna poveznica genotipa i samog učinka lijeka. Također je pokazana smanjena glukuronidacija lorazepama u prisutnosti varijantnog alela *UGT2B15*2* (He X i sur., 2009.). Dodatno, rezultati ranijih studija zaključuju kako nositelji homozigotnog alela Asp⁸⁵ imaju veći rizik razvoja raka prostate (McLeod i sur., 2000.). No, druge studije nisu potvrdile ovaj nalaz o značajnoj povezanosti gena i bolesti (Cunningham i sur., 2007.).

Polimorfizam enzima UGT2B4

Enzim UGT2B4 je uključen u metabolizam žučnih kiselina i raznih fenola. Nije dokazana značajnija uloga genetičkih polimorfizama između ostalih *UGT2B4*2* (Asp458Glu) u moduliranju funkcije ovog enzima. Smatra se da je razlog u preklapanju specifičnosti supstrata koja se uočava uz višu aktivnost enzima UGT2B7 (Minner i sur., 2002.).

Polimorfizam enzima UGT2B7

UGT2B7 se smatra najvažnijim enzimom superporodice enzima UGT koji metabolizira široki spektar kliničkih važnih lijekova uključujući morfin, kodein (Coffman i sur., 1997.), epirubicin (Innocenti i sur., 2001.), zidovudin (Barbier i sur., 2000.), nesteroidne protuupalne lijekove (NSAID) i valproat. Također je uključen u metabolizam endogenih tvari kao što su: steroidi, žučne kiseline, retinoidi i masne kiseline (Radomska-Pandya, 2001.). Enzim je osim u jetri izražen u mozgu, bubregu, gušterači i gastrointestinalnom traktu (Guillemette, 2003.). Gen za enzim UGT2B7 je polimorfan te su do sada opisana ukupno 4 alela *UGT2B7 (*1-4*)* koja mogu utjecati na ekspresiju enzima i njegovu aktivnost (Li Y i sur., 2012.). Najviše je istraživani polimorfizam *UGT2B7 802C>T* na eksonu 2 (H268Y) (*UGT2B7*2*) (Jin i sur., 1993.). Haplotipovi bez aminokiselinske promjene su označeni kao *1 haplotipovi, dok je haplotip koji sadrži H268Y označen kao *2 (Saeki i sur., 2004.). Dok je prevalencija oba alela (Y²⁶⁸ i H²⁶⁸) jednaka u bijeloj rasi (Lampe i sur., 2000.), alel *UGT2B7*1* je tri puta zastupljeniji u Japanaca. Učestalost alela *UGT2B7*2* je niža u azijata, samo 5% Japanaca su homozigoti (Bhasker i sur., 2000.). Analiza *UGT2B7* haplotipova otkrila je šest promotorskih varijanti (-1306 G>A, -1299 C>T, -1112 C>T, -900 A>G, -327 G>A i -161 C>T) koje mogu modulirati promotorsku aktivnost UGT2B7 i koje su u ravnotežnoj povezanosti s polimorfizmom *UGT2B7*2* (Parmar i sur., 2011.).

U ljudi, morfin se primarno metabolizira enzimom UGT2B7 čiji metaboliti imaju različito farmakološko djelovanje. Formiranje neaktivnog morfin-3-glukuronida (M3G) je važan eliminacijski put morfina, dok metabolit morfin-6-glukuronid (M6G) ima analgetičko djelovanje (Lötsch, 2005.). U studiji koja je uključivala 175 norveških pacijenata koji su kronično oralno primali morfin, za *UGT2B7*2* nije pokazana povezanost s koncentracijama morfina i njegovih metabolita (Holthe i sur., 2003.). Međutim u studiji Sawyer i sur., 2003.g. uočen je utjecaj – 161 C>T u promotorskoj regiji *UGT2B7* na značajno smanjenje razine M3G i M6G metabolita u homozigota za -161 C. Dodatno, *in vitro* studija nije dokazala da genotip *UGT2B7*2* ima utjecaja na glukuronidaciju morfina, kodeina ili zidovudina (AZT) (Court i sur., 2003.).

Iako je UGT2B7 glavni enzim za glukuronidaciju epirubicina, polimorfizam *UGT2B7*2* nije bio povezan sa promjenjenom glukuronidacijom istog u studiji Innocenti i sur., 2001. Međutim studija Parmer i sur., 2011.g. pokazala je kako smanjena glukuronidacija u homozigota za varijantu *UGT2B7* 268T ima za posljedicu odgođenu eliminaciju te povećano izloženosti epirubicinu i njenim aktivnim metabolitima, što povećava preživljavanje pacijenata u usporedbi s nositeljima barem jednog alela *UGT2B7* 268H.

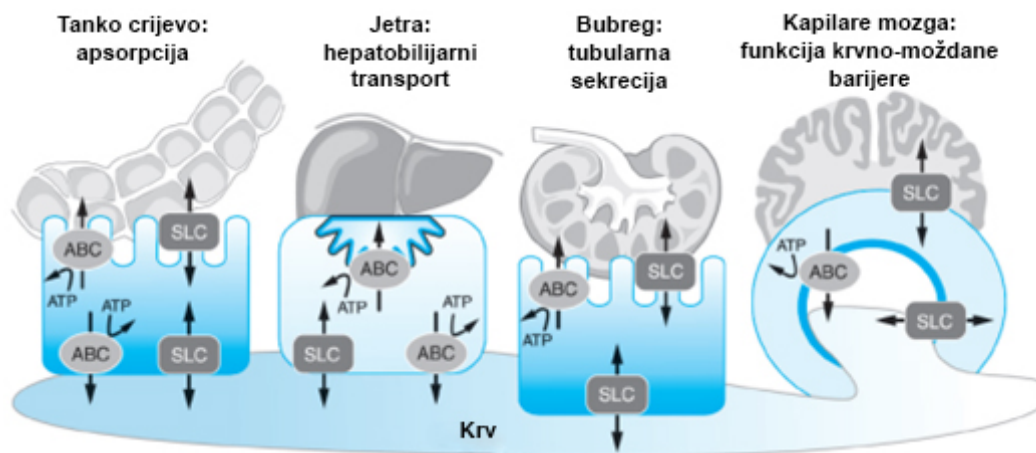
Samo je nekoliko neuvjerljivih podataka dostupno u literaturi vezano za utjecaj polimorfizma gena za UGT2B7 na metabolizam antiretrovirusnih lijekova AZT i efavirenz korištenih u liječenju HIV-a (Li i sur., 2012.).

2.3 TRANSPORTNI PROTEINI

Membrane epitelnih stanica probavnog trakta, ali i membranske stanice drugih organa i tkiva, te stanica tumorskih tkiva, sadrže brojne sustave s ulogom reguliranja transporta različitih tvari. Tako postoje izbacivački (efluksni) transportni proteini (engl. *efflux transporters*) i transporteri koji reguliraju ulazak hranjivih tvari u stanice (engl. *uptake* ili *influx*), a koji se koriste i za unos lijekova u stanice. S obzirom na transport lijekova razlikujemo dvije glavne superporodice transportera: ABC (engl. *ATP Binding Cassette*) i SLC (engl. *Solute Carrier*). (Slika 11.)

U skupinu izbacivačkih transportera, pripada superporodica sustava ABC ovisnih o ATP-u, stoga se nazivaju ATP-vezajuće kasete (engl. *ATP-Binding cassette (ABC) Superfamily of Transmembrane Proteins*). Poznato je 48 gena koji kodiraju proteine ABC koji mogu biti grupirani u sedam podklasa i obitelji (ABCA do ABCG). Najpoznatiji i najviše istraživani transporter u superporodici ABC su fosfolirani P-glikoprotein (P-gp), kodiran genom *ABCB1*, stariji naziv je MDR1 (od engl. *Multiple Drug Resistance protein*) i

transmembranski regulator cistične fibroze (CFTR, kodiran genom *ABCC7*). Za farmakokinetiku lijekova od posebnog značaja su transporteri smješteni u probavnom, jetrenom i bubrežnom epitelu te na krvno-moždanoj barijeri (Dean i sur., 2007., Giacomini i sur., 2006.).



Slika 11. Transepitelni ili transendotelni prolaz lijekova putem različitih transportera na epitelnoj ili endotelnoj brani. Prikazani su različiti tipovi transporta: probava (apsorpcija), bubreg i jetra (eliminacija) i kapilare mozga koje čine krvno-moždanu barijeru (prilagođeno prema Giacomini i sur., 2006.).

P-glikoprotein

Fosforilirani P-glikoprotein (P-gp), jedan je od klinički najvažnijih i najviše istraženih transmembranskih transportera u ljudi. P-gp je integralni membranski protein koji ima oko 1280 aminokiselina, molekularne mase 170 kDa te ima ukupno 12 transmembranskih zavoja i veznih mjesta za ATP. Funkcija mu je prijenos tvari iz stanice i s membrane prema van. Njegova fiziološka funkcija je zaštita stanice od toksičnih tvari. Mnogi su lijekovi supstrati P-gp, stoga aktivnost P-gp utječe na njihove farmakokinetičke parametre, međusobne interakcije i terapijsku učinkovitost što je prvi put uočeno u tumorskih stanica.

U genu *MDR1/ABCB1* identificirani su brojni SNP-ovi a povezuju se s promjenjivom oralnom biodostupnosti i rezistencijom na različite lijekove P-gp supstrate. Najviše su istraživana dva SNP-a: tiha mutacija *ABCB1* 3435 C>T u eksonu 26 (rs1045642) koja je povezana sa duodenalnim izražajem Pgp i *missense* polimorfizam *ABCB1* 2677 G>T/A u eksonu 21 (rs2032582). Analiza neravnotežne povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, *LD*) različitih polimorfizma P-gp pokazuje da je *ABCB1* 3435 C>T u neravnotežnoj vezi barem s jednim funkcionalnim polimorfnim lokusom *ABCB1* 2677 G>T/A i s trećim polimorfizmom *ABCB1* 1236 C>T (Deenen i sur., 2011.). U literaturi nalazimo

značajan broj radova koji su istraživali povezanost ekspresije P-gp s rezistencijom na različite antiepileptike, s postavljenom hipotezom da povećana ekspresija P-gp posebno na krvno-moždanoj barijeri i u samom tkivu mozga pridonosi razvoju rezistencije. Uz to, istraživanja su pokazala da neki antiepileptici i sami mogu inducirati ekspresiju P-gp (Hung i sur., 2008.). Prema provedenim studijama, rezultati istraživanja utjecaja polimorfnog gena *ABCB1* na farmakokinetiku lamotrigina nisu jednoznačni. Studija Lovrić i sur., 2012.g. pokazala je statistički značajnu povezanost koncentracija lamotrigina s polimorfizmom *ABCB1* C1236T. Koncentracije lamotrigina statistički su značajno niže u ispitanika nositelja alela T, te genotipa CT i TT. Također, dokazana je statistički značajna povezanost vrijednosti koncentracija lamotrigina i varijante *ABCB1* G2677T/A. Koncentracije lamotrigina bile su statistički značajno niže u ispitanika nositelja alela T. U istoj studiji za polimorfizam *ABCB1* C3435T nije ustanovljena statistički značajna korelacija s koncentracijama lamotrigina. Milosheska i sur., 2016.g. su ustanovili smanjenje klirensa lamotrigina za 22% odnosno 9% u pacijenata s genotipom *ABCB1* 2677GG i 2677GT, ali ne i za polimorfizam *ABCB1* 1236 C>T. Suprotno tom nalazu Makmor-Bakry i sur., 2010.g. su pokazali statistički značajan utjecaj upravo varijante *ABCB1* 1236C>T na koncentracije lamotrigina.

ABCG2

Jedan od najvažnijih transportera porodice ABCG je ABCG2 također, prvotno poznat pod nazivom BCRP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*) koji je značajnije eksprimiran u gastrointestinalnom traktu, jetri, bubregu, mozgu, srcu i placenti (Maliepaard i sur., 2001.). Farmakogenetičke studije su identificirale polimorfizam 421 C>A (Gln141Lys, Q141, rs22331142) koji može rezultirati smanjenom aktivnosti transportera. Učestalost varijantnog alela je veća u Japanaca (30%) nego kod bijelaca (10%) (Deenen i sur., 2011.). Studije *in vitro* su pokazale kako je ekspresija mRNA održana u nositelja varijantnog oblika gena *BCRP/ABCG2*, ali je uočeno za 50-70% smanjenje ekspresije i funkcije proteina zbog povećane podložnosti razgradnje proteasomima (Lee i sur., 2015.). Za nekoliko lijekova, uključujući sulfasalazin, rosuvastatin i atorvastatin uočena je povećana sistemska izloženost zbog smanjenog i transporta putem ABCG2 u pacijenata koji su bili nositelji varijantnog alela (Giacomini i sur., 2013.). Keskitalo i sur., 2009.g. su pokazali kako je kod nositelja homozigotnog varijantnog alela *BCRP* c.421AA za 2,4 puta veća izloženost rosuvastatinu nego u nositelja divljeg tipa *BCRP* c.421CC. Također su ispitivani i drugi polimorfizmi *ABCG2* (G406R, F431L, S441N, P408L, F489L, M515R, L525R, A528T i T542A) s obzirom na njihovu ulogu u ekspresiji i funkciji proteina (Sjöstedt i sur, 2017.). Rezultati su pokazali

kako je transmembranska regija ABCG2 osjetljiva na aminokiselinsku supstituciju te da bolesnici nositelji ovih varijantnih alela mogu imati značajno promijenjenu farmakokinetiku lijekova koji su supstrati ABCG2.

Prema dostupnoj literaturi, provedene su samo dvije studije o utjecaju varijantnog alela *ABCG2* 421C>A na koncentracije lamotrigina te su obje pokazale značajnu korelaciju (Zhou i sur., 2015., Shen i sur., 2016.). Dodatno, BCRP se pokazao kao važan medijator u interakcijama lijek-lijek, što su prepoznala različita regulatorna tijela poput FDA i EMA-e. Međutim uloga BCRP/ABCG2 u interakcijama lijek-lijek su ograničena zbog mogućeg preklapanja s drugim metaboličkim putevima (Poirier i sur., 2014.).

2.4 Farmakogenetika lamotrigina

Za lamotigin je karakteristično da ne podliježe biotransformaciji metaboličkim enzimima faze I već odmah ulazi u fazu II metabolizma i to dominantno putem enzima UGT. Stoga je najviše asocijacijskih farmakogenetičkih studija za lamotigin provedeno za ovu porodicu enzima/gena. Varijante gena *UGT1A4* pokazale su se značajne za varijabilnost serumskih koncentracija lamotrigina. Studije Chan i sur., 2014. i Zhou i sur., 2013. pokazale su porast serumske koncentracije lamotrigina u azijskoj populaciji u nositelja varijantnog alela *UGT1A4**3 u usporedbi s nositeljima divljeg tipa alela. Dok studija Wang i sur., 2014. nije pokazala povezanost s varijantnim alelom *UGT1A4**3, ali je pokazala statistički značajan utjecaj drugih polimorfizama *UGT1A4* poput -219 C>T i -163 G>A. Okolišni čimbenici poput pušenja mogu imati utjecaj na koncentracije lamotrigina. Primjena lijekova koji su induktori enzima u pušača nositelja varijantnog alela *UGT1A4**3 može značajno smanjiti koncentraciju lamotrigina (Gulcebi i sur., 2010.). Studija provedena u norveškoj populaciji nije pokazala statistički značajano smanjenje koncentracije lamotrigina, međutim zapažen je trend smanjenja u nositelja varijantnog alela *UGT1A4**3 te trend porasta koncentracije lamotrigina u nositelja varijantnog alela *UGT1A4**2 (Reimer i sur., 2016.).

Osim za enzim *UGT1A4*, u drugim studijama je uočena uloga varijantnog alela *UGT2B7* -161T. U tajlandskoj populaciji nositelji navedenog alela (-161 CT ili -161 TT) imali su značajano snižen klirens lamotrigina (do 18%) (Singkham i sur., 2013.). Isti rezultati dobiveni su u drugoj studiji u bjelačkoj populaciji (Milosheska i sur., 2016.), a još je dodatno pokazan snižen klirens lamotrigina u nositelja varijantnog alela *UGT2B7* 372 A>G. Statistički značajan utjecaj polimorfizma *UGT2B7* -161 C>T na koncentraciju LTG je pokazan kada su kao kovarijate uvršteni dob bolesnika i politerapija s drugim antiepilepticima (Blank Sanchez i

sur., 2010.). Studija provedena u azijskoj populaciji nije pokazala utjecaj *UGT2B7* -161 C>T na farmakokinetiku lamotrigina (Liu L i sur., 2015.).

2.5 Farmakogenetika valproične kiseline

Za razliku od lamotrigina valproati, premda u manjem opsegu, podliježu metaboličkim procesima faze I (CYP). Pokazano je kako genski polimorfizmi *CYP2C19* i *CYP2C9* značajno utječu na farmakokinetiku VPA (Jiang i sur., 2009.). Druga studija je pokazala da osim varijantnog alela *CYP2C9* na varijabilnost farmakokinetike VPA mogu značajno utjecati i drugi varijantni geni poput *CYP2A6* (Tan i sur., 2010.). Utjecaj varijantnog alela *CYP2C9* na VPA u djece nije pokazan, ali je potvrđena značajna uloga polimorfizama enzima *UGT1A6* (T19G, A541G i A552C) na ubrzan metabolizam VPA, što posljedično snižava serumsku koncentraciju VPA (Guo i sur., 2012.). Pokazani su i značajni utjecaji drugih polimorfizama na koncentracije VPA, poput *UGT2B7* A268G (MA H i sur., 2013.) i *UGT1A3**5 (Chu i sur., 2012.). Analiza učinkovitosti VPA pokazala je snažan utjecaj polimorfizma *UGT2B7* C802T (Du i sur., 2016.). Značajno snižena koncentracija VPA dokazana je u nositelja genotipa *UGT2B7* -161CC (Ionue i sur., 2014., Wang i sur., 2016.), ali u drugoj studiji to nije potvrđeno (Hung i sur., 2012.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2012.-2016. godine u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku i Klinici za neurologiju (Referentnom centru za epilepsiju Ministarstva zdravstva Republike Hrvatske) Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

U istraživanje su bili uključeni ispitanici dobne skupine od 16-77 godina s potvrđenom dijagnozom epilepsije sa ili bez sekundarne generalizacije. Dijagnoza epilepsije postavljena je na temelju anamnestičkih i heteroanamnestičkih podataka, kliničke slike epileptičkih napadaja, višekratnih elektroencefalografskih snimanja, te morfološkog nalaza MR mozga unutar fizioloških varijacija. Dodatni kriterij uključivanja je normalna bubrežna i hepatička funkcija ocjenjena standardnim biokemijskim parametrima (kreatinin, ureja, alanin aminotransferaza (ALT), gama-glutamil-transferaza (GGT)).

Na osnovi antiepileptičke terapije koju dobivaju, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine prema dosadašnjim saznanjima o interakcijama lamotrigina s ostalim antiepilepticima. U prvu skupinu svrstani su ispitanici na monoterapiji lamotriginom i antiepileptikom za koji nije dokazan utjecaj na kinetiku lamotrigina, a u drugu skupinu ispitanici na terapiji lamotriginom, valproatom i antiepileptikom za koji nije dokazan utjecaj na kinetiku lamotrigina niti valproata.

Lamotigin i valproat su primjenjeni prema odobrenom načinu doziranja (postupnom titracijom) ovisno o odgovoru i toleranciji pacijenta. U pacijenata na monoterapiji lamotriginom, doziranje je započeto s dozom od 25 mg jednom dnevno (tijekom 1. i 2. tjedna), potom je doza povišena na 50 mg jednom dnevno (tijekom 3. i 4. tjedna). Kako bi se postigla doza održavanja, doza se može povisivati za 50 mg na dan svakih 7-14 dana.

Za pacijente na politerapiji s lamotriginom i valproatom, doziranje lamotriginom je započeto s dozom 12,5 mg svaki drugi dan (tijekom 1. i 2. tjedna), potom je doza povišena na 25 mg na dan (tijekom 3. i 4. tjedna). Kako bi se postigla doza održavanja, doza se može povisivati za 25-50 mg na dan svakih 7-14 dana. Kada je postignuta doza održavanja, lamotigin se primjenjuje dva puta na dan. Valproat se primjenjuje dva puta na dan u dozi od 300 mg u prvom tjednu, potom se doza postupno povisuje za 300mg na dan u tjednim intervalima.

U istraživanje je bilo uključeno 205 pacijenata, od kojih je na monoterapiji lamotriginom bio 131 (63,9%) ispitanik, dok je na politerapiji s valproatom bilo njih 74 (36,1%). Demografski podaci o ispitanicima navedeni su u tablici 9 (vidjeti dio 4.1. Osobine ispitanika).

3.1.2. Analitički materijal

Za određivanje koncentracije lijekova lamotrigina i valproata te osnovnih parametara za funkciju bubrega i jetre korišten je uzorak krvi natašte uzet između 07:00 – 09:00, nakon postizanja ravnotežne koncentracije lijeka („steady state“) najmanje 21 dan od početka terapije i neposredno prije uzimanja jutarnje doze lijeka.

Za mjerenje biokemijskih parametara i koncentracije lijekova u serumu uzorkovano je 5 ml krvi bez antikoagulant, a za izdvajanje i genotipizaciju DNA 5 ml krvi s EDTA antikoagulantom.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje koncentracije antiepileptika

Koncentracije antiepileptika provodile su se u Odjelu za laboratorijsku farmakologiju i toksikologiju i Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografija Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. Koncentracija lamotrigina mjerena je vlastitom validiranom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s *diode array* detektorom (HPLC-DAD), na instrumentu Shimadzu HPLC sistem 10A (Shimadzu, Japan). Valproati su mjereni enzim - imunokemijskom metodom na automatskom analizatoru Dimension Xpand XP (Dade Behring, Njemačka).

HPLC-DAD

Oprema, pribor i reagensi:

Shimadzu HPLC sistem 10A *diode array* detektor (Shimadzu, Japan)

HPLC MN EC Nucleosil 100–5 C–18 HD 250 x 4.6 mm + pred kolona (MN CC 8/3

Nucleosil 100-5 C-18 HD) (Macherey-Nager, Njemačka)

Automatski podesive pipete i nastavci: 100, 200, 1000 i 5000 µl (Kartell, SAD)

Uparivač uzoraka u struji zraka ili dušika

Sistem za filtriranje mobilne faze (Millipore, SAD)

Centrifuga (MPW, Poljska)

Vakuum pumpa (Dräger, Njemačka)

Vibracijska i magnetska mješalica (Kartell, SAD)

Ultrazvučna kupelj (Julabo, Njemačka)

Tresilica za ekstrakciju (Heildorph, SAD)

Sistem za dobivanje vode visoke čistoće (Nirosta, Hrvatska)

Analitička vaga (Ohaus, SAD)

Reagensi:

Acetonitril (Merck, Njemačka)

Metanol (Merck, Njemačka)

Etilacetat (Merck, Njemačka)

Heksan (Merck, Njemačka)

Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, SAD)

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, SAD)

Kloramfenikol (Sigma-Aldrich, SAD)

Antiepileptici – serumski standard (Level I, II, i III) i kalibrator (Chromsystem, Njemačka)

Priprema uzorka za HPLC analizu

U epruvetu za ekstrakciju uzorka potrebno pipetirati 250 μl plazme ispitanika, 25 μl 0,1N otopine NaOH, 25 μl otopine internog standarda (kloramfenikol), i promješati na vorteks mješalici. Dodati 2,5 ml otapala heksan/etilacetat (1:1) i epruvetu postaviti u mješalicu za ekstrakciju i ekstrahirati 15 minuta. Nakon ekstrakcije pripremljenu smjesu centrifugirati 10 min na 3000 o/min. Gornji organski sloj kvantitativno odvojiti (2 ml) u epruvetu za uparavanje i upariti do suha u struji zraka na 37°C. Upareni ostatak otopiti u 200 μl mobilne faze.

Priprema otapala i HPLC instrumenta:

20 mmol Na_2HPO_4 (0,02 M); 2,83 g / nadopuniti u odmjernoj tikvici do 1 litre vodom.

20 mmol $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,02 M); 2,75 g / nadopuniti do 1 litre MiliQ vodom.

Pomiješati obje otopine u omjeru :

otopina 1. 245,0 ml (956 ml)

otopina 2. 255,0 ml (995 ml)

pH pufera treba biti 6,9 te ga nakon pripreve profiltrirati kroz celulozni (hidrofilni) filter 0,45 μm . Mobilna faza se sastoji od metanola, acetonitrila i 0,05M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ fosfatnog pufera (pH 6,9) u omjeru 75:90:285. Organska otapala i pufer je potrebno odmjeriti, svakog zasebno, pomiješati te odzračiti vakuumom u ultrazvučnoj kupelji.

Korišten je protok od 0,8 do 1,3 ml/min i termoststiranje kolone na 30°C.

Pumpa A 0,40 mL/min

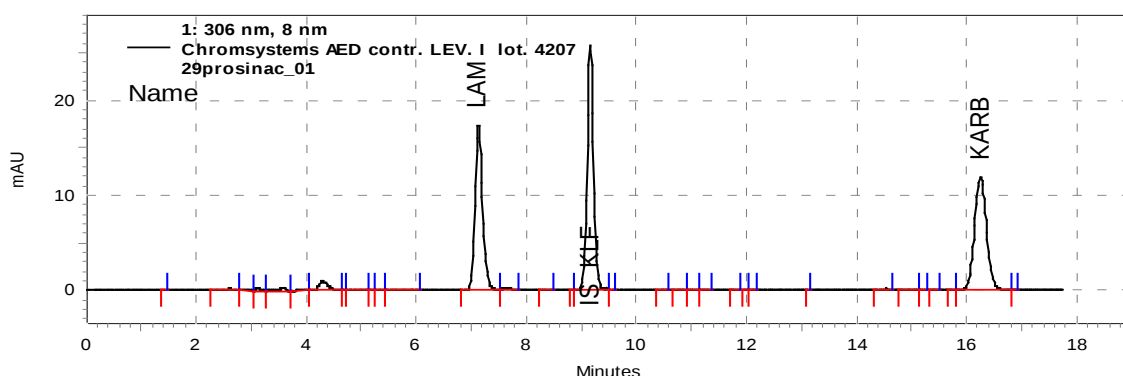
Pumpa B 0,40 mL/min

Program:	vrijeme (min)	pumpa A (mL/min)	pumpa B (mL/min)
	0, 0	0,40	0,40
	9,00	0,65	0,65
	9,10	0,90	0,90
	17,00	0,90	0,90
	17,10	0,40	0,40

Lamotrigin i IS kvantificirani su na 306 nm (Slika 12.).

Za validaciju metode ispitana je točnost, preciznost, linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon, granica detekcije, granica kvantifikacije i stabilnost analita (u dugom intervalu, kroz 21 dan (*long-term stability*)) koji su zadovoljavali kriterije koje preporuča Internacionalna Konferencija za Harmonizaciju (ICH, od engl. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) i FDA.

Svi mjereni analiti uključeni su u vanjsku procjenu kvalitete (RfB - Referenzinstitut für Bioanalytik i LGC Standards).



Slika 12. Određivanje lamotrigina u serumu na valnoj dužini 306 nm (HPLC-DAD)

3.2.2 Genotipizacija

Izdvajanje DNA i metode genotipizacije provodile su se u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

3.2.2.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA iz 5 ml pune krvi s EDTA antikoagulantom provodilo se pomoću komercijalnog reagensa FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača.

3.2.2.2. TaqMan[®] metoda PCR u stvarnom vremenu

Genotipizacija polimorfizama *ABCB1/MDR1* c.1236C>T (rs1128503), *ABCG2* c.421C>A (rs2231142), *UGT1A4**2 (c.70C>A, rs6755571) i *UGT2B7* (c.-161T>C, rs7668258) provedena je TaqMan[®] metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu za otkrivanje i analizu polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), koristeći reagens TaqMan[®] SNP Genotyping Assay ID C_7586662_10, ID C_15854163_70, ID C_25957120_10 odnosno C_27827970_40 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), dok je za *UGT1A4**3 (c.142T>G, rs2011425) korišten Custom TaqMan[®] SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) prema uputama proizvođača. Određivanje polimorfizama izvedeno je na uređaju za PCR u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD) analizom alelne diskriminacije.

Načelo metode:

Korišteni su reagensi TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD), koji sadrže specifične početnice i TaqMan[®] fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe te za detekciju koriste fluorescentni signal koji nastaje zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze. Fluorescentni signal je detektiran CCD kamerom (engl. *charge – coupled device*) i analiziran pomoću računalnog programa 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, SAD). Analizom alelne diskriminacije koja koristi par fluorescentno obilježenih detektora VIC[®] i FAM[®] (jedan detektor se poklapa s divljim tipom alela, a drugi s varijantnim alelom) određeno je da li se radi o homozigotu za divlji alel, heterozigotu ili homozigotu za mutirani alel. Slike 14-22 prikazuju analizu alelne diskriminacije za svaki polimorfizam pojedinačno na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System.

Oprema i pribor:

- uređaj ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- mikrocentrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitrarske pločice Eppendorf 5810R (Eppendorf, Njemačka)

- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete (Applied Biosystems, SAD)

Reagensi (Tablica 3):

- *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems, SAD)
- *TaqMan[®] SNP Genotyping Assay* (Applied Biosystems, SAD)

Tablica 3. Polimorfizmi analizirani Taqman[®] metodom PCR u stvarnom vremenu

Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	<i>TaqMan[®] SNP Assay ID</i>
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1128503	c.1236C>T	C_7586662_10
<i>ABCG2</i>	rs2231142	c.421C>A	C_15854163_70
<i>UGT1A4*2</i>	rs6755571	c.70C>A	C_25957120_10
<i>UGT1A4*3</i>	rs2011425	c.142T>G	Custom TaqMan [®] Assay
<i>UGT2B7</i>	rs7668258	c.-161T>C	C_27827970_40
<i>CYP2C9*2</i>	rs1799853	c.430C> T	C_25625805_10
<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	c.1075A >C	C_27104892_10
<i>CYP2C19*2</i>	rs4244285	c.681G>A	C_25986767_70
<i>CYP2C19*17</i>	rs12248560	c.-806C>T	C_469857_10

* referentni broj SNP iz baze podataka *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*

Za analizu svakog pojedinog polimorfizama korišten je odgovarajući reagenski kit za TaqMan[®] SNP Assay ID (Tablica 3.). Priprema reakcijske smjese (Tablica 4.) i uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System (Tablica 5.) isti su za genotipizaciju svih polimorfizama, izvedeni su prema uputama proizvođača.

Tablica 4. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju TaqMan® metodom

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
TaqMan® Universal PCR Master Mix	12,5	1x
TaqMan® SNP Assay Mix *	1,25	1x
DNA razrjeđenje	11,25	1-20 ng
Ukupni volumen reakcijske smjese	25	

*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odovarajući TaqMan® SNP Assay

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System

Pre-PCR	INICIJACIJA	PCR (50 ciklusa)		Post-PCR
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
60 °C / 60 s	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	92 °C / 15 s	60 °C / 60 s	60 °C / 60 s

3.2.2.3 Genotipizacija UGT1A4*3 metodom PCR-RFLP

Genotipizacija polimorfizama *UGT1A4*3* (c.142T>G, rs2011425) također je provedena metodom PCR i analize polimorfizma dužine restrikcijskih ulomaka (PCR-RFLP od engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) koja se temelji na očitavanju prisutnosti/odsutnosti restrikcijskih ulomaka PCR umnoška za pojedini genotip. Ova metoda korištena je kao potvrdna metoda za genotipizaciju polimorfizma *UGT1A4*3* TaqMan® metodom PCR u stvarnom vremenu te je izvedena prema već opisanim postupcima u literaturi (Ehmer i sur., 2004., Ghotbi i sur., 2010., Haslemo i sur., 2012.). Provedena je međulaboratorijska usporedba s laboratorijem iz Sveučilišne bolnice Diakonhjemmet u Oslu (Norveška) gdje su uzorci analizirani metodom PCR-RFLP, te su potvrđeni analizom sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) korištenjem panela za farmakogenetiku Pharmacogenomics AmpliSeq Panel (Thermo Fisher Scientific, SAD) na uređaju Ion PGM System (Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputama proizvođača.

Oprema i pribor:

- uređaj za PCR GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, SAD)
- mikrocentrifuga Eppendorf 5424 (Eppendorf, Njemačka)
- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0,5-10 μL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100 μL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- termostatski blok Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka)
- uređaj za elektroforezu PowerPac Basic (BIO-RAD Laboratories, SAD)
- uređaj za vizualizaciju gelova G:BOX (Syngene, Ujedinjeno Kraljevstvo)

Reagensi:

Za pripremu PCR reakcijske smjese korištene su odgovarajuće početnice (Invitrogen, SAD) i reagensi (Roche, Njemačka) (Tablica 6.).

Tablica 6. Sastojci PCR reakcijske smjese za genotipizaciju *UGT1A4**3

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
početnica <i>forward</i> : GTT GGG CCC ATA ACG AAA GGC AGT T, 10 μM	0,625	0,25 μM
početnica <i>reverse</i> : GCT CCA CAC AAC ACC TAT GAA G, 10 μM	0,625	0,25 μM
pufer, 10x	2,5	1x
MgCl_2 , 25 mM	1,5	1,5 mM
dNTP, 10 mM	0,5	0,2 mM
Taq DNA polimeraza (5 U/ μL)	0,125	0,625 U
ddH ₂ O	18,125	-
DNA	1	-
Ukupni volumen reakcijske smjese	25	

PCR reakcija se provodila na uređaju GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, SAD) prema uvjetima u tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *UGT1A4**3

Inicijalna denaturacija	Amplifikacija (35 ciklusa)			Elongacija
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
95 °C / 10 min	95 °C / 30 s	58 °C / 30 s	72 °C / 45 s	72 °C / 10 min

Digestija

Nakon PCR reakcije umnožak PCR digestirao se restrikcijskim enzimom na 37 °C 2 sata u termostatu Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka):

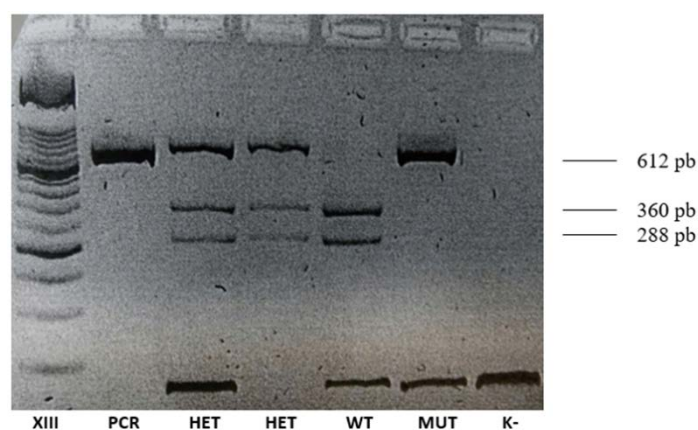
Sastojci smjese	Volumen (µL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
PCR umnožak	8,0	-
restrikcijski enzim Eco147I (StuI), 10 U/µL (Invitrogen, SAD)	0,5	0,25 U/µL
pufer B, 10x (Invitrogen, SAD)	2,0	1x
ddH ₂ O	9,5	-
Ukupni volumen	20	

Elektroforeza

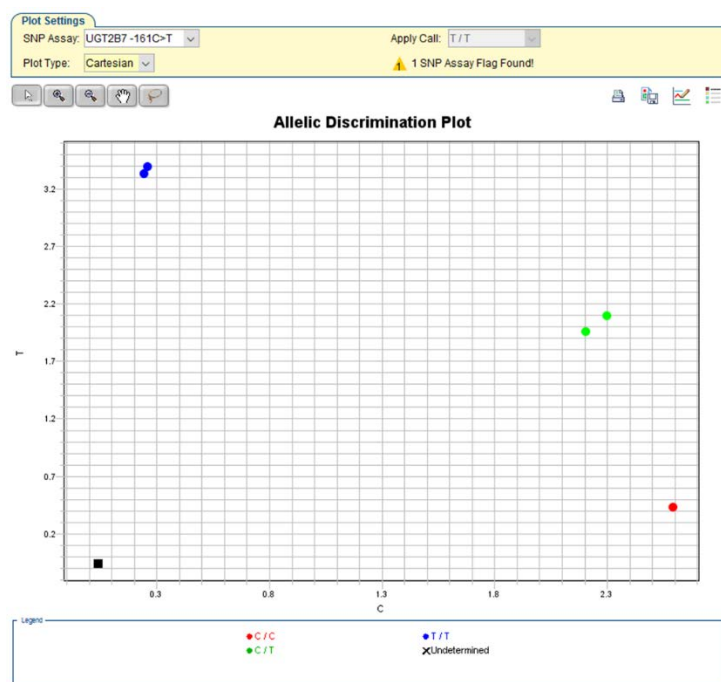
Analiza umnožaka PCR provodila se elektroforezom u 2 % agaroznom gelu (Invitrogen, SAD) s netoksičnom bojom (Olerup, Austrija). Razdvajanje na uređaju za elektroforezu PowerPac Basic (BIO-RAD Laboratories, SAD) je trajalo 70 minuta pri naponu od 75 V. Vizualizacija gelova izvodila se na uređaju G:BOX (Syngene, Ujedinjeno Kraljevstvo), a za detekciju duljine restrikcijskih ulomaka korišten je molekularni biljeg XIII (Roche, Njemačka). Interpretacija dobivenih ulomaka DNA i određivanje pojedinog genotipa opisana je u tablici 8. i prikazana na slici 13.

Tablica 8. Određivanje genotipa *UGT1A4**3 metodom PCR-RFLP

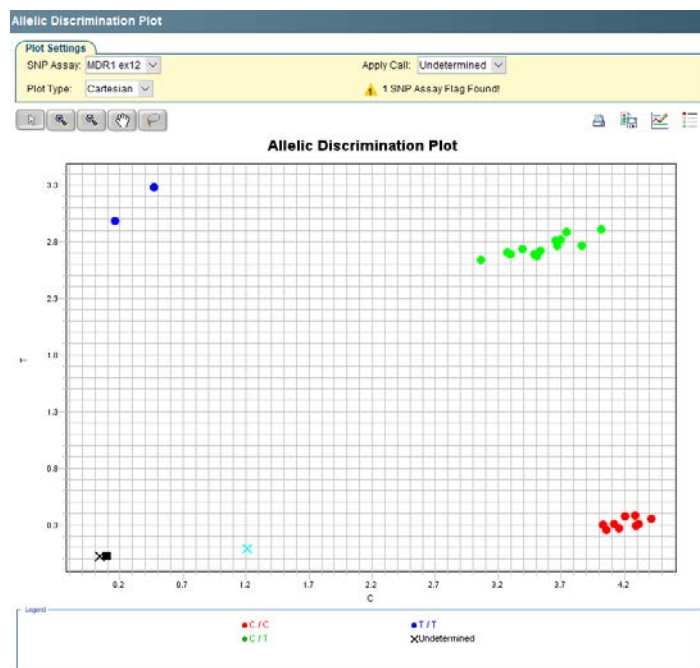
Genotip <i>UGT1A4</i> *3 (c.142T>G)	Broj parova baza
*1/*1 (TT)	360 i 288
*1/*3 (TG)	612, 360 i 288
*3/*3 (GG)	612



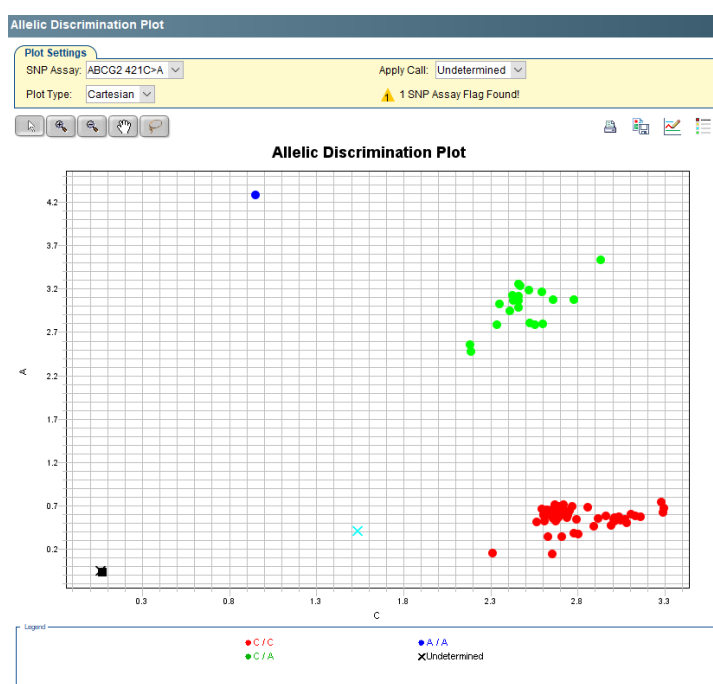
Slika 13. Analiza polimorfizma *UGT1A4**3 metodom PCR-RFLP



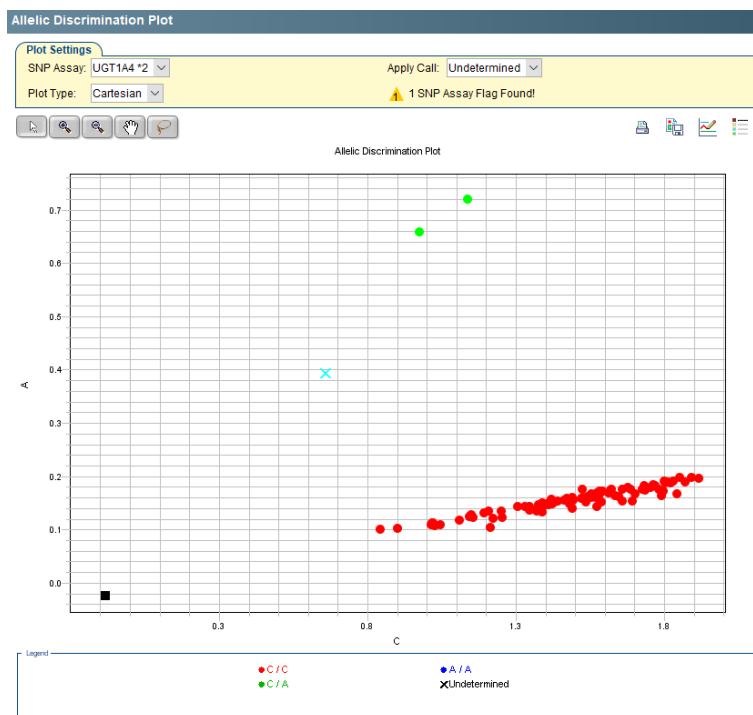
Slika 14. Analiza alelne diskriminacije polimorfizma *UGT2B7*-161 C>T TaqMan[®] metodom
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip CC; zelene točkice - heterozigot CT; plave točkice - homozigot mutirani TT.



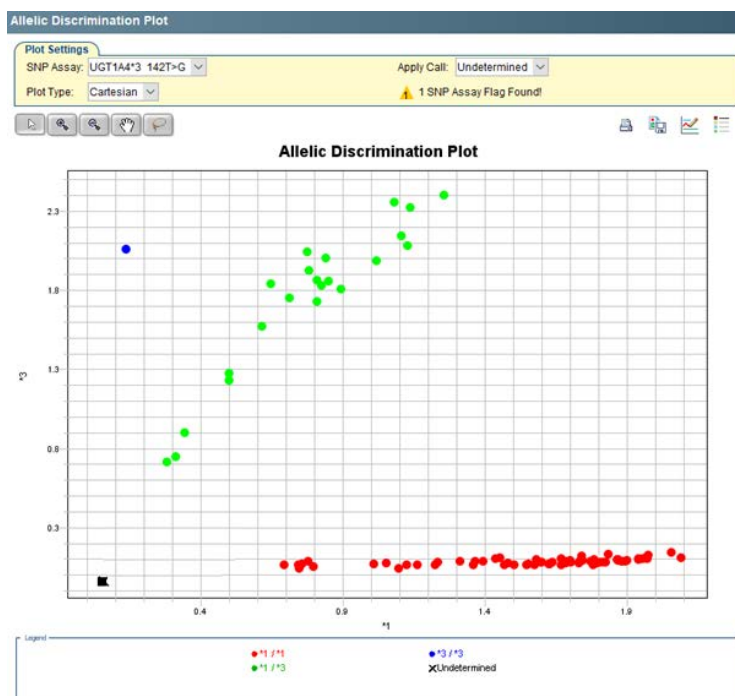
Slika 15. Analiza polimorfizma *ABCB1/MDR1* TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip CC; zelene točkice - heterozigot CT;
plave točkice - homozigot mutirani TT.



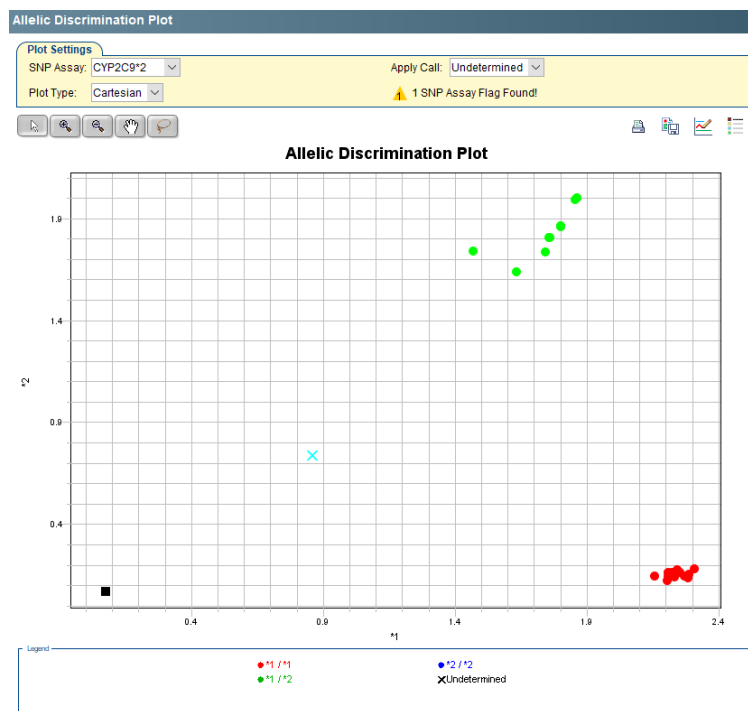
Slika 16. Analiza polimorfizma *ABCG2* TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip CC; zelene točkice - heterozigot CA;
plave točkice - homozigot mutirani AA.



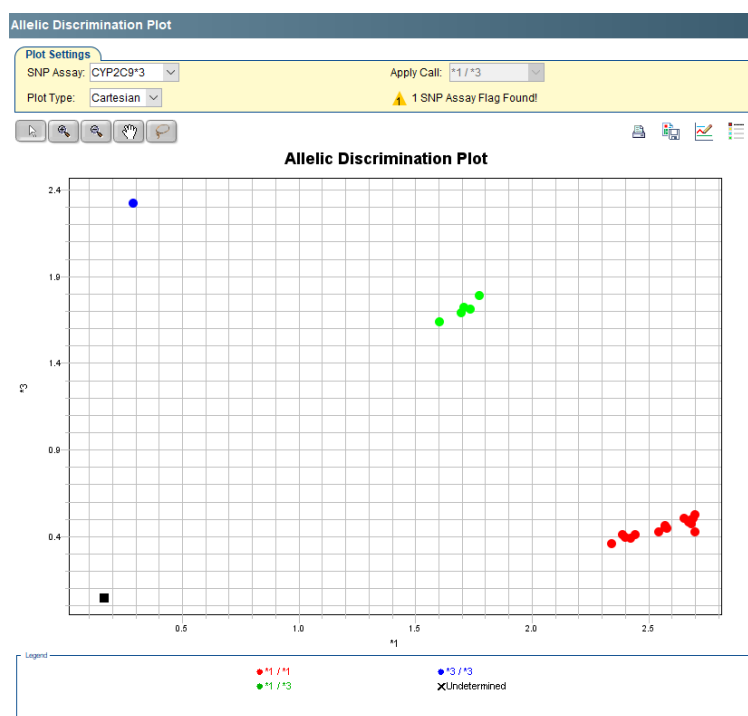
Slika 17. Analiza polimorfizma *UGT1A4* *2 TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip CC; zelene točkice - heterozigot CA;
plave točkice - homozigot mutirani AA.



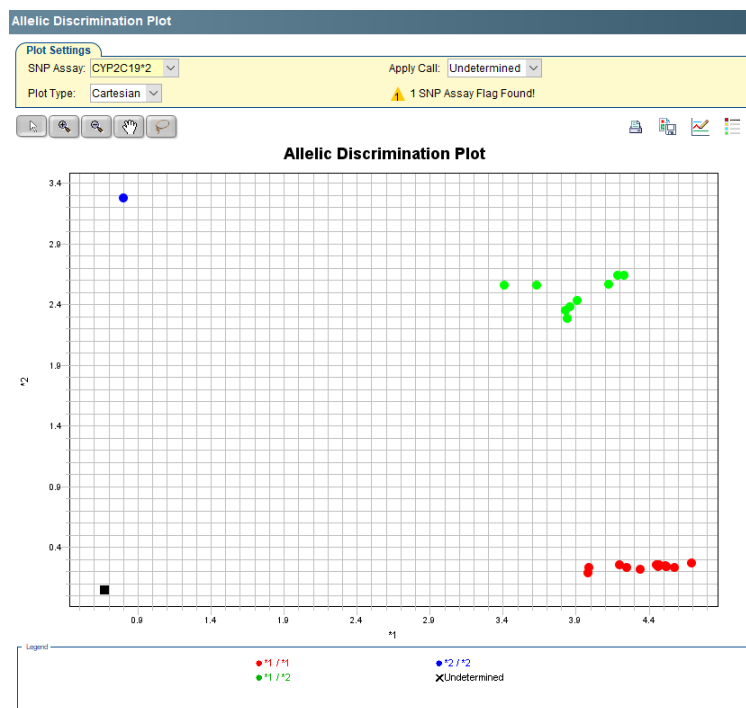
Slika 18. Analiza polimorfizma *UGT1A4* *3 TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip TT; zelene točkice - heterozigot TG;
plave točkice - homozigot mutirani GG



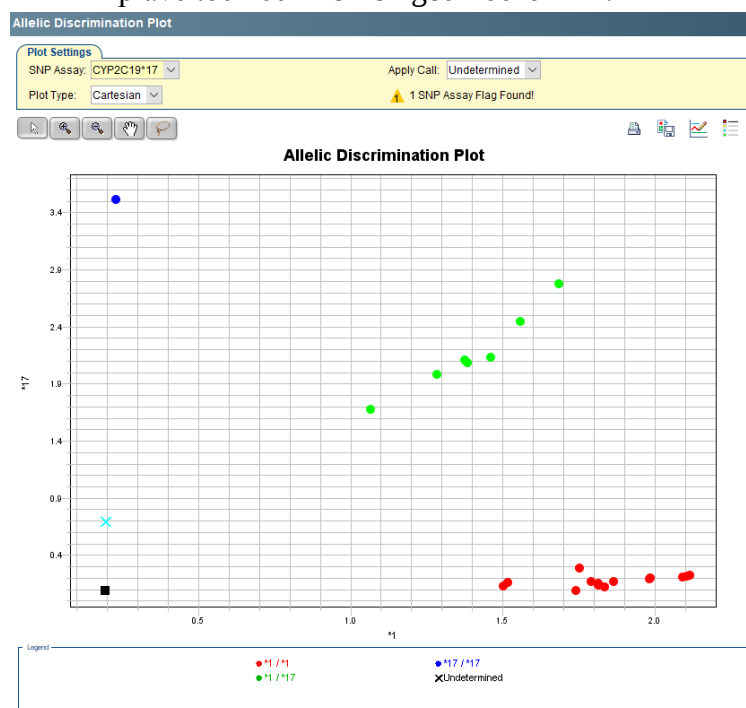
Slika 19. Analiza polimorfizma *CYP2C9**2 TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
 Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip *1/*1; zelene točkice - heterozigot *1/*2;
 plave točkice - homozigot mutirani *2/*2



Slika 20. Analiza polimorfizma *CYP2C9**3 TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
 Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip *1/*1; zelene točkice - heterozigot *1/*3;
 plave točkice - homozigot mutirani *3/*3



Slika 21. Analiza polimorfizma *CYP2C19*2* TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip **1/*1*; zelene točkice - heterozigot **1/*2*;
plave točkice - homozigot mutirani **2/*2*



Slika 22. Analiza polimorfizma *CYP2C19*17* TaqMan[®] metodom PCR u stvarnom vremenu
Tumačenje: crvene točkice - homozigot divlji tip **1/*1*; zelene točkice - heterozigot **1/*17*;
plave točkice - homozigot mutirani **17/*17*

3.2.3. Statističke metode

3.2.3.1 Veličina uzorka i snaga testa

Za potrebe ovog istraživanja nije proveden formalni izračun veličine uzorka (snage testa) budući da nisu bile raspoložive sve potrebne informacije, prvenstveno podaci o prevalenciji pojedinih genotipova. Primjerice, temeljem prethodnih istraživanja, za polimorfizam *ABCB1* (MDR1) 1236C>T očekivali smo prevalenciju od oko 40% (Lovrić i sur., 2012.), a očekivana prevalencija sporih i srednje brzih metabolizatora *CYP2C9* i *CYP2C19* bila je 20-30%. (Ganoci i sur., 2017.). No za druge ispitivane polimorfizme nismo u literaturi pronašli potrebne informacije. Stoga je odluka o veličini uzorka vođena ovim načelima:

- a) svaka od četiri podskupine ispitanika formirane na temelju genotipa na pojedinom od polimorfnih lokusa (nositelj varijantnog alela ili divlji tip i terapije (samo lamotrigin ili lamotrigin + valproat) treba imati najmanje po 10 ispitanika
- b) na dvostranoj razini greške tipa I od 5%, usporedba dvije skupine od po 10 ispitanika daje 80% vjerojatnosti (snagu testa) za detekciju razlike izražene kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio*, GMR) od 1,55 (55% više) ili 0,64 (36% manje), uz pretpostavljeni koeficijent varijacije od 35%. Smatrali smo da bi razlike te veličine (ili veće) mogle biti praktično važne.

3.2.3.2 Statistika

Kao mjera raspoloživosti lamotrigina i valproata, korištena je njihova koncentracija na kraju doznog intervala (engl. *trough*) tj. koncentracija određena neposredno prije slijedeće redovne doze, što je, za oba lijeka, općeprihvaćena mjera izloženost tim lijekovima i koristi se u TDM. Analizirane su: a) "sirove" izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$), te b) izmjerene koncentracije korigirane prema primjenjenoj dozi - nmol/L po miligramu doze. U daljnjem tekstu, za ove mjere koristit će se izrazi 'izmjerene koncentracije' i 'dozom prilagođene koncentracije'.

Za analizu su korišteni prirodni logaritmi (baza e) tih vrijednosti, a učinci (engl. *effects*) su iskazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio*, GMR) – GMR je eksponent razlika aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritama: $GMR = \exp[\bar{x} \ln(A) - \bar{x} \ln(B)]$. Podaci su analizirani u generalnim linearnim modelima.

Analiza je provedena sukladno definiranim ciljevima studije.

Primarni cilj: ispitati utjecaj pojedinih polimorfizama na raspoloživost lamotrigina, te na interakciju između lamotrigina i valproata

Za ostvarenje primarnog cilja studije, provedene su tri analize – glavna i dvije dodatne (suportivne).

Glavna analiza

Analiza je uključila sve ispitanike [kategorizirane kao divlji tip (engl. *wild type*, *wf*) ili kao nositelj varijantnog alela] i provedena je u više koraka :

a) **nepodešeni model** - zaseban model za svaki polimorfizam pojedinačno s ovim učincima: genotip (divlji tip ili nositelj varijantnog alela) na predmetnom lokusu, terapija (lamotrigin ili lamotrigin + valproat), interakcija genotip*terapija, te doza lamotrigina u analizi izmjerenih (neprilagođenih za dozu) koncentracija;

b) **potpuno podešeni modeli** – budući da je testiran učinak i na sam lamotrigin i na interakciju, korištena su tri tipa modela:

(i) *aditivni model* – učinci u modelu su: svi evaluirani polimorfizmi (za enzime i transportere; divlji tip ili nositelj varijantnog alela), terapija (lamotrigin ili lamotrigin + valproat), dob, spol, indeks tjelesne mase i doza lamotrigina (za izmjerene koncentracije, neprilagođene za dozu);

(iii) *multiplikativni modeli* – u modele su uključeni svi glavni učinci kao i u aditivnom modelu, samo što je u svakom od sukcesivnih modela slijedom testiranja i interakcija između terapije i genotipa na po jednom od ispitanih lokusa;

(iv) *parsimonični model* (samo učinci s P-vrijednostima $<0,05$, „reducirani“ multiplikativni model) – ovaj model je dodatno testiran samo za one polimorfizme za koje je nađen učinak na koncentraciju lamotrigina (razlikuje se od prethodna dva po tome što su izbačeni učinci koji nisu imali učinak na zavisnu varijablu).

Dodatna analiza 1

Ova dodatna analiza provedena je na potpuno isti način, primjenom svih istih modela kao i glavna analiza, samo što je varijabla „terapija“ umjesto kao dihotomna (lamotrigin ili

lamotrigin+valproat) tretirana kao kontinuirana varijabla: svim bolesnicima liječenim samo lamotriginom dodijeljena je vrijednost „0“, dok su vrijednosti za one liječene lamotriginom + valproatom odgovarale koncentraciji valproata na kraju doznog intervala.

Dodatna analiza 2

Učinak ispitanih polimorfizama na raspoloživost lamotrigina testiran je posebno u ispitanika liječenih samo lamotriginom i posebno u ispitanika liječenih samo valproatom. Za svaku od te dvije podskupine primijenjen je potpuno podešeni aditivni model (kako je opisano), samo što nije uključio nezavisnu varijablu „terapija“ (budući da je analiza u podskupinama po terapiji).

Sekundarni cilj: ispitati utjecaj pojedinih polimorfizama na raspoloživost valproata

Za analizu učinaka polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, UGT enzima i transportnih proteina na koncentraciju valproata (samo bolesnici liječeni lamotriginom + valproatom), razlike između brzih metabolizatora (ili ultra brzih u slučaju CYP2C19) i, kombinirano, srednje brzih i sporih metabolizatora, te razlika između varijantnog alela i divljeg tipa na svim analiziranim polimorfizmima UGT enzima i transportnih proteina, korišten je potpuno podešeni model, ali budući da je bilo samo 74 takva ispitanika, za svaki polimorfizam zasebno primijenjen je poseban model (osim polimorfizma, svaki model uključio je i ove učinke: dob, spol, indeks tjelesne mase, te doza valproata za analizu izmjerenih, dozom neprilagođenih koncentracija).

Za analizu podataka korišten je program SAS 9.4 za Windows (SAS Inc, Cary, NC, SAD). Za testiranje Hardy-Weinberg ravnoteže genotipova, te za testirane neravnoteže povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) korišten je računalni program CubeX (Gaunt i sur., 2007.).

4. REZULTATI

4.1. Osobine ispitanika

4.1.1. Temeljna svojstva

U istraživanje je bilo uključeno 205 ispitanika, od kojih je na monoterapiji lamotriginom bilo 131 (63,9%), dok ih je na politerapiji lamotriginom i valproatom bilo 74 (36,1%). Ispitanici u te dvije podskupine bili su razmjerno usporedivi prema dobi, spolu i indeksu tjelesne mase (Tablica 9).

Tablica 9. Demografski podaci o ispitanicima

	Svi ispitanici N=205	LAM N=131	LAM + VAL N=74
Dob	34 (16-77)	35 (16-74)	32,5 (16-77)
Muškarci	69 (33,6)	40 (30,5)	29 (39,2)
Žene	136 (66,3)	91 (69,4)	45 (60,8)
Indeks tjelesne mase	24 (12 – 40,5)	24,1 (18,7-40,5)	23,3 (12-35,4)

4.1.2. Učinak valproata na raspoloživost lamotrigina

Koncentracije lamotrigina i valproata na kraju doznog intervala (*trough*) – kako su izmjerene, te prilagođene prema primjenjenoj dozi (koncentracije po miligramu doze) – za sve, te zasebno za ispitanike na monoterapiji lamotriginom i one na politerapiji lamotriginom i valproatom, sažete su u tablici 10. Jasno je vidljivo da su koncentracije lamotrigina u monoterapiji znatno niže nego u politerapiji. Prosječna koncentracija lamotrigina na monoterapiji iznosila je 6,7 $\mu\text{mol/L}$, dok je na politerapiji iznosila 26 $\mu\text{mol/L}$.

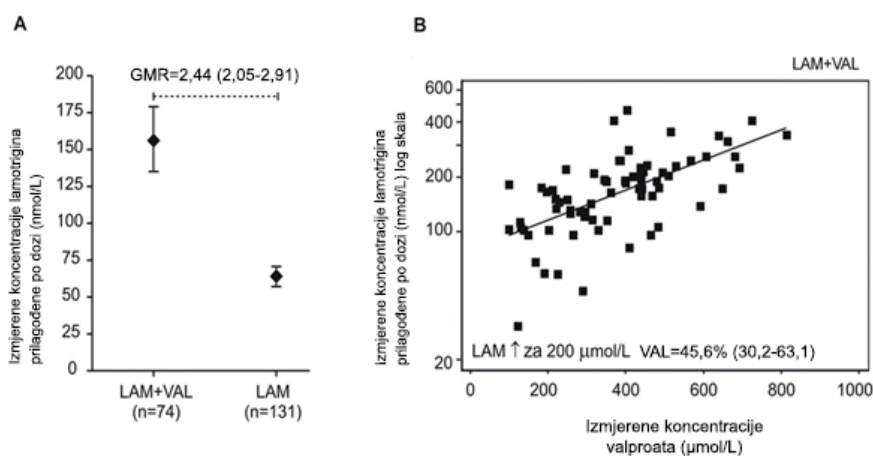
Tablica 10. Izmjerene koncentracije lamotrigina (LAM) i valproata (VAL), primjenjene doze, te prema dozi prilagođene koncentracije na kraju doznog intervala za sve ispitanike, te zasebno za one na monoterapiji (LAM) i politerapiji (LAM+VAL). Podaci su izraženi kao medijan (raspon).

	Svi ispitanici N=205	LAM N=131	LAM + VAL N=74
LAM izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$)	10,5 (0,5-102)	6,7 (0,5-37,6)	26 (2,3-102)
LAM doza (mg)	125 (12,5-400)	100 (12,5-400)	150 (25-350)

Tablica 10-nastavak

	Svi bolesnici N=205	LAM N=131	LAM + VAL N=74
LAM izmjerene koncentracije /mg doza (nmol/L)	92 (6,5-464)	68 (6,5-318)	172,3 (30,7-464)
VAL izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$)	376 (98,5-813,2)	---	376 (98,5-813,2)
VAL doza (mg)	1000 (250-2000)	---	1000 (250-2000)
VAL izmjerene koncentracije/mg doza (nmol/L)	412,9 (129,5-1295)	---	412,9 (129,5-1295)

Na slici 23 prikazan je učinak koadministracije valproata na izmjerene koncentracije lamotrigina prilagođene za primjenjenu dozu lamotrigina: uz podešenje za dob, spol i indeks tjelesne mase, koncentracije su 2,4 puta više u politerapiji valproatom nego u monoterapiji lamotriginom (slika 23A); u ispitanika na politerapiji, uz ista podešjenja, koncentracija lamotrigina je 45,6% viša za svaki porast izmjerenih koncentracija valproata za 200 $\mu\text{mol/L}$ (slika 23B).



Slika 23. Utjecaj valproata (VAL) na izmjerene koncentracije lamotrigina (LAM) prilagođene za primjenjenu dozu. **A)** Podešene (za dob, spol i indeks tjelesne mase) koncentracije lamotrigina u ispitanika na politerapiji (LAM+VAL) i ispitanika na monoterapiji (LAM) (rombovi su geometrijske srednje vrijednosti, vertikalne crte su 95% granice pouzdanosti) i

razlika između njih (naznačena horizontalnom crtkanom linijom) iskazana kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim granicama pouzdanosti. Analizirane su logaritmirane (baza e) vrijednosti koncentracija lamotrigina. Geometrijske srednje vrijednosti su eksponenti aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritama, a GMR je eksponent njihove razlike. **B)** Podešena (za dob, spol i indeks tjelesne mase) regresija koncentracija lamotrigina (izmjerene koncentracije prilagođene pod dozi) na koncentracije valproata (izmjerene koncentracije) u ispitanika na politerapiji. Procjena učinka valproata izražena je kao postotak s 95%-tnim intevalom pouzdanosti: koncentracija lamorigina raste za 46% za svakih 200 $\mu\text{mol/L}$ porasta koncentracije valproata izražena je kao postotak sa 95%-tnim intevalom pouzdanosti; porast koncentracije lamorigina za 46% za svaki 200 $\mu\text{mol/L}$ porast valproata.

4.1.3. Učestalost pojedinih polimorfizama

Učestalost varijantnih alela na pojedinim od ispitivanih lokusa sažeta je u tablici 11 i bila je kako slijedi: visoka (40-50%) za *MDR1/ABCB1* 1236 C>T i *UGT2B7* -161C>T, niska (10-13%) za *ABCG2* 421C>A i *UGT1A4* 142T>G (10-13%), dok je varijanti alel za *UGT1A4* 70C>A nađen tek sporadično – s frekvencijom od svega 2% (samo 6 ispitanika bili su nositelji varijantnog alela), te je bilo izvjesno da nije realno očekivati da bi se čak i u vrlo velikom uzroku mogao zadovoljiti uvjet od „najmanje 10 ispitanika u podskupinama po genotipu i terapiji“. Stoga ovaj polimorfizam nije uzet u obzir u daljnjim analizama. U ispitanika na politerapiji s valproatom prevladavali su brzi metabolizatori za CYP2C9 te brzi i ultra brzi metabolizatori za CYP2C19, dok su spori metabolizatori bili sporadični (tablica 11). Nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže niti na jednom lokusu, niti sveukupno, niti i u terapijskim podskupinama. Neravnotežnu povezanost između ispitivanih lokusa *ABCG2* i *UGT2B7* (smješteni na dugom kraku kromosoma 4) nije bilo moguće isključiti ($D' = 0,408$, $r^2 = 0,017$, $\text{Chi}^2 = 3,55$, $P = 0,059$).

Tablica 11. Učestalost genotipova na ispitivanim lokusima, ukupno i u terapijskim podskupinama: monoterapija lamotriginom (LAM) ili politerapija lamotriginom + valproatom (LAM+VAL). Polimorfizmi *CYP2C9* i *CYP2C19* ispitani su samo za ispitanike na politerapiji. Podaci su brojevi (postotci)

	Svi ispitanici (N=205)	LAM (N=131)	LAM+VAL (N=74)
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i> (rs2011425)			
TT	155 (75,9)	99 (76,2)	56 (75,3)
TG	47 (23,2)	30 (23,1)	17 (23,3)
GG	2 (0,99)	1 (0,77)	1 (1,37)
Učestalost varijantnog alela	13%	12%	13%
<i>UGT1A4*2 70C>A</i> (rs6755571)			
CC	199 (97,1)	128 (97,7)	71 (95,9)
CA	6 (2,9)	3 (2,3)	3 (4,1)
AA	0	0	0
Učestalost varijantnog alela	1%	1%	2%
<i>UGT2B7 -161 C>T</i> (rs7668258)			
CC	51 (24,9)	26 (19,9)	25 (33,8)
CT	98 (47,8)	65 (49,6)	33 (44,6)
TT	56 (27,3)	40 (30,5)	16 (21,6)
Učestalost varijantnog alela	51%	55%	44%
<i>ABCG2 421 C>A</i> (rs2231142)			
CC	167 (81,5)	103 (78,6)	64 (86,5)
CA	36 (17,5)	26 (19,9)	10 (13,5)
AA	2 (1,0)	2 (1,5)	0
Učestalost varijantnog alela	10%	11%	7%
<i>MDR1 1236 C>T</i>			
CC	75 (36,6)	50 (38,2)	25 (33,8)
CT	93 (45,4)	60 (45,8)	33 (44,6)
TT	37 (18,1)	21 (16,0)	16 (21,6)
Učestalost varijantnog alela	41%	39%	44%

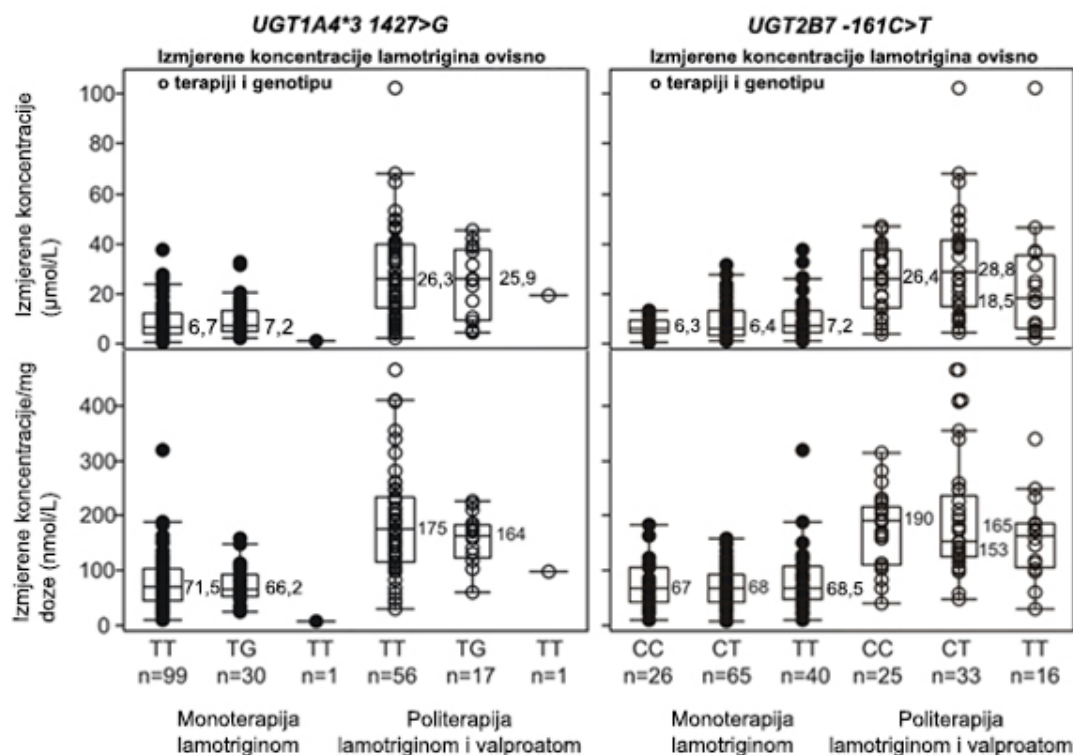
Tablica 11-nastavak

	Svi ispitanici (N=205)	LAM (N=131)	LAM+VAL (N=74)
CYP2C9 (rs1799853, rs1057910)			
*1/*1 (brzi metabolizator)	---	---	42 (56,8)
*1/*2 (srednje brzi metabolizator)	---	---	18 (24,3)
*1/*3 (srednje brzi metabolizator)	---	---	13 (17,6)
*2/*3 (spori metabolizator)	---	---	1 (1,3)
Učestalost alela *1 / *2 / *3 (%)	---	---	77,7 / 12,8 / 9,5
CYP2C19 (rs4244285, rs12248560)			
*1/*1 (brzi metabolizator)	---	---	28 (37,8)
*1/*17 (vrlo brzi metabolizator)	---	---	23 (31,1)
*17/*17 (vrlo brzi metabolizator)	---	---	2 (2,7)
*1/*2 (srednje brzi metabolizator)	---	---	13 (17,6)
*2/*17 (srednje brzi metabolizator)	---	---	5 (6,8)
*2/*2 (spori metabolizator)	---	---	3 (4,0)
Učestalost alela *1 / *2 / *17 (%)	---	---	62,2 / 16,2 / 21,6

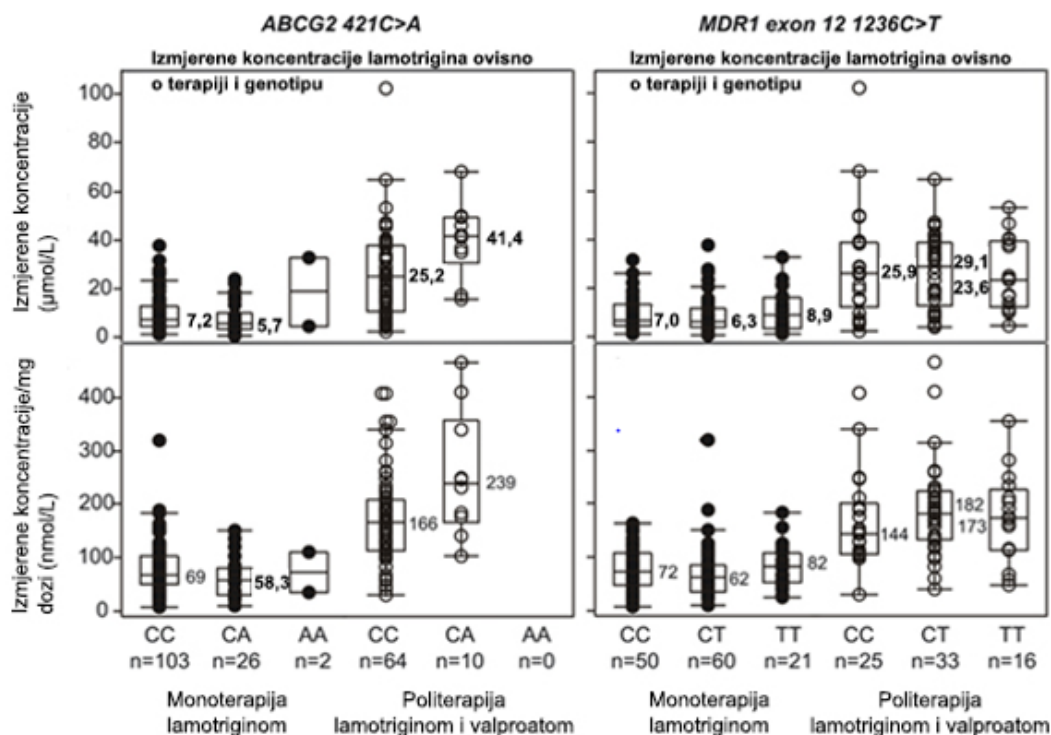
4.2. Utjecaj genskih polimorfizama za enzime UGT i transportere ABC na izmjerene koncentracije lamotrigina i na interakciju lamotrigin-valproat

4.2.1. Prikaz podataka: koncentracije lamotrigina ovisno o terapiji i genskom polimorfizmu za enzime UGT i transportne proteine ABC

Slika 24 i slika 25 prikazuju „sirove“ podatke: izmjerene i prema dozi prilagođene koncentracije lamotrigina u stanju dinamičke ravnotežne ovisno o terapiji (lamotrigin monoterapija ili politerapija s valproatom) i genskom polimorfizmu za enzime UGT (osim za *UGT1A4* 70 C>A) (slika 24), odnosno transportne proteine ABC (slika 25)



Slika 24 Izmjerene (gornji red) i prema dozi prilagođene (donji red) koncentracije lamotrigina ovisno o terapiji (monoterapija lamotriginom – lijevi dio svake slike, puni krugovi; ili politerapija lamotrigin+valproat – desni dio svake slike, otvoreni krugovi) i UGT genotipu (osim *UGT1A4**2, 70 C>A). Krugovi su individualne vrijednosti, horizontalne crte i brojčane vrijednosti su medijani, kvadrati označavaju gornju i donju kvartilu, a vertikalne crte označavaju unutarnje granice (od donja kvartila – 1,5 x interkvartilni raspon do gornja kvartila + 1,5 x interkvartilni raspon). Točke izvan ograda su netipične vrijednosti (engl. *outlier*).



Slika 25 Izmjerene (gornji red) i prema dozi prilagođene (donji red) koncentracije lamotrigina ovisno o terapiji (monoterapija lamotriginom – lijevi dio svake slike, puni krugovi; ili politerapija lamotrigin+valproat – desni dio svake slike, otvoreni krugovi) i ABC genotipu. Krugovi su individualne vrijednosti, horizontalne crte i brojčane vrijednosti su medijani, kvadrati označavaju gornju i donju kvartil, a vertikalne crte označavaju unutarnje granice (od donja kvartila – 1,5 x interkvartilni raspon do gornja kvartila + 1,5 x interkvartilni raspon). Točke izvan ograda su netipične vrijednosti (engl. *outlier*).

Podaci za polimorfizam *UGT1A4**2 70 C>A nisu grafički prikazani budući da je u uzorku bilo svega 6 nositelja varijantnog alela na ovom lokusu i nije bila moguća daljnja analiza potencijalnog učinka ovog polimorfizma na raspoloživost lamotrigina ili na lamotrigin-valproat interakciju. Nekoliko podataka, međutim, ukazuje da ovaj polimorfizam vrlo vjerojatno nema nikakav učinak na te parametre. Naime, od ispitanika na monoterapiji lamotriginom, 128/131 bili su nositelji divljeg tipa, a raspon izmjerenih koncentracija lamotrigina bio je od 0,5 do 37,6 μmol/l (medijan 6,6), dok je raspon prema dozi prilagođenih koncentracija iznosio 6,5 do 318 nmol/L (medijan 68,0). U tri nositelja varijantnog alela, izmjerene individualne koncentracije iznosile su 5,2, 12,5 odnosno 23,8 μmol/L, a

prilagođene koncentracije 79,3, 104,0 odnosno 125 nmol/L, tako da su se nalazile u potpunosti unutar raspona vrijednosti izmjerenih u ispitanika s genotipom divljeg tipa.

Slično, među bolesnicima liječenim lamotriginom i valproatom, 71/74 imali su divlji tip genotipa na ovom lokusu, a raspon koncentracija lamotrigina iznosio je 2,3 do 102 μ mol/L (medijan 25,9), dok je raspon prema dozi prilagođenih koncentracija iznosio 30,7 do 464 nmol/L (medijan 171,6). U tri nositelja varijantnog alela individualne koncentracije iznosile su 6,5, 49,3 odnosno 67,8 μ mol/L (prema dozi prilagođenih koncentracija 130, 247 odnosno 339 nmol/L), tako da su se nalazile u potpunosti unutar raspona vrijednosti izmjerenih u ispitanika s genotipom divljeg tipa.

4.2.2. Analiza

U svrhu odgovora na pitanje da li bilo koji (ili više) od analiziranih polimorfizama UGT enzima (*UGT2B7* -161C>T, *UGT1A4* 142T>G) i ABC transportnih proteina (*MDR1/ABCB1* 1236 C>T, *ABCG2* 421C>A) ima utjecaj na raspoloživost lamotrigina (izmjerene koncentracije) i/ili na interakciju između lamotrigina i valproata, provedena je jedna glavna i dvije dodatne analize.

Glavna analiza

Analiza je provedena u tri koraka.

Prvi korak je preliminarni probir koji je imao naznačiti mogući učinak (nekog) polimorfizma. Proveden je tako da su podaci (izmjerene i prema dozi prilagođene koncentracije) logaritmirani (baza e) i analizirani u nizu nepodešenih generalnih linearnih modela: po jedan model za svaki od četiri polimorfizma. Svaki model je sadržavao ove učinke (nezavisne varijable): terapija (monoterapija lamotriginom ili politerapija lamotrigin i valproat), genotip na predmetnom lokusu (varijantni alel ili divlji tip), dozu lamotrigina (za izmjerene koncentracije) i terapija*genotip interakciju – interakcija omogućuje da se odredi učinak polimorfizma posebno za ispitanike na monoterapiji i posebno za ispitanike na politerapiji, odnosno da se procjeni učinak terapije (valproata) ovisno o tome je li ispitanik nositelj varijantnog alela ili homozigot divljeg tipa. Učinci su prikazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR), a sažeti su u tablici 12. U svakom je modelu konzistentno uočen (poznati) učinak valproata na raspoloživost lamotrigina – oko 2,5 do 3,5 puta više koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala u ispitanika koji su primali lamotrigin i valproat u usporedbi s onima na monoterapiji lamotriginom. Također (razumljivo), izmjerene

koncentracije lamotrigina bile su to više što je doza lamotrigina bila viša: za oko 16% više za svakih 25 mg višu dozu. Niti za jedan polimorfizam (prisustvo varijantnog alela u odnosu na homozigot divljeg tipa) nije uočen učinak na koncentracije lamotrigina ili na odnos valproat-lamotrigin – osim za polimorfizam za transporter ABCG2 (*ABCG2* 421C>A) – sveukupno, prisustvo varijantnog alela nije imalo učinka na koncentracije lamotrigina, ali je uočena izražena interakcija između genotipa i terapije: učinak valproata na lamotrigin bio je oko 2,19 puta veći u nositelja varijantnog alela nego u homozigota divljeg tipa i obrnuto, za isto toliko se razlikovao učinak varijantnog alela u ispitanika na politerapiji u odnosu na one na monoterapiji.

Tablica 12. Učinak ispitivanih polimorfizama (varijantnih alela) UGT enzima i ABC transportnih proteina na raspoloživost lamotrigina [izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$) i prilagođene po dozi (nmol/L po miligramu doze) i na interakciju između lamotrigina (LAM) i valproata (VAL) – rezultati nepodešenih modela. Učinci su prikazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim granicama pouzdanosti. Za svaki je model prikazana i vrijednost AIC (*Akaike's information criterion* – što je vrijednost niža, to je model prikladniji podacima, tj. ima bolji „fit“).

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	GMR (95% CI)	P	GMR (95% CI)	P
UGT1A4*3 142T>G	AIC=403,5		AIC=381,8	
Učinak valproata (terapije): LAM+VAL vs. LAM	2,60 (2,10-3,20)	<0,001	2,48 (2,02-3,04)	<0,001
Učinak varijantnog alela: varijantni alel vs. divlji tip	0,92 (0,75-1,13)	0,426	0,91 (0,74-1,12)	0,370
Učinak valproata ovisno o genotipu				
LAM+VAL vs. LAM uz divlji tip	2,89 (2,35-3,55)	<0,001	2,53 (2,07-3,09)	<0,001
LAM+VAL vs. LAM uz varijantni alel	2,33 (1,62-3,35)	<0,001	2,44 (1,71-3,47)	<0,001
Učinak varijantnog alela ovisno o terapiji				
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM	1,02 (0,80-1,32)	0,858	0,93 (0,73-1,19)	0,549
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM+VAL	0,83 (0,59-1,15)	0,256	0,90 (0,65-1,24)	0,501

Tablica 12-nastavak

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	GMR (95% CI)	P	GMR (95% CI)	P
Razlika učinaka valproata ovisno o genotipu, odnosno varijantnog alela ovisno o terapiji	0,81 (0,53-1,22)	0,311	0,96 (0,64-1,45)	0,862
LAM doza (po 25 mg)	1,16 (1,13-1,19)	<0,001	---	---
UGT2B7 -161C>T	AIC=404,7		AIC=382,6	
Učinak valproata (terapije): LAM+VAL vs. LAM	2,79 (2,27-3,42)	<0,001	2,53 (2,08-3,08)	<0,001
Učinak varijantnog alela: varijantni alel vs. divlji tip	1,00 (0,82-1,23)	0,979	1,00 (0,82-1,22)	0,986
Učinak valproata ovisno o genotipu				
LAM+VAL vs. LAM uz divlji tip	2,89 (2,04-4,08)	<0,001	2,60 (1,86-3,63)	<0,001
LAM+VAL vs. LAM uz varijantni alel	2,69 (2,17-3,34)	<0,001	2,47 (2,00-3,04)	<0,001
Učinak varijantnog alela ovisno o terapiji				
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM	1,04 (0,79-1,36)	0,780	1,02 (0,79-1,33)	0,855
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM+VAL	0,97 (0,72-1,31)	0,831	0,97 (0,72-1,31)	0,852
Razlika učinaka valproata ovisno o genotipu, odnosno varijantnog alela ovisno o terapiji	0,93 (0,62-1,40)	0,730	0,95 (0,64-1,41)	0,794
LAM doza (po 25 mg)	1,16 (1,13-1,19)	<0,001	---	---
MDR1 1236C>T	AIC=404,9		AIC=382,4	
Učinak valproata (terapije): LAM+VAL vs. LAM	2,70 (2,24-3,26)	<0,001	2,45 (2,04-2,94)	<0,001
Učinak varijantnog alela: varijantni alel vs. divlji tip	1,05 (0,87-1,26)	0,634	1,03 (0,86-1,23)	0,781
Učinak valproata ovisno o genotipu	2,58 (1,91-3,49)	<0,001	2,26 (1,69-3,03)	<0,001
LAM+VAL vs. LAM uz divlji tip				
LAM+VAL vs. LAM uz varijantni alel	2,83 (2,26-3,54)	<0,001	2,65 (2,13-3,29)	<0,001

Tablica 12-nastavak

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	GMR (95% CI)	P	GMR (95% CI)	P
Učinak varijantnog alela ovisno o terapiji	1,00 (0,80-1,25)	1,000	0,95 (0,77-1,18)	0,632
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM				
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM+VAL	1,10 (0,81-1,48)	0,555	1,11 (0,83-1,49)	0,488
Razlika učinaka valproata ovisno o genotipu, odnosno varijantnog alela ovisno o terapiji	1,09 (0,75-1,59)	0,633	1,17 (0,81-1,68)	0,400
LAM doza (po 25 mg)	1,16 (1,13-1,19)	<0,001	---	---
ABCG2 421C>A	AIC=394,0		AIC=375,2	
Učinak valproata (terapije): LAM+VAL vs. LAM	3,57 (2,80-4,54)	<0,001	3,10 (2,45-3,93)	<0,001
Učinak varijantnog alela: varijantni alel vs. divlji tip	1,13 (0,89-1,43)	0,325	1,13 (0,89-1,42)	0,323
Učinak valproata ovisno o genotipu				
LAM+VAL vs. LAM uz divlji tip	2,41 (1,99-2,92)	<0,001	2,26 (1,87-2,73)	<0,001
LAM+VAL vs. LAM uz varijantni alel	5,28 (3,39-8,20)	<0,001	4,26 (2,76-6,57)	<0,001
Učinak varijantnog alela ovisno o terapiji				
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM	0,76 (0,59-0,98)	0,037	0,82 (0,64-1,05)	0,120
Varijantni alel vs. divlji tip uz LAM+VAL	1,67 (1,11-2,52)	0,014	1,55 (1,04-2,31)	0,033
Razlika učinaka valproata ovisno o genotipu, odnosno varijantnog alela ovisno o terapiji*	2,19 (1,35-3,54)	0,001	1,89 (1,18-3,03)	0,009
LAM doza (po 25 mg)	1,16 (1,13-1,19)	<0,001	---	---

*značajna interakcija polimorfizma i terapije

Drugi korak je imao svrhu provjeriti je li opaženi učinak ABCG2 polimorfizam na interakciju valproata i lamotrigina nezavisan i, ujedno, je li izostanak ukupnog učinka polimorfizma možda „maskiran“ istodobnim učinkom nekog drugog čimbenika – npr. spola, dobi, indeksa tjelesne mase ili pak bilo kojim drugim polimorfizmom od onih koji su istraživani. U tu svrhu

su logaritmirane koncentracije lamotrigina (izmjerene i prilagođene prema dozi) analizirane u *potpuno podešenim modelima* – prvo u aditivnom modelu, dakle bez interakcija [učinci u modelu su: terapija, dob, spol, indeks tjelesne mase i genotip (varijantni alel ili homozigot divljeg tipa) na sva četiri analizirana lokusa], a zatim u nizu od četiri multiplikativna modela – po jedan za svaki od analiziranih polimorfizama - svaki je model uključivao ove učinke: terapija (monoterapija lamotriginom ili politerapija lamotrigin+valproat), genotip na predmetnom lokusu (varijantni alel ili divlji tip), terapija*genotip interakcija, genotip na svakom od preostala tri istraživana lokusa, dob, spol, indeks tjelesne mase i doza lamotrigina (za izmjerene koncentracije). Glavni rezultati tih modela sažeti su u tablici 13 – prikazane su F-vrijednosti i odgovarajuće P-vrijednosti za svaku nezavisnu varijablu. U svim je modelima ponovljeno uočeno slično kao i u nepodešenim modelima: značajan (nezavisan) učinak valporata na raspoloživost lamotrigina, značajan (nezavisan) učinak više doze lamotrigina na „jednostavne“ izmjerene koncentracije, izostanak učinka bilo kojeg od polimorfizama na raspoloživost lamotrigina, izostanak učinka polimorfizama UGT enzima i MDR1 (ABCB1) transportera na lamotrigin-valproat interakciju te statistički značajna interakcija između *ABCG2* genotipa (varijantni alel ili homozigotni divlji tip) i terapije (lamotrigin ili lamotrigin+valproat) – što potvrđuje da je taj učinak nezavisan.

Treći korak je primijenjen samo za polimorfizam *ABCG2* – podaci su analizirani u parsimoničnom modelu koji je zadržao samo one nezavisne varijable koje su u multiplikativom modelu imale statistički značajan učinak ($P < 0,05$).

Na slici 26 prikazani su rezultati glavne analize učinka polimorfizma *ABCG2* 421 C>A na koncentracije lamotrigina i interakciju između lamotrigina i valproata u nepodešenom, potpuno podešenom multiplikativnom i parsimoničnom modelu. Glavna je poruka podataka prikazanih na slici da je učinak ovog polimorfizma konzistentan po opsegu u svim modelima, tj. da je „intenzitet“ interakcije ovog polimorfizma i valproata uvijek sličan bez obzira na to koje su sve druge nezavisne varijable uključene u model. Kako je prikazano na slici 26: a) u svim je modelima koncentracija lamotrigina 3,0-3,5 puta viša u ispitanika na politerapiji lamotriginom i valproatom nego u ispitanika na monoterapiji lamotriginom (sveukupni učinak valproata; b) sam varijantni alel *ABCG2* 421C>A nema ukupan utjecaj na koncentracije lamotrigina; c) međutim, u svim je modelima uočljiva značajna interakcija između terapije i varijantnog alela: (i) kod nositelja varijantnog alela, učinak valproata na izmjerene koncentracije lamotrigina je 2,19 do 2,36 puta veći nego u homozigota divljeg tipa ($P = 0,001$

ili $P < 0,001$; od modela do modela), dok je učinak na koncentracije prilagođene prema dozi oko 1,9 do 2,0 puta veći ($P = 0,009$, $P = 0,006$ i $P = 0,005$, od modela do modela); (ii) obrnuto, u ispitanika na politerapiji, varijantni alel je združen s 1,67 – 1,72 puta višom izmjerenom koncentracijom lamotrigina i s 1,55-1,60 puta višom prema dozi prilagođenom koncentracijom lamotrigina u odnosu na homozigote divljeg tipa; dok je u ispitanika na monoterapiji lamotriginom, varijantni alel združen s oko 18 do 26% nižom koncentracijom lamotrigina (izmjerene ili prilagođene, od modela do modela) u odnosu na homozigote divljeg tipa.

Tablica 13. Učinak ispitivanih polimorfizama (varijantnih alela) UGT enzima i ABC transportnih proteina na raspoloživost lamotrigina [koncentracije – izmjerene ($\mu\text{mol/L}$) i prilagođene po dozi (nmol/L po miligramu doze) i na interakciju između lamotrigina (LAM) i valproata (VAL) – rezultati potpuno podešenih modela. Prikazane su F i P-vrijednosti za svaku varijablu u svakom modelu. Za svaki je model prikazana i vrijednost AIC (*Akaike's information criterion* – što je vrijednost niža, to je model sukladniji podacima).

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	F	P	F	P
Aditivni model (bez interakcija)	AIC=424,5		AIC=403,7	
Dob	0,69	0,409	0,08	0,782
Spol	0,79	0,375	0,01	0,931
Indeks tjelesne mase	2,06	0,152	3,70	0,056
Terapija (LAM+VAL vs. LAM)	105,55	<0,001	92,45	<0,001
UGT1A4*3 142T>G (varijantni alel vs. divlji tip)	0,63	0,429	1,31	0,254
UGT2B7 -161C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,00	0,978	0,00	0,971
MDR1 1236C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,41	0,522	0,09	0,768
ABCG2 421C>A (varijantni alel vs. divlji tip)	0,17	0,678	0,03	0,862
LAM doza	107,73	<0,001	---	---

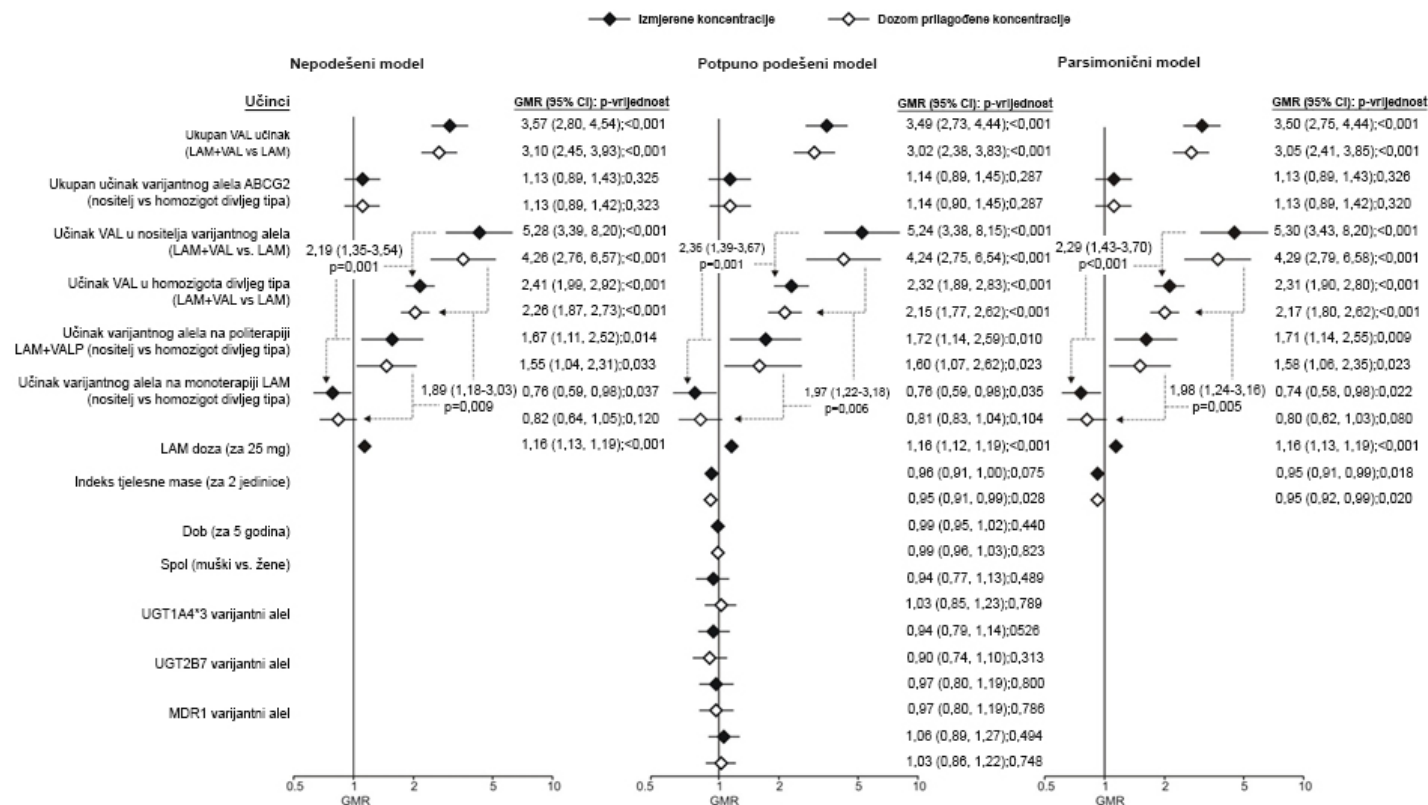
Tablica 13-nastavak

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	F	P	F	P
Model s interakcijom: terapija	AIC=424,7		AIC=404,9	
*UGT1A4*3				
Dob	0,64	0,425	0,07	0,789
Spol	0,69	0,407	0,01	0,921
Indeks tjelesne mase	2,18	0,142	3,71	0,056
Terapija (LAM+VAL vs. LAM)	69,98	<0,001	66,43	<0,001
UGT1A4*3 142T>G (varijantni alel vs. divlji tip)	1,11	0,294	1,35	0,247
UGT2B7 -161C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,01	0,912	0,00	0,986
MDR1 1236C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,50	0,482	0,09	0,758
ABCG2 421C>A (varijantni alel vs. divlji tip)	0,25	0,618	0,04	0,848
Terapija*UGT1A4*3 142T>G interakcija	1,14	0,288	0,05	0,816
LAM doza	107,79	<0,001	---	---
Model s interakcijom terapija*UGT2B7	AIC=425,8		AIC=405,0	
Dob	0,67	0,413	0,07	0,787
Spol	0,78	0,377	0,01	0,928
Indeks tjelesne mase	2,03	0,155	3,67	0,057
Terapija (LAM+VAL vs. LAM)	85,17	<0,001	74,78	<0,001
UGT1A4*3 142T>G (varijantni alel vs. divlji tip)	0,61	0,436	1,28	0,259
UGT2B7 -161C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,00	0,990	0,00	0,961
MDR1 1236C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,39	0,533	0,08	0,776
ABCG2 421C>A (varijantni alel vs. divlji tip)	0,17	0,682	0,03	0,865
Terapija*UGT2B7 -161C>T interakcija	0,01	0,909	0,01	0,922
LAM doza	106,59	<0,001	---	---

Tablica 13-nastavak

Modeli po polimorfizmu	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	F	P	F	P
Model s interakcijom terapija*MDR1	AIC=425,8		AIC=404,3	
Dob	0,73	0,393	0,12	0,735
Spol	0,69	0,409	0,04	0,847
Indeks tjelesne mase	2,05	0,154	3,70	0,056
Terapija (LAM+VAL vs. LAM))	94,68	<0,001	80,59	<0,001
UGT1A4*3 142T>G (varijantni alel vs. divlji tip)	0,67	0,413	1,44	0,231
UGT2B7 -161C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,01	0,935	0,01	0,942
MDR1 1236C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,57	0,451	0,33	0,565
ABCG2 421C>A (varijantni alel vs. divlji tip)	0,17	0,683	0,03	0,870
Tretman*MDR1 1236C>T interakcija	0,22	0,639	0,86	0,355
LAM doza	107,36	<0,001	---	---
Model s interakcijom*ABCG2	AIC=414,7		AIC=396,9	
Dob	0,60	0,440	0,05	0,823
Spol	0,48	0,488	0,07	0,789
Indeks tjelesne mase	3,21	0,075	4,93	0,028
Terapija (LAM+VAL vs. LAM)	103,11	<0,001	84,63	<0,001
UGT1A4*3 142T>G (varijantni alel vs. divlji tip)	0,40	0,526	1,02	0,313
UGT2B7 -161C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,06	0,800	0,07	0,786
MDR1 1236C>T (varijantni alel vs. divlji tip)	0,47	0,494	0,10	0,748
ABCG2 421C>A (varijantni alel vs. divlji tip)	1,14	0,287	1,14	0,287
Tretman*ABCG2 421C>A interakcija	11,09	0,001	7,88	0,006
LAM doza	114,20	<0,001	---	---

Razlika ovih učinaka po iznosu je identična razlici učinaka valproata u nositelja varijantnog alela i u homozigota divljeg tipa; d) viša doza lamotrigina konstatno je povezana s višim koncentracijama lamotrigina (za 16% za 25 mg; $P < 0,001$ u svim modelima); e) viši indeks tjelesne mase je povezan s nižim koncentracijama lamotrigina (za 4-5% za 2 jedinice; $P < 0,05$ u parsimoničnom modelu); f) nema učinaka dobi, spola i drugih ispitivanih varijantnih alela za enzime UGT i transporter MDR1/ABCB1.



Slika 26. Učinak polimorfizma *ABCG2* 421C>A (varijantnog alela) na koncentracije (izmjerene – crni rombovi; i prilagođene po dozi – bijeli rombovi) i na interakciju između lamotrigina (LAM) i valproata (VAL) – sažetak glavne analize: rezultati nepodešenog modela, potpuno podešenog multiplikativnog modela i parsimoničnog multiplikativnog modela. Učinci su iskazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim granicama pouzdanosti (CI). Crtkane strelice naznačuju značajne interakcije (omjer dva GMR-a s P-vrijednosti)

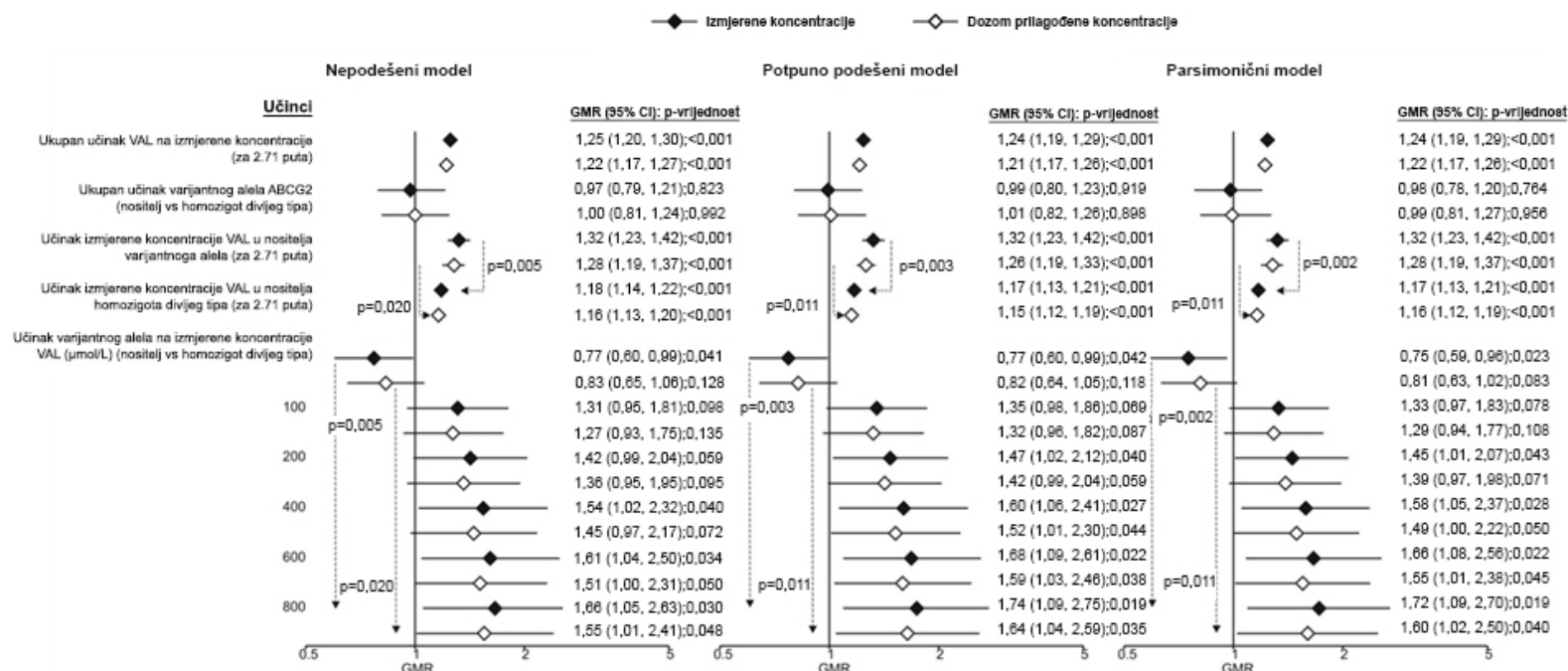
Dodatna analiza 1

U ovoj su analizi korišteni svi isti modeli kao i u glavnoj analizi, samo što je varijabla „terapija“ umjesto kao dihotomna (samo lamotrigin ili lamotrigin+valproat) tretirana kao kontinuirana – umjesto činjenice uporabe valproata, korištene su njegove izmjerene koncentracije: svim bolesnicima koji su liječeni samo lamotriginom dodijeljena je vrijednost „0“, a svaki ispitanik na politerapiji „zastupljen“ je svojom pripadajućom koncentracijom valproata. Rezultati su sažeti na slici 27, a sukladni su rezultatima glavne analize:

a) više izmjerene koncentracije valporata združene su s višim izmjerenim i prema dozi prilagođenim koncentracijama lamotrigina. Budući da je za potrebe generalnog linearnog modela bilo nužno logaritmirati i koncentracije valproata, učinak je iskazan kao iznos promjene koncentracije lamotrigina za 2,71-struki porast koncentracije valproata i iznosi od 21% do 25% (od modela do modela, izmjerene i prema dozi prilagođene koncentracije lamotrigina);

b) nema ukupnog učinka *ABCG2* varijantnog alela na koncentracije lamotrigina;

c) izražena je interakcija između terapije i genotipa: (i) porast (2,71-struki) koncentracije valproata združen je s veći porastom koncentracije lamotrigina kod nositelja varijantnog alela (za 32% u svim modelima) nego kod homozigota divljeg tipa (17-18% od modela do modela) – razlika između tih učinaka je značajna ($P=0,005$, $0,003$ i $0,002$, od modela do modela); (ii) obrnuto, učinak varijantnog alela na koncentracije lamotrigina različit je na različitim vrijednostima koncentracija valproata: kreće se od 23-25% nižih koncentracija kod nositelja varijantnog alela nego kod homozigota divljeg tipa kad je koncentracija valproata=0 (samo terapija lamotriginom), do 66-72% viših izmjerenih koncentracija i 55-64% viših prema dozi prilagođenih koncentracija kada je koncentracija valporata $800 \mu\text{mol/L}$ (od modela do modela) – u svim je modelima taj trend promjene učinka varijantnog alela na koncentraciju lamotrigina ovisno o koncentraciji valproata statistički značajan. Svi drugi učinci (dob, spol, indeks tjelesne mase, ostali polimorfizmi) u ovoj su analizi i po iznosu i po statističkoj (ne)značajnosti isti kao u glavnoj analizi prikazanoj na slici 26, pa radi jednostavnosti nisu ponovljeno prikazani i na slici 27.

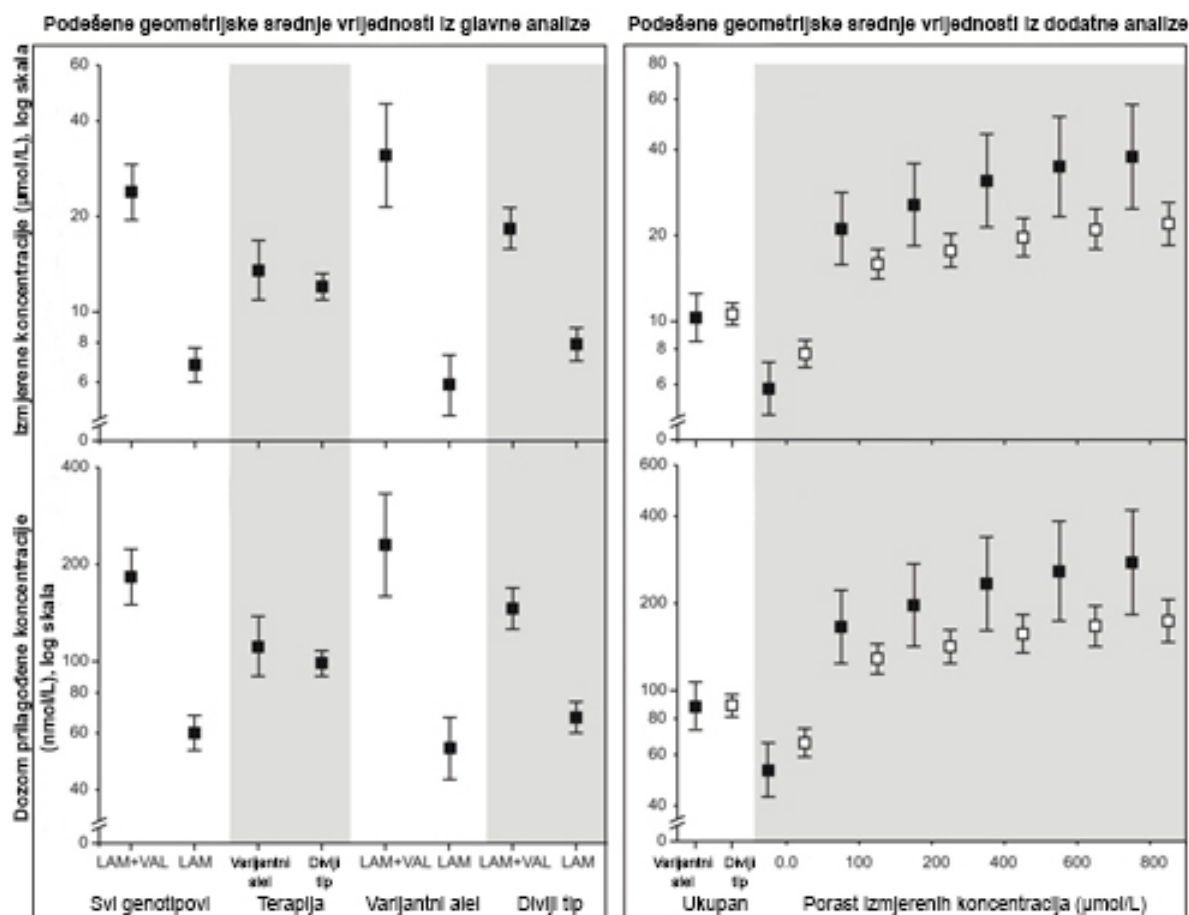


Slika 27. Učinak polimorfizma *ABCG2 421C>A* (varijantnog alela) na koncentracije lamotrigina (izmjerene – crni rombovi; i prilagođene po dozi – bijeli rombovi) i na interakciju između lamotrigina (LAM) i valproata (VAL) – sažetak dodatne analize 1: rezultati nepodešenog modela, potpuno podešenog multiplikativnog modela i parsimoničnog multiplikativnog modela. Učinci su iskazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim granicama pouzdanosti (CI). Crtkane strelice naznačuju značajne interakcije (omjer dva GMR-a s P-vrijednosti). Za razliku od glavne analize, ovdje je činjenica koadministracija valproata tretirana kao kontinuirana (a ne dihotomna) varijabla: bolesnicima koji su liječeni samo lamotriginom pridružena je vrijednost „0“, a ostale predstavljaju njihove izmjerene koncentracije valproata. Za potrebe modela (uvjet normalnosti reziduala), bilo je potrebno logaritmirati i koncentracije valporata – tako da je učinak valproata prikazan kao GMR za 2,71-struki porast koncentracije valproata.

Slika 28 objedinjeno prikazuje podešene geometrijske srednje vrijednosti koncentracija lamotrigina (izmjerene i prema dozi prilagođene) iz parsimoničnih modela u glavnoj (slika 28 lijevo) i dodatnoj 1 (slika 28 desno) analizi kako bi se bolje uočio opseg interakcije između terapije i *ABCG2* genotipa, odnosno razlika učinaka valproata ovisno o genotipu i, obrnuto, razlika učinaka varijantnog alela ovisno o prisustvu valproata u terapiji, te glavni elementi te interakcije.

Prosječne vrijednosti iz glavne analize (slika 28, lijevo) ukazuju da je razlika učinka valproata između dva genotipa (nositelj varijantnog alela ili homozigot divljeg tipa) prvenstveno posljedica viših koncentracija lamotrigina u nositelja varijantnog alela uz mali doprinos činjenice da su u ispitanika na monoterapiji koncentracije lamotrigina nešto niže uz varijantni alel nego u homozigota divljeg tipa. Redoslijed koncentracija lamotrigina od najviših prema najnižima jest: nositelji varijantnog alela na politerapiji s valproatom, homozigoti divljeg tipa na politerapiji s valproatom, homozigoti divljeg tipa na monoterapiji lamotriginom te nositelji varijantnog alela na monoterapiji lamotriginom.

Prosječne vrijednost iz dodatne analize 1 (slika 28, desno) ukazuju da je izraženiji učinak rastućih koncentracija valproata na koncentracije lamotrigina kod nositelja varijantnog alela (u odnosu na ispitanike – homozigote divljeg tipa) posljedica: (i) izraženijeg porasta koncentracije lamotrigina kod nositelja varijantnog alela u odnosu na homozigotni divlji tip pri promjeni vrijednosti koncentracije valproata s 0 na 100 $\mu\text{mol/L}$; (ii) izraženijeg porasta koncentracije lamotrigina u nositelja varijantnog alela u odnosu na homozigotni divlji tip pri promjeni koncentracija valproata sa 100 prema 800 $\mu\text{mol/L}$ [od 21 na 38 $\mu\text{mol/L}$ u odnosu na od 16 na 22 $\mu\text{mol/L}$ (izmjerene koncentracije) i od 166 na 277 nmol/L u odnosu na od 129 na 174 nmol/L (prema dozi prilagođene koncentracije)].



Slika 28. Podešene geometrijske srednje vrijednosti (kvadrati) s 95%-tnim granicama pouzdanosti (vertikalne crte) izmjerenih (gornji red) i prema dozi podešenih (donji red) koncentracija lamotrigina iz parsimoničnih modela u glavnoj (lijevo) i dodatnoj analizi 1 (desno). Osi y sadrži logaritamske vrijednosti, pa su granice pouzdanosti oko procjena simetrične. **Lijevo.** Geometrijske srednje vrijednosti (eksponenti aritmetičkih srednjih vrijednosti logaritmiranih koncentracija) prikazane su (s lijeva na desno) neovisno o genotipu za podskupinu liječenu lamotriginom+valproatom (LAM+VAL) ili samo lamotriginom (LAM); zatim neovisno o terapiji, za podskupinu nositelja varijantnog alela i podskupinu homozigota divljeg tipa; te zatim prema genotipu i prema terapiji – prvo za nositelje varijantnog alela a zatim za homozigote divljeg tipa. **Desno.** Geometrijske srednje vrijednosti prikazane su (s lijeva na desno) prema genotipu neovisno o koncentracijama valproata; te zatim pri različitim koncentracijama valproata (nositelji varijantnog alela naznačeni su crnim kvadratima, a homozigoti divljeg tipa bijelim kvadratima).

Dodatna analiza 2

U ovoj su analizi koncentracije lamotrigina (izmjerene i prilagođene prema dozi) analizirane zasebno u podskupini ispitanika na monoterapiji lamotriginom i podskupini na politerapiji lamotriginom i valproatom. U oba slučaja korišten je aditivni potpuno podešen model. Rezultati su sažeti u tablici 14. Kao i u svim prethodnim analizama, polimorfizmi UGT enzima i MDR1 transportera nemaju učinka na koncentracije lamotrigina, no vidi se učinak ABCG2 transportera: u ispitanika na monoterapiji lamotriginom, varijantni alel je združen s 21-25% nižim koncentracijama, dok je u ispitanika na politerapiji sa lamotriginom i valproatom, varijantni alel združen sa 56-64% višim koncentracijama lamotrigina – oba ta učinka statistički su značajna. Činjenica da su u potpunosti u „suprotnom smjeru“ ovisno o terapiji pokazuje da između terapije i genotipa postoji interakcija – dokaza i formalno u glavnoj analizi. Očekivano, više doze lamotrigina nezavisno su združene s višim izmjerenim koncentracijama lamotrigina; kao i u prethodnim analizama, dob i spol nemaju učinka na koncentracije lamotrigina, dok je viši indeks tjelesne mase u ispitanika na monoterapiji lamotriginom (ali ne i u onih na politerapiji lamotriginom i valproatom) združen s nešto nižim prema dozi prilagođenim koncentracijama lamotrigina.

Tablica 14. Učinak varijantnog alela *ABCG2* 421C>A koncentracije lamotrigina (izmjerene i prilagođene prema dozi), zasebno za ispitanike na monoterapiji lamotriginom (n=131) i za ispitanike na politerapiji lamotriginom i valproatom (n=74). Korišten je generalni linearni model za logaritamski transformirane vrijednosti, a učinci su prikazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (CI).

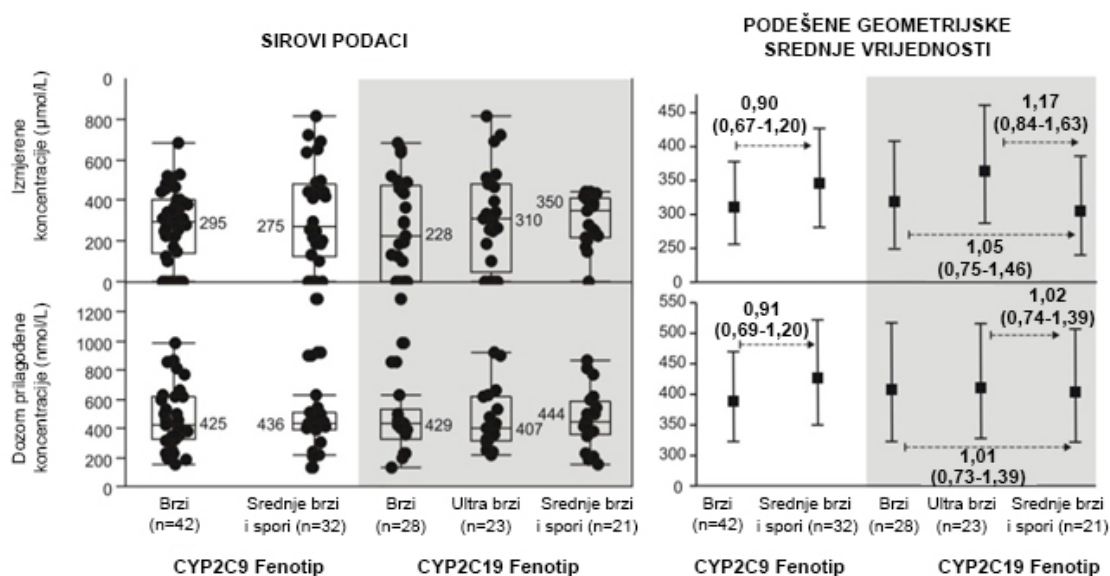
Modeli po terapijskim podskupinama	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	GMR (95% CI)	P	GMR (95% CI)	P
<i>Monoterapija lamotriginom</i>				
Dob (za 5 godina)	0,98 (0,94-1,03)	0,502	1,00 (0,96-1,05)	0,870
Spol (muški vs. ženski)	0,97 (0,74-1,27)	0,801	1,23 (0,95-1,59)	0,118
Indeks tjelesne mase (za 2 jedinice)	0,94 (0,88-1,00)	0,058	0,91 (0,86-0,97)	0,005
<i>ABCG2</i> 421C>A varijantni alel vs. divlji tip	0,75 (0,57-0,98)	0,036	0,79 (0,60-1,03)	0,082
<i>UGT1A4</i> *3 142T>G varijantni alel vs. divlji tip	1,03 (0,79-1,34)	0,824	0,92 (0,71-1,19)	0,522

Tablica 14-nastavak

Modeli po terapijskim podskupinama	Izmjerene koncentracije		Prilagođene koncentracije	
	GMR (95% CI)	P	GMR (95% CI)	P
<i>UGT2B7</i> -161C>T varijantni alel vs. divlji tip	1,05 (0,79-1,39)	0,722	1,02 (0,78-1,35)	0,864
<i>MDR1</i> 1236C>T varijantni alel vs. divlji tip	1,02 (0,81-1,28)	0,872	0,96 (0,76-1,21)	0,717
Doza lamotrigina (za 25 mg)	1,13 (1,09-1,17)	<0,001	---	
<i>Politerapija lamotriginom i valproatom</i>				
Dob (za 5 godina)	0,97 (0,94-1,03)	0,453	0,97 (0,93-1,02)	0,251
Spol (muški vs. ženski)	0,88 (0,68-1,14)	0,338	0,83 (0,65-1,07)	0,142
Indeks tjelesne mase (za 2 jedinice)	0,99 (0,92-1,06)	0,726	1,01 (0,94-1,07)	0,851
<i>ABCG2</i> 421C>A varijantni alel vs. divlji tip	1,64 (1,14-2,36)	0,009	1,56 (1,10-2,22)	0,014
<i>UGT1A4</i> *3 142T>G varijantni alel vs. divlji tip	0,80 (0,60-1,07)	0,129	0,90 (0,68-1,19)	0,450
<i>UGT2B7</i> -161C>T varijantni alel vs. divlji tip	0,95 (0,72-1,25)	0,702	0,95 (0,73-1,24)	0,701
<i>MDR1</i> 1236C>T varijantni alel vs. divlji tip	1,18 (0,90-1,56)	0,233	1,14 (0,87-1,48)	0,339
Doza lamotrigina (za 25 mg)	1,21 (1,16-1,27)	<0,001	---	

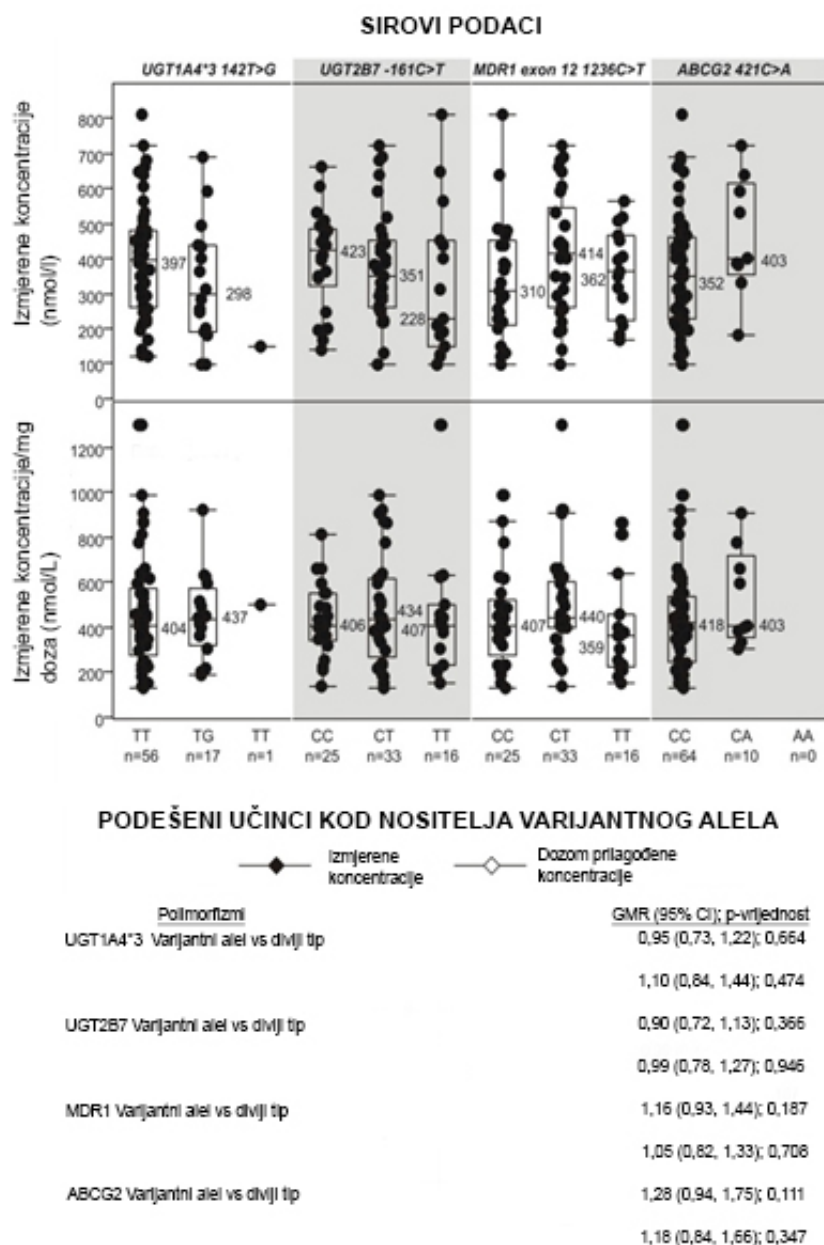
4.3. Utjecaj genskih polimorfizama za enzime CYP2C9, CYP2C19, UGT i transportere MDR1/ABCB1 i ABCG2 na ravnotežne izmjerene koncentracije valproata

Na slici 29 sažeti su podaci o učincima fenotipova CYP2C9 i CYP2C19 na izmjerene i prema dozi prilagođene koncentracije valproata – „sirovi“ podaci (lijevo), te geometrijske srednje vrijednosti i njihovi omjeri iz multivarijatnih modela (desno). Uz podešenje za dob, spol, indeks tjelesne mase i doze valproata (u analizi izmjerenih vrijednosti), nema relevantnih/statistički značajnih razlika između brzih i srednjih/sporih metabolizatora putem CYP2C9, odnosno između brzih ili ultrabrzih i srednjih/sporih metabolizatora putem CYP2C19. Rezultati ukazuju da polimorfizmi ovih enzima nemaju učinka na raspoloživost valproata. Više doze valproata bile su, konzistentno, združene s višim koncentracijama, a koncentracije su bile i nešto više u žena nego u muškaraca (nije prikazano).



Slika 29. Učinci fenotipa CYP2C9 i CYP2C19 na izmjerene koncentracije valproata u ispitanika na politerapiji lamotriginom i valproatom: izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$) (gornji red) i koncentracije prilagođene prema dozi (nmol/L po miligramu doze, donji red). Sirovi podaci (lijeva slika) su individualne vrijednosti (krugovi), medijani (horizontalne crte i brojačne vrijednosti), gornja i donja kvartila (kvadrati) i unutarnje ograde (od donja kvartila – 1,5xinterkvartilni raspon do gornja kvartila + 1,5xinterkvartilni raspon; vertikalne crte). Točke izvan ograda su netipične vrijednosti. Na slici desno su prikazane podešene (za dob, spol, indeks tjelesne mase i dozu valproata za izmjerene koncentracije) geometrijske srednje vrijednosti (kvadrati) s 95%-tnim granicama pouzdanosti (vertikalne crte) po fenotipovima, te njihovi omjeri (omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti) naznačeni crtkanim strelicama i prikazani brojčano s 95% -tnim granicama pouzdanosti.

Na slici 30 na sličan način su prikazani podaci o učincima polimorfizama UGT enzima i ABC transportera na koncentracije valproata u ispitanika na politerapiji lamotriginom i valproatom.



Slika 30. Utjecaj polimorfizama UGT enzima i ABC transportera na izmjerene koncentracije valproata. Gornji dio slike prikazuje „sirove podatke“ – izmjerene koncentracije ($\mu\text{mol/L}$) i koncentracije prilagođene prema dozi (nmol/L po miligramu doze) – individualne vrijednosti (krugovi), medijane (horizontalne crte i brojačne vrijednosti), gornje i donje kvartile (kvadrati) i unutarnje ograde (od donja kvartila – 1,5xinterkvartilni raspon do gornja kvartila + 1,5xinterkvartilni raspon; vertikalne crte) prema genotipu na svakom od četiri ispitana lokusa. Vrijednosti izvan ograda su netipične vrijednosti. Donji dio slike prikazuje podešene (za dob, spol, indeks tjelesne mase i dozu valproata za izmjerene vrijednosti) omjere geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s 95%-tnim granicama pouzdanosti (CI) za nositelje varijantnog alela u usporedbi s homozigotima divljeg tipa. Analizirane su logaritmirane

vrijednosti koncentracija (baza e) u generalnim linearnim modelima: po jedan model za svaki od polimorfizama.

Rezultati pokazuju da niti jedan od ispitivanih polimorfizama nema učinka na koncentracije valproata. Izmjerene koncentracije bile su više uz višu primjenjenu dozu valproata, a koncentracije su bile nešto više u žena nego u muškaraca (nije prikazano).

5. RASPRAVA

Farmakokinetika lamotrigina pokazuje zanačaju interindividulanu varijabilnost koja može utjecati na njegovu djelotvornost i sigurnost primjene zbog čega je lamotrigin uključen u terapijsko praćenje lijekova (Patsalos i sur., 2008.). Nekoliko antiepileptika i drugih lijekova koji nisu antiepileptici mogu snažno inducirati glukuronidaciju lamotrigina, time ubrzati njegov metabolizam i na taj način smanjiti njegovu djelotvornost. Među najznačajnije inhibitore metabolizma lamotrigina svakako pripada valproična kiselina (Patsalos i sur., 2008., Patsalos, 2016.). Kao dodatni potencijalni uzroci varijabilnosti farmakokinetike lamotrigina istraživani su polimorfizmi enzima UGT, između ostalih najčešći polimorfizmi *UGT1A4**3 142T>G (rs2011425), *UGT1A4**2 70 C>A (rs6755571) i *UGT2B7* -161C>T (rs7668258), međutim objavljeni rezultati nisu jednoznačni ponekad su bili i kontradiktorni (Chang i sur., 2014., Reimers i sur., 2016., Gulcebi i sur., 2011., Liu i sur., 2015., Du i sur., 2016., Milosheska i sur., 2016., Singkham i sur., 2013.). *In vitro*, lamotrigin je supstrat transportera MDR1/ABCB1 i ABCG2 (Luna-Tortos, 2008. i Romermann, 2015.). Rezultati studija u nekim europskim populacijam pokazuju da je polimorfizmom *MDR1* 1236C>T povezan s nešto nižom koncentracijom lamotrigina na kraju doznog intervala (Lovrić i sur., 2012.) ili da nema utjecaj na koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala (Milosheska i sur., 2016.). Polimorfizam *ABCG2* 421C>A testiran u kineskoj populaciji pokazao je značajan utjecaj na koncentraciju lamotrigina (Zhou i sur., 2015., Shen i sur., 2016.). S obzirom da se valproična kiselina manjim dijelom metabolizira pomoću enzima CYP, provedene su asocijacijske studije između polimorfizama za enzime CYP i njihovog utjecaja na metabolizam VPA. Prema nekim rezultatima polimorfizmi *CYP2C9* i *CYP2C19* značajno utječu na farmakokinetiku VPA (Jiang i sur., 2016.), dok je u drugoj studiji ta veza potvrđena za *CYP2C9* ali ne i za *CYP2C19* (Tan i sur., 2010.). Uzimajući u obzir kontradiktorne rezultate studija, u opisanom istraživanju, ispitivali smo utjecaj genskih polimorfizama za metaboličke enzime *UGT2B7* -161 C>T, *UGT1A4**2 (70C>A), *UGT1A4**3 (142T>G) i transportere *ABCB1* 1236 C>T i *ABCG2* 421 C>A u stanju dinamičke ravnoteže na koncentracije lamotrigina i valproata na kraju doznog intervala. Dodatno smo testirali i mogući utjecaj polimorfizama *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2, *CYP2C19**17 na koncentracije valproata na kraju doznog intervala u stanju dinamičke ravnoteže. Također je ispitan utjecaj istih polimorfizama na domete interakcije lamotrigina i valproata u odraslih ispitanika oboljelih od epilepsije.

Rezultati naše studije pokazali su kako su koncentracije lamotrigina, prilagođene prema dobi, spolu, indeksu tjelesne mase, oko 2,4 puta više u pacijenata na politerapiji s valproatom u odnosu na monoterapiju. Rezultati nisu pokazali značajan utjecaj ispitivanih polimorfizama metaboličkih enzima UGT i transportera ABCB1 na koncentracije lamotrigina i valproata te na domete interakcije ta dva lijeka primjenjena u konkomitantnoj terapiji. Osim toga, rezultati nisu pokazali značajan utjecaj ispitivanih polimorfizama metaboličkih enzima *CYP2C9*2*, *CYP2C9*3*, *CYP2C19*2* i *CYP2C19*17* na koncentracije valproata.

Međutim, rezultati su pokazali značajanu ulogu polimorfizma *ABCG2* 421 C>A u moduliranju interakcije lamotrigina i valproata. U nositelja varijantnog alela *ABCG2* 421A zapaža se izraženija interakcija lamotrigina i valproata, na način da je za oko 2 puta veći inhibitorski utjecaj valproata u usporedbi s inhibitorskim potencijalom valproata u nositelja divljeg homozigotnog alela *ABCG2* 421C.

5.1. Utjecaj genskih polimorfizama za transportere *ABCG2* i *MDR1/ABCB1*

ABCG2/BCRP pripada skupini o ATP-u ovisnih transportera izbacivača koji su eksprimirani u tankom crijevu, jetri, krvno-moždanoj barijeri, testistima, placenti i mliječnim žlijezdama (Endres i sur., 2006.), ograničavajući sistemsku i organsku izloženost važnim supstratima. *ABCG2* transportira endogene i egzogene supstrate te je njegov utjecaj na farmakokinetiku dodatno potenciran u slučaju supstrata slabe pasivne permeabilnosti (Poirier i sur., 2014.). Njegova primarna uloga je funkcija izbacivačke - efluksne pumpe na apikalnoj membrani enterocita, umanjujući intestinalnu apsorpciju slabo permeabilnih tvari te također aktivni prijenos/izbacivanje supstrata u kanalićima između stanica, transportirajući ih iz hepatocita u žuč. Za razliku od intestinalnog *ABCG2*, koji djeluje na razini apsorpcije tvari, prijenos na razini jetra- žuč glavni je čimbenik hepatičkog klirensa lijekova. *ABCG2* dodatno sudjeluje kao transporter u endotelnim stanicama moždanih kapilara, u stanicama bubrežnog proksimalnog tubula i sinciotrofoblastima placentе, doprinoseći apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijekova i endogenih tvari te također doprinoseći zaštiti stanica od izloženosti egzogenim tvarima- ksenobiotičima (Pfeifer i sur., 2013a,b.). Dodatno, *BCRP* se pokazao kao važan medijator u interekcijama lijek-lijek. Inhibiciju proteina *BCRP* kao važan mehanizam interakcija lijekova koje mogu značajno modulirati djelotvornost i sigurnu primjenu lijekova prepoznala su i regulatorna tijela poput FDA te EMA koja su izdale i smjernice za nove lijekove koji moraju biti ispitani kao potencijalno supstrati ili inhibitori proteina

BCRP/ABCG2 (US Food and Drug Administration, 2017; European Medicines Agency, 2012.).

Od njegovog otkrića 1998. godine, opisuje se i sve veći broj supstrata transportera BCRP/ABCG2 koji uključuje ne samo lijekove već i fiziološke supstance kao što su estron-3-sulfat, 17 β -estradiol, 17-(β -D-glukuronid) i mokraćna kiselina (Ni i sur., 2010.).

Pojedinačni nukleotidni polimorfizam ABCG2 c.421 C>A (p. Q141, rs2231142) rezultira smanjenom aktivnošću transportera (Giacomini i sur., 2012.). Prema podacima dobivenima iz studija *in vitro*, polimorfizam ABCG2 c.421 C>A zadržava ekspresiju mRNA, ali je ekspresija proteina te posljednično njihova funkcija smanjena za 50-70% zbog pojačane degradacije u proteasomu (Kondo i sur., 2004., Furukawa i sur., 2009.). U nositelja ovog polimorfizma uočena je povećana izloženost lijekovima uključujući atorvastatin, rosuvastatin i sulfasalazin (Giacomini i sur., 2013.) te je uočen porast incidencije nuspojava fluvastatina (Mirošević i sur., 2013.), atorvastatina (Mirošević i sur., 2015.) i gefitiniba (Cusatis i sur., 2006.).

Identificiran je veliki broj inhibitora transportera ABCG2 s različitom kemijskom strukturom (Mao i sur., 2015.), te postoje prilično uvjerljivi dokazi koji ukazuju na važnost ABCG2 transportera kao medijatora u interakcijama lijek-lijek u ljudi (Giacomini i sur., 2010.). Zaključak je temeljen na uočenom inhibitornom djelovanju biljnih produkata kurkumina i posljedično povećanoj izloženosti sulfasalazinu za 3,2 puta. Ovo otkriće je replicirano u divljih tipova ali ne i u Bcrp *knock out* miševa za ABCG2, dovodeći do zaključka kako je ta interakcija lijek-lijek rezultat inhibicije transporta putem ABCG2 (Shukla i sur., 2009., Kusuhara i sur., 2012.). Interakcija lijek-lijek na razini transportera ABCG2 klinički je opisana između topotekana i elakridara što je rezultiralo povećanom apsorpcijom topotekana; između metotreksata i benzimidazola što je rezultiralo odgođenom renalnom eliminacijom metotreksata te između ciklosporina i rosuvastatina što je rezultiralo povećanom apsorpcijom rosuvastatina (Lee i sur., 2015.). Postoje uvjerljivi dokazi koji ukazuju na kliničku važnost izbacivačkog transportera ABCG2. Analizirajući rezultate dviju studija (Elsby i sur., 2012., Elsby i sur., 2016.) u pogledu razumijevanja klinički važnih interakcija s rosuvastatinom, zanimljivo je primjetiti kako od ukupno 12 klinički važnih interakcija lijek-lijek u 6 slučajeva (50%) je primarni mehanizam bio inhibicija transportera ABCG2, za dva lijeka (17%; ciklosporin i atazanavir) mehanizam interakcije je potpuna inhicija transportera ABCG2 u kombinaciji s inhibicijom drugog transporetra OATP1B1. Sama inhibicija ABCG2

može rezultirati klinički značajnim interakcijama lijekova s rosuvastatinom, uzrokujući do dva puta veću izloženost što ukazuje na nužnost upozorenja u kliničkoj praksi o potrebi prilagođavanja doze statina (Elsby i sur., 2016.).

Klinički dokazi o inhibiciji ABCG2 kao glavnog mehanizma interakcije lijek-lijek s potencijalnim posljedicama u djelotvornosti i sigurnosti lijekova rezultirali su prepoznavanjem ovog transportera, kao bitnog farmakokinetičkog čimbenika i od strane internacionalnog konzorcija za transportere (eng. *The International Transporter Consortium*) što ne smije biti zanemareno u razvoju novih lijekova (Giacomini i sur., 2010.). Osim konzorcija, EMA i FDA izdale su preporuke za sve lijekove u istraživanju da se provede ispitivanje jesu li supstrati ili inhibitori transportera ABCG2, te utvrdi njihov potencijal stupanja u interakcije na razini ABCG2 (US Food and Drug Administration, 2017; European Medicines Agency, 2012.). Ove smjernice bi posebno mogle biti važne u slučajevima kada kandidatni lijek ima značajnu topivost ali oslabljenu permeabilnost zbog aktivnosti izbacivanja putem ABCG2 transportera. Zbog različitih transportera i enzima koji sudjeluju u metabolizmu mnogih lijekova koji su *in vitro* identificirani kao supstrati ili inhibitori ABCG2, klinički dokaz utjecaja samog ABCG2 na interakcije lijek-lijek je ograničen zbog mogućeg preklapanja s drugim metaboličkim putevima. I dalje postoji izazov i potreba za preciznijim definiranjem doprinosa pojedinih transportnih sustava u interakcijama lijekova (Poirier i sur., 2014.).

Već je naglašeno da su samo dvije studije provele ispitivanje o utjecaju polimorfizma ABCG2 421C>A na izloženost antiepilepticima. Obje studije provedene su u kineskoj populaciji te su pokazale povezanost ABCG2 421C>A s koncentracijama lamotrigina. U ispitivanju skupine od 112 pacijenata liječenih samo lamotriginom osim važnosti ABCG2 421C>A, pokazan je i doprinos drugog transportera OCT1 (rs628031) na koncentracije lamotrigina (Shen i sur., 2016.).

U drugoj studiji koja je uključivala 140 kineskih bolesnika s epilepsijom, testirano je dvanaest pojedinačnih nukleotidnih polimorfizama gena koji su značajni za metabolizam i transport lamotrigina uključujući UGT2B7, ABCB1, ABCG2, NR1I2 i HNF4α. U rezultatima se navodi da su polimorfizmi ABCG2 rs2231142, rs3114020, HNF4α rs2071197 i ABCB1 rs1128503 povezani s koncentracijama lamotrigina normaliziranim prema dozi normaliziranoj također prema tjelesnoj masi. Osim toga, višestruka linearna regresijska analiza pokazala je da ABCG2 rs2231142 (421C>A) ima značajan utjecaj na koncentracije

lamotrigina doprinoseći s 4,8% varijabilnosti njegovih koncentracija. Autori također navode da ovaj nalaz može pridonijeti razumijevanju značajnih među-etničkih razlika u farmakokinetici lamotrigina imajući u vidu značajnu razliku u učestalosti polimorfizama a time i aktivnosti *ABCG2* (Zhou i sur., 2015.). Osnova za te zaključke leži u spoznaji da se učestalost alela *ABCG2* 421C>A značajno razlikuje među populacijama i rasama, što može rezultirati različitim farmakokinetičkim svojstvima te različitim opsegom interakcija lijekova na razini *ABCG2*. Varijantni alel je najzastupljeniji u azijskoj populaciji (do 30%), zatim u populaciji bijelaca (10-15%), afro-amerikanca (2%) i afrikanca (0%) (Sakiyama i sur., 2014., Keskitalo i sur., 2009.). U našoj studiji zabilježena je učestalost varijantnog alela od 10%. U svjetlu ovih zaključaka možemo nadalje komentirati i važnost našeg rezultata s obzirom na polimorfizam *ABCG2* i njegovu ulogu u moduliranju interakcije lamotrigina i valproata. Niti jedna provedena studija do sada nije dokumentirala ovakav nalaz. Kako je u liječenju epilepsije kombiniranje antiepileptika važno upravo za liječenje, najčešće na monoterapiju rezistentnih pacijenata i s obzirom na svijest o mogućim štetnim učincima u predoziranju, posebno valproata, mogućnost procjene dometa interakcija primjenjenih lijekova može imati veliki klinički značaj. U ovom kontekstu, rezultati prezentiranog istraživanja koji ukazuju na važnost transporta putem *ABCG2* u interakciji lamotrigina i valproata, mogu doprinijeti spoznajama u ovom još uvijek nedovoljno istraženom području, posebno uzimajući u obzir značajan udio pacijenata oboljelih od epilepsije koji nemaju zadovoljavajući terapijski odgovor i uvijek im je nužno propisati više lijekova, što povećava rizik interakcija i nuspojava.

Rezultati studije su pokazali značajan utjecaj varijantnog alela *ABCG2* 421C>A na domete učinka valproata na koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala: politerapija s valproatom povezana je s značajno višim koncentracijama lamotrigina u usporedbi s koncentracijama lamotrigina primjenjenog u monoterapiji, pri čemu je u nositelja varijantnog alela ta razlika veća za 2,0-2,3 puta u odnosu na vrijednosti koncentracija u nositelja divljeg tipa alela. Ovaj nalaz bi svakako mogao biti potencijalno klinički značajan.

Ako se promatra s obrnutog stajališta, ova interakcija također otkriva utjecaj varijantnog alela *ABCG2* 421A koji ima drugačiji mehanizam od samog pojačavanja učinka valproata: u pacijenata na monoterapiji s lamotriginom, koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala su nešto niže (20-26%) u usporedbi sa koncentracijama u homozigotnog nositelja divljeg tipa alela (421CC), dok su u pacijenata na politerapiji s lamotriginom i valproatom zabilježene značajno povišene koncentracije lamotrigina na kraju doznog

intervala (55-65%). Ovi rezultati su dobiveni u svim modelima primjenjenima u glavnoj analizi kao i u dodatnim analizama. Prema ispitivanjima *in vitro*, valproat nije supstrat ljudskog ABCG2 transportera (Römermann i sur., 2015.), stoga se opisana interakcija ne može sa sigurnošću locirati na mjesto ovog transportera. Mogući mehanizam interakcije može uključivati povećanu apsorpciju lamotrigina zbog smanjene aktivnosti enterocitnog apikalnog izbacivačkog mehanizma. Manji dio nepromijenjenog lamotrigina ($\leq 10\%$) izlučuje se bubrežnom ekskrecijom (Lamictal, SPC, HALMED, 2016), pri čemu još nije razjašnjeno je li u taj prijenos uključen ABCG2, stoga bi bubrezi mogli predstavljati dodatno mjesto interakcije lamotrigina i valproata.

Uočena smanjena ostatna koncentracija lamotrigina (20-26%) u pacijenata na monoterapiji lamotriginom čini upitnima potencijalno suprostavljene učinke polimorfizma ABCG2 421C>A na transport lamotrigina koji ovisi o valproatu.

Studija Kanner i sur., 2010. je pokazala kako je stupanj inhibicije klirensa lamotrigina ovisan o dozi valproata i koncentraciji valproične kiseline u stanju ravnotežene koncentracije. Neki autori smatraju da se inhibicija lamotrigina može očekivati pri dozi valproata od 500 mg dnevno dok se domet inhibicije smanjuje pri nižim dozama (Gidal i sur., 2003.). Rezultati naše studije su pokazali statistički značajan porast koncentracije lamotrigina s porastom koncentracije valproata što je drugačije u odnosu na literaturne podatke. Na primjer, studija Yamamoto i sur., 2012. je pokazala kako valproat inhibira metabolizam lamotrigina ali nije pokazala značajanu korelaciju između koncentracija lamotrigina i valproata. Naša studija je pokazala veći porast koncentracije lamotrigina kod nositelja varijantnog alela ABCG2 421 C>A u odnosu na divlji tip u rasponu koncentracije valproata od 0-100 $\mu\text{mol/L}$ te veći porast koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala u nositelja varijantnog alela u odnosu na divlji tip pri rasponu koncentracije valproata od 100-800 $\mu\text{mol/L}$ (od 21-38 $\mu\text{mol/L}$ u odnosu na 16-22 $\mu\text{mol/L}$ (izmjerene koncentracije) i od 166-277 nmol/L u odnosu na 129-174 nmol/L (prema dozi prilagođene koncentracije).

Za razliku od transportera ABCG2 koji je relativno noviji objekt istraživanja polimorfizam P-glikoproteina (MDR1/ABCB1) je bio predmet mnogih studija. Testirane su korelacije polimorfizama s farmakokinetičkim parametrima, rezistencijom te s nuspojavama različitih antikonvulzivnih lijekova koji su supstrati P-gp s obzirom na dokaze da polimorfizmi ABCB1 određuju ekspresiju proteina i na krvno-moždanoj barijeri i u samom tkivu mozga (Bašić i sur., 2008.). Istraživanja su također pokazala da neki antiepileptici mogu

inducirati (Schuetz i sur., 1996.) ili inhibirati ekspresiju Pgp (Loscher i sur., 2002.). U tom smislu, provedena su različita istraživanja utjecaja haplotipova *ABCB1* C1236T, G2677T i C3435T na koncentracije lamotrigina, a objavljeni rezultati ne donose istoznačne zaključke. U studiji koju je provela Lovrić i sur., 2012. testirana je uloga polimorfizama *ABCB1* C1236T, G2677T i C3435T u varijabilnoj bioraspoloživosti lamotrigina primjenjenog u monoterapiji ili u politerapiji s drugim antiepilepticima koji imaju dokazan inhibitorski, odnosno induktorski potencijal. U skupini ispitanika (N=222) polimorfizmi *ABCB1* C3435T i G2677T/A nisu bili statistički značajno povezani s koncentracijama lamotrigina, dok je statistički značajan porast koncentracija lamotrigina uočen u nositelja genotipa 1236 CC u odnosu na genotip 1236 CT i TT. Također je analizom korelacije haplotipova *ABCB1* s koncentracijom lamotrigina dobivena statistički značajna povezanost ($P=0,018$). Međutim, treba naglasiti kako je ispitivana populacija uključivala 75% pacijenata na terapiji s induktorima enzima UGT ili su bili liječeni kombinacijom više od 2 antiepileptika pri čemu nije bila provedena zasebna analiza pacijenata koji su liječeni samo lamotriginom. Miloshevska i sur., 2016. je proveo istraživanje u okviru studije koja je uključivala 100 ispitanika od kojih je 54 bilo na monoterapiji lamotriginom. Njihovi rezultati nisu pokazali statistički značajan utjecaj polimorfizma C1236T na farmakokinetiku lamotrigina, ali je ustanovljen smanjen klirens lamotrigina za 22% u nositelja genotipa *ABCB1* 2677GG i za 9% u nositelja genotipa 2677GT. Dodatno, nije pokazan utjecaj haplotipova *ABCB1* na koncentraciju lamotrigina. Rezultati naše studije nisu pokazali statistički značajan utjecaj polimorfizma *ABCB1* C1236T na koncentraciju lamotrigina i valproata premda se radi o sličnoj učestalosti varijantnog alela kao u studij koju je provela Lovrić i sur., 2012. (oko 40%). U našoj studiji testiran je samo polimorfizam *ABCB1* 1236C>T te nismo mogli ispitati mogući utjecaj haplotipova na koncentracije lamotrigina kao što je provedeno u nekim drugim studijama. Naši rezultati su djelomično sukladni rezultatima iz studije koju opisuje Miloshevska i sur., 2016. u kojoj također nije potvrđen utjecaj polimorfizma *ABCB1* C1236T na koncentraciju lamotrigina. Studija provedena u kineskoj populaciji bolesnika koji su liječeni samo s lamotriginom pokazala je utjecaj polimorfizma *ABCB1* C1236T na koncentraciju lamotrigina (Zhou i sur., 2016.). Stoga za procjenu potencijalne uloge ovog polimorfizma u dispoziciji lamotrigina treba provesti istraživanje na većem broju ispitanika u različitim etničkim skupinama. Učestalost varijantnih alela *ABCB1* značajno varira među populacijama i rasama.

Za valproičnu kiselinu nije pokazano da je supstrat P-gp transportera. (Baltes i sur., 2007.).

5.2. Utjecaj genskih polimorfizama za enzime UGT i P450(CYP)

Ranije provedene studije pokazale su utjecaj polimorfizama gena za enzime UGT na farmakokinetičke parametre lamotrigina i valproata, međutim objavljeni rezultati su različiti (Du i sur., 2016., Liu i sur., 2015., Reimer i sur., 2016., Gulcebi i sur., 2010., Chang i sur., 2014., Blanca Sanchez i sur., 2010., Singkham i sur., 2013., Milosheska i sur., 2016., Wang i sur., 2016., Inoue i sur., 2014.). Razlike u rezultatima mogu se objasniti s nekoliko čimbenika. Zbog ograničenog/malog broj ispitanika i razlika u učestalosti minornog alela - MAF (eng. *minor allele frequency*) ne samo za polimorfizam UGT enzima već i drugih gena odgovornih za dispoziciju antiepileptika. Osim toga nisu jednako uzimani u obzir vanjski čimbenici poput konkomitantne terapije drugim antiepilepticima za koje je poznato da mogu inhibirati ili inducirati kako enzime tako i transportne proteine. S obzirom na čimbenik učestalosti ona je za *UGT1A4*2* u bjelačkoj populaciji između 6-8% (Benoit-Biancamano i sur., 2009., Ehmer i sur., 2004.) dok isti polimorfizam nije zabilježen u azijskoj populaciji (Mori i sur., 2005.). Osim toga, neki drugi polimorfizmi enzima UGT mogu imati veći utjecaj te mogu maskirati/prekriti utjecaj drugih ispitivanih genskih varijanti. Tako je u indijskoj populaciji, ustanovljen značajan utjecaj polimorfizma *UGT1A6 552A>C* u moduliranju farmakokinetike valproične kiseline (Munismay i sur., 2013.). Metabolizam valproične kiseline dodatno uključuje mitohondrijsku β -oksidaciju, u opsegu od 40%, koji također može varirati među populacijama (Ghodke-Puranik i sur., 2013.). Nadalje, za valproate, varijabilnost aktivnosti enzima CYP (2A6, 2B6, 2C9, 2C19) može biti važna s obzirom da se valproat djelomično metabolizira tim metaboličkim putem i MAF se među rasama značajno razlikuje (Ganoci i sur., 2017.). Dok je učestalost polimorfizama *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* viša u bijeloj rasi (oko 19%) nego u azijata (2,5-3,5%), učestalost varijantnog alela *CYP2C19*2* i *CYP2C19*3* je značajno viša u azijata (33-44%) nego u bijelaca (oko 14%) (Myrand i sur., 2008., Makeeva i sur., 2008., Yasui-Furukori i sur., 2007.). Varijabilnost gena za CYP2A6, CYP2B6 i CYP2C9 može doprinijeti s 6-14% interindividualnoj varijabilnosti farmakokinetičkih parametara valproata. Prema dostupnoj literaturi, bolesnici koji su nositelji varijantnih alela *CYP2A6*4*, *CYP2B6*6* i *CYP2C9*3* imaju veću izloženost valproičnoj kiselini (Tan i sur., 2010.). Neki podaci, također pokazuju kako je i enzim CYP2C19 uključen u metabolizam valproične kiseline (Voso i sur., 2009.). Osim toga, pokazano je kako polimorfizam enzima CYP postaje značajniji u pacijenata koji su nositelji varijantnih alela u genu za enzime UGT (Ghodke-Puranik i sur., 2013.) čija učestalost također varira među populacijama rezultirajući varijabilnom farmakokinetikom. S obzirom da se valproična

kiselina velikim dijelom metaboliziram putem enzima UGT, studije provedene u pedijatrijskoj populaciji u djece oboljele od epilepsije ukazale su na mogući utjecaj različitih polimorfizama na farmakokinetiku valproične kiseline. Polimorfizmi *UGT1A6* T19G, A541G i A552C povezani su s ubrzanim metabolizmom VPA (Guo i sur., 2012.). Polimorfizam *UGT2B7* A268G također se pokazao kao mogući čimbenik varijabilnosti koncentracija valproične kiseline (Du i sur., 2016.). Studija provedena na odraslim bolesnicima u kineskoj populaciji oboljelim od epilepsije potvrdila je utjecaj genotipa *UGT2B7* 268AA (homozigoti za divlji tip alela) koji je bio povezan s značajno višim koncentracijama valproične kiseline (MA H i sur., 2013.). Također je ustanovljena korelacija polimorfizma *UGT1A3**5 s nižim koncentracijama valproične kiseline u nositelja varijantnog alela u odnosu na nositelje divljeg tipa alela (Chu i sur., 2012.). *In vitro* studije su pokazale da je alel *UGT2B7* -161C povezan s povećanjem transkripcijske aktivnosti za dva puta (Duguay i sur., 2004.), međutim rezultati studija *in vivo* su kontradiktorni u smislu utjecaja na dispoziciju valproične kiseline. Dok su neke studije zabilježile značajano nižu koncentraciju valproične kiseline u nositelja genotipa -161CC u odnosu na -161CT ili TT u japanske i kineske djece (Ioune i sur., 2014., Wang i sur., 2015.), druge studije ne izvještavaju o takvom nalazu (Hung i sur., 2011.). U nositelja varijantnih alela ili genotipova *UGT1A4* -219C>T/-163G>A uočene su povišene koncentracije valproata u usporedbi s koncentracijama u nositelja divljeg tipa alela (Wang i sur., 2015.).

Rezultati naše studije nisu potvrdili mogući utjecaj polimorfizama *UGT2B7* -161 C>T, *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 na koncentracije valproične kiseline što korelira s rezultatima objavljenima za kinesku pedijatrijsku populaciju, u kojoj polimorfizmi *UGT2B7**2 i *CYP2C9**3 nisu imali utjecaj na metabolizam valproata (Guo i sur., 2012.) te u skladu sa studijom provedenoj u Norveškoj koja također nije uspjela pokazati utjecaj varijantnih alela *CYP2C9**2, *CYP2C9**3, *CYP2C19**2 i *CYP2C19**17 na koncentracije valproične kiseline (Smith i sur., 2016.).

Rezultati naše studije u pogledu utjecaja polimorfizama na farmakokinetiku lamotrigina su djelomično u skladu s podacima objavljenim za drugu bjelačku (slovensku) populaciju (Milosheska i sur., 2016.). U toj studiji ispitan je utjecaj polimorfnih UGT enzima i transportera na farmakokinetiku lamotrigina i njegovih metabolita. Nije dokazan značajan utjecaj polimorfizma *UGT1A4* 70 C>A niti *ABCB1* C1236T na farmakokinetiku lamotrigina. Međutim ustanovili su smanjenje klirensa za 20,4% te posljedično povećanje koncentracije lamotrigina u nositelja genotipa *UGT2B7* -161CC u usporedbi s nositeljima genotipova -161CT i TT.

Ranije spomenute studije utjecaja dva SNP-a gena *UGT1A4**2 (70C>A) i *3 (142T>G) su pokazale nepromijenjenu, smanjenu ili povećanu enzimsku aktivnost. Pa je tako za *UGT1A4* *2 (70C>A) pokazana smanjena enzimska aktivnost za supstrate beta-naftilamin, benzidin i dihidrotestosteron (Ehmer i sur., 2004.), dok je *in vitro* za takrolimus (Laverdiere i sur., 2011.) i klozapin (Erickson-Ridout i sur., 2012.) pokazana nepromijenjena enzimska aktivnost. Za *UGT1A4* *3 (142T>G) pokazana je nepromijenjena enzimska aktivnost za olanzapin (Haslemo i sur., 2012.), smanjena enzimska aktivnost *in vitro* za dihidrotestosteron, tamoksifen i lamotrigin (Zhou i sur., 2011.) te povećana enzimska aktivnost za olanzapin (Ghotbi i sur., 2010.).

Međutim, većina tih studija su bile eksperimentalnog karaktera te su rijetki klinički podaci. Zanimljivo je da su sve kliničke studije zaključile kako je *UGT1A4**3 povezan s većom enzimskom aktivnošću. Studija provedena u norveškoj populaciji pokazala je obrnuti utjecaj dviju varijanti *UGT1A4* na serumske koncentracije lamotrigina. Pa je tako *UGT1A4**3 bio povezan s nižom koncentracijom lamotrigina, dok su u nositelja varijante *UGT1A4**2 zabilježene više koncentracije lamotrigina (Reimers i sur., 2016.). Iako utjecaj *UGT1A4**2 nije bio statistički značajan, ovo je prva studija koja je pokazala potencijalni utjecaj genske varijante *UGT1A4**2 na serumske koncentracije lamotrigina. U istraživanju koje je provela skupina autora pod vodstvom Gulcebi i sur., 2011.g. ispitivana je uloga polimorfizma *UGT1A4**2 u moduliranju bioraspoloživosti lamotrigina, međutim autori su zaključili da zbog niske pojavnosti varijantnog alela (samo pet u ukupnom uzorku) nije bilo moguće provesti statističku obradu podataka. Taj nalaz je u skladu i s našim dobivenim rezultatima, jer smo također identificirali samo 6 heterozigotnih nositelja varijantnog alela (CA) što ukazuje na učestalost (MAF) od samo 2,9% u ispitivanoj populaciji te se nije mogla provesti pouzdana evaluacija utjecaja tog SNP-a na koncentracije lamotrigina i valproata te posljedično na njihovu interakciju. Snižena koncentracija lamotrigina u nositelja varijantnog alela *UGT1A4**3 je zabilježena i u drugim studijama (Chang i sur., 2014., Ghotobi i sur., 2010., Gulcebi i sur., 2011.). Samo jedna studija nije uspjela pokazati značajan utjecaj *UGT1A4**3 na serumske koncentracije lijeka (Haslemo i sur., 2012.). Međutim uspjela je pokazati povećanje koncentracije glukuronidnih metabolita i kod heterozigotnih i homozigotnih nositelja varijante *3, ukazujući na određeno povećanje enzimске aktivnosti. Postoje razni epigenetski čimbenici koji bi dodatno mogli utjecati na ekspresiju enzima *UGT1A4*, poput različitih liganda i tkivno-specifičnih transkripcijskih faktora kao što je arilhidrokarbonski receptor (AhR) i hepatocitni nuklearni faktor 1 α (HNF1 α) (Rowland i sur., 2013.). Stoga je uputno uzajamno

promatrati varijabilnost genetičkih polimorfizama kao i epigenetičkih faktora, njihove varijabilnosti što u interakciji može rezultirati interindividulanom nasljednom varijabilnosti u ekspresiji enzima UGT1A4 te posljedično promjenom metaboličke aktivnosti. Kao što je već ranije spomenuto učestalost pojavnosti polimorfizama je također jedan od faktora varijabilnosti koji može ukazati na farmakokinetiku varijabilnost lamotrigina na populacijskoj razini. U turskoj populaciji (Gulcebi i sur., 2011.) zabilježena je učestalost polimorfizma *UGT1A4**3 (142 T>G) od oko 25%, dok je učestalost *UGT1A4* *2 (70C>A) oko 2%. Zanimljivo, u azijskim populacijama, polimorfizam *UGT1A4**2 je vrlo rijedak ili se ne pojavljuje, dok je učestalost varijante *UGT1A4**3 slična onoj zabilježenoj u bijelaca (Chang i sur., 2014., Mori i sur., 2005., Saeki i sur., 2005.). Učestalost varijantnog alela *UGT1A4**3 u našoj studiji iznosi 13%, dok je za *UGT1A4**2 samo 1%, te nije pronađena značajna korelacija tih varijanti sa serumskim koncentracijama lamotrigina ili valproata niti je dokazan njihov utjecaj na domete interakcija ta dva lijeka.

Osim enzima UGT1A4, poznati su i drugi enzimi koji mogu utjecati na metabolizam lamotrigina. *In vitro* studija je pokazala kako valproična kiselina inhibira mikrosomalnu glukuronidaciju lamotrigina putem enzima UGT2B7, a ne putem UGT1A4 koji se smatra dominantnim u metabolizmu lamotrigina (Rowland i sur., 2006.). Polimorfizam promotorske regije *UGT2B7* -161 C>T ne mijenja aminokiselinski slijed enzima UGT2B7, ali može promijeniti razinu transkripcije enzima (Thibaut i sur., 2006.). Do sada je u samo nekoliko provedenih studija dokumentiran mogući utjecaj polimorfizma *UGT2B7* -161C>T na koncentracije lamotrigina. Rezultati prve takve studije su pokazali u multivarijantnoj analizi da politerapija sa drugim antiepilepticima objašnjava 70% varijabilnosti koncentracija lamotrigina, dob pacijenta doprinosi s 24%, dok je doprinos polimorfizma *UGT2B7* -161 C>T procijenjen na 12% (Blanca Schanez i sur., 2010.). Druga studija provedena u tajlandskoj populaciji pokazala je značajno smanjenje klirensa lamotrigina za 18% te posljedično povećanje serumske koncentracije lamotrigina u pacijenata nositelja varijantnog alela *UGT2B7* -161T (CT ili TT) u odnosu na homozigotne nositelje divljeg tipa alela *UGT2B7* -161 CC (Singkham i sur., 2013.). Osim toga već spominjana studija provedena u slovenskoj populaciji također je pokazala smanjenje klirensa lamotrigina za 20,4% u homozigota za varijantni alel T (*UGT2B7* -161TT) u usporedbi s nositeljima alela -161C. U heterozigota (*UGT2B7* -161 CT) klirens lamotrigina je bio nešto manji (3,7%) te statistički neznačajan u usporebi s nositeljima alela C (*UGT2B7* -161CC) (Miloshevska i sur., 2016.). Studija provedena u kineskoj populaciji nije uspjela dokazati značajan utjecaj polimorfizma

UGT2B7 -161C>T na koncentracije lamotrigina (Liu i sur., 2015.) što je u skladu sa našim rezultatima, prema kojima nismo pokazali značajan utjecaj tog polimorfizma ni na serumske koncentracije lamotrigina niti na koncentracije valproata ili na domet njihovih interakcija. Dodatno, u našoj studiji nije uzet u obzir mogući utjecaj nikotina. Učinak nikotina, za koji je poznato da ima inducirajuću učinak na mikrosomalne enzime CYP1A1/1A2, CYP2A1/2A2, CYP2B1/2B2 i CYP2E1 te na UGT1A9 i UGT2B7. Manji dio lamotrigina metabolizira se putem enzima UGT2B7 te može biti pod inducirajućim učinkom nikotina što posljedično može rezultirati promjenama u serumskoj koncentraciji lamotrigina. Pokazano je statistički značajno smanjenje serumske koncentracije lamotrigina kod pacijenata pušača liječenih samo lamotriginom (Reinsberger i sur., 2008.). Isto je potvrdila studija Gulcebi i sur., 2011. koja je također pokazala statistički značajno smanjenje koncentracije lamotrigina i u monoterapiji i politerapiji. S obzirom na magnitudu utjecaja nikotina na klirens lamotrigina i činjenicu da je navika pušenja široko rasprostranjena, neki autori ističu potrebu da se navika pušenja svakako kao varijabla uključi u evaluaciji terapije lamotriginom (Milosheska i sur., 2016.).

5.3. Ograničenja i važnost provedene studije

Provedena studija ima nekoliko ograničenja, prvo temelji se na mjerenjima jutarnjih koncentracijama na kraju intervalnog doziranja (engl. *trough*), u okviru rutinskog praćenja liječenja, a ne na detaljnoj farmakokinetičkoj analizi. Međutim to ne isključuje njen potencijalni klinički značaj s obzirom da je ovakav pristup preporučen u međunarodnim smjernicama za TDM antiepileptika (Lamictal, SPC, HALMED, 2016.). Dodatno, učestalost varijantnog alela UGT1A4*2 70 C>A je bila niska, u samo 6 od ukupno 205 pacijenata što je isključilo bilo kakvu značajniju analizu. Nisu testirani i neki drugi polimorfizmi koji se u literaturi navode kao mogući biomarkeri, poput UGT2B7 372A>G (Milosheska i sur., 2016.), UGT1A4 -219C>T/-163G>A (Wang i sur., 2015.), UGT2B7 A268G (Ma H i sur., 2013.) te neki drugi polimorfizmi transportera poput ABCB1 2677T>G/A (Milosheska i sur., 2016.) i OCT1 rs628031 (Shen i sur., 2016.). Stoga rezultate studije treba promatrati u okviru navedenih ograničenja. S druge strane, studija je uključila relevantan broj pacijenata, uključne/isključne kriterije, odgovarajuće vrijeme uzrokovanja te analizu jutranjih koncentracija i dozom prilagođenih koncentracija (multivarijatni model simultano uključujući sve ispitivane polimorfizme i demografske podatke pacijenata osiguravajući kontrolu potencijalnih varijabli koje bi mogle utjecati na studiju). Stoga se rezultati studije mogu smatrati razumno relevantnima i točnima.

Danas se u liječenju mnogih bolesti često istovremeno primjenjuje više lijekova, posebice ako se radi o liječenju kroničnih i zloćudnih bolesti, što značajno povećava mogućnost njihovih uzajamnih interakcija. Biomedicinska literatura je glavni izvor saznanja o interakcijama lijekova i njihovim nuspojavama. Pubmed baza podataka iz siječnja 2017. godine sadržava blizu 5,000 članaka o interakcijama lijekova (engl. *Drug-Drug Interactions, DDI*) i preko 7,000 članka o nuspojavama (Raja i sur., 2017.). S obzirom na činjenicu da do interakcije lijek-lijek može doći u slučaju kada dva lijeka stupaju u međudjelovanje na razini istog gena/enzima sve češće se u literaturi koristi i izraz interakcija lijek-lijek-gen (engl. *Drug-Drug-Gene Interactions, DDGI*). Farmakogenetičko ispitivanje (PGx) može poboljšati sigurnost i djelotvornost primjenjene terapije, otkrivajući genetičke varijante za koje je poznato da mogu utjecati na farmakokinetiku ili učinkovitost/toksičnost primijenjenog lijeka-lijekova.

Važno je također analizirajući farmakogenetički status pacijenta uvijek imati na umu i druge čimbenike varijabilnosti farmakoterapije. Osim komorbiditeta poput insuficijencija jetre i bubrega, to su i vanjski čimbenici koji uključuju pušenje, hranu i istodobnu primjenu drugih lijekova. Posebno, istodobna primjena lijekova na recept ili lijekova odobrenih za izdavanja bez recepta, mogu utjecati na farmakokinetičke parametre određene varijabilnom funkcijom metaboličkih enzima i transportera što u konačnici može značajno promijeniti (pojačati ili smanjiti) učinkovitost farmakoterapije (Klieber i sur., 2015.). Prema istraživanju provedenom u Austriji, prosječno svaki četvrti pacijent uzima lijek za kojeg je farmakogenetička analiza značajna (PGx lijek), u politerapiji s lijekovima koji inhibiraju ili induciraju metaboličke enzime ili transportere. U više od polovine takvih slučajeva zabilježene su srednje jake (47,3%) ili jake (7,3%) inhibicije ili indukcije (Blagec i sur., 2017.). Fokus istraživanja posljednjih godina usmjeren je na aktivnosti koje doprinose donošenju kliničkih odluka temeljenih na farmakogenetičkim spoznajama ili interakcijama lijek-lijek. Međutim malo je istraživanja koja su integrirala ova dva pristupa analizirajući učinke interakcija gen-lijek-lijek (Božina i sur, 2017.). Stoga držim da je pristup zastupljen u ovom radu, koji je zasnovan na ispitivanju interakcija gen-lijek-lijek dobar putokaz za integraciju farmakogenomike u kliničku praksu. Taj pristup će svakako značajno unaprijediti individualizaciju i optimizaciju terapije za svakog pojedinog pacijenta što i jest krajnji cilj personalizirane medicine.

Stoga držim da je rezultat ove studije koji upućuje na značaj polimorfizma *ABCG2* u moduliranju interakcije valproata i lamotrigina važan i kao putokaz za daljnja istraživanja.

Kao što je već ranije istaknuto kroz razne primjere, primjena konkomitatnog lijeka koji je inhibitor proteina ABCG2, može modulirati farmakokinetiku transportiranog supstrata, rezultirajući interakcijama primjenjenih lijekova, što posljedično može dovesti do neželjenih toksičnih učinaka zbog povećane izloženosti. Uzimajući u obzir kako je prema dosadašnjim podacima oko 6% pacijenata iskusilo intoksikaciju antiepilepticima te kako još oko 25% pacijenata nema odgovarajući odgovor na terapiju antiepilepticima, naš rezultat o ulozi ABCG2, a koji još nije dokumentiran u znanstvenoj literaturi dobiva dodatno na važnosti i držimo da je vrijedan daljnjih istraživanja, te ga treba replicirati na većem broju ispitanika i u drugim populacijama.

6. ZAKLJUČCI

1. Nije dokazan ukupan učinak polimorfizma *ABCG2* 421C>A (rs2231142) na koncentracije lamotrigina i valproata, ali je uočena značajna interakcija između varijantnog alela i terapije (politerapija s lamotriginom i valproatom):
 - a) Utjecaj valproata na interakciju s lamotriginom je značajno veći u nositelja varijantnog alela u odnosu na divlji tip gena *ABCG2*
 - b) U ispitanika na monoterapiji s lamotriginom, u nositelja varijantnog alela uočeno je smanjenje koncentracije lamotrigina za 20-26%, dok je u pacijenata na konkomitantnoj terapiji s lamotriginom i valproatom uočen statistički značajan porast koncentracije lamotrigina za 55-65%
 - c) Uočena je za 2,0-2,3 puta veća razlika u učinku valproata u dvije podskupine genotipova, kao i učinaka varijantnog alela u dvije podskupine liječenja
 - d) Koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala povećavaju se s porastom koncentracija valproata na kraju doznog intervala, ali je taj porast značajno veći u nositelja varijantnog alela u odnosu na divlji homozigotni genotip
2. Nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizama gena za metaboličke enzime *UGT1A4* 142T>G (rs2011425), *UGT1A4* 70C>A (rs6755571), *UGT2B7* -161 C>T (rs7668258) i koncentracija lamotrigina i valproata te na domete njihovih interakcija.
3. Nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizma gena za transportni protein *ABCB1* 1236 C>T (rs1128503) i koncentracija lamotrigina i valproata te na domete njihovih interakcija.
4. Nije dokazana statistički značajna povezanost između polimorfizama *CYP2C9**2 (rs1799853), *CYP2C9**3 (rs1057910), *CYP2C19**17 (rs12248560) i *CYP2C19**2 (rs4244285) na koncentracije valproata u pacijenata na konkomitantnoj terapiji s lamotriginom i valproatom.

7. LITERATURE REFERENCE:

1. Albani F, Theodore WH, Washington P, Devinsky O, Bromfield E, Porter RJ, Nice FJ (1991) Effect of felbamate on plasma levels of carbamazepine and its metabolites. *Epilepsia* 32: 130-132.
2. Almeida AM, Falcao AC, Sales F, Baldeiras I, Rocha MJ, Caramona MM (2006) Lamotrigine pharmacokinetic evaluation in epileptic patients submitted to VEEG monitoring. *Eur J Clin Pharmacol* 62: 737-742.
3. Baltes S, Fedrowitz M, Tortós CL, Potschka H, Löscher W (2007) Valproic acid is not a substrate for P-glycoprotein or multidrug resistance proteins 1 and 2 in a number of in vitro and in vivo transport assays. *J Pharmacol Exp Ther* 320: 331-343.
4. Barbier O, Turgeon D, Girard C, Green MD, Tephy TR, Hum DW, Belanger A (2000) 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) is glucuronidated by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug metab Dispos* 28: 497-502.
5. Benoit-Biancamano MO, Adam JP, Bernard O, Court MH, Leblanc MH, Caron P, Guillemette C (2009) A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. *Pharmacogenetic and Genomics* 19: 945-954.
6. Berry DJ, Besag FM, Pool F, Natarajan J, Dooze D (2002) Lack of an effect of topiramate on lamotrigine serum concentrations. *Epilepsia* 43: 818-823.
7. Besag FM, Berry DJ, Pool F, Newbery JE, Subel B (1998) Carbamazepine toxicity with lamotrigine: pharmacokinetic or pharmacodynamic interaction? *Epilepsia* 39: 183-187.
8. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T (2000) Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 at amino acid change 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics* 10: 679-685.
9. Bialer M, Yagen B (2007) Valproic acid: second generation, *Neurotherapeutics: Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics* Vol.4: 130-137.
10. Blagc K, Kuch W, Samwald M (2017) The Importance of Gene-Drug-Drug-Interactions in Pharmacogenomics Decision Support: An Analysis Based on Austrian Claims Data. *Stud Health Technol Inform* 236: 121-127.
11. Blanca Sánchez M, Herranz JL, Leno C, Arteaga R, Oterino A, Valdizán EM, Nicolas JM, Adín J, Shushtarian M, Armijo JA (2010) UGT2B7 -161C>T polymorphism is associated with lamotrigine concentration-to-dose ratio in a multivariate study. *Ther Drug Monit* 32: 177-184.

12. Booven VD, Marsh S, McLeod H, Carrillo WM, Sangkuhl K, Klein ET, Altmand BR (2010) Cytochrome P450 2C9-CYP2C9. *Pharmacogenet Genomics* 20: 277–281.
13. Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA i sur (1995) The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDPglucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *N Engl J Med* 333: 1171–1175.
14. Božina N, Lalić Z, Nađ-Škegro S, Borić-Bilušić A, Božina T, Kaštelan Ž, Trkulja V (2017) Steady-state pharmacokinetics of mycophenolic acid in renal transplant patients: exploratory analysis of the effects of cyclosporine, recipients' and donors' ABCC2 gene variants, and their interactions. *Eur J Clin Pharmacol* 73:1129-1140.
15. Božina N, Pejnovic L (2013) Osnove farmakogenetika. U: Božina N, Macolić Šarinić V, Farmakogenomika i farmakovigilancija, sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije, upute i smjernice. Zagreb, Medicinska naklada, 1-22.
16. Castel-Branco MM, Almeida AM, Falcao AC, Macedo TA, Caramona MM, Lopez FG (2001) Lamotrigine analysis in blood and brain by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 755: 119-127.
17. Chang Y, Yang LY, Zhang MC, Liu SY (2014) Correlation of the UGT1A4 gene polymorphism with serum concentration and therapeutic efficacy of lamotrigine in Han Chinese of Northern China. *Eur J Clin Pharmacol* 70: 941-946.
18. Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederick M (2010) Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of Valproic Acid. *J Biomed Biotechnol* 2010: 479364.
19. Chu XM, Zhang LF, Wang GJ, Zhang SN, Zhou JH, Hao HP (2012) Influence of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms on valproic acid pharmacokinetics in Chinese epilepsy patients. *Eur J Clin Pharmacol* 68: 1395-1401.
20. Ciotti M, Marrone A, Potter C, Owens IS (1997) Genetic polymorphism in the human UGT1A6 (planar phenol) UDP-glucuronosyltransferase: pharmacological implications. *Pharmacogenetics* 7: 485-495.
21. Coffman BL, Rios GR, King CD, Tephy TR (1997) Human UGT2B7 catalyzes morphine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 25:1-4.
22. Cohen AF, Land GS, Breimer DD, Yuen WC, Winton C, Peck AW (1987) Lamotrigine, a new anticonvulsant: pharmacokinetics in normal humans. *Clin Pharmacol Ther* 42: 535-541.
23. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for Revised Classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes (1989). *Epilepsia* 30: 389-399.

24. Court MH, Hao Q, Krishnaswamy S, Bekaii-Saab T, Al-Rohaimi A, von Moltke LL, Greenblatt DJ (2004) UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 pharmacogenetics: UGT2B15 D85Y genotype and gender are major determinants of oxazepam glucuronidation by human liver. *J Pharmacol Exp Ther* 310: 656-665.
25. Court MH, Krishnaswamy S, Hao Q, Duan SX, Patten CJ, Von Moltke LL, Greenblatt DJ (2003) Evaluation of 3'-azido-3'-deoxythymidine, morphine, and codeine as probe substrates for UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) in human liver microsomes: specificity and influence of the UGT2B7*2 polymorphism. *Drug Metab Dispos* 31: 1125-1133.
26. Cunningham JM, Hebring SJ, McDonnell SK, Cicek MS, Christensen GB, Wang L, Jacobsen SJ, Cerhan JR, Blute ML, Schaid DJ, Thibodeau SN (2007) Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16: 969-978.
27. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res* 42: 1007–1017.
28. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH (2011) Part 2: pharmacogenetics variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist* 16: 820-834.
29. Depakine-chrono 300 mg i 500 mg filmom obložene tablete, Sažetak opisa svojstava lijeka, datum revizije teksta 24.07.2017., dostupno sa Internet stranice HALMED-a
30. Divakaran K, Hines RN, McCarver DG (2014) Human hepatic UGT2B15 developmental expression. *Toxicol Sci* 141: 292-299.
31. Drugs.com (2016), <https://www.drugs.com/drug-interactions/valproic-acid,valproate-sodium.html>
32. Du Z, Jiao Y, Shi L (2016) Association of UGT2B7 and UGT1A4 Polymorphisms with Serum Concentration of Antiepileptic Drugs in Children. *Med Sci Monit* 22: 4107-4113.
33. Duguay Y, Baar C, Skorpen F, Guillemette C (2004) A novel functional polymorphism in the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 promoter with significant impact on promoter activity. *Clin Pharmacol Ther* 75: 223-233.
34. Ehmann F, Caneva L, Prasad K, Paulmichl M, Maliepaard M, Llerena A, Ingelman-Sundberg M, Papaluca-Amati M (2015) Pharmacogenomic information in drug labels: European Medicines Agency perspective. *Pharmacogenomics J* 15: 201-210.

35. Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP (2004) Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4. *Hepatology* 39: 970-977.
36. Elsby R, Martin P, Surry D, Sharma P, Fenner K (2016) Solitary Inhibition of the Breast Cancer Resistance Protein Efflux Transporter Results in a Clinically Significant Drug-Drug Interaction with Rosuvastatin by Causing up to a 2-Fold Increase in Statin Exposure. *Drug Metab Dispos* 44: 398-408.
37. Erickson-Ridout KK, Zhu J, Lazarus P (2011) Olanzapine metabolism and the significance of UGT1A4 48V and UGT2B1067Y variants. *Pharmacogenet Genomics* 21: 539-551.
38. European Medicines Agency (2012) EMA/CHMP/37646/2009, Use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products.
39. Evans DA, White TA (1964) Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med* 63: 394-403.
40. Fitton A, Goa KL *Drugs* (1995) Lamotrigine. An update of its pharmacology and therapeutic use in epilepsy. *Drugs* 50: 691-713.
41. Fungades SBR (2008) Valproic acid:review. *Rev Neurocienc* 16/2: 130-136.
42. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N (2017) Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther* doi: 10.1515/dmpt-2016-0024.
43. Gaunt TR, Rodriguez S, Day NMI (2007) Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool "CubeX". *BMC Bioinformatics* 8: 428.
44. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK (2013) Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Altm Pharmacogenet Genomics* 23: 236-241.
45. Ghotbi R, Mannheimer B, Aklillu E, Suda A, Bertilsson L, Eliasson E, Osby U (2010) Carriers of the UGT14 142 T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure-an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol* 66:465-474.
46. Giacomini KM, Balimane PV, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, Huang SM, Sugiyama Y, Weitz D, Wen Y i sur. (2013) International Transporter Consortium:

- International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* 94: 23–26.
47. Giacomini KM, Huang SM, Tweedie DJ, Benet LZ, Brouwer KL, Chu X, Dahlin A, Evers R, Fischer V, Hillgren KM i sur. (2010) International Transporter Consortium Membrane transporters in drug development. *Nat Rev Drug Discov* 9: 215–236.
 48. Giacomini KM, Sugiyama Y (2006) Membrane Transporters and drug response. U Brunton L, Lazo JS, Parker KL *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Companies, 41-70.
 49. Gidal BE (2002) Topiramate. Drug interaction. In: Levy RH, Mattison RH, Meldrum BS, Perucca E, eds, *Antiepileptic drugs* 5th edition, Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 734-739.
 50. Gidal BE, Sheth R, Parnell J, Maloney K, Sale M (2003) Evaluation of VPA dose and concentration effects on lamotrigine pharmacokinetics: implications for conversion to lamotrigine monotherapy. *Epilepsy Res* 57: 85–93.
 51. Goa KL, Ross SR, Chrisp P (1993) Lamotrigine. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs* 46: 152-176.
 52. Green MD, Oturu EM, Tephly TR (1994) Stable expression of a human liver UDP-glucuronosyltransferase (UGT2B15) with activity toward steroid and xenobiotic substrates. *Drug Metab Dispos* 22: 799-805.
 53. Guillemette C (2003) Pharmacogenomics of human UDP glucuronosyltransferase enzymes. *Pharmacogenomics J* 3: 136–158.
 54. Guillemette C, Lévesque E, Harvey M, Bellemare J, Menard V (2010) UGT genomic diversity: beyond gene duplication. *Drug Metabolism Rev* 42: 24-44.
 55. Gulcebi MI, Ozkaynakc1 A, Goren MZ, Aker RG, Ozkara C, Onat FY (2011) The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 95: 1-8.
 56. Guo Y, Hu C, He X, Qiu F, Zhao L (2012) Effects of UGT1A6, UGT2B7, and CYP2C9 genotypes on plasma concentrations of valproic acid in Chinese children with epilepsy. *Drug Metab Pharmacokinet* 27: 536-542.
 57. Hajnešek I, Kovačević I, Petelin Ž (2010) Epilepsija-terapijske smjernice. *Neurol. Croat* 59: 1-2.
 58. Haslemo T, Loryan I, Ueda N, Mannheimer B, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Molden E, Eliasson E (2012) UGT1A4*3 encodes significantly increased

- glucuronidation of olanzapine in patients on maintenance treatment and in recombinant systems. *Clin Pharmacol Ther* 92: 221-227.
59. He X, Hesse LM, Hazarika S, Masse G, Harmatz JS, Greenblatt DJ, Court MH (2009) Evidence for oxazepam as an in vivo probe of UGT2B15: oxazepam clearance is reduced by UGT2B15 D85Y polymorphism but unaffected by UGT2B17 deletion. *Br J Clin Pharmacol* 68:721-730.
 60. Hick JS, Swen JJ, Thorn CF, Sangkuhl K, Kharasch ED, Ellingrod VL, Skaar TC, Muller DJ, Gaedigk A, Stingl JC (2013) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotype and Dosing of Tricyclic Antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 93: 402-408.
 61. Hiller A, Nguyen N, Strassburg CP, Li Q, Jainta H, Pechstein B, Ruus P, Engel J, Tukey RH, Kronbach T (1999) Retigabine N-glucuronidation and its potential role in enterohepatic circulation. *Drug Metab Dispos* 27: 605-612.
 62. Holthe M, Rakvåg TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, Skorpen F (2003) Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J* 3:17-26.
 63. Huić M, Francetić I (2014) Interakcije. U: Francetić I, Vitezić D *Klinička farmakologija*. Zagreb, Medicinska naklada, 207-226.
 64. Hung CC, Chen CC, Lin CJ, Liou HH (2008) Functional evaluation of polymorphisms in the human ABCB1 gene and the impact on clinical responders of epileptic drugs. *Pharmacogenetics Genomics* 18: 390-402.
 65. Hung CC, Ho JL, Chang WL, Tai JJ, Hsieh TJ, Hsieh YW, Liou HH (2011) Association of genetic variants in six candidate gene with valproic acid therapy optimization. *Pharmacogenomics* 12 : 1107-1117.
 66. Innocenti F, Iyer L, Ramirez J, Greeb MC, Ratain MJ (2001) Epiribucin glucuronidation is catalyzed by human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Drug Metab Dispos* 29: 686-692.
 67. Inoue K, Suzuki E, Yazawa R, Yamamoto Y, Takahashi T, Takahashi Y, Imai K, Koyama S, Inoue Y, Tsuji D, Hayashi H, Itoh K (2014) Influence of uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B7 -161C>T polymorphism on the concentration of valproic acid in pediatric epilepsy patients. *Ther Drug Monit* 36: 406-409.

68. Iyer L, Hall D, Das S, Mortell MA, Ramírez J, Kim S, Di Rienzo A, Ratain MJ (1999) Phenotype-genotype correlation of in vitro SN-38 (active metabolite of irinotecan) and bilirubin glucuronidation in human liver tissue with UGT1A1 promoter polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 65: 576-582.
69. Jančova P, Šiller M (2012) Phase II Drug Metabolism,. U: Topics on Drug Metabolism, Paxton J (Ed.), InTech, New York, USA, 35-60.
70. Jiang D, Bai X, Zhang Q, Lu W, Wang Y, Li L, Müller M (2009) Effects of CYP2C19 and CYP2C9 genotypes on pharmacokinetic variability of valproic acid in Chinese epileptic patients: nonlinear mixed-effect modeling. *Eur J Clin Pharmacol* 65: 1187-1193.
71. Jin C, Miners JO, Lillywhite KJ, Mackenzie PI (1993) Complementary deoxyribonucleic acid cloning and expression of a human liver uridine diphosphate-glucuronosyltransferase glucuronidating carboxylic acid-containing drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 264: 475-479.
72. Johannessen C, Johannessen S (2003) Valproate: Past, Present, and Future. *CNS Drug Rev* 9: 199–216.
73. Johannessen SI, Tomson T (2006) Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed?. *Clin Pharmacokinet* 45: 1061-1075.
74. Kalow W (1952) Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther* 104: 122-134.
75. Kalow W (1962) Pharmacogenetics, heredity and the response to drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 52: 208.
76. Kanner AM, Frey M (2000) Adding valproate to lamotrigine: a study of their pharmacokinetic interaction. *Neurology* 55: 588-591.
77. Kapetanovic IM, Kupferberg HJ, Potere RJ, Theodore W, Shulman E, Penry JK (1981) Mechanism of valproate-phenobarbital interaction in epileptic patients. *Clin Pharmacol* 29: 480-486.
78. Kasuba ADM, Bertino JS (2001) Mechanisms of Drug Interactions. U: Piscitelli SC, Rodvold KA (urednici) *Drug Interactions in Infectious Diseases*. Humana Press, Totowa, NJ, 13-38.
79. Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M (2009) ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 86: 197–203.

80. Kiang TK, HO PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TK (2006) Contribution of CYP 2C9, CYP2A6 and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicol.Sci* 94: 261-271.
81. Klieber M, Oberacher H, Hofstaetter S, Beer B, Neururer M, Amann A, Alber H, Modak A (2015) CYP2C19 Phenoconversion by Routinely Prescribed Proton Pump Inhibitors Omeprazole and Esomeprazole: Clinical Implications for Personalized Medicine. *J Pharmacol Exp Ther* 354: 426-430.
82. Kwan P, Schachter SC, Brodie MJ (2011) Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med* 365: 919-926.
83. Lamictal 25 mg, 50 mg i 100 mg tablete, Sažetak opisa svojstava lijeka, datum revizije teksta: 13.10.2016., dostupno sa Internet stranice HALMED-a
84. Lampe JW, Bigler J, Bush AC, Potter JD (2000) Prevalence of polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B family: UGT2B4 (D458E), UGT2B7 (H268Y) and UGT2B15 (D85Y). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 329-333.
85. Laverdiere I, Caron P, Harvey M, Levesque E, Guillemette C (2011) In vitro investigation of human UDP-glucuronosyltransferase isoforms responsible for tacrolimus glucuronidation: predominant contribution of UGT1A4. *Drug Metab Dispos* 39: 1127-1130.
86. Leach MJ, Marden CM, Miller AA (1986) Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neuro-chemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia* 27: 490–497.
87. Lee CA, O'Connor MA, Ritchie TK, Galetin A, Cook JA, Ragueneau-Majlessi I, Ellens H, Feng B, Taub ME, Paine MF, Polli JW, Ware JA, Zamek-Gliszczynski MJ (2015) Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metab Dispos* 43:490-509.
88. Lee MC, Sun YH, Lee CH, Wu AJ, Wu TW (2012) Interaction between valproic acid and carbapenems: Case series and literature review. *Tzu Chi Medical Journal* 24: 80-84.
89. Levesque E, Beaulieu M, Green MD, Tephly TR, Belanger A, Hum DW (1997) Isolation and characterization of UGT2B15(Y85): a UDP-glucuronosyltransferase encoded by a polymorphic gene. *Pharmacogenetics* 7: 317–325.

90. Li J, Menard V, Benish RL, Jurevic RJ, Guillemette C, Stoneking M, Zimmerman PA, Mehlotra RK (2012) Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implications for HIV/AIDS treatment. *Pharmacogenomics* 13: 555–570.
91. Liu L, Zhao L, Wang Q, Qiu F, Wu X, Ma Y (2015) Influence of valproic acid concentration and polymorphism of UGT1A4*3, UGT2B7 -161C > T and UGT2B7*2 on serum concentration of lamotrigine in Chinese epileptic children. *Eur J of Clin Pharmacol* 71: 1341–1347.
92. Llyod KA (2013) A scientific review: mechanism of valproate-mediated teratogenesis. *Bioscience horizons* volume 6.
93. Löscher W (2002) Valproic acid. Mechanisms of action. In: Levy RH, Mattson RH, Meldrum BS, Perucca E (urednici) *Antiepileptic drugs*. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 767–779.
94. Löscher W, Schmidt D (2012) Perampanel-new promise for refractory epilepsy? *Nat Rev Neurol* 8: 661-662.
95. Lötsch J (2005) Opioid metabolites. *J Pain Symptom Manage* 29: S10 24.
96. Lovrić M, Božina N, Hajnšek S, Kuzman MR, Sporiš D, Lalić Z, Božina T, Granić P (2012) Association between lamotrigine concentrations and ABCB1 polymorphisms in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit* 34: 518-525.
97. Lu W, Uetrecht JP (2007) Possible Bioactivation Pathways of Lamotrigine. *Drug Metab Dispos* 35: 1050-1056.
98. Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W (2008) Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacol* 55: 1364-1375.
99. Löscher W, Potschka H (2002) Role of Multidrug Transporters in Pharmacoresistance to Antiepileptic Drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 301: 7-14.
100. Ma H, Zhang T, Gong Z, Zhou B, Zou M, Xiao S, Zhu W (2013) Effect of UGT2B7 genetic variants on serum valproic acid concentration. *J Cent South Univ (Med Sci)* 38: 766-772.
101. Mackenzie PI, Rogers A, Treloar J, Jorgensen BR, Miners JO, Meech R (2008) Identification of UDP glycosyltransferase 3A1 as UDP N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 283: 36205-36210.
102. Madian AG, Wheeler HE, Jones RB, Dolan ME (2012) Relating human genetic variation to variation in drug responses. *Trends Genet* 28: 487-495.

103. Makeeva O, Stepanov V, Puzyrev V, Goldstein DB, Grossman I (2008) Global pharmacogenetics: genetic substructure of Eurasian populations and its effect on variants of drug-metabolizing enzymes. *Pharmacogenomics* 9:847-868.
104. Makmor-Bakry M, Sills GJ, Btler E (2010) Genetic predictor of lamotrigine maintenance dose; a role for P-glycoprotein?. *Neurology Asia* 15:54.
105. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH (2001) Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 61: 3458 –3464.
106. May T, Rambeck B (1985) Serum concentration of valproic acid: influence of dose and comedication. *Therp Drug Monit* 7: 387-390.
107. May TW, Rambeck B, Jurgens U (1996) Serum concentrations of lamotrigine in epileptic patients: the influence of dose and comedication. *Ther Drug Monit* 18: 523-531.
108. May TW, Rambeck B, Jürgens U (1999) Influence of oxcarbazepine and methsuximide on lamotrigine concentrations in epileptic patients with and without valproic acid comedication: results of a retrospective study. *Ther Drug Monit* 21: 175-181.
109. McClain MR, Palomaki GE, Piper M, Haddow JE (2008) A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding. *Genet Med* 10: 89–98.
110. McLeod SL, Nowell S, Plaxco J, Lang NP (2000) An allele-specific polymerase chain reaction method for the determination of the D85Y polymorphism in the human UDP-glucuronosyltransferase 2B15 gene in case-control study of prostate cancer. *Ann. Sur. Oncol* 7: 777-782.
111. Meech R, Rogers A, Zhuang L, Lewis BC, Miners JO, Mackenzie PI (2012) Identification of Residues That Confer Sugar Selectivity to UDP-Glycosyltransferase 3A (UGT3A) Enzymes. *J Biol Chem* 287: 24122-24130.
112. Messenheimer JA (1995) Lamotrigine *Epilepsia* 36: 87-94.
113. Miller AA, Sawyer DA, Roth B i sur (1986) Lamotrigine. U Meldrum BS, Poretr RJ (urednici) *New anticonvulsant drugs*. London, John Libbey, 165-177.
114. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucl Acid Res* 16:1215.

115. Milosheska D, Lorber B, Vovk T, Kastelic M, Dolžan V, Grabnar I (2016) Pharmacokinetics of lamotrigine and its metabolite N-2-glucuronide: Influence of polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases and drug transporters. *Br J Clin Pharmacol* 82: 399-411.
116. Minners OJ, McKinnon AR, MacKenzie IP (2002) Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferases and their functional significance. *Toxicology* 181-182: 453-456.
117. Mizuma T (2009) Intestinal glucuronidation metabolism may have a great impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: a study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9 and 1A10. *Int J Pharm* 378: 140-141.
118. Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y (2005) UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Dispos* 33:672-675.
119. Myrand SP, Sekiguchi K, Man MZ, Lin X, Tzeng RY, Teng CH, Hee B, Garrett M, Kikkawa H, Lin CY i sur. (2008) Pharmacokinetics/genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first- and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations. *Clin. Pharmacol. Ther* 84: 347–361.
120. Neels HM, Sierens AC, Naelaerts K, Scharpé SL, Hatfield GM, Lambert WE (2004) Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med* 42: 1228-1255.
121. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q (2010) Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab* 11: 603-617.
122. Olson KC, Dellinger RW, Zhong Q, Sun D, Amin S, Spratt TE, Lazarus P (2009) Functional characterization of low-prevalence missense polymorphism in UDP-glucuronosyltransferase 1A9 gene. *Drug Metab Dispos* 37: 1999-2007.
123. Parmar S, Stingl JC, Huber-Wechselberger A, Kainz A, Renner W, Langsenlehner U, Krippel P, Brockmöller, Haschke-Becher E (2011) Impact of UGT2B7His268Tyr polymorphism on the outcome of adjuvant epirubicin treatment in breast cancer. *Breast Cancer Research* 13:R57.
124. Patsalos PN, Fröscher W, Pisani F, M. van Rijn C (2002) The importance of drug interactions in epilepsy therapy. *Epilepsia* 43: 365-385.

125. Patsalos PN, Perucca E (2003) Clinically important drug interaction in epilepsy: general features and interactions between antiepileptic drugs. *Lancet Neurol* 2: 347-356.
126. Perucca E (2000) Is there a role for therapeutic drug monitoring of new anticonvulsants?. *Clin Pharmacokinet* 38: 191-204.
127. Perucca E (2001) The clinical pharmacology and therapeutic use of the new antiepileptic drugs. *Fund Clin Pharmacol* 15: 405-417.
128. Perucca E (2002) Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs* 16:695-714.
129. Pfeifer ND, Bridges AS, Ferslew BC, Hardwick RN, and Brouwer KL (2013a) Hepatic basolateral efflux contributes significantly to rosuvastatin disposition II: characterization of hepatic elimination by basolateral, biliary, and metabolic clearance pathways in rat isolated perfused liver. *J Pharmacol Exp Ther* 347:737–745.
130. Pfeifer ND, Yang K, and Brouwer KL (2013b) Hepatic basolateral efflux contributes significantly to rosuvastatin disposition I: characterization of basolateral versus biliary clearance using a novel protocol in sandwich-cultured hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 347:727–736.
131. PharmGKB (Pharmacogenomics Knowledge Base) (2017), Dosing guidelines, <https://www.pharmgkb.org/guidelines>
132. Plavšić F, Stavljenić A, Vrhovac B (1992) Individualizacija terapije. U: Plavšić F, Stavljenić A, Vrhovac B *Osnove kliničke farmakokinetike*, Zagreb, Školska knjiga, 80-121.
133. Porter JR, Meldnum BS (2011) Antiepileptici. U: Katzung BG, Masters SB, Trebr AJ, *Temeljna i klinička farmakologija*. Zagreb, Medicinska naklada, 399-422.
134. Posner J, Cohen AF, Land G, Winton C, Peck AW (1989) The pharmacokinetics of lamotrigine (BW430C) in healthy subjects with unconjugated hyperbilirubinaemia (Gilbert's syndrome). *Br J Clin Pharmacol* 28:117-120.
135. Radomska-Pandya A, Little JM, Czernik PJ (2001) Human UDP-glucuronosyltransferase 2B7. *Curr Drug Metab* 2:283-298.
136. Raja K, Patrick M, Elder JT, Tsoi LC (2017) Machine learning workflow to enhance predictors of Adverse Drug Reactions (ADRs) through drug-gen interactions: application to drugs for cutaneous diseases. *Sci Rep* 7:3690.
137. Rambeck B, Wolf P (1993) Lamotrigine clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet* 25:433-443.

138. Ramsay RE, Pellock JM, Garnett WR, Sanchez RM, Valakas AM, Wargin WA, Lai AA, Hubbell J, Chern WH, Allsup T i sur. (1991) Pharmacokinetics and safety of lamotrigine (Lamictal) in patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 10: 191-200.
139. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (2003) Antiepileptici. U: Geber J (ed.) *Farmakologija*, Prvo hrvatsko izdanje. Zagreb, Golden marketing-Tehnička knjiga, 550-561.
140. Reidenberg P, Glue P, Banfield CR, Colucci RD, Meehan JW, Radwanski E, Mojavarian P, Lin CC, Nezamis J, Guillaume M i sur (1995) Effects of felbamate on the pharmacokinetics of phenobarbital. *Clin Pharmacol Ther* 58: 279-287.
141. Reimers A, Sijursen W, Helde G, Brodtkorb E (2016) Frequencies of UGT1A4*2 (P24T) and *3 (L48V) and their effects on serum concentrations of lamotrigine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 41:149-155.
142. Relling M, Klein T (2011) CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clin Pharmacol Ther* 89:464-467.
143. Rendić S, Medić-Šarić M (2013a) Reakcije I. faze, oksidoredukcijske reakcije i reakcije hidrolize. U: Medić-Šarić M, *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*, Zagreb, Medicinska naklada, 15-170.
144. Rendić S, Medić-Šarić M (2013b) Reakcije II. faze, Metilacije, konjugacije s α -aminokiselinama i endogenim aminima (N-acetilacije), acetilacije, sulfokonjugacije, glukuronidacije i reakcije s reduciranim oblikom glutationa, GSH. U: Medić-Šarić M, *Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika*, Zagreb, Medicinska naklada, 175-248.
145. Römermann K, Helmer R, Löscher W (2015) The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Neuropharmacology* 93:7-14.
146. Rowland A, Elliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG, Miners JO (2006) In vitro characterization of lamotrigine N2-glucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction. *Drug Metab Dispos* 34:1055-1062.
147. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI (2013) The UDP-glucuronosyltransferases: their role in the drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol* 45: 1121-1132.
148. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, Ozawa S, Kawamoto M, Kamatani N, Shirao K, Minami H, Ohtsu A, Yoshida T, Saijo N, Komamura K, Kotake T, Morishita H, Kamakura S, Kitakaze M, Tomoiike H, Sawada J (2005)

- Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet* 20: 144-151.
149. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Ohno A, Ozawa S, Ueno K, Kamakura S, Kamatani N, Komamura K, Kitakaze M, Sawada J (2004) Single nucleotide polymorphisms and haplotype frequencies of UGT2B4 and UGT2B7 in a Japanese population. *Drug Metab Dispos* 32:1048-1054.
 150. Samara EE, Gustavson LE, El-Shourbagy T, Locke C, Grannerman GR, Sommerville KW (1998) Population analysis of the pharmacokinetics of tiagaine in patients with epilepsy. *Epilepsia* 39: 868-873.
 151. Sandson NB, Marcucci C, Bourke DL, Smith-Lamacchia R (2006) An interaction between aspirin and valproate: the relevance of plasma protein displacement drug-drug interactions. *Am J Psychiatry* 163: 1891-1896.
 152. Sapine E, Perucca E (2002) Clinical significance of pharmacokinetic interaction and psychotropic drugs. *Epilepsia* 43: 37-44.
 153. Sawyer MB, Innocenti F, Das S, Cheng C, Ramírez J, Pantle-Fisher FH, Wright C, Badner J, Pei D, Boyett JM, Cook E Jr, Ratain MJ (2003) A pharmacogenetic study of uridindiphosphate-glucuronosyltransferase 2B7 in patients receiving morphine. *Clin Pharmacol Ther* 73: 566-574.
 154. Schuetz EG, Beck WT, Schuetz JD (1996) Modulators and substrates of P-glycoprotein and cytochrome P4503A coordinately up-regulate these proteins in human colon carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 49: 311-318.
 155. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot JS, Thron CF, Altman RB, Klein TE (2012) PharmaGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenom* 22: 159-165.
 156. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, Klein TE, Sabatine MS, Johnson JA, Shuldiner AR (2013) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. *Clin Pharmacol Ther* 94: 317-323.
 157. Seo AK, Bae KS, Choi KY, Choi CS, Liu KH, Shin JG (2010) Metabolism of 1' – and 4 hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP glucuronosyltransferases 1A4,2B4 and 2B7. *Drug Metab Dispos* 38: 2007-2013.

158. Shen CH, Zhang YX, Lu RY, Jin B, Wang S, Liu ZR, Tang YL, Ding MP. (2016) Specific OCT1 and ABCG2 polymorphisms are associated with lamotrigine concentrations in Chinese patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 127: 186-190.
159. Shorvon SD, Tallis RC, Wallace HK (2002) Antiepileptic drugs: coprescription of proconvulsant drugs and oral contraceptive: a national study of antiepileptic drug prescribing practice. *J. Neurol Neurosurg psychiatry* 72: 114-155.
160. Sidhu J, Job S, Bullman J, Francis E, Abbott R, Ascher J, Theis JG (2006) Pharmacokinetics and tolerability of lamotrigine and olanzapine coadministered to healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 61:420-426.
161. Silva MF, Aires CC, Luis PB, Ruiter JP, IJlst L, Duran M, Wanders RJ, Tavares de Almeida I (2008) Valproic acid metabolism and its effects on mitochondrial fatty acid oxidation: a review. *J Inherit Metab Dis* 31:205-216.
162. Singkham N, Towanabut S, Lertkachatarn S, Punyawudho B (2013) Influence of the UGT2B7 -161C>T polymorphism on the population pharmacokinetics of lamotrigine in Thai patients. *Eur J Clin Pharmacol* 69: 1285-1291.
163. Sjöstedt N, van den Heuvel JJMW, Koenderink JB, Kidron H (2017) Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2. *Pharm Res* 34: 1626-1636.
164. Smith RL, Haslemo T, Refsum H, Molden E (2016) Impact of age, gender and CYP2C9/2C19 genotypes on dose-adjusted steady-state serum concentrations of valproic acid-a large-scale study based on naturalistic therapeutic drug monitoring data. *Eur J Clin Pharmacol* 72: 1099-1104.
165. Sneitz N, Court MH, Zhang X, Laajanen K, Yee KK, Dalton P, Ding X, Finel M (2009) Human UDP-glucuronosyltransferase UGT2A2: cDNA construction, expression, and functional characterization in comparison with UGT2A1 and UGT2A3. *Pharmacogenet Genomics* 19: 923-934.
166. Stingl JC, Bartels H, Viviani R, Lehmann ML, Brockmöller J (2014) Relevance of UDP-glucuronosyltransferase polymorphisms for drug dosing: A quantitative systematic review. *Pharmacol Ther* 141: 92-116.
167. Sun D, Chen G, Dellinger RW, Duncan K, Fang JL, Lazarus P (2006) Characterization of tamoxifen and 4- hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res* 8: R50.
168. Swen JJ, Wilting I, de Goede AL, Grandia L, Mulder H, Touw DJ, de Boer A, Conemans JM, Egberts TC, Klungel OH, Koopmans R, van der Weide J, Wilffert B,

- Guchelaar HJ, Deneer VH (2008) Pharmacogenetics: from bench to byte. *Clin Pharmacol Ther* 83: 781-787.
169. Tan L, Yu JT., Sun YP, Ou JR, Song JH, Yu Y (2010) The influence of cytochrome oxidase CYP2A6, CYP2B6, and CYP2C9 polymorphisms on the plasma concentrations of valproic acid in epileptic patients. *Clin Neurol Neurosurg* 112: 320-323.
 170. Tartara A, Galimberti CA, Manni R, Morini R, Limido G, Gatti G, Bartoli A, Strada G, Perucca E (1993) The pharmacokinetic profile of oxcarbamazepine and its active metabolite 10-hydroxycarbamazepine in healthy subjects and in epileptic patients treated with phenobarbitone or valproic acid. *Br J Clin Pharmacol* 36: 366-368.
 171. Terbach N, Williams RS (2009) Structure-function studies for the panacea, valproic acid. *Biochem Soc Trans* 37: 1126-1132.
 172. Thibaudeau J, Le pine J, Tojcic J (2006) Characterization of common UGT1A8, UGT1A9 and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. *Cancer res* 66: 125-133.
 173. Tsanaclis LM, Allen J, Perucca E, Routledge PA, Richens A (1984) Effect of valproate on free plasma phenytoin concentrations. *Br J Clin Pharmacol* 18(1): 17-20.
 174. Tukey RH, Strassburg CP (2000) Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 581-616.
 175. US Food and Drug Administration (2017) Guidance for Industry: Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations
 176. Vecht CJ, Wagner L, Wilms EB (2003) Interaction between antiepileptic and chemotherapeutic agents. *Lancet Neurol* 2: 404-409.
 177. Villeneuve L, Girard H, Fortier LC, Gagné JF, Guillemette C (2003) Novel functional polymorphism in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 307: 117-128.
 178. Vogel F (1959) *Moderne Probleme der Humangenetik*. Max Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie.
 179. Voso MT, Santini V, Finelli C, Musto P, Pogliani E, Angelucci E, Fioritoni G, Alimena G, Maurillo L, Cortelezzi A, Buccisano F, Gobbi M, Borin L, Di Tucci A, Zini G, Petti MC, Martinelli G, Fabiani E, Fazi P, Vignetti M, Piciocchi A, Liso V,

- Amadori S, Leone G (2009) Valproic acid at therapeutic plasma levels may increase 5-azacytidine efficacy in higher risk myelodysplastic syndromes. *Clin Cancer Res* 15: 5002-5007.
180. Wagner ML, Graves NM, Leppik IE, Remmel RP, Shumaker RC, Ward DL, Perhach JL (1994) The effect of felbamate on valproic acid disposition. *Clin Pharmacol Ther* 56: 494-502.
 181. Wang Q, Liang M, Dong Y, Yun W, Qiu F, Meng H, Zhao L, Guo Y (2016) Effects of UGT2B7 genetic polymorphism on serum concentrations of valproic acid in Chinese epileptic children comedicated with lamotrigine. *Ther Drug Monit* 38: 343-349.
 182. Wang Q, Liang M, Dong Y, Yun W, Qiu F, Zhao L, Guo Y (2015) Effects of UGT1A4 genetic polymorphisms on serum lamotrigine concentrations in Chinese children with epilepsy. *Drug Metab Pharmacokinet* 30: 209-213.
 183. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, Altman RB, Klein TE (2012) Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther* 92: 414-417.
 184. WHO (World Health Organisation) (2017) Epilepsy, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>
 185. Wnuk W, Volanski A, Foletti G (1999) Topiramate decreases lamotrigine concentrations. *TDM* 21: 449.
 186. Yamamoto Y, Inoue Y, Matsuda K, Takahashi Y, Kagawa Y (2012) Influence of concomitant antiepileptic drugs on plasma lamotrigine concentration in adult Japanese epilepsy patients. *Biol Pharm Bull* 35: 487-493.
 187. Yasui-Furukori N, Kaneda A, Iwashima K, Saito M, Nakagami T, Tsuchimine S, Kaneko S (2007) Association between cytochrome P450 (CYP) 2C19 polymorphisms and harm avoidance in Japanese. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet* 144B: 724-727.
 188. Zabalza M, Subirana I, Sala J, Lluís-Ganella C, Lucas G, Tomás M, Masiá R, Marrugat J, Brugada R, Elosua R (2012) Meta-analyses of the association between cytochrome CYP2C19 loss- and gain-of-function polymorphisms and cardiovascular outcomes in patients with coronary artery disease treated with clopidogrel. *Heart* 98: 100-108.
 189. Zhou J, Argikar UA, Remmel RP (2011) Functional analysis of UGT1A4 (P24T) and UGT1A4 (L48V) variant enzymes. *Pharmacogenomics* 12: 1671-1679.

190. Zhou Y, Wang X, Li H, Zhang J, Chen Z, Xie W, Zhang J, Li J, Zhou L, Huang M (2015) Polymorphisms of ABCG2, ABCB1 and HNF4 α are associated with Lamotrigine trough concentrations in epilepsy patients. *Drug Metab Pharmacokinet* 30: 282-287.
191. Zhu AZ, Cox LS, Ahluwalia JS, Renner CC, Hatsukami DK, Benowitz NL, Tyndale RF (2015) Genetic and phenotypic variation in UGT2B17, a testosterone-metabolizing enzyme, is associated with BMI in males. *Pharmacogenet Genomics* 25: 263-269.

8. ŽIVOTOPIS

Iva Klarica Domjanović (r. Klarica) rođena je 10. lipnja 1987. godine u Sinju. Osnovnu i srednju školu završila je Zagrebu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet u Zagrebu, smjer farmacija upisala je 2005. godine na kojem je diplomirala 2010. godine i stekla zvanje magistra farmacije. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, biološkog odsjeka upisala je u studenom 2011. godine.

Nakon završetka Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, 2011. godine zaposlila se kao pripravnik na ljekarničkom stažu u ljekarnama zagrebačke županije u Samoboru te položila državni ispit 2012.

Od 2012. godine do danas zaposlena je u Agenciji za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) gdje je radila na regulatornim poslovima u Odsjeku za validaciju zahtjeva te od 2016. godine na ocjeni ne-kliničke i kliničke dokumentacije u Odsjeku za djelotvornost i sigurnost lijekova. Sudjelovala je na nekoliko domaćih znanstvenih skupova te je održala predavanja na svjetskim kongresima kliničke toksikologije i terapijskog praćenja lijekova.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. Lovrić M, Čajić I, Petelin Gadže Ž, Klarica Domjanović I, Božina N (2018) Effect of antiepileptic drug comedication on lamotrigine concentrations. *Croat Med J* 59(1): 13-19.
2. Božina N, Klarica Domjanović I, Ganoci L (2017) Farmakogenomika u pedijatrijskoj populaciji. *Paediatr Croat* 61 (Supl 1): 184-192.
3. Krasniqi V, Dimovski A, Domjanović IK, Bilić I, Božina N (2016) How polymorphisms of the cytochrome P450 genes affect ibuprofen and diclofenac metabolism and toxicity. *Arh Hig Rada Toksikol* 67(1): 1-8.

Kongresni sažeci u časopisima:

4. Božina N, Mirosevic Skvrce N, Ganoci L, Mas P, Klarica Domjanovic I, Simic I (2016) Integrating Pharmacovigilance and Pharmacogenomics: Croatian Experience. *Clin Ther* 6;38(10S): e23.
5. Ganoci L, Lovrić M, Živković M, Šagud M, Klarica Domjanović I, Božina N (2016) The Role Of Cyp2d6, Cyp3a4/5, And Abcb1 Polymorphisms In Patients Using Long-Acting Injectable Risperidone. *Clin Ther* 6;38(10S): e10-e11.