

Uloga polimorfizma gena ABCG2, ABCB1 i SLCO1B1 u nastanku štetnih učinaka rosuvastatina

Radman, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:359935>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Radman

**Uloga polimorfizma gena
ABCG2, ABCB1 i SLC01B1
u nastanku štetnih učinaka
rosuvastatina**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ivana Radman

**Uloga polimorfizma gena
ABCG2, ABCB1 i SLCO1B1
u nastanku štetnih učinaka
rosuvastatina**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Zavodu za farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti i Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Iveta Merćep

ZAHVALE

Duboko zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Iveti Merćep na znanstvenom usmjeravanju, korisnim savjetima te nesebičnoj pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovog doktorskog rada.

Posebno se zahvaljujem prof. dr. sc. Nadi Božini na njezinoj stalnoj predanosti, pristupačnosti i ohrabrenju te konstruktivnim savjetima.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Milanu Miloševiću na korisnim savjetima i statističkoj analizi podataka.

Također zahvaljujem svim sudionicima ovog istraživanja, kolegama i suradnicima koji su pomogli u izvedbi ovog rada.

Od srca zahvaljujem svim mojim pravim prijateljima s kojima sam dijelila lijepe i teške trenutke u životu.

uboko sam zahvalna svojim roditeljima, ocu Ivi, majci Marini i sestri Marii na iskrenoj podršci, razumijevanju, pomoći i ljubavi koja mi je bila snažan oslonac i podrška tijekom svih godina moga stručnog i znanstvenog rada.

Na kraju, zahvaljujem dečku Bruni na pruženoj ljubavi, podršci i razumijevanju.

“Neprestani trud, ne snaga ili inteligencija, ključ je za otključavanje našeg potencijala.”

Winston Churchill

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1	UVOD	1.
1.1.	Klinička primjena statina.....	5.
1.2.	Klasifikacija statina i potencijal smanjenja LDL kolesterola.....	6.
1.3.	Nuspojave povezane sa statinima.....	7.
1.4.	Izvešća o nuspojavama statina u Eudravigilance.....	9.
1.5.	Interakcije lijekova.....	10.
1.6.	Rosuvastatin.....	12.
1.6.1.	Farmakokinetika rosuvastatina.....	12.
1.6.2.	Farmakodinamika rosuvastatina.....	14.
1.7.	Polimorfizam metaboličkih enzima.....	17.
1.7.1.	Citokrom P450 (CYP).....	17.
1.7.2.	Citokrom P450 2C9 (CYP2C9).....	17.
1.7.3.	Citokrom P450 2C19(CYP2C19).....	18.
1.8.	Polimorfizam membranskih prijenosnika.....	19.
1.8.1.	Membranski prijenosnici ABC.....	20.
1.8.1.1.	PGP/ABCB1.....	20.
1.8.1.2.	ABCG2/BCRP.....	22.
1.8.2.	Membranski prijenosnici SLC.....	27.
1.8.2.1.	Organski anionski transporter (OATP1B1).....	27.
1.8.2.2.	Smjernice Konzorcija za provedbu kliničke farmakogenetike za SLCO1B1 miopatiju izazvanu statinima.....	30.
1.8.2.3.	Farmakogenetske informacije u službenom označavanju proizvoda za statine.....	31.
2.	HIPOTEZA	33.
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34.

4.	ISPITANICI I METODE	35.
4.1.	Ispitanici.....,	35.
4.2.	Metode genotipizacije	38.
4.2.1.	Izdvajanje DNA.....	38.
4.2.2.	Genotipizacija polimorfizama ABCB1, ABCG2, SLCO1B1, CYP2C9 i CYP2C19	38.
4.3.	Statističke metode	41.
5.	REZULTATI	42.
6.	RASPRAVA	65.
6.1.	Polimorfizmi <i>ABCB1</i>	65.
6.1.	Polimorfizmi <i>CYP2C9 i CYP2C19</i>	66.
6.3.	Polimorfizmi <i>ABCG2 i SLCO1B1</i>	67.
6.4.	Ograničenja studije.....	73.
6.5.	Značaj rezultata	74.
7.	ZAKLJUČCI	76.
8.	SAŽETAK	77.
9.	SUMMARY	79.
10.	LITERATURA	81.
11.	ŽIVOTOPIS	100.

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC	superobitelj membranskih prijenosnika ovisnih o ATP-u (engl. ATP binding cassette)
ABCB1	prijenosnik podobitelji B člana 1 ovisan o ATP-u (engl. ATP binding cassette subfamily B member 1)
ABCG2	prijenosnik podobitelji G člana 2 ovisan o ATP-u (engl. ATP Binding Cassette subfamily G member 2)
ApoB	apolipoprotein B
ALP	alkalna fosfataza (engl. Alkaline phosphatase)
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
ATP	aspartat aminotransferaza
BCRP	protein izoliran iz stanica raka dojke otporan na lijekove (engl. Breast Cancer Resistance Protein)
CIOMS	Vijeće međunarodnih organizacija za medicinske znanosti (engl. Council for International Organizations for Medical Sciences)
CK	kreatin kinaza
CPIC	Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenetike (engl. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium)
CYP	citokrom P450
CRP	C reaktivni protein
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EM	brzi metabolizator (engl. Extensive Metabolizer)
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. European Medicines Agency)
EVDAS	EudraVigilance sustav analize podataka (engl. EudraVigilance Data Analysis System)

FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. Food and Drug Administration)
GGT	gama glutamiltransferaza
GWA	analiza cjelokupnog genoma (engl. Genome Wide Association)
HDL	kolesterol velike gustoće (engl. High Density Lipoprotein Cholesterol)
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A
ICH	Međunarodna konferencija o harmonizaciji (engl. International Conferences on Harmonisation)
IM	srednje brz metabolizator (engl. Intermediate Metabolizer)
KVB	kardiovaskularna bolest
KBZ	kronično zatajenje bubrega
LDL-C	kolesterol male gustoće (engl. Low Density Lipoprotein – Cholesterol) protein
MDR1	višestruke otpornosti na lijekove 1 (engl. Multidrug Resistance Protein 1)
MRP2	protein višestruke otpornosti na lijekove 2 (engl. Multidrug Resistance Associated Protein 2)
OATP1B1	organski anionski transportni polipeptid 1B1 (engl. Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. Polymerase Chain Reaction)
Pgp	P-glikoprotein
PPK	površina pod krivuljom (engl. <i>Area Under the Curve</i> - AUC)
PM	spori metabolizator (eng. Poor Metabolizer)
RUCAM	kriteriji metode Roussel Uclaf (engl. Roussel Uclaf Causality Assessment Method)
SLCO1B1	gen koji kodira prijenosnik za organske anione (engl. Solute Carrier Organic Anion Transporter)
SmPC	sažetak opisa svojstava lijeka (engl. Summary of Product Characteristic)
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. Single Nucleotide Polymorphism)
UEM	vrlo brzi metabolizator (engl. Ultraextensive Metabolizer)
VLDL	kolesterol vrlo male gustoće (engl. Very Low Density Lipoprotein Cholesterol)

1. UVOD

Inhibitori 3-hidroksi-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze, statini, učinkoviti su lijekovi za snižavanje kolesterola u krvi i prevenciju kardiovaskularnih događaja (1,2). Statini su heterogena skupina lijekova koji se međusobno razlikuju prema fizikalno-kemijskim svojstvima i kliničkim učincima, a u Hrvatskoj su trenutno registrirani simvastatin, atorvastatin, lovastatin, fluvastatin i rosuvastatin.

Većina statina se iz crijeva brzo apsorbira i postiže vršnu koncentraciju za manje od 4 sata. Maksimalni učinak statini ostvaruju nakon 4 do 6 tjedana. Rosuvastatin zahvaljujući dugom poluvremenu eliminacije ostvaruje ujednačeni učinak u snižavanju kolesterola tijekom cijelog dana. Rosuvastatin se općenito dobro podnosi i sistemska izloženost lijeku je ovisna o dozi. Apsorpcija peroralnog rosuvastatina procjenjuje se na oko 50 %, a bioraspoloživost je oko 20 % zbog učinka prvog prolaza kroz jetru. U metaboličkom putu rosuvastatina značajnu ulogu imaju membranski prijenosnici ABCB1 i ABCG2 koji kontroliraju unos statina na razini enterocita i prijenos na membrani jetra-žuč, te OATP1B1/SLCO1B1 koji je odgovoran za unos lijeka u jetru.

Iako se pokazalo da su statini relativno sigurni za većinu bolesnika, ipak se u manjeg broja bolesnika javi neka od nuspojava. U kliničkoj praksi učestalost blažih nuspojava čini se da je viša od podataka koji su dobiveni u kontroliranim kliničkim ispitivanjima i procjenjuje se na 5-10 % (3,4).

Najčešća nuspojava koja opterećuje primjenu statina je miopatija, ali su zabilježeni i drugi štetni učinci (hepatotoksičnost, reverzibilno kognitivno oštećenje, povećanje glikoziliranog hemoglobina i koncentracije glukoze u krvi).

Identificirani su različiti predisponirajući čimbenici koji utječu na povišenu sistemsku izloženost lijeku i time potenciraju štetne učinke statina: interakcije lijekova, starija dob, ženski spol, nizak indeks tjelesne mase, hipotireoza, šećerna bolest te genetički čimbenici (5-12).

Cilj farmakogenomike je identifikacija relevantnih genskih biljega na temelju kojih se može pretpostaviti profil-fenotip odgovora na farmakoterapiju, te primjena genetičkih informacija za stvaranje algoritama za odabir najprikladnijeg lijeka za svakoga pojedinog bolesnika ili skupine bolesnika (individualizacija i optimizacija terapije) (13-15).

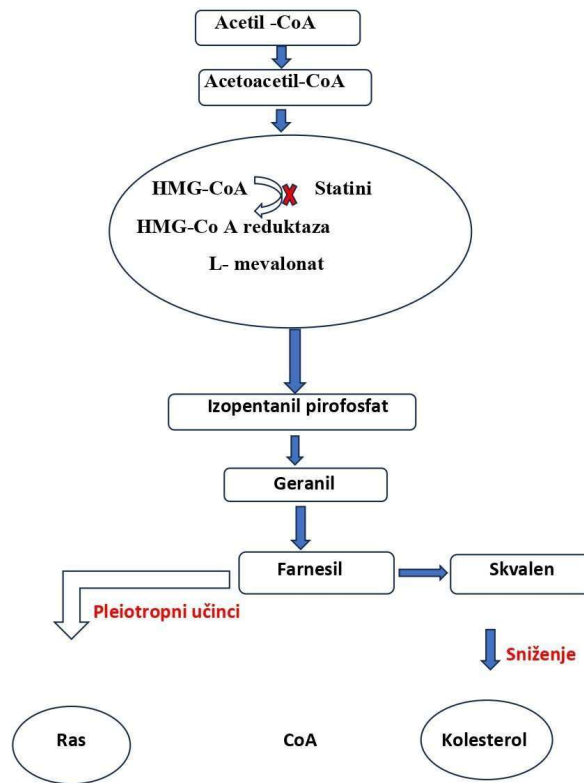
Do sada je proveden značajan broj istraživanja s ciljem proučavanja farmakogenetike/farmakogenomike statina (16-31). Ta su se istraživanja više bavila simvastatinom i atorvastatinom nego rosuvastatinom, a rezultirala su preporukama i smjernicama za doziranje simvastatina prema genotipu *SLCO1B1* jer smanjena funkcija OATP1B1 (kodiran genom *SLCO1B1*) pri primjeni statina može biti podloga za razvoj nuspojava, najčešće miopatije uključujući i rabdomiolizu (17). Otkriće ljudskog genoma omogućilo je istovremenu analizu većeg broja gena ili cjelokupnog genoma te je došlo do ekspanzije tzv. cjelogenomskih istraživanja - GWA (engl. *Genome Wide Association*). Cjelogenomska istraživanja mogu povezati niz nukleotidnih polimorfizama s odgovorom na lijekove olakšavajući time nova otkrića. Najznačajnija studija GWA bavila se genskim varijacijama povezanim s miopatijom – jednom od najznačajnijih nuspojava statinske terapije (18). Varijanta SNP rs4363657 gena *SLCO1B1* koji kodira polipeptid OATP1B1 pokazala se značajnom predispozicijom za razvoj miopatije pri primjeni simvastatina ($p = 4.1 \times 10^9$). Rezultati studija ističu da je rizik razvoja miopatije bio 17,4 puta veći u homozigotnih nositelja varijantnog genotipa *521CC* u odnosu na genotip *521TT* (19). Ovo je dosad najsnažniji zabilježeni farmakogenetički učinak povezan s uzimanjem statina. Također su identificirani SNP u genu *ABCB1* (rs3789244 i rs1922242) koji snažno utječu na

statinsku terapiju (20). Keskitalo sa suradnicima je dokazala značajnu korelaciju haplotipova *ABCB1* (rs1045642, rs2032582 i rs1128503) s farmakokinetičkim parametrima simvastatina i atorvastatina (21). Za transporter *ABCG2* je dokumentirana povezanost polimorfizma *c.421C>T* s nuspojavama fluvastatina (22) i atorvastatina (23) u hrvatskoj populaciji, dok jasnih dokaza za rosuvastatin još nema osim podataka koji se odnose na varijabilnu farmakokinetiku rosuvastatina u zdravih kineskih dragovoljaca nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421A* (24). Premda je prema podacima za europsku populaciju uloga *OATP1B1* u transportu/farmakokinetici rosuvastatina značajno manja u odnosu na simvastatin i atorvastatin, najnovija studija također provedena u kineskoj populaciji izvještava o povezanosti polimorfizma *SLCO1B1 c.521T>C* s rosuvastatinom izazvanom miotoksičnošću u bolesnika s koronarnom bolesti srca (25). Ta nesuglasja se mogu objasniti značajnim razlikama u učestalosti polimorfizma *SLCO1B1* u pojedinim rasama. Tako je učestalost varijantnih alela u azijskim populacijama veća u odnosu na bjelačke populacije (25). Navode se prosječne vrijednosti za površinu pod krivuljom (PPK) (engl. Area Under the Curve - AUC) rosuvastatina koje su bile za 64 % i 84 % više, a maksimalne koncentracije (C_{max}) za 70- 98 % više u istočnoazijskim populacijama u odnosu na bjelačku populaciju (26). Druga studija u kineskoj populaciji navodi za varijantu *ABCG2 c.421AA* (smanjena aktivnost transportera) porast plazmatske koncentracije rosuvastatina i njegovog metabolita za 63% odnosno 41% u odnosu na nositelje genotipa *421CA* te porast koncentracija od 120% i 99% u nositelja genotipa *421CC* (27). Studija u kanadskoj populaciji je ispitala povezanost između kliničkih i farmakogenetičkih varijabla i koncentracija statina. Ustanovljeno je da koncentracija statina pri primjeni iste doze lijeka varira za 45 puta među ispitanicima s različitim farmakogenetičkim karakteristikama. Nakon statističke prilagodbe za spol, dob, indeks tjelesne mase, etničku pripadnost, dozu i proteklo vrijeme od posljednje doze, varijante gena *SLCO1B1 c.521T>C* i *ABCG2 c.421C>A* su se pokazale značajnima za koncentracije rosuvastatina (28). Međutim, druga studija s ispitanicima

regrutiranima iz studije JUPITER (engl. **J**ustification for the **U**se of **S**tatins in **P**revention: An **I**ntervention

Trial **E**valuating **R**osuvastatin) nije našla povezanost između polimorfizma *SLCO1B1* i mijalgije pri uporabi rosuvastatina (29). I dok u literaturi nalazimo podatke koji povezuju varijabilnu farmakokinetiku rosuvastatina ovisnu o više farmakogena (*ABCB1*, *ABCG2*, *SLCO1B1*) njihova uloga kao prediktora razvoja nuspojava još nije razjašnjena i definirana u mnogim populacijama uključujući bjelačku (30).

Uz farmakogenetičku predispoziciju istraživanja upućuju i na značajnu ulogu interakcija lijekova u popratnoj terapiji te interakcija lijek-lijek-gen na ukupan sigurnosni profil statina (31). Stoga je prijedlog ovog istraživanja upravo ispitati ulogu nekih farmakogena kao mogućih prediktora toksičnosti rosuvastatina uz analizu i drugih rizičnih čimbenika.



Slika 1. Mehanizam djelovanja statina

1.1. Klinička primjena statina

Statini djeluju prvenstveno inhibiranjem aktivnosti 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzima-A (HMGCoA) reduktaze, što dovodi do smanjenja sinteze kolesterola i povećanja unosa lipoproteinskog kolesterola male gustoće (low density lipoprotein - cholesterol, LDL -C) iz krvi u jetru što u konačnici smanjuje koncentraciju kolesterola male gustoće LDL kolesterola u plazmi.

(slika 1.) (32).

Oni su najpropisivaniji lijekovi u liječenju dislipidemije i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti (KVB) (1,2). Terapija statinima je pokazala učinkovitost u smanjenju koronarne ateroskleroze, čime se smanjuje incidencija i rizik od akutnog koronarnog sindroma i moždanog udara, neovisno o dobi (8,10). Statini su pokazali značajnu korist u dijabetičara s kardiovaskularnim komplikacijama što rezultira i izjednačavanjem rizika od KVB u usporedbi s nedijabetičarima (4). Uporabom statina smanjuje se stopa smrtnosti u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem (KBZ), a smanjuje se i rizik od srčanog infarkta i moždanog udara (33,34).

Međutim, u bolesnika s oštećenjem bubrega i hiperlipoproteinemijom 3.-5. stupnja potrebna je prilagodba doze statina zbog rizika od nefrotoksičnosti (35,36).

Nekoliko je studija izvijestilo o neovisnim učincima statina na snižavanje koncentracije LDL-a, poznatim kao pleiotropni učinci koji uključuju protuupalno i antioksidativno djelovanje, modulaciju imunološkog odgovora, modifikaciju u intermedijarnim signalima kolesterola koji dovode do stabiliziranja aterosklerotskih plakova i antiagregacijskih učinaka (37-39).

Pleiotropni učinci statina povezani su s nizom bolesti, uključujući kroničnu opstruktivnu bolest pluća, reumatoidni artritis, upalne bolesti crijeva, metabolički sindrom, multiplu sklerozu, vensku

trombozu, sistemski eritematozni lupus, malignu neoplazmu, moždani udar, Alzheimerovu bolest, Parkinsonovu bolest, AIDS, sindrom policističnih jajnika i bakterijske infekcije (40-44).

1.2. Klasifikacija statina i potencijal smanjenja LDL kolesterola

Statini su razvrstani u tri kategorije prema potenciji i učinkovitosti u pogledu smanjenja LDL kolesterola (45-48).

Prvu kategoriju čine statini niskog intenziteta, u koje spadaju pravastatin, lovastatin i fluvastatin. Ti su statini uvedeni na tržište između 1980. i 1990. godine i imaju najmanju moć za smanjenje LDL-a, manje od 30% uz doziranje jednom dnevno (pravastatin 10 mg, 20 mg; lovastatin 20 mg; fluvastatin 20 mg, 40 mg). Pravastatin je najviše proučavan od statina niskog intenziteta i pokazao je učinkovitost u smanjenju kardiovaskularnog (KV) rizika u sekundarnoj prevenciji KVB i kod simptomatske bolesti koronarnih arterija. Također su poznate prednosti fluvastatina i lovastatina u smanjenju KV rizika (46).

Druga kategorija statina su statini srednjeg intenziteta (simvastatin i atorvastatin) koji imaju veću učinkovitost u smanjenju razine LDL-a u plazmi u usporedbi sa statinima niskog intenziteta (30-45% smanjenja LDL-a). Doze od 20 mg i 40 mg simvastatina i doze od 10 mg i 20 mg atorvastatina su umjerenog intenziteta kada se daju jednom dnevno. Doza simvastatina od 10 mg dnevno ima nisku razinu intenziteta u smanjenju LDL-C (48,49).

Treća kategorija statina su statini visokog intenziteta. Rosuvastatin i visoke doze atorvastatina (40 mg, 80 mg) klasificirani su kao visokointenzivni jer smanjuju koncentraciju LDL-a za $\geq 50\%$. Rosuvastatin ima značajnu moć i djelotvornost zahvaljujući fluoriranoj fenilnoj skupini, hidrofilnoj metansulfonamidnoj skupini i snažnom kapacitetu vezanja s enzimom HMG-CoA reduktaze. Doze

rosuvastatina označene kao doze visokog intenziteta su 20 mg i 40 mg. Dnevna doza rosuvastatina od 10 mg se klasificira kao doza umjerenog intenziteta, ekvivalentna većim dozama pravastatina, lovastatina i fluvastatina (47-51).

Metaanaliza studija koje su ispitivale učinak statina u rizičnim skupinama bolesnika (VOYAGER) (engl. individual patient meta-analysis Of statin therapy in At risk Groups: Effects of Rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin) pokazala je veću učinkovitost rosuvastatina u smanjenju razine LDL-a u usporedbi s drugim statinima (49).

Program GALAXY (engl. Goal Achievement in Lipid Attenuation is eXcellent for reducing coronary events) sveobuhvatna je globalna istraživačka inicijativa koja uključuje niz kliničkih studija koje ispituju djelotvornost i podnošljivost rosuvastatina u skladu s hipotezom da je rosuvastatin statin s najvećom učinkovitošću u poboljšanju aterogenog lipidnog profila i sposobnošću modifikacije upalnih biljega što također može usporiti napredovanje ateroskleroze i poboljšati kardiovaskularne ishode u usporedbi sa sličnim dozama simvastatina i atorvastatina (50).

1.3. Nuspojave povezane sa statinima

U brojnim je izvješćima potvrđeno da statini imaju dobar sigurnosni profil i da je rizik nuspojava prihvatljiv u odnosu na kliničku korist. Ipak, mogućnost nastanka štetnih događaja važno je uzeti u obzir prilikom propisivanja i praćenja liječenja statinima kao dijela personalizirane strategije liječenja (3,9,10). U kliničkoj praksi učestalost blažih nuspojava čini se da je viša od podataka koji su dobiveni u kontroliranim kliničkim ispitivanjima i procjenjuje se na 5-30% (4). Najčešća nuspojava koja opterećuje primjenu statina je miopatija, ali su zabilježeni i drugi štetni učinci (hepatotoksičnost, reverzibilno kognitivno oštećenje, povećanje glikoziliranog hemoglobina i koncentracije glukoze u krvi). Identificirani su različiti predisponirajući čimbenici koji utječu na

povišenu sistemsku izloženost lijekovima i time potenciraju štetne učinke statina: interakcije lijekova, starija dob, ženski spol, nizak indeks tjelesne mase, hipotireoza, šećerna bolest te genetički čimbenici (3-12).

Klinički najznačajnije nuspojave statina su mišićni simptomi koji su najčešći uzrok prestanka uzimanja statina i nepridržavanja propisane doze što povećava rizik od kardiovaskularnih događaja (51-68). Mišićni simptomi uzrokovani statinima dokumentirani u kliničkim studijama su mijalgija, miopatija i rabdomioliza, a oni koji se obično javljaju prema iskustvu pacijenata su bolovi u mišićima, osjetljivost, ukočenost, grčevi i mišićna slabost (56-59).

Incidencija mišićnih nuspojava varira od 5% do 30% (4). Mijalgija i miopatija smatraju se blažim simptomima i javljaju se češće. Američki kardiološki koledž / Američko udruženje za srce / Nacionalni institut za srce, pluća i krv mijalgiju definira kao bolove u mišićima ili slabost bez povišenja kreatin-kinaze (CK) (52). Miopatija se definira kao difuzna mišićna bolest koja uzrokuje povišenje razine CK do 10 puta veću od gornje granice normale (9-12). Rabdomioliza je ozbiljnija nuspojava, ali je rjeđa, javlja se u incidenciji od 1 na 10 000 pacijenata godišnje. Rabdomiolizu karakteriziraju jaki mišićni bolovi, nekroza mišića i mioglobinurija, što potencijalno dovodi do zatajenja bubrega i smrti (31,64).

Pojava mišićnih simptoma varira između različitih statina i doza (21-31, 65-68). Lipofilni statini, uključujući simvastatin, atorvastatin i lovastatin, imaju veću učestalost mišićnih simptoma od hidrofilnih statina, poput rosuvastatina i pravastatina, a stopa mišićnih nuspojava raste s uporabom sintetičkih statina (fluvastatin i atorvastatin) i većim dozama statina (21-23). Mišićni simptomi su često ograničeni na određeno područje i utječu na velike mišićne skupine, uključujući proksimalne i distalne mišiće nogu, posebno mišiće bedara i gluteusa (68). Dijagnoza mišićnih simptoma i dalje je izazovna zbog nedostatka zlatnih standardnih definicija, klasifikacija i smjernica. Konsenzus

Europskog društva za aterosklerozu iz 2015. predlaže tri mogućnosti dijagnoze miopatije povezane sa statinima; (i) pravodobna povezanost simptoma i / ili visokih razina CK iznad gornje granice normale na početku liječenja statinima, (ii) nestanak simptoma nakon povlačenja statina i (iii) ponovna pojava mišićnih simptoma kada se ponovno izazove s drugim statinom (58). Međutim, razine CK ne smatraju se najpouzdanijim pokazateljem statinske miopatije, budući da uz pojavu mišićnih simptoma razina CK može biti unutar normalnog raspona (22-198 U/l), jer sama miopatija može biti uzrokovana strukturnim oštećenjem mišićnih vlakana (69).

1.4. Izvješća o nuspojavama statina u Eudravigilance

Opseg farmakovigilancije evoluirao je u prijavljivanje neželjenih nuspojava lijekova, pogreške u lijekovima, krivotvorenje ili otkrivanje nekvalitetnih lijekova, nedostatka djelotvornosti i interakcije lijekova.

Sigurnost pacijenta, praćenje liječenja i nadzor lijekova glavni su fokus farmakovigilancije kada se lijek uvodi na tržište (70). EudraVigilance sustav analize podataka (EVDAS – EudraVigilance Data Analysis System) jedan je od najvećih sustava izvještavanja u prijavljenih nuspojava lijekova širom svijeta i odgovoran je za prikupljanje, upravljanje i analizu prijavljenih sumnji na neželjene reakcije lijekova odobrenih u Europskoj Uniji. Njime upravlja Europska agencija za lijekove, EMA (engl. European Medicines Agency) od 2001. godine (71).

Izvješća o nuspojavama lijekova uključuju izvješća o miopatiji, mijalgiji i rbdomiolizi uzrokovanu simvastatinom, atorvastatinom i rosuvastatinom za petogodišnje razdoblje (2014.-2018.) iz 28 zemalja Europske unije (EU). Izvješća su prikupljena u bazu podataka EVDAS i analizirana prema dobi, spolu, dozi statina i težini nuspojava. Analizirano je ukupno 4.164 izvješća koja se odnose na

mišićne nuspojave. Od ukupnog broja izvješća 78,3% se odnosi na mijalgiju, 15,4% na rabdomiolizu i 6,3% na miopatiju. Najviše nuspojava vezano je uz atorvastatin 47,3%, dok je za simvastatin zabilježeno 33,2%, a za rosuvastatin 19,5%. Mijalgija je registrirana u 47,1% bolesnika na atorvastatinu u usporedbi s 32,4% na simvastatinu i 20,6% na rosuvastatinu. Slična je raspodjela u pojavnosti rabdomiolize izazvane atorvastatinom 48,8%, simvastatinom 37,2% i rosuvastatinom 14,5%. Također se miopatija najčešće javlja u bolesnika koji uzimaju atorvastatin (47,5%) u usporedbi s bolesnicima koji uzimaju simvastatin 33,7% i rosuvastatin 18,8% (72).

1.5. Interakcije lijekova

Broj djelotvornih lijekova u suvremenoj medicine stalno se povećava što potiče polipragmaziju. Istodobna primjena većeg broja lijekova (5 i više nazivamo polifarmacijom) uobičajena je u liječenju tumora i kroničnih bolesti te u bolesnika s više komorbiditeta. To povećava vjerojatnost nastanka interakcija lijek-lijek. Učestalost nuspojave raste s brojem lijekova koji se uzimaju istodobno. U bolesnika koji uzimaju 15 i više lijekova vjerojatnost neželjenih reakcija premašuje 40% (73).

Interakcija lijek-lijek može pojačati ili smanjiti učinke jednog ili oba lijeka. Klinički značajne interakcije često su predvidljive i obično nepoželjne. Mogući su štetni učinci ili terapijski neuspjeh. Rijetko, kliničari mogu koristiti predvidljive interakcije između lijekova kako bi proizveli željeni terapijski učinak. Na primjer, istodobna primjena lopinavira i ritonavira kod bolesnika s HIV infekcijom rezultira promijenjenim metabolizmom lopinavira i povećava koncentracije i učinkovitost lopinavira u serumu (74). U terapijskom dupliciranju, 2 lijeka sličnih svojstava uzimaju se istodobno i imaju aditivnu učinkovitost. Na primjer, uzimanje benzodiazepina za

anksioznost i drugog benzodiazepina prije spavanja za nesanicu može imati kumulativni učinak, što dovodi do toksičnosti.

Mišićna toksičnost izazvana rosuvastinom ovisi o dozi i interakcijama lijekova koje dovode do povećanih koncentracija rosuvastatina u plazmi.

Rosuvastatin se često koristi istodobno s inhibitorom agregacije trombocita tikagrelorom za sprječavanje ponovljenih kardiovaskularnih događaja, npr. nakon perkutane koronarne intervencije. Liječenje se obično dobro podnosi, no u literaturi se navodi više slučajeva rabdomiolize tijekom istodobne primjene rosuvastatina i tikagrelora (75,76).

Rosuvastatin se podvrgava samo ograničenom metabolizmu, a metabolizirajući enzimi imaju samo mali učinak na izloženost rosuvastatinu. Nasuprot tome, membranski prijenosnici OATP1B1 kodiran genom *SLCO1B1* i BCRP kodiran genom *ABCG2* značajno utječu na farmakokinetiku rosuvastatina. Pokazalo se da inhibitori ovih prijenosnika povećavaju izloženost rosuvastatinu. Na primjer, feboksostat povećava izloženost rosuvastatinu 1,9 puta, vjerojatno inhibicijom intestinalnog BCRP. Varijante gena *ABCG2* i *SLCO1B1* koji rezultiraju smanjenom funkcijom prijenosnika BCRP i OATP1B1 dodatno povećavaju koncentraciju rosuvastatina i rizik od nuspojava (77).

Smjernice Konzorcija za kliničku implementaciju farmakogenetike (engl. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortiuma - CPIC) preporučuju korištenje nižih doza rosuvastatina za pacijente koji imaju genetski smanjenu ili odsutnu funkciju BCRP ili OATP1B1 (78).

1.6. Rosuvastatin

1.6.1. Farmakokinetika

Oralna bioraspoloživost rosuvastatina iznosi 20%, što je usporedivo s atorvastatinom, pravastatinom i fluvastatinom, a veća je od simvastatina i lovastatina. Nakon jedne oralne doze, vršna koncentracija u plazmi postiže se nakon 5 sati. To je duže od ostalih statina koji postižu maksimalne koncentracije u plazmi za manje od 3 sata. U prikupljenim podacima iz farmakokinetičkih ispitivanja, vršna koncentracija u plazmi i površina pod krivuljom vremena i koncentracije pokazuju uglavnom linearni odnos kako se doza rosuvastatina povećava s 5 na 80 mg. Unos hrane smanjuje brzinu apsorpcije rosuvastatina za 20%, ali ne i opseg apsorpcije. To ne smanjuje učinkovitost snižavanja kolesterola. Stoga se rosuvastatin može uzimati s hranom ili bez nje te ujutro ili navečer (79-81).

Otpriblike 90% rosuvastatina se veže za proteine plazme. Rosuvastatin ima srednji volumen raspodjele u stanju ravnoteže od 134 litre. Vežanje na proteine je reverzibilno i neovisno o koncentraciji rosuvastatina u plazmi.

Metilsulfonamidni dio molekule daju rosuvastatinu relativnu hidrofilnost. Statini s većom hidrofilnošću imaju manju brzinu pasivne difuzije i za ulazak trebaju aktivni transport. Stoga selektivno ulaze u stanice kao što su hepatociti koji na svojoj površini imaju aktivne prijenosnike s velikim afinitetom za organske anione, poput statina. Također je pokazano da je rosuvastatin supstrat za ljudski jetreni specifični transportni protein organskog aniona OATP-C. Ulazak statina u ekstrahepatična tkiva događa se pasivnom difuzijom i ovisi o njihovoj lipofilnosti. To utječe na sigurnost mišića i najteži oblik miotoksičnosti - rabdomioliza najčešća je u pacijenata na lipofilnim agensima poput cerivastatina i lovastatina (56).

Ispitivanja na humanim hepatocitima ukazuju da je rosuvastatin slab supstrat za metabolizam putem citokroma P450 (CYP) i stoga se 90% lijeka izlučuje nepromijenjeno. CYP2C9 i CYP2C19 su glavni izoenzimi uključeni u metabolizam rosuvastatina s minimalnim učinkom (58). Rosuvastatin se metabolizira u N-desmetilni metabolit koji je manje moćan od matičnog lijeka u inhibiranju aktivnosti HMG-CoA reduktaze. Matični lijek rosuvastatin odgovoran je za približno 90% aktivnosti inhibitora HMG-CoA u plazmi. Manje je vjerojatno da će rosuvastatin uzrokovati metaboličke interakcije s lijekovima jer ima ograničeni metabolizam putem izoenzima CYP. Ostali statini, poput atorvastatina i simvastatina, metaboliziraju se putem CYP3A4. Njihovu koncentraciju u plazmi povećavaju inhibitori CYP3A4 kao što su ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, inhibitori proteaze i makrolidni antibiotici (82-84).

Poluvrijeme eliminacije rosuvastatina iznosi 19 sati, što je duže od atorvastatina (15 sati) i simvastatina (2-3 sata). Primarno se eliminira u fecesu (90%) u usporedbi s 10% izlučivanja putem bubrega. Samo 10% primijenjene doze rosuvastatina metaboliziraju enzimi CYP (uglavnom CYP2C9, manje CYP2C19) u N-desmetilrosuvastatin. Ovaj metabolit ima 17% do 50% aktivnosti izvornog rosuvastatina. I rosuvastatin i njegov metabolit 90% se eliminiraju fekalnim putem. U studiji utjecaja dobi i spola na farmakokinetički profil rosuvastatina nije bilo značajne razlike među skupinama različite dobi i spola. U drugom ispitivanju, rosuvastatin u dozi od 10 mg kroz 14 dana primijenjen je u bolesnika s blagim i umjerenim oštećenjem jetre, a kontrolna skupina su bili zdravi ispitanici. Maksimalne koncentracije rosuvastatina u plazmi povećane su za 60%, odnosno 100%, a PPK i C_{max} povećana je za 5%, odnosno 21% u bolesnika s poremećenom funkcijom jetre (85). Blaga do umjereni bubrežna disfunkcija nema utjecaja na farmakokinetiku rosuvastatina. Međutim, koncentracije rosuvastatina u plazmi povećane su trostruko u bolesnika s teškim oštećenjem bubrega (klirens kreatinina <30 ml / min / $1,73$ m²) u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Također

je pokazano da kada uzimaju istu dozu rosuvastina japanski i kineski ispitanici imaju dvostruko povišenje srednje vrijednosti izloženosti (površina pod krivuljom) u usporedbi s bijelačkim ispitanicima (24,25).

1.6.2. Farmakodinamika

Rosuvastatin kompetitivnim mehanizmom selektivno i reverzibilno inhibira enzim reduktazu HMG-CoA. Ovaj enzim pretvara HMG-CoA u mevalonsku kiselinu u biosintetskom putu kolesterola čime ograničava brzinu sinteze kolesterola. To dovodi do smanjenja koncentracije hepatocelularnog kolesterola na što hepatociti reagiraju povećanom sintezom receptora LDL kolesterola kako bi poboljšali povrat LDL kolesterola iz cirkulacije u jetru. Krajnji učinak je smanjenje koncentracije ukupnog kolesterola i LDL kolesterola. Statini također smanjuju proizvodnju apolipoproteina B (ApoB) što dovodi do smanjenog izlaska kolesterola vrlo male gustoće (VLDL-C) i triglicerida iz jetre u krv. U bolesnika s homozigotnom obiteljskom hiperkolesterolemijom rosuvastatin smanjuje LDL kolesterol unatoč nedostatku funkcionalnih LDL receptora (86).

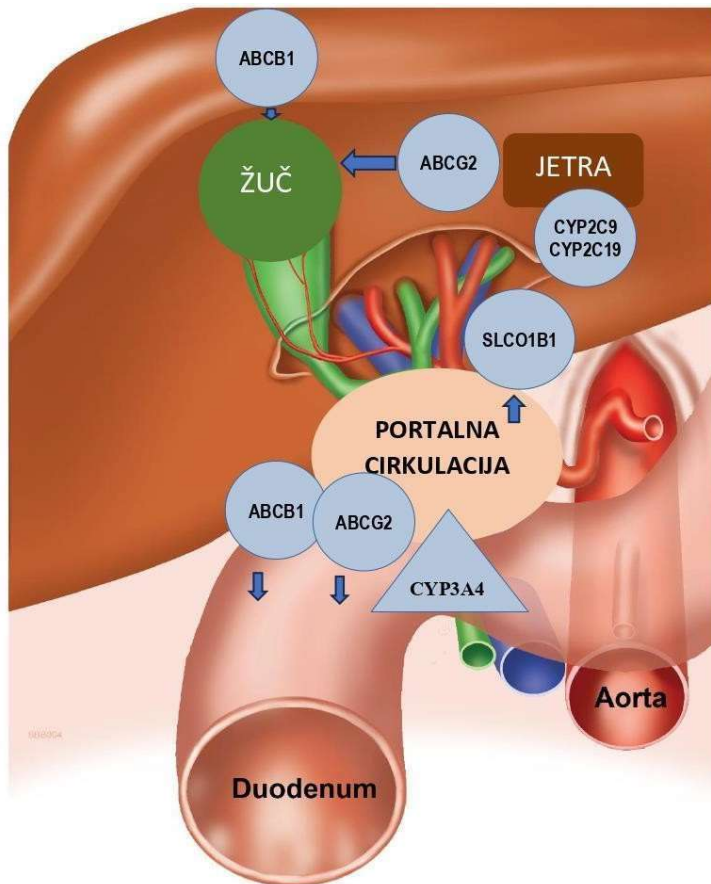
Rosuvastatin je pokazao usporedivo smanjenje koncentracija triglicerida u odnosu na druge statine, a najveća korist zabilježena je u bolesnika s visokom početnom razinom triglicerida. Studije su pokazale da rosuvastatin povećava HDL kolesterol za 8- 12%, bez jasne povezanosti između doze i odgovora, iako je porast najveći u bolesnika s niskim početnim razinama HDL kolesterola. To može biti posljedica smanjene koncentracije transportnog proteina za prijenos estera kolesterola (87).

Afinitet rosuvastatina za aktivno mjesto enzima četiri je puta veći od afiniteta HMG-CoA za enzim. Rosuvastatin ima najveći afinitet za enzim reduktazu HMG-CoA među statinima koji se koriste u

Europi. Ovaj visoki afinitet zajedno s tijesnom ionskom interakcijom rezultira sporim oporavkom enzimске aktivnosti nakon uklanjanja rosuvastatina (88, 89).

Budući da je hidrofilni statin, rosuvastatin se oslanja na polipeptid koji transportira organske anione (OATP-1B1), koji je snažno izražen na bazolateralnoj membrani hepatocita i služi kao ključni mehanizam za aktivni transport u hepatocite. Njegov afinitet za OATP1B1 usporediv je s atorvastatinom, ali je značajno veći od pravastatina ili simvastatina. Rosuvastatin se stoga primarno distribuira u hepatocite, dok su periferne koncentracije niske (90).

Kao što je primijećeno kod ostalih statina, rosuvastatin ima pleiotropne učinke neovisno o inhibiciji HMG-CoA reduktaze. To uključuje poboljšanje funkcije endotela, protuupalni, antitrombotički i antioksidativni učinak. Rosuvastatin i drugi statini poboljšavaju funkciju endotela povećavajući stvaranje endotelnog dušikovog oksida i smanjujući nastanak slobodnih radikala izvedenih iz kisika. To zauzvrat smanjuje endotelnu disfunkciju koja je bila uključena u aterosklerozu. Rosuvastatin smanjuje C reaktivni protein (CRP) koji je biljeg upale i neovisni prediktor kardiovaskularnog rizika. Rosuvastatin inhibira agregaciju trombocita i leukocite koji inhibiraju stvaranje ugrušaka u ozlijeđenom mišiću (37, 38).



Slika 2. Metabolizam statina. Metabolički enzimi i membranski prijenosnici

Slika 2. prikazuje metaboličke enzime i membranske prijenosnike koji sudjeluju u metabolizmu i izlučivanju rosuvastatina. Statini podliježu pasivnoj intestinalnoj apsorpciji i krvnom strujom ulaze u jetru pomoću membranskih prijenosnika SLC01B1. Statini se metaboliziraju pomoću enzima faze 1 i faze 2 i eliminiraju pomoću izbacivačkih/efluksnih transportera u žuč. Više različitih enzima je uključeno u fazu 1 metabolizma statina, dominantan je CYP3A4. Izlučivanje statina omogućuju članovi obitelji efluksnih prijenosnika (ABCB1, ABCG2 i dr.). Metabolizam statina i njihovo izlučivanje prvenstveno se odvija u jetri, a manjim dijelom u bubrezima.

1.7. Polimorfizam metaboličkih enzima

1.7.1. Citokrom P450 (CYP)

Superobitelj gena citokroma *P450 (CYP)* kodira skupinu enzima koji kataliziraju oksidacijski metabolizam brojnih lijekova, kancerogena i toksina te sudjeluju u biotransformaciji endogenih supstrata poput masnih kiselina, steroida, prostaglandina i drugih ksenobiotika.

Većina statina se ekstenzivno metabolizira putem enzima CYP zbog čega često stupaju u interakcije lijek-lijek. Simvastatin, lovastatin i atorvastatin se uglavnom metaboliziraju putem CYP3A4 (91-93).

Pravastatin gotovo uopće ne podliježe metabolizmu putem enzima CYP te nema interakcija s drugim lijekovima na razini ovih enzima. Značajniju ulogu u metabolizmu lijekova ima i polimorfizam *CYP3A5*. Rosuvastatin se u manjoj mjeri metabolizira u jetri putem metaboličkih enzima CYP2C9 i CYP2C19 te su interakcije s drugim lijekovima na razini metaboličkih enzima rjeđe nego kod drugih statina (94). Polimorfizam gena prema intenzitetu metabolizma određuje ovisno o enzimu CYP i do 5 kategorija fenotipova (normalni, brzi, vrlo brzi, intermedijarni i spori metabolizator). Normalan je fenotip dobro izraženog metabolizma (engl. *Extensive Metabolizer*, EM) koji se nalazi u većini populacije. Fenotip slabog metabolizma (engl. *Poor Metabolizer*, PM) je autosomno recesivno svojstvo koje se očituje smanjenom ili odsutnom aktivnošću enzima s posljedičnim nagomilavanjem specifičnih lijekova-supstrata u organizmu. Amplifikacija gena također se nasljeđuje autosomno recesivno i dovodi do ubrzane razgradnje lijekova-supstrata te predstavlja fenotip izrazito pojačanog metabolizma (engl. *Rapid Metabolizer - RM* i *Ultraextensive Metabolizer- UEM*). Kategoriji srednje brzog metabolizma (engl. *Intermediate Metabolizer - IM*)

pripadaju heterozigoti ili homozigotni nositelji alela smanjene aktivnosti. Nuspojave lijekova najčešće se javljaju u sporih metabolizatora.

1.7.2. Citokrom P450 2C9 (CYP2C9)

Gen *CYP2C9* nalazi se na kromosomu 10q24. Uz normalni, divlji tip "wt" ili *1, identificirano je 50 različitih varijantnih alela *CYP2C9*. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su u 90% sporih metabolizatora prisutni aleli *CYP2C9*2* (*R144C, c.3608C>T*) i *CYP2C9*3* (*I359L, c.42614A>C*). U bjelačkoj populaciji učestalost alela *2 je oko 12%, a alela *3 oko 8% (95). Prema radu Božine i sur. u hrvatskoj populaciji njihova učestalost je 3.5% (96).

Genski polimorfizmi enzima *CYP2C9* su vrlo značajni za farmakoterapiju nekih važnih lijekova koji su supstrati ovih enzima poput antidijabetika, inhibitora protonske pumpe, antikoagulanata, antidepresiva, triazolnih antifungika i antikonvulziva. Enzim *CYP2C9* je posebno važan za metabolizam fenitoina u kojem sudjeluje 90 % pri čemu nositelji haplotipova *CYP2C9*2* i *CYP2C9*3* zbog usporenog metabolizma imaju visok rizik od razvoja nuspojava (97).

1.7.3. Citokrom P450 2C19 (CYP2C19)

Enzim *CYP2C19* sudjeluje u metabolizmu antidepresiva, benzodiazepina, inhibitora protonske pumpe i antiagregacijskih lijekova (klopidogrel). Među 20 dosad poznatih različitih alela najvažniji su aleli *2 (*c.681G>A*) i alel *3 (*c636G>A*) zbog povezanosti sa smanjenom enzimskom aktivnošću i visokim rizikom razvoja nuspojava. Suprotno, nositelji alela *17 (*c.-806C>T*) imaju pojačanu aktivnost enzima. U bijelaca je najveća učestalost alela *17 (21%), a najmanja alela *3 (<1%). Učestalost alela *2 je 12%.

Osoba koja nosi dva nefunkcionalna alela *CYP2C19* (*2/*3) označena kao CYP2C19 slabi metabolizator ima usporen farmakodinamski odgovor na klopidogrel s posljedično povećanim rizikom od kardiovaskularnog incidenta. Na temelju sveobuhvatnog razumijevanja uloge varijanti gena *CYP2C19* na odgovor na klopidogrel, genetski probir može pomoći u odlučivanju o odgovarajućoj dozi za pacijente. CPIC je izdao smjernice za primjenu nalaza genotipizacije *CYP2C19* u optimizaciji terapije klopidogrelom (98). Međutim, ne postoje studije koje bi procijenile utjecaj fenotipova enzima CYP2C19 na učinkovitost statinskih lijekova.

1.8. Polimorfizam membranskih prijenosnika

Membranski proteini prijenosnici (transporteri) reguliraju unos hranjivih tvari i iona u stanicu te odstranjivanje staničnog detritusa, toksina i drugih štetnih tvari iz stanice. Kontrolnim mehanizmom ulaska i izlaska različitih spojeva kroz staničnu membranu igraju važnu ulogu u apsorpciji, raspodjeli i izlučivanju lijekova kao i toksičnih i kancerogenih tvari iz okoliša. Važni su modulatori nepoželjnih učinaka navedenih spojeva na organizam.

Prijenosnici se nalaze na stanicama epitela mnogih tkiva, poput crijevne, bubrežne i jetrene membrane. Mogu imati sinergijsko djelovanje s enzimima za metabolizam lijekova i značajno utjecati na koncentracije lijekova i njihovih metabolita u plazmi i tkivima. Prijenosnici se razlikuju prema smjeru transporta na one koji unose (engl. *influx*) i one koji iznose (engl. *efflux*) supstrate iz stanice. Prema načinu prijenosa ovisno o utrošku energije mogu prenositi supstrate aktivnim putem (uz utrošak energije) ili olakšanim putem (bez utroška energije).

Važnu ulogu u prijenosu lijekova imaju dvije glavne superobitelji membranskih transportera ABC (engl. ATP Binding Cassette) i SLC (engl. Solute Carrier).

1.8.1. Membranski prijenosnici ABC

Superobitelj ABC ima 52 identificirana člana od kojih samo 5 proteina ima veću ulogu u transportu lijekova i drugih tvari kroz membranu. Poznato je 49 gena koji kodiraju proteine ABC grupirane u sedam podrazreda i porodica (ABCA do ABCG).

1.8.1.1. Pgp/ABCB1

Dosad je najbolje proučen prijenosnik P-glikoprotein (Pgp) kodiran genom *ABCB1* ili *MDR1* (engl. *Multidrug Resistance*) (99). Pgp je integralni membranski protein koji prenosi tvari iz stanice kroz membranu u vanstanični prostor štiteći tako stanicu od toksičnih tvari. Aktivnost Pgp utječe na farmakokinetičke parametre, međusobne interakcije i terapijsku učinkovitost mnogih lijekova koji su supstrati Pgp-a. Taj je mehanizam najprije uočen u zloćudnim stanicama gdje visoka ekspresija i aktivnost MDR1 čini tumorske stanice otpornima na mnoge protutumorske lijekove. Nasuprot tome, smanjena aktivnost Pgp-a može rezultirati povećanom toksičnošću lijekova. Pgp je također prisutan u zdravim stanicama crijeva, placente, bubrega, jetre, gušterače, testisa, krvno-moždane barijere, limfocita te makrofaga s ulogom moduliranja bioraspoloživosti lijeka. U crijevima Pgp kontrolira apsorpciju lijeka nakon ingestije (100). Do sada je identificirano 15 različitih polimorfizama (SNP) u genu *ABCB1*.

Najviše proučeni polimorfizmi ovog gena jesu *c.3435C>T* (ekson 26, rs1045642), *c.1236C>T* (ekson 12, rs1128503) i *c.2677G>T/A* (ekson 21, rs2032583). Ovi su polimorfizmi u jakoj neravnotežnoj vezi i stoga se često proučavaju kao haplotip *c.2677G>T/A* SNP je nesinonimni SNP i rezultira promjenom jedne aminokiseline u proteinu. Nasuprot tome, SNP *c.1236C>T* i *c.3435C>T* sinonimni su SNP-ovi koji nemaju učinka na slijed aminokiselina. Iako je *c.3435C>T* SNP tihi (engl. *silent*) polimorfizam, pokazano je da rezultira smanjenom razinom mRNK-a, smanjenjem stabilnosti mRNK-a i stvaranjem proteina s promijenjenom konformacijom i

funkcijom. Ovi se polimorfizmi povezuju s varijabilnom FK i FD brojnih lijekova – supstrata Pgp-a. Tako su uočene znatno niže koncentracije lijekova u nositelja genotipa *3435 CC* u odnosu na genotip *TT* (101).

Meta-analiza pacijenata s hiperkolesterolemijom koji su primali statine ispitala je učinkovitost i sigurnost snižavanja lipida povezane s *ABCB1 c.3435C>T*. Rezultati su pokazali da je usporedba *CC* + *CT* naspram *TT* bila povezana sa značajnim povišenjem serumskog HDL-C i razine ukupnog kolesterola nakon liječenja statinima, a varijante *ABCB1 c.3435CC* naspram *TT* u homozigota bile su u korelaciji sa smanjenjem LDL-a -C. Umjesto toga nije uočena značajna povezanost u razinama triglicerida u serumu. Polimorfizam *c.3435C>T* u *ABCB1* također može objasniti određenu heterogenost neželjenog odgovora na statine. Alel *c.3435T* bio je češći u bolesnika s mijalgijom izazvanom atorvastatinom (21,103). Nadalje, analiza *ABCB1 c.3435C>T* stratifikacije prema trajanju liječenja pronašla je povezanost s rizikom od miopatije u bolesnika liječenih statinima dulje od 5 mjeseci (102). Trenutačno, literatura izvješćuje o kontroverznim podacima o *c.3435C>T* SNP, čija se povezanost s učinkom statina na razine kolesterola i lipida još uvijek raspravlja. Značajni podaci dobiveni su kombinacijom analize triju *ABCB1* SNP-ova (*c.1236C>T*, *c.2677G>T/A* i *c.3435C>T*) u haplotipovima. Konkretno, Becker i kolege su pokazali da su haplotipovi *TTT* i *CGT* povezani sa smanjenjem razine ukupnog kolesterola i LDL-C, dok haplotip *CGC* divljeg tipa nije (64). U studiji, Fiegenbaum i sur. pokazali su smanjenje učestalosti *T-T/A-T* haplotipa (20 %) u bolesnika u kojih se mijalgija razvila tijekom liječenja simvastatinom u usporedbi s onima koji nisu iskusili nuspojave (41,4 %), što ukazuje na povezanost između varijanti gena *ABCB1* i povećane osjetljivosti na mijalgiju (106).

Haplotip *ABCB1 TTT* također je imao značajan utjecaj na varijabilnost među bolesnicima u farmakokinetici rosuvastatina, s višim vrijednostima C_{max} i PPK koncentracija-vrijeme od nositelja

koji nisu imali haplotip *TTT*. Osim toga, varijantni genotipovi koji nose alele *ABCB1 c.2677G>T/A* i *c.3435C>T* u pacijenata s hiperkolesterolemijom pokazali su značajno veće smanjenje LDL-C kao odgovor na terapiju atorvastatinom (21).

Postoji znatna razlika u učestalosti varijantnih alela *ABCB1* na način da je genotip visoke aktivnosti *3435CC* učestaliji u crnoj rasi (i do 83 %) i žutoj rasi (oko 35 %) u odnosu na bijelu rasu (oko 25 %). Ovu činjenicu svakako treba imati na umu kada se procjenjuju učinci na farmakokinetiku lijekova koji su supstrati Pgp-a (poput inhibitora HIV-1 proteaza ili ciklosporina).

1.8.1.2. ABCG2/BCRP

Transportni protein ABCG2, poznat i pod nazivom BCRP (engl. *Breast Cance Resistance Protein*), djeluje kao membranska izlazna crpka koja prenosi supstrate iz stanice u luminalni prostor i ovisan je o energiji ATP-a (107). Kodiran je genom *ABCG2*. Smješten je na apikalnim membranama epitelnih stanica crijeva, jetre, bubrežnih tubula i krvno-moždane barijere. ABCG2 može smanjiti intestinalnu apsorpciju i prijenos u tkiva te povećati izlučivanje svojih supstrata u jetrima i bubrezima.

Polimorfizam *c.421C>A* (*p.Gln141Lys*; rs2231142) smanjuje prijenos putem ABCG2. Učestalost polimorfizma *c.421C>A* u bijeloj populaciji je 10 - 15 % (16, 107).

U ispitanika s genotipom *ABCG2 c.421AA* PPK simvastatina bila je dvostruko veća, a fluvastatina i atorvastatina za ¾ veća u odnosu na koncentracije zabilježene u nositelja genotipa *c.421C>A* (16, 108). Porast koncentracije rezultat je povećane bioraspodjelivosti lijeka zbog reducirane funkcije izbacivačkog prijenosnika ABCG2 povezane s genotipom *421AA*. Do sada nisu bile dostupne studije o utjecaju genotipova *ABCG2* na razvoj nuspojava koje se mogu očekivati jer je ovaj

transporter osim u prvotno otkrivenom tumorskom tkivu dojke izražen i u probavnom sustavu, jetri, bubrezima, mozgu, srcu i posteljici. Nalazi se u brojnim membranama kao što su one u stanicama debeloga i tankog crijeva, krvno-moždanoj barijeri, posteljici i kanalikularnoj membrani hepatocita. Smanjena transportna aktivnost ABCG2 bilo zbog genetičke varijabilnosti ili inhibicije (interakcija lijekova) može prouzročiti znatnu varijabilnost farmakokinetičkih parametara. Visok izražaj ABCG2 povezan je s otpornošću na više protutumorskih lijekova u hematološkim malignim bolestima te solidnim tumorima, što upozorava na njegovu ulogu u farmakorezistenciji. Studije pokazuju da polimorfizam *c.421C>A* (rs2231142) mijenja funkciju prijenosnika smanjujući stupanj izražaja proteina preko razgradnje potpomognute ubikvitinom ili snižene ATP-azne aktivnosti.

Mirošević Skvrce i sur. pokazali su da pacijenti s varijantnim alelom *ABCG2 421A* i liječeni fluvastatinom imaju 2,75 puta veće izgleda za razvoj nuspojava od onih koji nose alel *421C* (22). Čini se da ovaj polimorfizam igra važnu ulogu u farmakokinetici rosuvastatina (107). Doista, učinak je najjači za rosuvastatin kod ispitanika s genotipom *c.421AA* koji imaju 2,2 puta veću sistemsku izloženost statinima u usporedbi s pojedincima koji nose genotip *c.421CC* (109).

Genetički određena zamjena aminokiseline Q141K (*ABCG2, c.421C>A, rs2231142*) povećava vjerojatnost razgradnje proteina putem proteasomalne razgradnje potpomognute ubikvitinom (110). Unatoč očuvanim razinama mRNK-a, ekspresija proteina u nositelja polimorfizma *421A* iznosila je 30 – 40 % ekspresije u nositelja divljeg tipa *ABCG2*. Intestinalni transport u osoba homozigotnih za varijantni alel A iznosio je 23 % u odnosu na nositelje genotipa *c.421CC* (111). Također se inaktivirajuće varijante gena *ABCG2* povezuju s produljenom bioraspoloživosti lijekova – supstrata i nastankom nuspojava. Tako se opisuju nuspojave na fluvastatin (22), atorvastatin (23), rosuvastatin, sulfasalazin, gefitinib i sunitinib povezane s navedenom varijantom gena.

U istraživanju Mirošević Skvrce i suradnika bolesnici s genotipovima *ABCG2 c.421CA* ili *AA* imali su 2,9 puta veće izgleda za razvoj nuspojava ovisnih o dozi atorvastatina od pacijenata s *c.421CC* (23). Mehanizam kojim alel *ABCG2 c.421A* utječe na koncentracije statina u plazmi najvjerojatnije je povezan s pojačanom intestinalnom apsorpcijom i smanjenim izlučivanjem lijeka u jetri, čime pridonosi povećanju bioraspoloživosti statina nakon oralne primjene (90).

U pacijenata s hiperkolesterolemijom liječenih rosuvastatinom od 10 mg/dan, varijanta *c.421A* je izazvala značajno smanjenje razine LDL-C u usporedbi s pojedincima koji su nosili *c.421CC* (112). Druga randomizirana kontrolirana studija u bolesnika s akutnim koronarnim sindromom (AKS) otkrila je da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* ima značajan učinak na učinkovitost i podnošljivost rosuvastatina u dozi od 10 mg. Konkretno, nakon 3-mjesečnog liječenja, pacijenti koji su nosili najmanje jedan alel *c.421A* postigli su srednje razine LDL-C značajno niže nego pojedinci s *c.421CC*. Taj odnos nije uočen u bolesnika koji su primali simvastatin u dozi od 40 mg (113).

U većoj farmakogenetičkoj analizi 125 polimorfizama u 61 genu kandidatu analizirano je radi povezanosti s hipolipemičnim odgovorom na rosuvastatin (114). Zanimljivo je da je na farmakokinetiku rosuvastatina utjecala prisutnost polimorfizma *ABCG2 c.34G>A* (rs2231137), nesinonimnog SNP-a koji se nalazi u eksonu 2 i dovodi do promjene aminokiseline iz valina u metionin na kodonu 12. Nadalje, osobe koje su bile homozigoti ili složeni heterozigoti za *ABCG2 c.34G>A* i *c.421C>A* imale su značajan utjecaj na dispoziciju rosuvastatina s izrazitom promjenom farmakokinetike lijeka. Međutim, polimorfizam *c.34G>A* nije imao učinka na sniženje LDL-C uz primjenu rosuvastatina unutar skupine s genotipom *c.421C>A*, što ukazuje da je povezanost između polimorfizma *c.34G>A* i smanjenja LDL-C uz primjenu rosuvastatina bila posljedica njegove neravnotežne povezanosti s polimorfizmom *c.421C>A* (115).

Klinički dokazi o inhibiciji ABCG2 kao važnom mehanizmu interakcije lijekova s potencijalnim posljedicama za njihovu djelotvornost i sigurnost rezultirali su prepoznavanjem ovog transportera kao bitnoga farmakokinetičkog čimbenika i od međunarodnog konzorcija za transportere, ITC (engl. *The International Transporter Consortium*), što svakako treba uzeti u obzir u razvoju novih lijekova. Osim Konzorcija, EMA i FDA izdale su preporuke za sve lijekove u istraživanju prema kojima je obvezna provedba ispitivanja novih lijekova jesu li supstrati ili inhibitori transportera ABCG2 te utvrđivanje njihova potencijala za stupanje u interakcije na razini ABCG2 (116). Ove bi smjernice posebno mogle biti važne u slučajevima kada kandidatni lijek ima znatnu topljivost, ali oslabljenu propusnost zbog aktivnosti izbacivanja s pomoću transportera ABCG2. 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 ograničen je zbog mogućeg preklapanja s drugim metaboličkim putovima. I dalje postoji izazov i potreba za preciznijim definiranjem doprinosa pojedinih transportnih sustava u interakcijama lijekova.

Varijantni alel *ABCG2 c.421c>A (Gln141Lys; rs2231142)* je jedan od najčešćih polimorfizama u *ABCG2* genu koji smanjuje efluksnu aktivnost membranskog prijenosnika ABCG2. S obzirom da je rosuvastatin supstrat ABCG2, polimorfizam *ABCG2 c.421c>A* može utjecati na njegovu farmakokinetiku i terapijsku učinkovitost. Većina studija koje su ispitivale povezanost farmakokinetike rosuvastatina s polimorfizmom *ABCG2 c.421c>A* uključivala je mali broj bolesnika što je rezultiralo različitim ishodima i zaključcima što ih je činilo neprikladnim za kliničku primjenu. Song i sur. su u metaanalizi 8 studija koje su uključivale 425 zdravih ispitanika pokazali da nositelji alela *A* iz polimorfizma *ABCG2 c.421c>A* imaju 1.5 puta veću površinu pod krivuljom (PPK) i maksimalnu koncentraciju (C_{max}) ($p < 0.0001$) rosuvastatina u odnosu na nositelje

CC genotipa (117). Opažena je blaga razlika između bijelaca i Azijata koja nije statistički značajna ($p=0.61$ za AUC i 0.54 za C_{max}). U studiji Zhanga i sur. na 14 zdravih kineskih dobrovoljaca kojima su mjerene koncentracije rosuvastatina tijekom 72 sata nakon jedne doze od 20 mg rosuvastatina nositelji alela *A* imali su veće vrijednosti klirensa u odnosu na nositelje CC genotipa (674 l/h naprema 384.7 l/h) (118). Slične su rezultate objavili Liu i sur. (25) i Wan i sur. (115). Međutim, u radu Keskitala i sur. bubrežni klirens nije bio statistički značajan među *ABCG2* genotipovima iako je količina izlučenog rosuvastatina u 24-h urinu bila veća u nositelja *AA* genotipa nego u nositelja alela *C* (16). Zamjerka ovim studijama može biti što su ispitanici zdravi dobrovoljci. No slični rezultati proizlaze i iz istraživanja koja se bave bolesnicima s hiperkolesterolemijom. De Gorter i sur. su u skupini od 165 bolesnika na rosuvastatinu pokazali da nositelji alela *421 A* imaju više plazmatske koncentracije rosuvastatina od nositelja drugih genotipova ($p<0.05$) (28).

Nekoliko studija se bavilo ne samo farmakokinetičkim parametrima nego i farmakološkom učinkovitošću rosuvastatina. Tako su Lee i sur. pokazali da se postotak promjena u koncentraciji LDL-C značajno razlikuje među *421C>A* genotipovima (*CC* u odnosu na *CA* i *AA* = -48.5 ; -55.1 ; -54.9 ; $p<10^5$) (27). Slično su objavili Tomlinson i sur. utvrdivši da se u nositelja *421A* alela uz iste doze rosuvastatina značajnije smanjila koncentracija kolesterola (112).

Dokazano je da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* smanjuje ekspresiju proteina u plazmatskoj membrani ili ATP-aznu aktivnosti prijenosnika *ABCG2*. To povećava apsorpciju rosuvastatina u crijevima i smanjuje njegovu eliminaciju iz jetre u bilijarni trakt. Tako je akumulacija lijeka u sistemske cirkulaciji potpomognuta s dva mehanizma.

Farmakogenetska ispitivanja među različitim etničkim skupinama pokazala su da neovisno o rasi u nositelja alela *421A* izloženost rosuvastatinu raste za 50 %. Kako je učestalost tog alela veća u Azijata nego u bijelaca (0.29% naprema 0.15%) očekuje se u njih veća izloženost rosuvastatinu, a

time i veća učestalost nuspojava. Zbog toga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) preporučila smanjenje doze rosuvastatina za Azijate.

Nedavno je CPIC proveo sustavno istraživanje i objavio smjernice za mišićne nuspojave povezane sa statinima uključujući *ABCG2 c.421C>A*. Preporučena je početna doza rosuvastatina ≤ 20 mg za nositelje varijantnog alela *421A* zbog veće izloženosti rosuvastatinu (78).

1.8.2. Membranski prijenosnici SLC

Superobitelj prijenosnika SLC (engl. solute carrier) sadržava više od 300 transportera smještenih na brojnim membranama koji, za razliku od superobitelji ABC, većinom omogućuju ulazak malih molekula u stanice. Najpoznatiji prijenosnici lijekova iz ove superobitelji jesu organski anionski transportni polipeptidi, OATP, od kojih su klinički važni OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3 i OATP2B1.

1.8.2.1. Organski anionski transporter (OATP1B1)

OATP1B1 (kodiran genom *SLCO1B1*) je prijenosnik koji se sastoji od 691 aminokiseline i nalazi se većinom u bazolateralnoj membrani hepatocita. Ima ulogu unosa u jetru uglavnom slabo kiselih lijekova i endogenih spojeva, npr. statina, metotreksata i bilirubina. U ovom je transporteru identificirano više od 40 nesinonimnih varijanti (nsSNP), od kojih neke rezultiraju smanjenom transportnom funkcijom. Pokazalo se da polimorfizam smanjene funkcije, *SLCO1B1* rs4149056 (*c.521T>C*, p.V174A, ekson 5), umanjuje transport supstrata OATP1B1 *in vitro*, kao i da mijenja farmakokinetičke i kliničke ishode *in vivo*. Učestalost alela *5 je $\sim 15\%$. Smanjenje transportne aktivnosti zbog genetičke varijabilnosti ili interakcija može dovesti do povećane bioraspoloživosti

lijekova – supstrata te posljedično do razvoja nuspojava, npr. ozbiljne miopatije ili rabdomiolize nakon primjene statina (119).

Inhibitori HMG-koenzim-A-(CoA)-reduktaze (statini) općenito imaju dobar sigurnosni profil i dobro se podnose, ali razvoj nuspojava u vidu štetnih učinaka na skeletnim mišićima može ograničiti njihovu primjenu (3-5, 9). Poznati čimbenici rizika uključuju visoku dozu statina, lijekove koji ulaze u interakcije sa statinima, stariju dob i metaboličke komorbiditete (3-12). Cjelogenomske studije otkrile su čestu varijantu, *SLCO1B1 c.521T>C* (rs4149056) kao bitnog čimbenika razvoja miopatije i rabdomiolize pri primjeni statina, prvenstveno simvastatina (17, 18). *SLCO1B1* povećava sistemsku izloženost simvastatinu (221-postotno povećanje površine ispod krivulje u plazmi za pacijente homozigote za varijantu rs4149056, npr. *SLCO1B1* *5/*5. Za pojedince sa smanjenom funkcijom OATP1B1 (prisutnost barem jednoga nefunkcionalnog alela) koji primaju simvastatin, CPIC preporučuje nižu dozu simvastatina ili primjenu drugog statina (78).

I uz primjenu drugih statina postoji rizik, premda nešto niži, za razvoj miopatije u nositelja varijantnih alela *SLCO1B1*.

Studija koju su proveli Danik i suradnici na 4404 Europljana s rizikom od KV događaja pokazala je da nema povezanosti između nositelja *SLCO1B1 c.521C>T* i miopatije u bolesnika na rosuvastatinu (29). Liu i suradnici proveli su studiju u Kini s pacijentima liječenim atorvastatinom, rosuvastatinom, simvastatinom, fluvastatinom i pravastatinom i prijavili značajnu povezanost između alela *SLCO1B1 521C* i rosuvastatina (25). Zabilježeno je da su koncentracije rosuvastatina u plazmi kod Azijata veće u usporedbi s bijelcima (26). Stoga se nalazi Liua i sur. ne mogu generalizirati na druge etničke skupine.

U studiji Sivkova i sur. koja je u 180 bolesnika ispitivala učinak genskog polimorfizma prijenosnika *SLCO1B1* i *MDR1* na učinkovitost liječenja rosuvastatinom, atorvastatinom i simvastatinom pokazano je da genotip *521 CC* negativno utječe na hipolipemijsku djelotvornost i povećava rizik od razvoja miopatije (120).

Meta-analiza objavljena 2018. godine o povezanosti polimorfizma *SLCO1B1 T521C* i rizika od miopatije izazvane statinima, koja je uspoređivala i analizirala prethodno raspravljene studije, zaključila je da je polimorfizam *SLCO1B1 T521C* povezan sa značajno povećanim rizikom od miopatije, posebno za simvastatin i rosuvastatin. Ova meta-analiza preporučila je provođenje daljnjih studija kako bi se procijenila povezanost polimorfizma *SLCO1B1 T521C* s miopatijom izazvanom različitim statinima (121).

Zanimljivo je da je GWAS meta-analiza pokazala da je polimorfizam *SLCO1B1 c.1498–1256T>A* (rs2900478) bio u neravnoteži povezivanja s *c.521T>C* SNP. Ostale varijante povezane s promijenjenim učincima rosuvastatina uključivale su *SLCO1B1 c.1498–1331T>C* i *c.971-901A>G* SNP (122).

Brojne studije opisale su povezanost između varijante gena *SLCO1B1 rs4149056* i mišićnih nuspojava, međutim povezanost nije dosljedna i još uvijek postoji potreba za daljnjim istraživanjem kako bi se procijenila ta povezanost i potvrdili dokazi. Područje farmakogenetike u kliničkoj praksi napreduje sporim tempom zbog ograničenih kliničkih studija koje podupiru dokazi za njezinu primjenu. Kako bi se promovirala uporaba farmakogenetike u personalizaciji liječenja statinima i povećala sigurnost pacijenata, potrebne su daljnje studije i suradnja multidisciplinarnog tima za pravilnu interpretaciju farmakogenetičkih nalaza.

1.8.2.2. Smjernice Konzorcija za provedbu kliničke farmakogenetike (CPIC) za *SLCO1B1* i miopatiju izazvanu statinima

Smjernice Konzorcija za provedbu kliničke farmakogenetike (CPIC - *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) za *SLCO1B1* i mišićne nuspojave izazvane statinima prvi put su objavljene 2012. s ciljem usmjeravanja doziranja i rutinskog praćenja primjene simvastatina prema *SLCO1B1* rs4149056 (123). Smjernice su ažurirane 2014. uključujući informacije o drugim statinima i navođenje izvora potrebnih za kliničku primjenu farmakogenetike za terapiju statinima (124).

Smjernice su uspostavljene kada su dokazi o povezanosti mišićnih nuspojava sa *SLCO1B1* rs4149056 smatrani visokokvalitetnim nakon randomiziranih ispitivanja i kohortnih studija temeljenih na kliničkoj praksi.

Razvoj CPIC preporuka za doziranje simvastatina potaknut je promjenama na etiketi proizvoda od strane Uprave za hranu i lijekove (FDA). Ove preporuke za doziranje mogu se koristiti kao smjernice za informiranje zdravstvenih radnika o riziku od mišićnih nuspojava kod nositelja alela

C. Preporuča se da se nositeljima alela C propiše niža doza simvastatina (20 mg) ili da se razmotri alternativni statin, kao što je rosuvastatin, uz kliničko praćenje i praćenje vrijednosti CK. Ostala razmatranja pri propisivanju uključuju ciljanu razinu LDL-C, komorbiditete kao što su dijabetes melitus ili kronična bubrežna bolest i konkomitantna terapija (124).

CPIC smjernice pregledavaju i provjeravaju informacije iz kombinacije uvjerljivih pretkliničkih i kliničkih podataka. Aspekti koji se uzimaju u obzir uključuju *in vivo* kliničke rezultate i farmakokinetičke podatke za statine kod pojedinaca koji se razlikuju po genotipu *SLCO1B1*

rs4149056. *In vitro* farmakodinamika i farmakokinetički podaci za terapiju statinima također su uzeti u obzir (124).

Nedavno je CPIC proveo sustavno istraživanje i objavio smjernice za mišićne nuspojave povezane sa statinima uključujući genotip *ABCG2 c.421C>A*. Preporučena je početna doza rosuvastina ≤ 20 mg za nositelje varijantnog alela *421 A* zbog veće izloženosti rosuvastatinu (78).

1.8.2.3. Farmakogenetičke informacije za statine u službenom označavanju proizvoda

Sažetak opisa svojstava lijeka (SmPC) simvastatina, koji je odobrila EMA i koji je ažuriran u siječnju 2019. izvješćuje o povezanosti genotipa *SLCO1B1 c.521T>C* s miopatijom i rabdomiolizom. Odjeljak 4.4 'Posebna upozorenja i mjere opreza pri uporabi' navodi da alel smanjene funkcije *SLCO1B1* rs4149056 koji kodira transport proteina OATP1B1 u jetri, koji je odgovoran za unos simvastatina, dovodi do veće izloženosti mišića simvastatinu, što može povećati rizik od miopatije i rabdomiolize. Odjeljak 5.2 „Farmakokinetička svojstva” pod „Posebne populacije” navodi srednju izloženost simvastatinu od 120% u heterozigota *TC* i 221% u homozigota *CC* u usporedbi s nositeljima *TT*.

Sažetak opisa svojstava lijeka za rosuvastatin, koji je odobrila EMA i koji je ažuriran u travnju 2019. navodi u odjeljku 5.2 „Farmakokinetička svojstva” pod „Genetski polimorfizmi”, farmakokinetiku rosuvastatina i objašnjava genetske polimorfizme, uključujući *SLCO1B1* rs4149056. Sažetak opisa svojstava lijeka za rosuvastatin navodi da *SLCO1B1 c.521T>C* nije utvrđen u kliničkoj praksi 4, dok je u Sažetku opisa svojstava lijeka za simvastatin povezanost između *SLCO1B1 rs4149056* i miopatije potkrijepljena kliničkim podacima.

Američka FDA oznaka lijeka za simvastatin, ažurirana u travnju 2019. spominje protein OATP1B1 u odjeljku o farmakokinetici. Oznaka lijeka navodi da inhibicija ovog proteina rezultira povećanom

koncentracijom simvastatina u plazmi i posljedično povećanim rizikom od miopatije. Oznaka lijeka FDA za rosuvastatin uključuje odjeljak koji navodi da je povećana izloženost rosuvastatinu opažena kod pacijenata s genetskim polimorfizmom za protein OATP1B1. Podaci na etiketi lijeka navode da učinak alela smanjene funkcije SLCO1B1 na rosuvastatin nije jasno utvrđen.

Što se tiče sigurnosti pacijenata, EMA SmPC za atorvastatin, posljednji put ažuriran u kolovozu 2012., izvješćuje u odjeljku 5.2 „Farmakokinetička svojstva” pod „Posebne populacije” o polimorfizmu *SLCO1B1* koji uključuje prijenosnik OATP1B1. SmPC navodi rizik od rabdomiolize kod nositelja polimorfizma *c.521T>C*. Oznaka lijeka FDA za atorvastatin ne ukazuje na nikakve farmakogenetske podatke o polimorfizmu *SLCO1B1* rs4149056.

2. HIPOTEZA

U razvoju nuspojava rosuvastatina bitnu ulogu uz kliničke parametre ima i genetička predispozicija pojedinca u vidu polimorfizama transportnih proteina ABCG2, ABCB1 i SLCO1B1, metaboličkih enzima CYP2C9 i CYP2C19 te interakcije lijek-lijek-gen.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Opći cilj:

Ispitati ulogu polimorfnih gena membranskih prijenosnika *ABCB1*, *ABCG2* i *SLCO1B1* te metaboličkih enzima *CYP2C9* i *CYP2C19* kao mogućih prediktora štetnih učinaka rosuvastatina primjenom multivarijatne analize koja će uključiti i relevantne kliničke parametre.

Specifični ciljevi:

1. Ispitati učestalost varijantnih alela *CYP2C9**2*3, *CYP2C19**2*17, *ABCB1* 3435C>T, *ABCG2* 421C>A, *SLCO1B1* c.521T>C u skupini ispitanika s nuspojavama i u kontrolnoj skupini.
2. Ispitati ulogu kliničkih parametara (dob, spol, funkcija jetre i bubrega, komorbiditeti i konkomitantna terapija) na nastanak štetnih učinaka statina
3. Procijeniti značaj interakcije rosuvastatina s lijekovima u konkomitantnoj terapiji
4. Procijeniti domete interakcija statina s drugim lijekovima u odnosu na ispitivane polimorfizme (interakcije lijek-lijek-gen)

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Ispitanici

U studiju je u razdoblju od kolovoza 2018. do kolovoza 2020. bilo uključeno 95 bolesnika koji su prijavili neku nuspojavu na primjenu rosuvastatina i 125 pacijenata bez nuspojava na terapiju rosuvastatinom koji su poslužili kao kontrolna skupina. Ispitivanje je provedeno u Zavodu za farmakologiju Klinike za unutarnje bolesti i Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Kriteriji za uključivanje u studiju bili su: dob ≥ 18 godina; dislipidemija koja zahtijeva liječenje statinima i rosuvastatin kao prvi izbor statina. Isključni kriteriji su bili: prethodno liječenje fibratima, aktivna zloćudna bolest, transplantirani bolesnici i kronične autoimune bolesti. Prije uključivanja u studiju pacijenti su potpisali obrazac za informirani pristanak. Ispitivanje je trajalo 2 godine. Istraživanje je odobreno od Etičkog povjerenstva ustanove.

U svih bolesnika uzeta je anamneza i obavljen fizikalni pregled. Učinjene su hematološke i biokemijske pretrage te je izvršena genotipizacija transportnih proteina *ABCG2* c.421C>A (rs2231142), *ABCB1* c.3435C>T i *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056) te metaboličkih enzima *CYP2C9**2 (rs1799853), *3 (rs1057910) i *CYP2C19* *2 (rs4244285) i *17(rs12248560).

Dizajn studije je istraživanje parova (*case – control*) .

Rosuvastatin je propisivan sukladno odobrenim indikacijama i načinu primjene u dnevnoj dozi od 5 do 40 mg. U slučaju potrebe uključivani su drugi hipolipemici. Bolesnici su kontinuirano praćeni i zbrinjavani u Zavodu za farmakologiju KBC-a Zagreb prema principima dobre kliničke prakse.

Nuspojave su razmatrane u slučaju ako je procjena uzročnosti prema kriterijima Karch i Lasagna u vezi s uporabom rosuvastatina ocijenjena kao moguća, vjerojatna ili izvjesna-sigurna (125). Procjena povezanosti prema kriterijima Karch – Lasagna uzima u obzir sljedeće: vremenski odnos između lijeka i nastanka nuspojave, ako je nuspojava poznati učinak lijeka, prisutnost alternativnog objašnjenja, poboljšanje stanja nakon povlačenja i ponovnog uzimanja lijeka (rechallenge).

Kako bi se zadovoljili određeni kriteriji prema primijenjenim kriterijima uzročnost, nuspojava mora nestati nakon uklanjanja lijeka i ponoviti se nakon ponovnog uvođenja lijeka u terapiju. U slučaju ozbiljnih nuspojava, kao što je rabdomioliza i miopatija, bilo bi neetično ponovno uvesti lijek u terapiju.

Za procjenu hepatotoksičnosti rosuvastatina korišteni su kriteriji metode Roussel Uclaf (engl. *Roussel Uclaf Causality Assessment Method - RUCAM*) (126). RUCAM ljestvica koristi numeričko vrednovanje ključnih značajki u sedam različitih područja: kronologija (latencija i dechallenge), čimbenici rizika, istodobna uporaba drugih lijekova, traženje drugih etiologija, postojanje informacija o hepatotoksičnom potencijalu lijeka i odgovor na ponovno uvođenje lijeka - rechallenge. Numeričko vrednovanje koje se dodjeljuje svakoj značajki se zbraja, a ukupan rezultat odražava vjerojatnost uzročnosti (vrlo vjerojatna, vjerojatna, moguća, malo vjerojatna ili isključena). Nuspojave su smatrane ozbiljnima prema kriterijima iz međunarodnih smjernica - International Conferences on Harmonisation (ICH) E2A guidelines (127) i smjernicama društva - Council for International Organizations for Medical Sciences (CIOMS) V guidelines (128). Prikupljeni su i podaci o dobi, spolu, režimu upotrebe rosuvastatina i primjenjene doze, popratnim komorbiditetima i lijekovima, podaci o čimbenicima rizika za nuspojave rosuvastatina (disfunkcija jetre ili bubrega, perioperativna razdoblja, multisistemske bolesti, manji indeks tjelesne mase i neliječena hipotireoza).

U studiju su uključeni bolesnici koji su razvili nuspojavu rosuvastatina u vidu miotoksičnosti ili hepatotoksičnosti prema sljedećim definicijama:

- Mijalgija: bol u mišićima
- Blaga miopatija s razinama CK koje su povišene < 3 x iznad gornje granice normalnog raspona
- Teška miopatija uključujući i rabdomiolizu: s razinama CK > 3 x iznad gornjeg referentnog raspona; (rabdomioliza - teško oštećenje mišića i oslobađanje mioglobina u cirkulaciju uz smeđe obojeni urin i zatajenja bubrega).

Hepatotoksičnost: kao porast jetrenih enzima (AST i ALT) iznad gornje granice referentnog intervala. Nismo koristili kriterije hepatoksičnosti koje je predložio Aithel i sur. jer su nuspojave statina vezane uz poremećaj funkcije jetre obično blage, a namjera je ispitati biomarkere koji bi mogli pomoći u razlikovanju blagih čestih nuspojava uz primjenu rosuvastatina od rijetkih teških nuspojava (129). Bilježili smo i druge nuspojave poput povećanja glikoziliranog hemoglobina i koncentracije glukoze u krvi. Uz farmakogenetičku predispoziciju, procijenjeni su i drugi klinički i biokemijski čimbenici rizika za razvijanje nuspojava (spol, funkcija jetre i bubrega, perioperativno razdoblje, šećerna bolest, hipotireoza, infekcije i interakcije lijekova). Interakcije lijek-lijek detektirane su primjenom online verzije Stockley-ovog programa interakcije lijekova (130). Također je procijenjeno jesu li istodobno lijekovi bili supstrati / inhibitori analiziranih enzima i/ili transportnih proteina (131). Analizirani su inhibitori za koje prema literaturi postoje dokazi o njihovom potencijalu stupanja u interakcije.

4. 2. Metode genotipizacije

Krv za genotipizaciju uzimana je u slučaju pojave neke od neželjenih reakcija na rosuvastatin, a ispitanicima iz kontrolne skupine nakon najmanje 3 mjeseca uzimanja lijeka. Genotipizacija se provodila u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.2.1. Izdvajanje DNA

Izdvajanje DNA provodilo se iz 3-5 ml pune krvi s antikoagulantom Na-EDTA, upotrebom komercijalnoga reagensa iPrep^RPureLink^RgDNA Blood Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) na automatiziranom sustavu AutoMate ExpressTM DNA Extraction System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, SAD) prema uputama proizvođača.

4.2.2. Genotipizacija polimorfizama *ABCB1*, *ABCG2*, *SLCO1B1*, *CYP2C9* i *CYP2C19*

Genotipizacija polimorfizama *ABCB1* c.3435 C>T (rs1045642), *ABCG2* c.421 C>A (rs2231142), *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149065), *CYP2C9**2 (rs1799853), *3 (rs1057910) *CYP2C19**2 (rs4244285) i *17 (rs12248560) provedena je metodom PCR u stvarnom vremenu (qPCR) na aparatu *TaqMan*, 7500 RealTime PCR System (Applied Biosystems, SAD) za otkrivanje i analizu SNP-a koristeći reagense prema šiframa (*TaqMan*[®]*SNPAssay ID*) navedenim u tablici 1. Primijenjena je metoda opisana u literaturi (132-134).

Reagensi:

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

Tablica 1. Polimorfizmi analizirani *Taqman*[®] metodom PCR u stvarnom vremenu i pripadajuće oznake korištenih kitova (SNP Assay ID)

Gen/alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	<i>TaqMan</i> [®] SNP Assay ID
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1045642	3435 C>T	C_7586657_20
<i>ABCG2</i>	rs2231142	421C>A	C_15854163_70
<i>SLCO1B1</i>	rs4149065	521 T>C	C_30633906_10
<i>CYP2C9*2</i>	<u>rs1799853</u>	c.430C>T	C_25625805_10
<i>CYP2C9*3</i>	rs1057910	<u>c.1075A>C</u>	C_27104892_10
<i>CYP2C19*2</i>	<u>rs4244285</u>	681 G>A	C_25986767_70
<i>CYP2C19*17</i>	<u>rs12248560</u>	806 C>T	C_469857_10

Postupak

Priprema reakcijske smjese (tablica 2.) i uvjeti PCR reakcije (tablica 3.) na uređaju *ABI 7500 Real-time PCR System* isti su za genotipizaciju svih polimorfizama, a provedeni su prema uputama proizvođača (132-134).

Tablica 2. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju metodom PCR (*TaqMan*[®]) u stvarnom vremenu)

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

Tablica 3. 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



crvene točke – *wt* homozigoti; zelene točke – heterozigoti; plave točke – *mut* homozigoti

Slika 3. Analiza alelne diskriminacije metodom PCR u stvarnom vremenu (*TaqMan*[®])

4.3. Statističke metode

Podaci su prikazani tablično i grafički. Napravljena je analiza normalnosti raspodjele numeričkih podataka (Smirnov-Kolmogorovljev test) te su se shodno dobivenim rezultatima primijenili odgovarajući neparametrijski statistički testovi.

Kvantitativni podaci su prikazani kroz medijane i interkvartilne raspone. Kategorijski podaci su prikazani kroz apsolutne frekvencije i pripadajuće udjele, odnosno 95% intervale pouzdanosti. Razlike u kvantitativnim vrijednostima su analizirane Mann-Whitney U testom. Razlike u kategorijskim varijablama su analizirane χ^2 testom ili Fisherovim egzaktnim testom, odnosno Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom u slučaju kontigencijskih tablica koje su veće od formata 2x2 ako je u pojedinoj ćeliji bilo manje od 8 ispitanika. Načinjena je Hardy-Weinbergova analiza ravnoteže pojedinih gena koji su bili prikazani kao frekvencije dominantnog homozigota, heterozigota i recesivnog homozigota. Hardy Weinbergova ravnoteža označava očekivanu učestalost pojedinih genotipova u određenoj populaciji. Odstupanje od ravnoteže govori u prilog veće učestalosti varijantnih genotipova .

Napravljen je multivarijatni regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja je razvila nuspojave. Kao prediktorske varijable analizirane su varijable definirane u hipotezi i ciljevima (polimorfizmi gena *SLCO1B1*, *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* te razina interakcije lijek-lijek-gen), a koje su u prethodnim bivarijatnim analizama pokazivale razinu značajnosti $P < 0,200$ (135).

Sve P vrijednosti manje od 0,05 su smatrane značajnima. U analizi i grafičkim prikazima se koristila licencirana programska podrška IBM SPSS Statistics for Windows, verzija 29.0.1.

5. REZULTATI

U istraživanje je u razdoblju od kolovoza 2018. do kolovoza 2020. konsektivno uključeno 220 bolesnika koji su imali indikaciju za liječenje rosuvastatinom. Nuspojave su zabilježene u 95 bolesnika, dok 125 ispitanika nije imalo neželjene reakcije na rosuvastatin. Karakteristike ispitanika prikazane su u tablici 4. Raspodjela bolesnika po dobi i spolu bila je ujednačena. U skupini bolesnika s nuspojavama medijan (interkvartilni raspon) dobi je bio 62 (23-88) godine, a u skupini bez nuspojava također 62 (29-84) godine. Razlika u godinama između ispitivanih skupina nije bila statistički značajna (Mann-Whitney $U=1431,500$; $p=0,643$). Udio žena je bio veći u skupini bez nuspojava (75 žena i 50 muškarca), ali to nije bila statistički značajna razlika ($p=0.783$). Bolesnici su uzimali rosuvastatin u dozama od 5 do 40 mg dnevno. U ispitivanoj skupini osamnaest bolesnika je uzimalo 5 mg rosuvastatina (18.9%), četrdeset šest bolesnika je uzimalo 10 mg (48.4%), trideset bolesnika 15-20 mg (31.6%), a jedan bolesnik je uzimao 30-40 mg (1.1%). U kontrolnoj skupini najmanju dozu od 5 mg uzimalo je četrnaest ispitanika (10.9%), a dozu od 10 mg četrdeset osam ispitanika (38.8%). Četrdeset ispitanika (31.8%) uzimalo je 15-20 mg, a dvadeset troje (18.6%) je uzimalo 30-40 mg. Nađena je značajna razlike u dozi rosuvastatina od 10 mg koja je bila češća u skupini s nuspojavama ($P=0.010$), dok je doza od 40 mg bila češća u skupini bez nuspojava ($P=0.004$).

Šezdeset šest (69.5%) bolesnika je razvilo nuspojave u prva tri mjeseca, a dvadeset (21.1%) bolesnika u razdoblju od tri do šest mjeseci od uvođenja rosuvastatina. Četiri (4.2%) bolesnika je uzimalo rosuvastatin od 8 do 11 mjeseci prije nastanka nuspojava, a u pet (5.2%) bolesnika su se neželjene reakcije javile između 13 i 15 mjeseci terapije. Prosječno trajanje liječenja bilo je 10

mjeseci (medijan 304 dana; raspon 136 - 496 dana) <, a u ¾ bolesnika liječenje je trajalo dulje od 200 dana (tablica 4.).

Tablica 4. Karakteristike ispitanika (bolesnici s mišićnim i jetrenim nuspojavama) i kontrole (bolesnici bez nuspojava)

	Nuspojave	Kontrole	Nuspojave-kontrole*	P
N	95 (%)	125 (%)	–	–
Spol				
M/Ž	49/46	50/75	0.62 (0.37-1.07)	0.088
Dob (godine)				
Medijan (raspon)	62 (23-88)	62 (29-84)	0.81 (-2.5, 4.0)	0.643
Doza rosuvastatina				
5 mg/dan	18 (18.9)	14 (11.2)	0.64 (0.39-1.06)	0.083
10 mg/dan	45 (47.4)	44 (35.2)	1.50 (1.10-2.05)	0.010
15-20 mg/dan	31 (32.6)	40 (32.0)	1.02 (0.69-1.50)	0.921
30-40 mg/dan	1 (1.1)	27 (21.6)	0.05 (0.01-0.39)	0.004
Vrijeme nastanka nuspojave (mjeseci)				
< 3	66 (69.5)			
3-6	20 (21.1)			
7-12	4 (4.2)			
>12	5 (5.2)			
Trajanje liječenja (dani)				
Medijan (raspon)	300 (136-496)			

*Razlika ispitanici – kontrole; omjeri prevalencija

P- razina statističke značajnosti rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije

U oko polovice bolesnika zabilježeni su komorbiditeti. Njihova učestalost je bila slična u obje skupine, a najčešće su zabilježene hipertenzija, dijabetes i hipotireoza. U skupini s nuspojavama bila su 43 (45.3%) bolesnika s povišenim krvnim tlakom, 16 (16.8%) bolesnika sa šećernom

bolešću, 7 (7.4%) bolesnika s hipotireozom, 9 (9.5%) bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrežne funkcije i 8 (8.4%) bolesnika s kroničnom jetrenom bolešću. U kontrolnoj skupini 56 (44.8%) bolesnika je imalo povišen krvni tlak, 17 (13.6%) bolesnika šećernu bolest, 14 (11.2%) bolesnika hipotireozu, 3 (2.4%) bolesnika hipertireozu, 9 (7.2%) bolesnika kronično zatajenje bubrežne funkcije i 3 (2.4%) bolesnika kroničnu bolest jetre (tablica 5.).

Tablica 5. Razlike u spolu i komorbiditetima između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 test

		Grupa				P
		Nuspojave n=95		Bez nuspojave n=125		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	49	51,60%	50	40,00%	0,087
	Ženski	46	48,40%	75	60,00%	
Familijarna dislipidemija*	Ne	92	96,80%	107	85,60%	0,005
	Da	3	3,20%	18	14,40%	
Diabetes mellitus	Ne	79	83,20%	108	86,40%	0,505
	Da	16	16,80%	17	13,60%	
Hipertenzija	Ne	52	54,70%	69	55,20%	0,945
	Da	43	45,30%	56	44,80%	
Hipotireoza*	Ne	88	92,60%	111	88,80%	0,366
	Da	7	7,40%	14	11,20%	
Hipertireoza*	Ne	95	100,00%	122	97,60%	0,261
	Da	0	0,00%	3	2,40%	
Kronično zatajenje bubrega	Ne	86	90,50%	116	92,80%	0,623
	Da	9	9,50%	9	7,20%	
Kronična jetrena bolest*	Ne	87	91,60%	122	97,60%	0,060
	Da	8	8,40%	3	2,40%	
Ukupan komorbiditeta** broj	1	37	38,90%	47	37,60%	0,951
	2	35	36,80%	51	40,80%	
	3	20	21,10%	22	17,60%	
	4	3	3,20%	4	3,20%	
	5	0	0,00%	1	0,80%	

*Fisherov egzakti test

**Fisher-Freeman-Haltonov egzakti test

Nije bilo statističke značajne razlike među skupinama u prevalencija dijabetesa ($p=0.505$), hipertenzije ($p=0.945$), hipotireoze ($p=0.366$), hipertireoze ($p=0.261$), kronične bubrežne ($p=0.623$) i kronične jetrene bolesti ($p=0.060$). Jedina značajna razlika zabilježena je u učestalosti familijarne dislipidemije koja je bila češća u skupini bez nuspojava: 18 (14,4%) u odnosu na 3 (3,2%) bolesnika iz skupine s nuspojavama ($P=0,005$).

U ispitivanoj skupini 37 (38.9%) bolesnika je imalo pored hiperlipidemije još jednu dijagnozu, 35 (36.8%) bolesnika dva komorbiditeta, 20 (21.1%) bolesnika tri komorbiditeta, a u 3 (3.2%) bolesnika zabilježena su četiri komorbiditeta. U kontrolnoj skupini jedan komorbiditet je imalo 47 (37.6%) bolesnika, dva komorbiditeta 51 (40.8%) bolesnik, tri komorbiditeta 22 (17.6%) bolesnika i četiri komorbiditeta 4 (3.2%) bolesnika. U jednog (0.8%) bolesnika registrirano je 5 komorbiditeta. Nije bilo statistički značajne razlike u ukupnom broju komorbiditeta između skupina ($p=0.951$) (tablica 5).

Bolesnici uključeni u studiju osim statina uzimali su i druge lijekove zbog svojih komorbiditeta što je predstavljalo rizik za nastanak interakcije lijek-lijek koja je dodatno pojačana u nositelja polimorfnih gena enzima i membranskih prijenosnika.

U tablici 6. prikazani su inhibitori CYP2C9, CYP2C19, SLCO1B1/OATP1B1 i ABCG2 koje su bolesnici uzimali kao popratnu terapiju.

Tablica 6. Inhibitori ABCG2, SLCO1B1, CYP2C9 i CYP2C19

Inhibitori ABCG2	Inhibitori SLCO1B1	Inhibitori CYP2C9	Inhibitori CYP2C19
pantoprazol	ciklosporin	pantoprazol	pantoprazol
nifedipin	gemfibrozil	amiodaron	valsartan
ciklosporin	acetilcistein	klopidogrel	klopidogrel
lacidipin	verapamil	valsartan	amiodaron
amlodipin	pantoprazol	gemfibrozil	varfarin
takrolimus	digoksin	tikagrelor	gliklazid
lerkandipin	valsartan	nifedipin	ciklosporin
doksazosin	diklofenak	losartan	fenofibrat
felodipin	takrolimus	nilotinib	tikagrelor
nilotinib		amlodipin	diazepam

Tablica 7. Razlike u vrsti korištenih inhibitora i razini interakcije lijek-lijek-gen između ispitivane i kontrolne skupine: Fisherov egzaktni test

		Grupa				P
		Nuspojave n=95		Bez nuspojava n=125		
		N	%	N	%	
INHIBITOR CYP2C9	Ne	73	76.84	105	84.00	0.183
	Da	22	23.16	20	16.00	
INHIBITOR CYP2C19	Ne	63	65.32	94	75.20	0.209
	Da	32	34.68	31	24.80	
INHIBITOR OATP1B1	Ne	77	81.05	112	89.60	0.076
	Da	18	18.95	13	10.40	
INHIBITOR ABCG2	Ne	61	64.21	90	72.00	0.217
	Da	34	35.79	35	28.00	
	0	72	75.79	82	65.60	
Razina interakcije*	1	8	8.42	23	18.40	0,110
	2	7	7.37	5	4.00	
	3	8	8.42	10	8.00	

Dvadeset i dva bolesnika (23.16%) iz ispitivane skupine i dvadeset bolesnika (16.00%) iz kontrolne skupine uzimali su inhibitore CYP2C9 što nije bila statistički značajna razlika (P=0.183). Lijekove

- inhibitore CYP2C19 uzimala su 32/95 (34.68%) bolesnika u skupini s nuspojavama i 31/125 (24.80%) u skupini bez nuspojava ($P=0.209$). Inhibitori ABCG2 su podjednako korišteni u obje skupine: 34 (35.79%) bolesnika u skupini s nuspojavama i 35 (28.00%) bolesnika u skupini bez nuspojava ($P=0.217$). Inhibitori OATP1B1 su češće korišteni u skupini bolesnika s nuspojavama: 18/95 (18.95%) bolesnika u odnosu na 13/125 (10.40%) bolesnika iz kontrolne skupine, ali ta razlika nije dosegla statističku značajnost ($P= 0.077$). Također, ni u razini interakcija lijek-lijek- gen nije bilo statistički značajnih razlika ($P=0.110$).

U skupini od devedeset pet bolesnika koji su razvili neku od nuspojava, najčešće su bile mišićne nuspojave koje su se javile u 88 (92.63%) bolesnika. Jetrenu leziju razvilo je sedam bolesnika (7.36%), u jednog (1.2%) bolesnika istodobno je zabilježena jetrena i mišićna lezija, dok su u šest (6.31%) bolesnika uz mišićne zabilježene i druge nuspojave (osip, alergijska reakcija, oticanje nogu, mučnina, trnci u nogama i alopecija).

Mišićne nuspojave bile su podjeljene u 3 skupine: u prvu skupinu uključeni su bolesnici s mialgijom (samo bol u mišićima), u drugoj skupini su bili bolesnici s umjerenom miotoksičnošću (povećanjem $CK<3$) i u trećoj skupini bolesnici s težom miotoksičnošću (povećanjem $CK>3$ uključujući i rabdomiolizu). Najčešće je bila izražena mialgija u 55 bolesnika (57,9%) i blaža miotoksičnost u 33 bolesnika (34,7%). Teži oblik miotoksičnosti zabilježen je u 8 bolesnika (8.4%), od kojih je 1 bolesnik razvio rabdomiolizu s posljedičnim razvojem bubrežnog oštećenja. U tablici

8. prikazana je raspodjela nuspojava.

Tablica 8. Raspodjela pojedinih nuspojava u ispitivanoj skupini (n=95)

	N	%	95,0% CI	
Nuspojave: mijalgija	55	57,9%	47,9%	67,5%
Nuspojave: miotoksičnost <3x	33	34,7%	25,7%	44,7%
Nuspojave: miotoksičnost >3x	8	8,4%	4,1%	15,3%
Nuspojave: hepatotoksičnost	7	7,4%	3,4%	13,9%
Nuspojave: mišićne+jetrene	1	1,2%	0,6%	2,7%
Nuspojave: mišićne+ostale	6	6,3%	2,7%	12,6%

Tablica 9. Razlike u dnevnoj dozi rosuvastatina te laboratorijskim pokazateljima jetrenog i mišićnog oštećenja između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

Grupa	N	Min	Max	Centile			P	
				25.	Medijan	75.		
Dnevna doza rosuvastatina (mg)	Nuspojave	95	5,00	40,00	10,00	10,00	20,00	0,001
	Bez nuspojave	125	5,00	40,00	10,00	15,00	20,00	
CK (U/L)	Nuspojave	95	46,00	23975,00	97,00	187,00	280,00	<0,001
	Bez nuspojave	125	24,00	261,00	72,00	86,00	112,00	
AST (U/L)	Nuspojave	95	12,00	156,00	21,00	26,00	32,00	<0,001
	Bez nuspojave	125	10,00	73,00	18,00	21,00	26,00	
ALT (U/L)	Nuspojave	95	10,00	192,00	21,00	26,00	39,00	<0,001
	Bez nuspojave	125	8,00	114,00	18,00	21,00	28,00	
GGT (U/L)	Nuspojave	95	8,00	356,00	19,00	32,00	46,00	<0,001
	Bez nuspojave	125	6,00	356,00	15,00	22,00	30,50	
ALP (U/L)	Nuspojave	95	19,00	396,00	60,00	72,00	86,00	0,009
	Bez nuspojave	125	18,00	261,00	56,00	66,00	77,50	
Bilirubin (µmol/L)	Nuspojave	95	3,00	35,00	8,00	11,00	14,00	0,038
	Bez nuspojave	125	3,00	40,00	7,00	10,00	12,00	

KRATICE: *Medijan (interkvartilni raspon); P razina statističke značajnosti rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije; CK kreatin kinaza; AST aspartat transaminaza; ALT alanin transaminaza, GGT glutamil transaminaza; ALP alkalna fosfataza

Razlike u dnevnoj dozi rosuvastatina te laboratorijskim pokazateljima jetrenog i mišićnog oštećenja između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 9.

Vrijednosti kreatin kinaze kao biokemijskog markera srčanog oštećenja značajno su više u skupini bolesnika s nuspojavama nego u kontrolnoj skupini. Medijan (interkvartilni raspon) vrijednosti kreatin kinaze u ispitivanoj skupini bio je 187 U/L i 86 U/L u kontrolnoj skupini; $p < 0.001$). Također su i vrijednosti jetrenih enzima statistički značajno više u skupini bolesnika s nuspojavama (ALT 26 U/L u odnosu na 21 U/L; $p < 0.001$; GGT 32 U/L naprema 22 U/L; $p < 0.001$; ALP 72 U/L naprema 66 U/L; $p < 0.009$; bilirubin 11 $\mu\text{mol/L}$ naprema 10 $\mu\text{mol/L}$; $p = 0.038$). Zanimljivo, skupina s nuspojavama imala je značajno nižu dnevnu dozu rosuvastatina ($P = 0,001$) što se može objasniti redukcijom doze zbog pojave neželjenih reakcija.

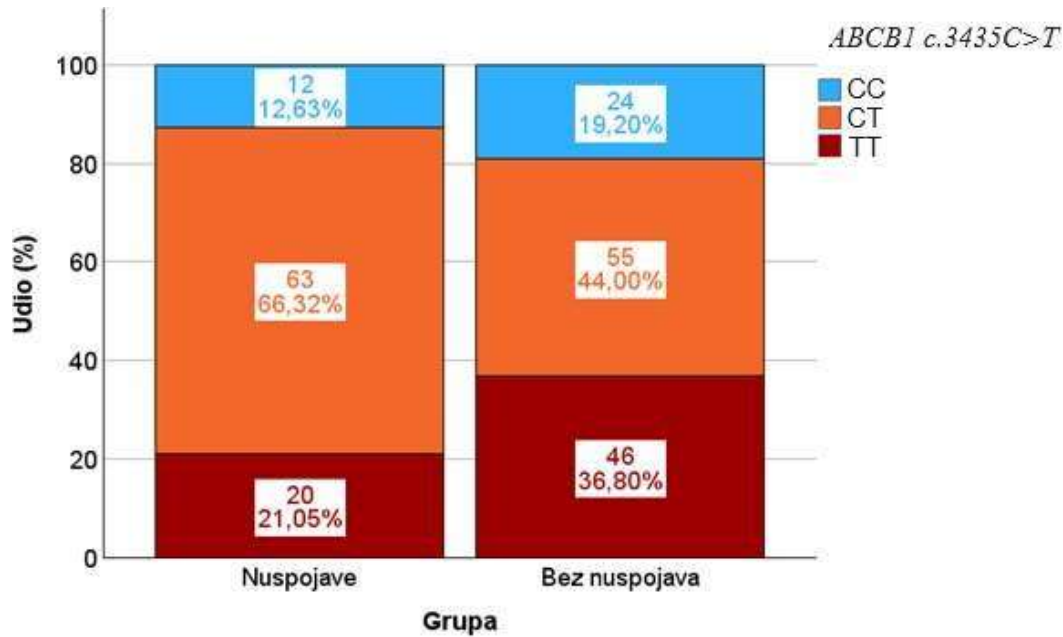
Tablica 10. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCB1* c.3435C>T između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 -test

		Grupa				P
		Nuspojave n=95		Bez nuspojava n=125		
		N	%	N	%	
Genotipovi						
<i>ABCB1</i> c.3435C>T	CC	12	12,6%	24	19,2%	0,004
	CT	63	66,3%	55	44,0%	
	TT	20	21,1%	46	36,8%	
<i>ABCB1</i> c.3435C>T	CC	12	12,6%	24	19,2%	0,192
klasifikacija	CT+TT	83	87,4%	101	80,8%	

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa

U skupini s nuspojavama 12 bolesnika (12.6%) imalo je „divlji“ genotip za razliku od 24(19.2%) u skupini bez nuspojava. U ispitivanoj skupini varijantni genotip nađen je u 83 (87.4%) bolesnika,

od toga heterozigotni CT u 66.3% , a homozigotni TT u 21.1%. U kontrolnoj skupini učestalost mutiranih alela bila je 80.8% (44.0% CT i 36.8% TT)



Slika 4. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCBI c.3435C>T* između ispitivane i kontrolne skupine

Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCBI c.3435C>T* između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 10. te na Slici 4. Mutirane varijante gena *ABCBI c.3435C>T* (CT i TT) bile su nešto češće prisutne u skupini s nuspojavama, međutim, homozigotni haplotip TT bio je češći u kontrolnoj skupini. Ukupno uzevši, nije bilo statistički značajne razlike između skupina ($p=0.192$). U skupini s nuspojavama zabilježeno je značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ($P=0,001$) za razliku od kontrolne skupine gdje je polimorfizam *c.3435 T>C* bio u ravnoteži (Tablica 11). Međutim, u multivarijantnoj analizi nije bilo statistički značajne razlike u

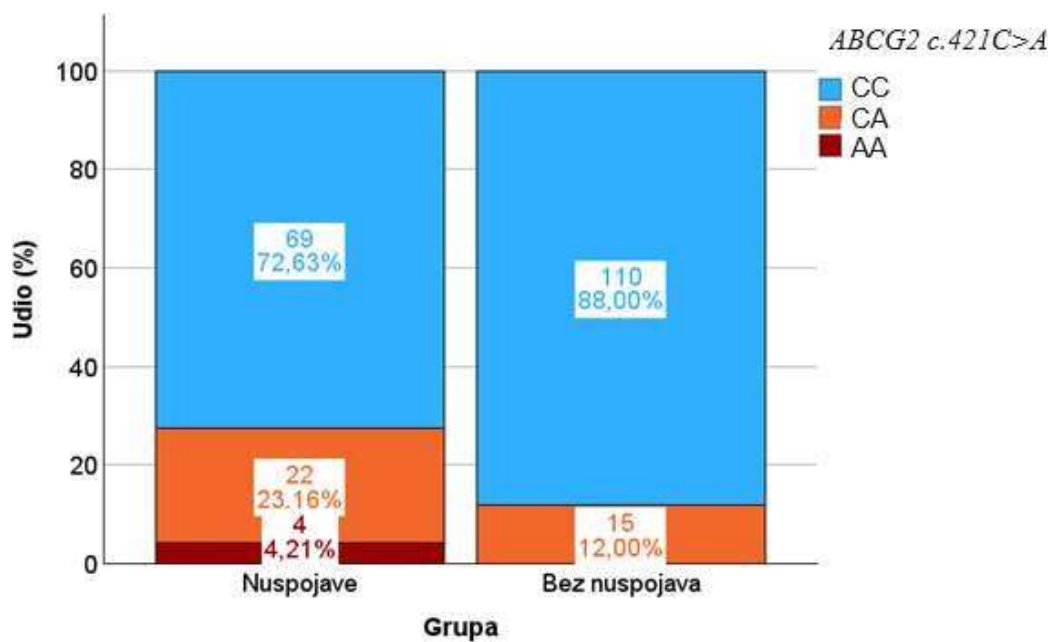
prediktivnoj vrijednosti varijantnog genotipa za nastanak nuspojava rosuvastatina. (OR 1.85, 95% CI 0.82-4,10, P=0.143).

Tablica 11. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCG2 c.421C>A* između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 -test

		Grupa				P
		Nuspojave n=95		Bez nuspojava n=125		
		N	%	N	%	
<i>ABCG2 c.421C>A</i>	CC	69	72,60%	110	88,00%	0,003
	CA	22	23,20%	15	12,00%	
	AA	4	4,20%	0	0,00%	
<i>ABCG2 c.421C>A</i> klasifikacija	CC	69	72,60%	110	88,00%	0,005
	CA+AA	26	27,40%	15	12,00%	

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa

U skupini s nuspojavama 69 (72.6%) bolesnika imalo je “divlji” genotip *ABCG2 CC* za razliku od 110 (88%) bolesnika u skupini bez nuspojava (p=0.003). U ispitivanoj skupini varijantni genotip nađen je u 26 (27.4%) bolesnika, od toga heterozigotni CT u 22 (23.2%) bolesnika, a homozigotni AA u 4 (4.2%) bolesnika. U kontrolnoj skupini nije bilo nositelja homozigotne varijante gena, a heterozigotni oblik zabilježen je u 15 (12%) ispitanika (p=0.005)



Slika 5. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCG2 c.421C>A* između ispitivane i kontrolne skupine

Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *ABCG2 c.421C>A* između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 11. i na Slici 5. Mutirane varijante gena *ABCG2 c.421C>A* bile su značajno češće prisutne u skupini s nuspojavama ($P=0.005$).

Tablica 12. Analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže u gena *ABCG2 c.421C>A* u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

PACIJENTI S NUSPOJAVAMA		
ABCG2 421C>A	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	69	67,4
Heterozigot	22	25,3
Rijetki homozigot	4	2,4
Var allele freq:	0,16	
$X^2 =$	1,58	
X^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,208	1 df

PACIJENTI BEZ NUSPOJAVA		
ABCG2 421C>A	Promatrani #	Očekivani #
Uobičajeni homozigot	110	110,5
Heterozigot	15	14,1
Rijetki homozigot	0	0,5
Var allele freq:	0,06	
$X^2 =$	0,51	
X^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,475	1 df

Analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže gena *ABCG2 c.421C>A* u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 12. Nije bilo značajnih odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže kako u ispitivanoj, tako i u kontrolnoj skupini. U multivarijantnoj analizi nositelji mutiranih varijanti gena *ABCG2 c.421C>A* imaju 2.68 puta veći rizik za nastanak nuspojava rosuvastatina (OR 2.68; 95% CI 1.28-5.60; P=0.008).

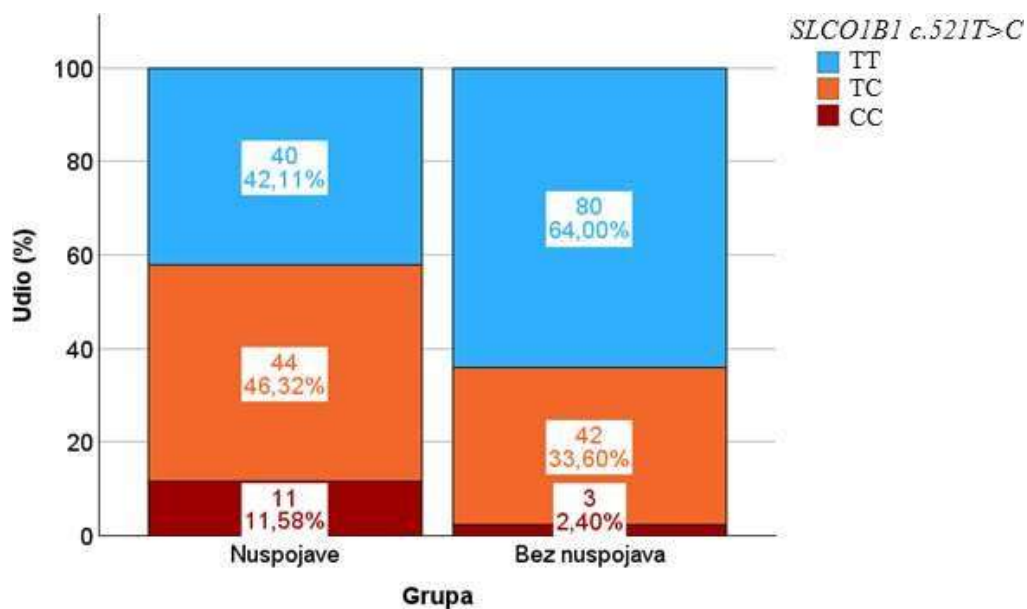
Tablica 13. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *SLCO1B1 c.521T>C* između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 -test

	Grupa			P	
	Nuspojave	Kontrole			
	n=95	n=125			
	N (%)	N (%)	OR		
Genotipovi					
<i>SLCO1B1 c.521T>C</i>	TT	40 (42.1)	80 (64.0)	64,00%	<0,001
	TC	44 (46.3)	42 (33.6)	33,60%	
	CC	11 (11.6)	3 (2.4)	2,40%	
<i>SLCO1B1 c.521T>C</i> klasifikacija	TT	40 (42.1)	80 (64.0)	64,00%	<0,001
	TC+CC	55 (57.9)	45 (36.0)	36,00%	
Aleli	T	122(64.9)	122 (71.8)	64,00%	
	C	66 (35.1)	48 (28.2)	36,00%	

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa

U skupini s nuspojavama 40 bolesnika (42.1%) imalo je normalan (wt) genotip *SLCO1B1 TT* za razliku od 80 ispitanika (64.0%) u skupini bez nuspojave. Učestalost varijantnih alela bila je značajno veća u ispitivanoj skupini. Četrdeset i četiri bolesnika (46.30%) s nuspojavama imala su heterozigotni genotip TC, a 11 bolesnika (11.6%) homozigotni genotip CC, dok su u kontrolnoj skupini 42 bolesnika (33.6%) imala TC genotip i 3 (2.4%) CC genotip. U ispitivanoj skupini varijantni genotip nađen je u 57.9% bolesnika, a u kontrolnoj skupini učestalost mutiranih haplotipova bila je 36% što je statistički značajna razlika ($p < 0.001$).

Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *SLCO1B1 c.521T>C* između ispitivane i kontrolne skupine prikazane su u Tablici 13. te na slici 6. Razlika u učestalosti genotipova *SLCO1B1 c.521T>C* između skupina s nuspojavama i bez nuspojava bila je statistički značajna ($P < 0,001$). Mutirane varijante gena *SLCO1B1 c.521T>C* bile su značajno češće prisutne u skupini s nuspojavama 55 (57.9%) bolesnika u odnosu na 45 (36%) bolesnika u skupini bez nuspojava ($P < 0,001$).



Slika 6. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *SLCO1B1 c.521T>C* između ispitivane i kontrolne skupine

Tablica 14. Analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže gena *SLCO1B1 c.521T>C* u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

PACIJENTI S NUSPOJAVAMA			
SLCO1B1 521T>C	Promatrani #	Očekivani #	
Uobičajeni homozigot	40	40,5	
Heterozigot	44	43,1	
Rijetki homozigot	11	11,5	
Var allele freq:	0,35		
	$X^2 =$	0,04	
X^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,834		1 df

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=1 za genotipove

PACIJENTI BEZ NUSPOJAVA			
SLCO1B1 521T>C	Promatrani #	Očekivani #	
Uobičajeni homozigot	80	81,6	
Heterozigot	42	38,8	
Rijetki homozigot	3	4,6	
Var allele freq:	0,19		
	$X^2 =$	0,86	
X^2 test <i>P</i> vrijednost =	0,354		1 df

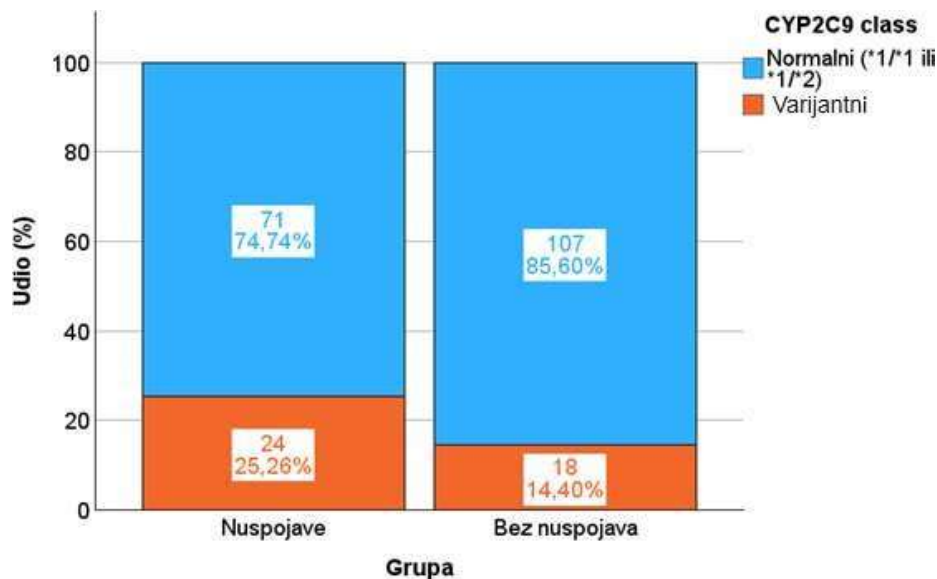
Analiza Hardy-Weinbergove ravnoteže gena *SLCO1B1 c.521T>C* u ispitivanoj i kontrolnoj skupini prikazana je u Tablici 14. Nije bilo značajnih odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže kako u ispitivanoj (χ^2 0.04; P=0.834; 1 df), tako i u kontrolnoj (χ^2 0.86; P=0.354; 1 df) skupini.

U multivarijantnoj analizi nositelji varijantnih genotipova gena *SLCO1B1 c.521T>C* imaju 2.52 puta veći rizik za nastanak nuspojava u odnosu na nositelje divljeg genotipa (OR 2.5; 95% CI 1.42-4.48; P=0.002).

Tablica 15. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena CYP2C9 između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 -test

	Genotip	Fenotip	Stupanj aktivnosti	Grupa		P		
				Nuspojave			Bez nuspojava	
				n=95			n=125	
				N	%	N	%	
<i>CYP2C9</i>	*1/*1	normalni metabolizator	2	58	61,10%	91	72,80%	0,007
	*1/*2	srednji metabolizator	1.5	13	13,70%	16	12,80%	
	*1/*3	srednji metabolizator	1	13	13,70%	13	10,40%	
	*2/*2	srednji metabolizator	1	1	1,10%	1	0,80%	
	*2/*3	spori metabolizator	0.5	10	10,50%	1	0,80%	
	*3/*3	nema funkcije	0	0	0,00%	3	2,40%	
<i>CYP2C9</i> klasifikacija	*1/*1;*1/*2	normalni/srednji	1.5-2	71	74,70%	107	85,60%	0,042
	Varijantni	spori metabolizator/ nema funkcije	0-0.5	24	25,30%	18	14,40%	

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa



Slika 7. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *CYP2C9* između ispitivane i kontrolne skupine

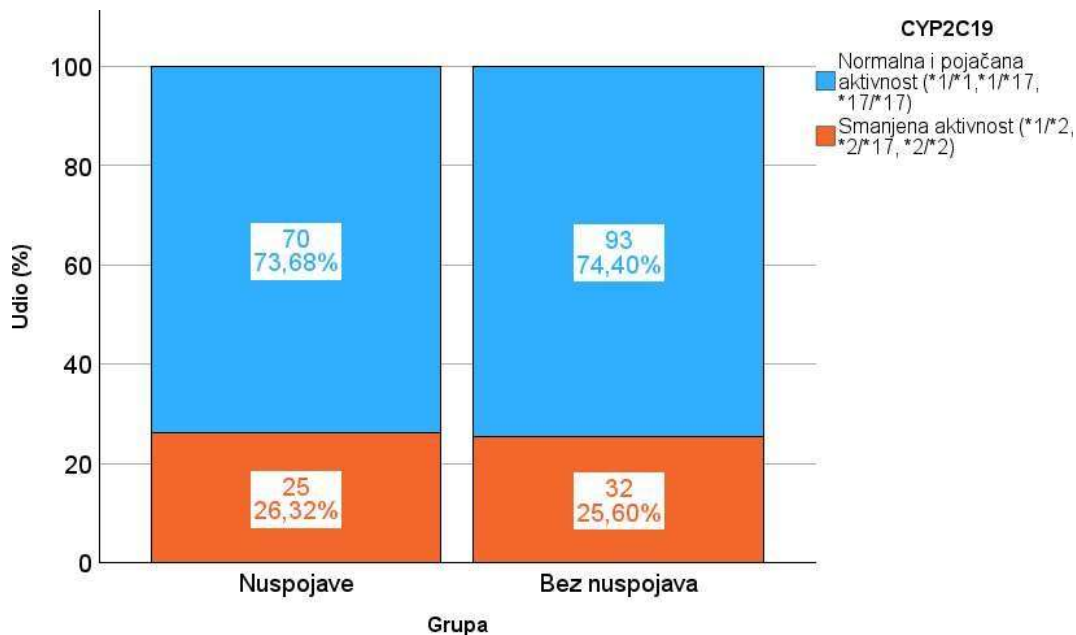
Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *CYP2C9* između ispitivane i kontrolne skupine prikazana je u Tablici 15. i na Slici 7. Alel *1 povezan je s normalnom funkcijom enzima, alel *2 nosi smanjenu funkciju enzima, a alel *3 izrazito smanjenu ili odsutnu funkciju enzima. Genotipovi *1/*1 i *1/*2 kodiraju fenotipove normalnog i srednjeg metabolizatora koji osiguravaju normalnu aktivnost enzima *CYP2C9*. Nositelji alela *3 imaju slabu funkciju enzima te spori metabolizam rosvastatina što predstavlja rizik za nastanak mišićnih nuspojava. To je naročito izraženo u homozigota, nositelja 2 nefunkcionalna alela *3*3 u kojih je funkcija enzima izrazito smanjena ili odsutna. U ispitivanoj skupini normalni (*1/*1 i *1/*2) genotipovi nađeni su u 71 (74.74%) bolesnika za razliku od 107 (85.6%) bolesnika u kontrolnoj skupini. U skupini s nuspojavama 24 (25.3%) bolesnika su imala varijantne oblika gena (*1/*3; *2/*2; *2/*3; *3/*3) za razliku od 18 (14.4%) bolesnika u skupini bez nuspojava što je statistički značajna razlika ($P= 0.042$). U

multivarijantnoj analizi nositelji varijantnih genotipova imaju 2.4 puta veći rizik za nastanak nuspojava (OR 2.4, 5% CI 1.15-5.0, P=0.019).

Tablica 16. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *CYP2C19* između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 -test

	Grupa				P	
	Nuspojave n=95		Bez nuspojava n=125			
	N	%	N	%		
<i>CYP2C19</i> *2, *17	*1/*1	45	47,40%	48	38,40%	0,366
	*1/*2	23	24,20%	31	24,80%	
	*2/*2	2	2,10%	1	0,80%	
	*1/*17	22	23,20%	35	28,00%	
	*2/*17	0	0,00%	0	0,00%	
	*17/*17	3	3,20%	10	8,00%	
Normalna i pojačana aktivnost	70	73,68%	93	74,40%	0,904	
<i>CYP2C19</i> klasifikacija (*1/*1, *1/*17, *17/*17)						
Smanjena aktivnost (*1/*2, *2/*17, *2/*2)	25	26,32%	32	25,60%		

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa



Slika 8. Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *CYP2C19* između ispitivane i kontrolne skupine

Razlike u zastupljenosti polimorfizama gena *CYP2C19* između ispitivane i kontrolne skupine prikazana je u Tablici 16. i na Slici 8. Alel *1 povezan je s normalnom funkcijom enzima, alel *17 s pojačanom funkcijom enzima, a alel *2 nosi smanjenu funkciju enzima. Genotipovi *1/*1, *1/*17 i *17/*17 kodiraju fenotipove normalne i pojačane aktivnosti enzima *CYP2C19*. Heterozigotni ili homozigotni nositelji alela *2 imaju slabu funkciju enzima te spori metabolizam rosuvastatina što predstavlja rizik za nastanak mišićnih nuspojava. U ispitivanoj skupini genotipovi koji kodiraju normalne i brze metabolizatore (*1/*1, *1/*17, *17/*17) nađeni su u 70 (73.68%) bolesnika za razliku od 93 (74.4%) bolesnika u kontrolnoj skupini. U skupini s nuspojavama 25 (26.32%) bolesnika je imalo heterozigotne ili homozigotne genotipove povezane sa srednjim ili sporim metabolizmom (*1/*2, *2/*17, *2/*2), a u skupini s nuspojavama 32 (25.6%) bolesnika što nije statistički značajna razlika ($P= 0.904$). U multivarijantnoj analizi nositelji varijantnih genotipova

CYP2C19 nemaju prediktivni značaj u nastanku nuspojava rosuvastatina (OR 1.02, 95% CI 0-59-1.25, P=0.952).

Tablica 17. Prevalencija genotipova *CYP2C9* i *CYP2C19* i njihovih metaboličkih fenotipova te prevalencija genotipova *SLCO1B1* i *ABCG2* u ispitanika s i bez nuspojava

	Nuspojave	Kontrole	Nuspojave-kontrole*	P
N	95	125	—	—
<i>CYP2C9</i>				
*1/*1	58 (61.1)	91 (72.8)	0.59 (0.33-1.04)	0.066
*1/*2	13 (13.8)	16 (12.8)	1.08 (0.49-2.37)	0.848
*1/*3	13 (13.7)	13 (10.4)	1.36 (0.60-3.10)	0.456
*2/*2	1 (1.1)	1 (0.8)	1.32 (0.08-21.37)	0.132
*2/*3	10 (10.5)	1 (0.8)	14.59(1.83-116.08)	0.011
*3/*3	0 (0)	3 (2.4)	0.02 (0.00-0.31)	0.005
Metabolički fenotip				
normalan	58 (61.1)	91 (72.8)	0.83 (0.69-1.02)	0.074
srednji	27 (28.4)	30 (24.0)	1.18 (0.76-1.85)	0.458
spor	10 (10.5)	4 (3.2)	3.29 (1.06-10.17)	0.039
<i>CYP2C19</i>				
*1/*1	45 (47.4)	48 (38.4)	1.44 (0.84-2.48)	0.183
*1/*2	23 (24.2)	31 (24.8)	0.97 (0.52-1.80)	0.920
*2/*2	2 (2.1)	1 (0.8)	2.67 (0.24-29.85)	0.426
*1/*17	22 (23.2)	35 (28.0)	0.78 (0.42-1.44)	0.417
*2/*17	0 (0.0)	0 (0.0)	1.32 (0.03-66.83)	0.892
*17/*17	3 (3.1)	10 (8.0)	0.38 (0.10-1.40)	0.145
Metabolički fenotip				
normalan	45 (47.4)	48 (38.4)	1.23 (0.91-1.68)	0.180
srednji	23 (24.2)	31 (24.8)	0.98 (0.61-1.56)	0.919
spor	2 (2.1)	1 (0.8)	2.63 (0.24-28.59)	0.427
brz	22 (26.3)	35 (24.8)	0.83 (0.52-1.31)	0.420
ultrabrz	3 (3.1)	10 (8.0)	0.39 (0.11-1.39)	0.149
<i>SLCO1B1 c.521T>C</i>				
TT	40 (42.1)	80 (64.0)	0.66 (0.50-0.86)	0.002
TC	44 (46.3)	42 (33.6)	1.38 (0.99-1.91)	0.055
CC	11 (11.6)	3 (2.4)	4.82 (1.38-16.21)	0.013
Varijantni genotipovi	55 (57.9)	45 (36.0)	2.44 (1.41-4.22)	0.001
<i>ABCG2 c.421C>A</i>				
CC	69 (72.6)	110 (88.0)	0.83 (0.72-0.95)	0.007
CA	22 (23.2)	15 (12.0)	1.93 (1.06-3.52)	0.032
AA	4 (4.2)	0 (0.0)	11.8 (0.64-216.78)	0.096
Varijantni genotipovi	26 (27.4)	15 (12.0)	2.28 (1.28-4.06)	0.005
<i>ABCB1 c.3435C>T</i>				
CC	12 (12.6)	24 (19.2)	0.66 (0.35-1.25)	0.199
CT	63 (66.3)	55 (44.0)	1.51 (1.18-1.92)	0.001
TT	20 (21.1)	46 (36.8)	0.57 (0.36-0.90)	0.016
Varijantni genotipovi	83 (87.6)	101 (80.8)	1.08 (0.96-1.21)	0.182

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa

*Razlike (slučajevi – kontrole) su omjeri prevalencija

Tablica 17. sumarno prikazuju prevalenciju genotipova i alela metaboličkih enzima i membranskih prijenosnika i njihovih fenotipova. Fenotipovi sporog metabolizatora CYP2C9 su češći u skupini s nuspojavama ($p=0.039$), dok je učestalost metaboličkih fenotipova CYP2C19 slična u obje skupine. Nije bilo statistički značajne razlike u učestalosti varijantnih genotipova gena *ABCB1 c.3435C>T* između ispitivane i kontrolne skupine ($P=0.182$). Učestalost varijantnih alela *SLCO1B1* i *ABCG2* je bila veća u bolesnika s nuspojavama nego u kontrolnoj skupini ($P=0.001$ i $P=0.005$).

Tablica 18. Multivarijatni regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja je razvila nuspojave: binarna logistička regresija

	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
<i>ABCB1</i> : mutirane varijante	1,85	0,82	4,10	0,143
<i>SLCO1B1 c.521T>C</i> : mutirane varijante	2,52	1,42	4,48	0,002
<i>ABCG2</i> : mutirane varijante	2,68	1,28	5,60	0,008
<i>CYP2C9</i> : mutirane varijante	2,40	1,15	5,00	0,019
<i>CYP2C19</i> : mutirane varijante	1.02	0,53	1,97	0,952
Inhibitori CYP2C9	1.08	0.63	1.86	0.781
Inhibitori CY2C19	1.84	1.02	3.35	0.044
Inhibitori ABCG2	1.03	0.57	1.86	0.913
Inhibitori SLCO1B1	1.68	0.93	3.05	0.087
Razina interakcije lijek-lijek-gen	0,86	0,59	1,25	0,439

KRATICE: P =razina statističke značajnosti, rezultat χ^2 -testa; OR omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95% **interval** pouzdanosti za omjer izgleda

Multivarijatni regresijski model predikcije pripadnosti skupini koja je razvila nuspojave prikazan je u Tablici 18. Kao prediktorske varijable uvršteni su analizirani polimorfizmi gena *ABCB1*, *SLCO1B1*, *ABCG2*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, njihovi inhibitori te razina interakcije lijek-lijek-gen. Regresijski model bio je statistički značajan ($P<0,001$). U multivarijatnom okružju, kontrolirano na utjecaj svih ostalih prediktorskih varijabli u regresijskom modelu (geni i interakcija lijek-lijek-

gen), značajnu predikciju na pripadnost skupini s nuspojavama s više od 2 puta većom vjerojatnošću imaju mutirane varijante gena *SLCO1B1* c.521T>C (OR=2,52; 95% CI=1,42-4,48; P=0,002), mutirane varijante gena *ABCG2* (OR=2,68; 95% CI=1,28-5,60; P=0,008) te mutirane varijante gena *CYP2C9* (OR=2,40; 95% CI=1,15-5,00; P=0,019).

6. RASPRAVA

Dosad je objavljeno više radova koji su se bavili farmakogenetikom statina u hrvatskoj populaciji, međutim nije bilo značajnijih istraživanja o utjecaju genetskih varijanti metaboličkih enzima i membranskih prijenosnika na nastanak nuspojava rosuvastatina (22,23, 96, 136-139). Rosuvastatin je jedan od najdjelotvornijih statina s vrlo dobrim sigurnosnim profilom (3,4). Ipak, pojava neželjenih učinaka rosuvastatina kreće se od 5 do 29% što utječe na adherenciju bolesnika i smanjuje pozitivne rezultate u liječenju hiperlipidemije i prevenciji kardiovaskularnih događaja. Stoga smo postavili hipotezu kako u razvoju nuspojava rosuvastatina bitnu ulogu uz kliničke parametre ima i genetička predispozicija pojedinca u vidu polimorfizama transportnih proteina *ABCG2*, *ABCB1* i *SLCO1B1*, metaboličkih enzima *CYP2C9* i *CYP2C19* te interakcije lijek-lijek- gen. Farmakogenetički pristup može doprinijeti personalizaciji terapije statinima i tako povećati učinkovitost liječenja, a smanjiti učestalost nuspojava.

Razmatranje proturječnih podataka u vezi sa *SLCO1B1 c.521T>C* kao i nedostatak relevantnih podataka koji se odnose na *ABCG2 c.421C>A*, naši rezultati doprinose pojašnjenju pitanja o praktičnom značaju genetskih varijanti za sigurnost primjene rosuvastatina (25, 29, 104, 140).

6.1. Polimorfizmi *ABCB1*

U našoj studiji nađena je visoka učestalost polimorfizama gena *ABCB1* u obje skupine ispitanika. Zastupljenost varijantnih haplotipova u našem istraživanju značajno je veća u skupini bolesnika s nuspojavama u kojoj je zabilježeno i značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže ($p < 0.001$). Međutim, u multivarijatnoj analizi varijante gena *ABCB1* nisu imale značajan utjecaj na nastanak nuspojava rosuvastatina ($p = 0.17$, OR 1.77). Naši rezultati su u suglasju s rezultatima

istraživanja Keskitalo i sur. u kojem se navodi da haplotipovi *ABCBI* c.1236C-c.2677G-c.3435C i 1236T-c.2677T-c.3435T ne igraju značajnu ulogu u farmakokinetici fluvastatina, pravastatina, lovastatina i rosuvastatina (141). U studiji de Gortera i sur. rezultati pokazuju da polimorfizam c.3435C>T ne utječe na koncentraciju rosuvastatina u plazmi (28). Isti rezultat se navodi u istraživanju koje su proveli Bai i sur. u kineskoj populaciji (142). Iz tog proizlazi da spomenuti polimorfizmi ne povećavaju rizik za nastanak nuspojava rosuvastatina.

Suprotan rezultat pokazuje studija Zhoua i sur. također u kineskoj populaciji u kojoj nositelji homozigotnog haplotipa *3435TT* imaju 30% veću PPK rosuvastatina u odnosu na nositelje heterozigotnog haplotipa *3435TC*, a time i veći rizik od mišićnih nuspojava (30).

Ovi rezultati su u suprotnosti sa studijom Fiegenbauma i sur. koja je pokazala nižu učestalost CT/TT haplotipa u skupini bolesnika s mijalgijom nego u kontrolnoj skupini, dok je u našoj studiji učestalost haplotipa CT/TT veća u skupini s nuspojavama u usporedbi s kontrolnom skupinom iako razlika nije bila statistički značajna ($p=0.19$) (106).

6.2. Polimorfizmi *CYP2C9* i *CYP2C19*

Malo je podataka o utjecaju varijanti gena *CYP2C9* i *CYP2C19* na nuspojave rosuvastatina. Poznato je da su *CYP2C9* i *CYP2C19* glavni enzimi uključeni u metabolizam rosuvastatina s minimalnim učinkom. Zato smo ove gene uključili u ispitivanje s pretpostavkom da bi mogli imati prediktivni značaj u učestalosti nuspojava rosuvastatina.

Naša studija je prva studija koja je ispitala učinak i pokazala da postoji značajan utjecaj varijantnih alela *CYP2C9*3* i *CYP2C9*2* na nastanak nuspojava rosuvastatina. Nađena je značajnija uloga alela *CYP2C9*3* u odnosu na *CYP2C9*2* što je razumljivo jer alel *2 nosi smanjenu funkciju

enzima, a alel *3 izrazito smanjenu ili odsutnu funkciju enzima. Posebno su rizični nositelji 2 nefunkcionalna alela *3*3 jer genotip *CYP2C9**3/*3 smanjuje aktivnost enzima na samo 10% aktivnosti „divljeg“ genotipa *CYP2C9**1/*1. Rizik od nastanka nuspojava rosuvastatina u naših bolesnika je 2.4 puta veći u nositelja mutiranih varijanti gena *CYP2C9* u odnosu na nositelje „divljeg“ gena.

Naši rezultati se razlikuju od rezultata studije Lina i sur. na 218 ispitanika od kojih su 21 imali varijantne genotipove *CYP2C9**1/*3 ili *CYP2C9**3/*3, a 197 su bili nositelji „divljeg“ genotipa *CYP2C9**1/*1. Nakon 4 mjeseca terapije rosuvastatina u dozi od 10 mg dnevno nije bilo razlike u učestalosti nuspojava između dviju skupina (143).

Rezultati naše studije pokazuju da varijante gena *CYP2C19* nemaju značajan utjecaj na nastanak nuspojava rosuvastatina. Naši rezultati su u suglasju s rezultatima prethodnih studija (27, 144) koji su pokazali kako varijante gena *CYP2C19* nemaju učinak na farmakokinetiku rosuvastatina među kineskim pacijentima.

Rezultati našeg istraživanja su pokazali da nositelji varijanti gena koji kodira metabolički enzim *CYP2C9* češće imaju nuspojave rosuvastatina u odnosu na nositelje „divljeg“ gena što nismo dokazali za nositelje mutiranih genotipova *CYP2C19*.

6.3. Polimorfizmi *ABCG2* i *SLCO1B1*

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su polimorfizmi *ABCG2* c.421C>A (rs2231142) i *SLCO1B1* c.521T>C (rs4149056) odgovorni za smanjenu funkciju membranskih transportnih proteina *ABCG2* i *OATP1B1* što je povezano s povećanim rizikom od mišićnih i jetrenih nuspojava u bolesnika liječenih rosuvastatinom.

Zastupljenost polimorfizama gena *ABCG2 c.421C>A* bila je značajno veća u skupini bolesnika s nuspojavama u odnosu na kontrolnu skupinu ($p=0.005$). Međutim, nije nađeno značajno odstupanje od Hardy –Weinbergove ravnoteže kako u ispitivanoj tako i u kontrolnoj skupini. U multivarijantnoj analizi varijantni haplotipovi *ABCG2* (CC i CA) pokazali su značajnu predikciju za nastanak nuspojava rosuvastatina ($p=0.01$; OR 2.65)

Varijantni alel *ABCG2 c.421C>A* (Gln141Lys; rs2231142) je jedan od najčešćih polimorfizama u *ABCG2* genu koji smanjuje izbacivačku/efluksnu aktivnost membranskog prijenosnika ABCG2. S obzirom da je rosuvastatin supstrat ABCG2, polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* može utjecati na njegovu farmakokinetiku i terapijsku učinkovitost. Većina studija koje su ispitivale povezanost farmakokinetike rosuvastatina s polimorfizmom *ABCG2 c.421C>A* uključivala je mali broj bolesnika što je rezultiralo različitim ishodima i zaključcima što ih je činilo neprikladnim za kliničku primjenu. Song i sur. su u metaanalizi 8 studija koje su uključivale 425 zdravih ispitanika pokazali da nositelji alela A iz polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* imaju 1.5 puta veću površinu ispod krivulje (PPK) i maksimalnu koncentraciju (C_{max}) ($p<0.0001$) rosuvastatina u odnosu na nositelje CC genotipa (107). Opažena je blaga razlika između bijelaca i Azijata koja nije statistički značajna ($p=0.61$ za PPK i 0.54 za C_{max}). U studiji Zhanga i sur. na 14 zdravih kineskih dobrovoljaca kojima su mjerene koncentracije rosuvastatina tijekom 72 sata nakon jedne doze od 20 mg rosuvastatina nositelji alela A imali su više vrijednosti u odnosu na nositelje CC genotipa (674 l/h naprema 384.7l/h) (118). Slične su rezultate objavili Liu (25) i sur. i Wan i sur. (115). Međutim, u radu Keskitala i sur. bubrežni klirens nije bio statistički značajno različit među *ABCG2* genotipovima iako je količina izlučenog rosuvastatina u 24-h urinu bila veća u nositelja AA genotipa nego u nositelja alela C (145). Zamjerka ovim studijama može biti što su ispitanici zdravi dobrovoljci. No, slični rezultati proizlaze i iz istraživanja koja se bave bolesnicima s hiperkolesterolemijom. De

Gorter i sur. su u skupini od 165 bolesnika na rosuvastatinu pokazali da nositelji alela *421 A* imaju više plazmatske koncentracije rosuvastatina od nositelja drugih genotipova ($p < 0.05$) (28).

Nekoliko studija se bavilo ne samo farmakokinetičkim parametrima nego i farmakološkom učinkovitošću rosuvastatina. Tako su Lee i sur. pokazali da se postotak promjena u koncentraciji LDL-C značajno razlikuje među *c.421C>A* genotipovima (*CC* u odnosu na *CA* i *AA* = -48.5: -55.1: -54.9; $p < 10^{-5}$) (27). Slično su objavili i Tomlinson i sur. i utvrdivši da se u nositelja *421 A* alela uz iste doze rosuvastatina značajnije smanjila koncentracija kolesterola (112).

Dokazano je da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* smanjuje ekspresiju u plazmatskoj membrani ili ATP-aznu aktivnosti prijenosnika *ABCG2*. To povećava apsorpciju rosuvastatina u crijevima i smanjuje njegovu eliminaciju iz jetre u bilijarni trakt. Tako je akumulacija lijeka u sistemske cirkulaciji potpomognuta s dva mehanizma.

Farmakogenetska ispitivanja među različitim etničkim skupinama pokazala su da neovisno o rasi u nositelja alela *421A* izloženost rosuvastatinu raste za 50%. Kako je učestalost tog alela veća u Azijata nego u bijelaca (0.29% naprema 0.15%) očekuje se u njih veća izloženost rosuvastatinu, a time i veća učestalost nuspojava. Zbog toga je Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) preporučila smanjenje doze rosuvastatina za Azijate.

Nedavno je CPIC na temelju sustavnih istraživanja objavio smjernice za mišićne nuspojave povezane sa statinima uključujući polimorfizam *ABCG2 c.421C>A*. Preporučena je početna doza rosuvastatina ≤ 20 mg za nositelje varijantnog alela *421 A* zbog veće izloženosti rosuvastatinu (78).

U našem istraživanju zastupljenost polimorfizama gena *SLCO1B1* bila je značajno veća u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu ($p < 0.001$), ali nije bilo značajnih odstupanja u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži ni u jednoj skupini. U multivarijantnom regresijskom modelu polimorfizmi

SLCO1B1 pokazuju značajnu prediktivnu vrijednost za nastanak nuspojava rosuvastatina (OR=2,58; $p<0.001$).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su polimorfizmi gena *SLCO1B1 c.521T>C* (rs4149056) povezani s povećanim rizikom od mišićnih nuspojava u bolesnika liječenih rosuvastatinom. Ta povezanost je prisutna i kada se razmatraju samo slučajevi mišićne toksičnosti (broj bolesnika s oštećenjem jetre je bio vrlo malen te nije adekvatan za statističku analizu). Stoga smo smatrali prikladnim ta dva neželjena učinka promatrati kumulativno jer se mogu smatrati konkurentskim događajima – u bolesnika koji razvija znakove miotoksičnosti, rosuvastatin je obustavljen ili mu je smanjena doza što bi moglo spriječiti razvoj kasnije hepatotoksičnosti i obrnuto. Razmatranje proturječnih podataka u vezi sa *SLCO1B1 c.521T>C* kao i nedostatak relevantnih podataka koji se odnose na *ABCG2 c.421C>A*, naši rezultati doprinose pojašnjenju pitanja o praktičnom značaju genetskih varijanti za sigurnost primjene rosuvastatina (25, 29, 104, 140). Međutim, njih treba promatrati imajući na umu ograničenja studije. Neki od ispitanika iz kontrolne skupine su možda bili pogrešno klasificirani – ocijenjeni su kao "kontrolne" u određenom vremenskom trenutku, ali je kasnije mogao razviti mišićnu/jetrenu leziju. Pokušali smo minimizirati ovu pristranost regrutiranjem kontrola koje je trebalo liječiti dulje od slučajeva koji su potaknuli njihovo uključivanje : 69,3% slučajeva bilo je izloženo rosuvastatinu do 3 mjeseca u trenutku nastanka neželjene nuspojave, a dodatnih 20,5% je identificirano tijekom 3 do 6 mjeseci liječenja. Najkraća izloženost u kontrolnoj skupini bila je 136 dana, dok je 75% bolesnika bilo liječeno duže od 200 dana. U studiji Akimota i sur. medijan vremena do mišićnih nuspojava u 413 prijavljenih slučajeva povezanih s rosuvastatinom bio je 30 dana, a 75. percentil bio je 92 dana; najdulje prijavljeno vrijeme do mišićnih štetnih događaja u ukupno 1437 slučajeva povezanih sa statinom bilo je 364 dana (146). M. Lehtisalo i sur. su proveli prospektivno cjelogenomsko istraživanje farmakokinetike

rosuvastatina u zdravih ispitanika koji su uzeli 1 dozu od 40 mg rosuvastatina (109). Rezultate su analizirali zajedno s 88 prethodno objavljenih cjelogenomskih studija. U metaanalizi spomenutih istraživanja zaključili su da je varijacija 1 nukleotida (SNV) *SLCO1B1* c. 521 T>C (rs4149056) povezana s povećanom površinom ispod krivulje koncentracije u plazmi-vrijeme i vršnom koncentracijom rosuvastatina u plazmi ($p=1,8 \times 10^{-12}$ i $p=3,2 \times 10^{-15}$). Analiza gena kandidata pokazala je povezanost *ABCG2* c.421 >A s povećanom površinom pod krivuljom PPK ($P=0,0079$), dok je *SLCO1B1* c.388A>G bio povezan sa smanjenom PPK rosuvastatina ($P=0,0041$). Na temelju genotipa *SLCO1B1* autori su stratificirali ispitanike u 5 funkcionalnih skupina OATP1B1 (spora, srednja, normalna, brza i ultrabrza). Fenotip spore funkcije OATP1B1 povezan je s 2.1 puta povećanom PPK rosuvastatina, dok je fenotip OATP1B1 izrazito povećane funkcije povezan s 44 % smanjenom PPK rosuvastatina. Genotip *ABCG2* c.421A/A rezultira s 2,2 puta povećanjem PPK rosuvastatina. Ovi podaci ukazuju na uloge *SLCO1B1* i *ABCG2* u farmakokinetici rosuvastatina. Genotipovi slabe funkcije *SLCO1B1* ili *ABCG2* mogu povećati rizik od miotoksičnosti izazvane rosuvastatinom. Bolesnicima s ovim genotipovima preporučuju se smanjene doze rosuvastatina.

Stoga, iznesena zapažanja opravdano podupiru zaključak da su istraživani polimorfizmi povezani s većom vjerojatnošću pojave mišićnih i jetrenih nuspojava jer povećavaju izloženost rosuvastatinu. Zanimljivo, uočene razlike u prevalenciji nositelja varijantnih alela *SLCO1B1* c.521T>C i *ABCG2* c.421C>A između naših ispitanika s nuspojavama i onih bez nuspojava (omjeri 1.56 i 1.74) su u suglasju s omjerima koncentracija 48-satne izloženosti rosuvastatinu 16 nositelja varijantnih alela u istraživanju Pasanena i sur. (53 ng*/h/ml naprema 34 ng*/h/ml; omjer 1.59 (za *SLCO1B1* c.521T>C) (147) i Kesitalo i sur. (95 ng*/h/ml naprema 62.3 ng*/h/ml; omjer 1.53 (za *ABCG2* c.421C>A) (145).

Do sada nije bilo izravnih dokaza da bi se propisivanje statina temeljeno na genotipizaciji odrazilo na adherenciju pacijenata i poboljšanje kardiovaskularnih ishoda ili sigurnosti statina iako se to čini logičnim načinom razmišljanja (148). Ovo može osobito vrijediti u slučajevima polifarmacije, gdje pojedinačno manje interakcije lijek-lijek ili lijek-gen u kombinaciji s jednim ili više polimorfizama mogu udruženo rezultirati klinički ozbiljnim nuspojavama (136).

U radovima Vrkić Kirhmajer i sur. i Božine i sur. opisani su slučajevi teške rabdomiolize (149) i izrazite hepatotoksičnosti (138) u bolesnika liječenih rosuvastatinom i popratnom terapijom koji nose inaktivirajuće alele gena koji kodiraju metaboličke enzime i/ili membranske transportere.

Ova studija dokazuje da genotipovi (*SLCO1B1 c.521T>C* i *ABCG2 c.421C>A*) utječu na farmakokinetiku rosuvastatina. Mehanizmi koji leže u pozadini učinaka su vjerojatne promjene u bioraspoloživosti rosuvastatina (*ABCG2*) i unosa rosuvastatina u jetru (*SLCO1B1*). Uzimanje ovih genotipova u obzir pri propisivanju rosuvastatina moglo bi pomoći u smanjenju nuspojava ovisnih o dozi kao što su miotoksičnost i osigurati učinkovitost terapije rosuvastatinom. Konkretno, bolesnici s genotipom *ABCG2*2/*2(421AA)* ili *SLCO1B1* koji predviđaju smanjenu funkciju OATP1B1 trebali bi izbjegavati visoke doze rosuvastatina jer njihova izloženost rosuvastatinu može biti više nego udvostručena.

Normalan raspon doza rosuvastatina je od 5 do 40 mg na dan. Obzirom da se rizik od mišićne toksičnosti povećava sa sistemskom koncentracijom rosuvastatina uzimanje u obzir genetske varijabilnosti u farmakokinetici rosuvastatina moglo bi pomoći u sprječavanju pojave miotoksičnosti. U bolesnika s genotipovima smanjene funkcije OATP1B1 ili *ABCG2* koncentracije rosuvastatina mogu biti dvostruko veće nego u onih koji nisu nositelji ovih varijanti. Stoga bi preporuka bila koristiti početnu dozu rosuvastatina nižu od normalne i izbjegavati uobičajenu maksimalnu dozu od 40 mg u ovih bolesnika.

To neizravno potvrđuju i rezultati našeg istraživanja. U skupini s nuspojavama 94/95 bolesnika uzimalo je ≤ 20 mg rosuvastatina, a samo jedan je uzimao 40 mg, dok je u skupini bez nuspojava maksimalnu dozu od 40 mg uzimalo 27/125 ispitanika. Imajući u vidu da su naši bolesnici s nuspojavama rosuvastatina često bili nositelji rizičnih genotipova možemo zaključiti da su mutacije gena *ABCG2*, *SLCO1B1* i *CYP2C9* s posljedično smanjenom funkcijom odgovarajućih transportnih proteina i metaboličkog enzima povezane s nuspojavama. Intervencijsko istraživanje koje procijenjuje ispitivanje rosuvastatina (JUPITER) nije dokazalo povezanost između genotipova *SLCO1B1* i stope kliničke mijalgije u bolesnika koji su primali 20 mg rosuvastatina dnevno (150). Stoga bi maksimalna dnevna doza od 20 mg rosuvastatina mogla biti siguran izbor za bolesnika s rizičnim/varijantnim genotipovima *OATP1B1* ili *ABCG2*.

U zaključku, ova studija potvrđuje rezultate drugih autora da su polimorfizmi koji uzrokuju smanjenu funkciju membranskih prijenosnika *OATP1B1* (*SLCO1B1 c.521T>C*) i *ABCG2* (*ABCG2 c.421C>A*), povezani s povećanom izloženošću rosuvastatinu, a time i povećanom riziku od miotoksičnosti/hepatotoksičnosti.

6.4. Ograničenja studije

U našem istraživanju uključen je mali broj bolesnika koji su razvili jetrene nuspojave. U samo sedam bolesnika nađena je lezija jetre (7.36%), a u jednog (1.2%) bolesnika istodobno je zabilježena jetrena i mišićna lezija. Broj tih slučajeva je bio premali za adekvatnu statističku analizu.

Neki od ispitanika iz kontrolne skupine su možda bili pogrešno klasificirani – ocijenjeni su kao "kontrole" u određenom vremenskom trenutku, ali su kasnije mogli razviti mišićnu/jetrenu leziju.

Pokušali smo minimizirati ovu pristranost regrutiranjem kontrola koje je trebalo liječiti dulje od slučajeva koji su potaknuli njihovo uključivanje: 69,3% slučajeva bilo je izloženo rosuvastatinu do 3 mjeseca u trenutku nastanka neželjene nuspojave, a dodatnih 20,5% je identificirano tijekom 3 do 6 mjeseci liječenja. Najkraća izloženost u kontrolnoj skupini bila je 136 dana, dok je 75% bolesnika bilo liječeno duže od 200 dana.

6.5. Značaj rezultata

Rezultati našeg istraživanja pokazuju značajnu učestalost polimorfizama ispitivanih gena koji nose rizik od nastanka nuspojave rosuvastatina. Prevalencija mutiranih varijanti gena *ABCG2* 421C>A u populaciji od 220 naših ispitanika bila je 18.6% (16.8% nositelja 421 C/A i 1.8% nositelja 421 A/A) što je u suglasju s rezultatima Božine i sur. na 905 hrvatskih ispitanika koji nalaze 17.8% nositelja varijantnog genotipa *ABCG2* 421 C/A i 0.8% varijantnog genotipa *ABCG2* 421 A/A (137).

Učestalost varijantnog alela *ABCG2* 421A bila je 10.2% u naših ispitanika, a inače se u bjelačkoj populaciji kreće između 6.1% i 15%. Češća je u Latinoamerikanaca (23%), a najčešća u Azijata (30%).

Podudarna je i učestalost polimorfizama gena *SLCO1B1* c.521 T>C. U našem istraživanju 39.1% ispitanika su bili nositelji 521 T/C genotipa, a 6.4% nositelji 521 C/C genotipa. U prethodno spomenutoj studiji Božine i sur. 34.8% su nositelji genotipa 521 T/C i 3.5% nositelji genotipa 521 C/C (137).

Učestalost varijantnog alela *SLCO1B1* 521C u našem istraživanju bila je 25.5% što je malo više nego u studiji Božine i sur. (20.9%). I drugi europski autori izvještavaju slične podatke.

Naša studija je prva studija koja je ispitala učinak i pokazala da postoji značajan utjecaj varijantnih genotipova gena *CYP2C9* na nastanak nuspojava rosuvastatina. Nositelji alela *CYP2C9**3 imaju veći rizik od nuspojava nego nositelji *CYP2C9**2 jer alel *2 nosi smanjenu funkciju enzima, a alel *3 izrazito smanjenu ili odsutnu funkciju enzima. Posebno su rizični nositelji 2 nefunkcionalna alela *3*3 jer genotip *CYP2C9**3/*3 smanjuje aktivnost enzima na samo 10% aktivnosti „divljeg“ genotipa *CYP2C9**1/*1. Rizik od nastanka nuspojava rosuvastatina u naših bolesnika je 2.4 puta veći u nositelja mutiranih varijanti gena *CYP2C9* u odnosu na nositelje „divljeg“ gena.

Do sada nije bilo izravnih dokaza da bi se propisivanje statina temeljeno na genotipizaciji odrazilo na adherenciju pacijenata i poboljšanje kardiovaskularnih ishoda ili sigurnosti statina (148). Ovo može osobito vrijediti u slučajevima polifarmacije, gdje pojedinačno manje interakcije lijek-lijek ili lijek-gen u kombinaciji s jednim ili više polimorfizama mogu udruženo rezultirati klinički ozbiljnim nuspojavama (136, 151).

7. ZAKLJUČCI

1. Ova studija pokazuje značaj farmakogenetičkog testiranja u predviđanju nastanka nuspojava rosuvastatina. Dokazali smo da nositelji varijantnih gena *CYP2C9* te *ABCG2* i *SLCO1B1* koji kodiraju metabolički enzim *CYP2C9* kao i membranske prijenosnike *ABCG2* i *OATP1B1* imaju farmakogenetičku predispoziciju za nastanak nuspojava rosuvastatina.
2. Većina nuspojava odnosi se na miotoksičnost, ali je pokazan i značaj farmakogenetičkog ispitivanja u predviđaju hepatotoksičnosti.
3. Rizik za nastanak nuspojava rosuvastatina u nositelja alela *CYP2C9**2*3 veći je 2.42 puta u odnosu na nositelje normalnog (divljeg) gena.
4. Rizik za nastanak nuspojava rosuvastatina u nositelja varijante gena *ABCG2* veći je 2.65 puta u odnosu na nositelje normalnog (divljeg) gena.
5. Rizik za nastanak nuspojava rosuvastatina u nositelja varijantnog gena *SLCO1B1* veći je 2.58 puta u odnosu na nositelje normalnog (divljeg) gena.
6. Nije dokazan utjecaj dobi, spola kao ni interakcije lijek-lijek-gen na nastanak nuspojava rosuvastatina.
7. Naše istraživanje potvrđuje preporuke drugih autora da u nositelja rizičnih genotipova doza rosuvastatina treba biti ≤ 20 mg .

8. SAŽETAK

NASLOV: Uloga polimorfizma gena *ABCG2*, *ABCB1* i *SLCO1B1* u nastanku štetnih učinaka rosuvastatina

AUTOR: Ivana Radman, 2024.

UVOD: Inhibitori 3-hidroksi-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) reduktaze, statini, učinkoviti su lijekovi za snižavanje kolesterola u krvi i prevenciji kardiovaskularnih događaja. U brojnim je izvješćima potvrđeno da statini imaju dobar sigurnosni profil, no ipak se u manjeg broja bolesnika javlja neka od nuspojava.

CILJ: Naša studija je imala za cilj procijeniti utjecaj genskih polimorfizama membranskih prijenosnika *SLCO1B1*, *ABCB1* i *ABCG2* te metaboličkih enzima *CYP2C9* i *CYP2C19* na pojavu miotoksičnosti i hepatotoksičnosti povezane s rosuvastatinom.

METODE: U razdoblju od dvije godine u studiju je konsektivno uključeno 220 bolesnika na terapiji rosuvastatinom od kojih su 95 razvili nuspojave (88 bolesnika mišićne, 6 jetrene i 1 obje), a 125 bolesnika bez nuspojava su poslužili kao kontrola. U multivarijatnom regresijskom modelu analizirane su prediktorske varijable definirane u hipotezi i ciljevima (polimorfizmi gena *SLCO1B1*, *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* te razina interakcije lijek-lijek-gen), a koje su u prethodnim bivarijatnim analizama pokazivale razinu značajnosti $P < 0,200$.

REZULTATI: Naši rezultati povezuju varijante rizičnih gena s nastankom nuspojava rosuvastatina: *SLCO1B1* c.521 C>A (OR=2,52; 95% CI=1,42-4,48; $P=0,002$); *ABCG2* c.421C>A (OR=2,68; 95% CI=1,28-5,60; $P=0,008$) i *CYP2C9**2*3 (OR=2,40; 95% CI=1,15-5,00; $P=0,019$).

Naša studija je prva studija koja je pokazala da postoji značajan utjecaj varijantnih genotipova gena *CYP2C9* na pojavu miotoksičnosti rosuvastatina.

ZAKLJUČAK: Polimorfizam gubitka funkcije u genima *SLCO1B1* c.521T>C, *ABCG2* c.421C>A i *CYP2C9**2*3 povezan je s nastankom nuspojava rosuvastatina.

KLJUČNE RIJEČI: rosuvastatin, nuspojave, miotoksičnost, hepatotoksičnost, polimorfizam, *ABCB1* c.3435C>T, *ABCG2* c.421C>A, *SLCO1B1* c.521T>C

9. SUMMARY

TITLE: The role of polymorphism genes ABCG2, ABCB1 and SLCO1B1 in predicting the side effects of rosuvastatin

AUTHOR: Ivana Radman, 2024.

INTRODUCTION: 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase inhibitors, statins, are effective drugs for blood cholesterol lowering and preventing of cardiovascular events. Numerous reports have confirmed that statins have a good safety profile, but some of the side effects occur in a small number of patients.

OBJECTIVE: Our study aimed to evaluate the influence of gene polymorphisms of membrane transporters SLCO1B1, ABCB1 and ABCG2 and metabolic enzymes CYP2C9 and CYP2C19 on the occurrence of rosuvastatin-related myotoxicity and hepatotoxicity.

METHODS: In a period of two years, 220 patients on rosuvastatin therapy were consecutively included in the study, of which 95 developed side effects (88 muscular, 6 hepatic, and 1 both), and 125 patients without side effects served as controls. In the multivariate regression model, the predictor variables defined by the hypotheses and goals (polymorphisms of the *SLCO1B1*, ABCB1, *ABCG2*, *CYP2C9*, *CYP2C19* genes and the drug-drug-gene interaction) were analyzed, which in previous bivariate analyzes showed a significance level of $P < 0.200$.

RESULTS: Our results associate risk gene variants with the occurrence of rosuvastatin side effects: *SLCO1B1* c.521 C>A (OR=2.52; 95% CI=1.42-4.48; P=0.002); *ABCG2* c.421C>A (OR=2.68; 95% CI=1.28-5.60; P=0.008) and *CYP2C9**2*3 (OR=2.40; 95% CI=1.15- 5.00; P=0.019). Our study is the first study that showed a significant influence of variant genotypes of the *CYP2C9* gene on the occurrence of rosuvastatin myotoxicity.

CONCLUSION: Loss-of-function polymorphisms in *SLCO1B1* c.521T>C, *ABCG2* c.421C>A and *CYP2C9**2*3 genes are associated with rosuvastatin side effects.

KEYWORDS: rosuvastatin, side effects, myotoxicity, hepatotoxicity, polymorphism, *ABCB1* c.3435C>T, *ABCG2* c.421C>A, *SLCO1B1* c.521T>C.

10. LITERATURA

1. Stone NJ, Robinson JG, Lichtenstein AH, Bairey Merz CN, Blum CB, Eckel RH i sur. 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129:(25 Suppl. 2);1–45.
2. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Chapman MJ i sur. 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidemias: lipid modifications reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J*. 2020;41(1):111-188.
3. Mancini GB, Baker S, Bergeron J i sur. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference. *Can J Cardiol*. 2011; 27(5): 635–662.
4. Nichols GA, Koro CE. Does Statin Therapy Initiation Increase the Risk for Myopathy? An Observational Study of 32,225 Diabetic and Nondiabetic Patients. *Clin Ther*. 2007; 29(8):1761–1770.
5. McKenney JM, Davidson MH, Jacobson TA, Guyton JR. Final conclusions and recommendations of the National Lipid Association Statin Safety Assessment Task Force. *Am J Cardiol* 2006;97(8A):89C-94C.
6. Chatzizisis YS, Koskinas KC, Misirli G, Vaklavas C, Hatzitolios A, Giannoglou GD. Risk factors and drug interactions predisposing to statin-induced myopathy: implications for risk assessment, prevention and treatment. *Drug Saf*. 2010;33(3): 171–187.

7. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drug: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2006; 80(6): 565–581.
8. Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, i sur. Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation.* 2004;24(8):227–39.
9. Reiner Z. Resistance and intolerance to statins. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24(10):1057-1066.
10. Baigent C, Blackwell L, Emberson J, Holland LE, Reith C, Bhala N, i sur. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials. *Lancet.* 2010;376(9753):1670-81.
11. Alfirevic A., Neely D., Armitage J., Chinoy H., Cooper R.G., Laaksonen R, i sur. Phenotype standardization for statin-induced myotoxicity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(4):470–476.
12. Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, i sur. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet.* 2016;388(10059):2535-61.
13. Božina N, Ganoci L, Šimičević L, Mirošević Skvrce N, Božina T, Macolić Šarinić V. Farmakogenomika - bitna karika personalizirane medicine. U: Molekularna genetika – novosti u dijagnostici i terapiji. Sertić J, Gamulin S, Sedlić F. ur. Zagreb: Medicinska naklada; 2018. str. 87-103.
14. Feng Q, Wilke RA, Baye TM. Individualized risk for statin-induced myopathy: current knowledge, emerging challenges and potential solutions. *Pharmacogenomics.* 2012;13(5):579-94.
15. Alfonsi JE, Hegele RA, Gryn SE. Pharmacogenetics of Lipid-Lowering Agents: Precision or Indecision Medicine? *Curr Atheroscler Rep.* 2016;18(5):24.

16. Puccetti L, Ciani F, Auteri A. Genetic involvement in statins induced myopathy. Preliminary data from an observational case-control study. *Atherosclerosis*.2010; 211(1): 28-29.
17. Brunham LR, Lansberg PJ, Zhang L, Miao F, Carter C, Hovingh GK, i sur. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy associated with simvastatin and atorvastatin. *Pharmacogenomics J*. 2012;12(3):233–237.
18. SEARCH Collaborative Group. Link E, Parish S, Armitage J, Bowman L, Heath S, Matsuda F, i sur. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy--a genomewide study. *N Engl J Med*. 2008; 359(8):789–799.
19. Voora D, Shah SH, Spasojevic I, Ali S, Reed CR, Salisbury BA, i sur. The SLCO1B1*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am Coll Cardiol*. 2009; 54(17):1609–1616.
20. Canestaro WJ, Austin MA, Thummel KE. Genetic factors affecting statin concentrations and subsequent myopathy: a HuGENet systematic review. *Genet Med*. 2014;16(11):810-9.
21. Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvoneni PJ, Niemi M. ABCB1 haplotypes differentially affect the pharmacokinetics of the acid and lactone forms of simvastatin and atorvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;84(4):457-61.
22. Mirošević Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolić Šarinic V. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics*. 2013;14(12):1419-31.
23. Mirošević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Muačević Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics*. 2015;16(8):803-15.

24. Liu M, Wu XJ, Zhao GL, Zhang T, Xu SS, Sun YX, i sur. Effects of Polymorphisms in NR1H4, NR1I2, SLCO1B1, and ABCG2 on the Pharmacokinetics of Rosuvastatin in Healthy Chinese Volunteers. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2016;68(5):383-390.
25. Liu JE, Liu XY, Chen S, Zhang Y, Cai LY, Yang M, i sur. SLCO1B1 521T > C polymorphism associated with rosuvastatin-induced myotoxicity in Chinese coronary artery disease patients: a nested case-control study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2017; 73(11):1409-1416.
26. Birmingham BK, Bujac SR, Elsby R, Azumaya CT, Zalikowski J, Chen Y, i sur. Rosuvastatin pharmacokinetics and pharmacogenetics in Caucasian and Asian subjects residing in the United States. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71(3):329-40.
27. Lee HK, Hu M, Lui SSh, Ho CS, Wong CK, Tomlinson B. Effects of polymorphisms in ABCG2, SLCO1B1, SLC10A1 and CYP2C9/19 on plasma concentrations of rosuvastatin and lipid response in Chinese patients. *Pharmacogenomics.* 2013;14(11):1283-94.
28. DeGorter MK, Tirona RG, Schwarz UI, Choi YH, Dresser GK, Suskin N, i sur. Clinical and pharmacogenetic predictors of circulating atorvastatin and rosuvastatin concentrations in routine clinical care. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(4):400-8.
29. Danik JS, Chasman DI, MacFadyen JG, Nyberg F, Barratt BJ, Ridker PM. Lack of association between SLCO1B1 polymorphisms and clinical myalgia following rosuvastatin therapy. *Am Heart J.* 2013;165(6):1008-14.
30. Zhou Q, Ruan ZR, Yuan H, Xu DH, Zeng S. ABCB1 gene polymorphisms, ABCB1 haplotypes and ABCG2 c.421c > A are determinants of inter-subject variability in rosuvastatin pharmacokinetics. *Pharmazie.* 2013;68(2):129-34.
31. Marusic S, Lisicic A, Horvatic I, Bacic-Vrca V, Bozina N. Atorvastatin-related rhabdomyolysis and acute renal failure in a genetically predisposed patient with potential drug-drug interaction. *Int J Clin Pharm.* 2012;34(6):825-7.

32. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990;343(6257):425-430.
33. Fulcher J, Mihaylova B, O'Connell R, Emberson J, Blackwell L, Reith C, et al. Efficacy and safety of statin therapy in older people: a meta-analysis of individual participant data from 28 randomised controlled trials. *Lancet*. 2019;393(10170):407-415.
34. Barylski M, Nikfar S, Mikhailidis DP, Toth PP, Salari P, Ray KK, et al. Statins decrease all-cause mortality only in CKD patients not requiring dialysis therapy: A meta-analysis of 11 randomized controlled trials involving 21,295 participants. *Pharmacol Res*. 2013;72:35-44.
35. Kaysen GA. Lipid-lowering therapy in CKD: Should we use it and in which patients. *Blood Purif*. 2017;43(1-3):196-199.
36. Tonelli M, Wanner C, Kidney Disease: Improving Global Outcomes Lipid Guideline Development Work Group Members. Lipid management in chronic kidney disease: Synopsis of the kidney disease: Improving global outcomes 2013 clinical practice guidelines. *Ann Intern Med*. 2014;160(3):182.
37. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:89-118.
38. Kavalipati N, Shah J, Ramakrishnan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. *Ind J Endocrinol Metabol*. 2015;19(5):554-62.
39. Murphy, C.; Deplazes, E.; Cranfield, C.G.; Garcia, A. The Role of Structure and Biophysical Properties in the Pleiotropic Effects of Statins. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22): 8745.
40. Agarwal V, Phung OJ, Tongbram V, Bhardwaj A, Coleman CI. Statin use and the prevention of venous thromboembolism: A meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2010;64(10):1375-83.
41. Fedson DS. Pandemic influenza: A potential role for statins in treatment and prophylaxis. *Clin Infect Dis*. 2006;43(2):199-205.

42. Bifulco M, Malfitano AM, Marasco G. Potential therapeutic role of statins in neurological disorders. *Exp Rev Neurother*. 2008;8(5):827-37.
43. Deedwania P, Barter P, Carmena R, Fruchart JC, Grundy SM, Haffner S, et al. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol in patients with coronary heart disease and metabolic syndrome: Analysis of the Treating to New targets study. *Lancet*. 2006;368 (9539):919–28.
44. Trialists, C.T. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta analysis of data from 170.000 participants in 26 randomised trials. *Lancet*. 2010; 376(9539): 1670-1681.
45. Kapur NK, Musunuru K. Clinical efficacy and safety of statins in managing cardiovascular risk. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(2):341-53.
46. Weng TC, Yang YH, Lin SJ, Tai SH. A systematic review and meta-analysis on the therapeutic equivalence of statins. *J Clin Pharm Ther*. 2010;35(2):139-51.
47. Rabar S, Harker M, O’Flynn N, Wierzbicki AS. Lipid modification and cardiovascular risk assessment for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Summary of updated NICE guidance. *BMJ*. 2014; 349:g4356.
48. Naci H, Brugts J, Ades T. Comparative tolerability and harms of individual statins: A study-level network meta-analysis of 246,955 participants from 135 randomized, controlled trials. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2013;6(4):390-9.
49. Karlson BW, Palmer MK, Nicholls SJ, Lundman P, Barter PJ. Doses of rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin that induce equal reductions in LDL-C and non-HDL-C: Results from the VOYAGER meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol*. 2016;23(7):744-7.
50. Schuster H. The GALAXY Program: an update on studies investigating efficacy and tolerability of rosuvastatin for reducing cardiovascular risk. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2007;5(2):177-93.

51. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA*. 2003;289(13):1681-90.
52. Law M, Rudnicka AR. Statin safety: A systematic review. *Am J Cardiol*. 2006;97(8A):52C-60C.
53. Sathasivam S, Lecky B. Statin induced myopathy. *BMJ*. 2008;337(7679):a2286
54. Sathasivam S. Statin induced myotoxicity. *Eur J Intern Med*. 2012;23(4):317-4.
55. Abd TT, Jacobson TA. Statin induced myopathy: A review and update. *Expert Opin Drug Saf*. 2011;10(3):373-87.
56. Maji D, Shaikh S, Solanki D, Gaurav K. Safety of statins. *Indian J Endocrinol Metab*. 2013;17(4):636-46.
57. Pasternak RC, Smith SC, Bairey-Merz CN, Grundy SM, Cleeman JI, Lenfant C. ACC/AHA/NHLBI clinical advisory on the use and safety of statins. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40(3):567-72
58. Stroes ES, Thompson PD, Corsini A, Vladutiu GD, Raal FJ, Ray KK, et al. Statin associated muscle symptoms: impact on statin therapy-European Atherosclerosis Society Consensus panel statement on assessment, aetiology and management. *Eur Heart J*. 2015;36(17):1012-22.
59. Grundy SM, Stone NJ, Bailey AL, Beam C, Birtcher KK, Blumenthal, et al. 2018 AHA/ACC/AACVPR/AAPA/ABC/ACPM/ADA/AGS/APhA/ASPC/NLA guideline on the management of blood cholesterol: A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. *Circulation*. 2019;139(25):e1082-e1143.

60. Zhou Z, Albarqouni L, Breslin M, Curtes AJ, Nelson M. Statin-associated muscle symptoms (SAMS) in primary prevention for cardiovascular disease in older adults: A protocol for a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ open*. 2017;7(9):e017587.
61. Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, *i sur*. Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet*. 2016;388(10059):2535-61.
62. Mancini GB, Tashakkor AY, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, *i sur*. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: Canadian Working Group Consensus update. *Can J Cardiol*. 2013;29(12):1553-68.
63. Rosenson RS, Baker SK, Jacobson TA, Kopecky SL, Parker BA. An assessment by the statin muscle safety task force: 2014 update. *J Clin Lipidol*. 2014;8(3 Suppl):S58-71.
64. Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, Andrade SE, Schech SD, La Grenade L *i sur*. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA*. 2004;292(21):2585-90.
65. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, *i sur*. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005; 366(9493):1267-1278.
66. Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, *i sur*. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet*. 2006; 368(9542):1155-1163.
67. Zhou Z, Albarqouni L, Curtis AJ, Breslin M, Nelson M. The Safety and Tolerability of Statin Therapy in Primary Prevention in Older Adults: A Systematic Review and Meta-analysis. *Drugs Aging*. 2020;37(3):175-185.

68. Vinci P, Panizon E, Tosoni LM, Cerrato C, Pellicori, Mearelli F, i sur. Statin-Associated Myopathy: Emphasis on Mechanisms and Targeted Therapy. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21):11687.
69. Mohaupt MG, Karas RH, Babiychuk EB, Sanchez-Freire V, Monastyrskaya K, Lyer L, i sur. Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ.* 2009;181(1-2):E11-8.
70. Olsson S, Harrison-Woolrych M. The role and strategy of ISoP in global pharmacovigilance. *Int J Clin Pharm.* 2018;40(4):740-743. !!!
71. Postigo R, Brosch S, Slattery J, van Haren A, DognéJM, Kurz X, i sur. EudraVigilance Medicines Safety Database: Publicly Accessible Data for Research and Public Health Protection. *Drug Saf.* 2018;41(7):665-675.
72. Judith Cerda Ineta. Pharmacogenetics in Statin Use (disertacija) Msida: Sveučilište na Malti, Farmaceutski fakultet; 2019.
73. Macolić Šarinić V. Nuspojave lijekova i medicinskih proizvoda. U: Igor Francetić, Ksenija Makar-Aušperger, Željko Reiner, ur. Farmakoterapijski priručnik 7. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2015. Str. 10-19.
74. Gutierrez-Pizarraya A, Fernández-FuertesM, Morillo-Verdugo R, Trigo M, Real LM, Pineda JA. High rate of major drug-drug interactions of lopinavir-ritonavir for COVID-19 treatment. *Sci Rep.* 2020;10(1):20958.
75. Danielak D, Karaźniewicz-Łada M, Główska F. Assessment of the Risk of Rhabdomyolysis and Myopathy During Concomitant Treatment with Ticagrelor and Statins. *Drugs.* 2018 ;78(11):1105-1112.

76. Roule V, Alexandre J, Lemaitre A, Chrétien B, Sassier M, Fedrizzi S, Beygui F, Dolladille C. Rhabdomyolysis with Co-Administration of Statins and Antiplatelet Therapies-Analysis of the WHO Pharmacovigilance Database. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2023 Apr 28. doi: 10.1007/s10557-023-07459-8. Epub ahead of print. PMID: 37115431.
77. Lehtisalo M, Keskitalo JE, Tornio A, Lapatto-Reiniluoto O, Deng F, Jaatinen T, i sur. Febuxostat, But Not Allopurinol, Markedly Raises the Plasma Concentrations of the Breast Cancer Resistance Protein Substrate Rosuvastatin. *Clin Transl Sci.* 2020;13(6):1236-1243.
78. Cooper-DeHoff RM, Niemi M, Ramsey LB, Luzum JA, Tarkiainen EK, Straka RJ i sur. The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guideline for SLCO1B1, ABCG2, and CYP2C9 genotypes and Statin-Associated Musculoskeletal Symptoms. *Clin Pharmacol Ther.* 2022;111(5):1007-1021.
79. Olsson, A.G., McTaggart, F, Raza, A. Rosuvastatin: a highly effective new HMG-CoA reductase inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev.*2002; 20(4): 303–328.
80. Bowman CM, Ma F, Mao J, Chen Y. Examination of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models of Rosuvastatin. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2021; 10(1):5-17.
81. Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Brindley C, Short T. Absolute oral bioavailability of rosuvastatin in healthy white adult male volunteers. *Clin Ther.* 2003; 25(10):2553–2563.
82. Cooper KJ, Martin PD, Dane AL, Warwick MJ, Raza A, Schneck DW. Lack of effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2003;55(1):94-99.
83. Cooper KJ, Martin PD, Dane AL, Warwick MJ, Cantarini, MV. The effect of fluconazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002;58(8):527-536.

84. Cooper KJ, Martin PD, Dane AL, Warwick MJ, Schneck DW, Cantarini MV. Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73(4):322-329.
85. Simonson SG, Martin PD, Mitchell P, Schneck DW, Lasseter KC, Warwick MJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosuvastatin in subjects with hepatic impairment. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003;58(10):669-675.
86. Marais AD, Raal FJ, Stein EA, Rader DJ, Blasetto J, Palmer M, i sur. A dose-titration and comparative study of rosuvastatin and atorvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis.* 2008;197(1):400-6.
87. Jones PH, Hunninghake DB, Ferdinand KC, Stein EA, Gold A, Caplan RJ, i sur. Statin Therapies for Elevated Lipid Levels Compared Across Doses to Rosuvastatin Study Group. Effects of rosuvastatin versus atorvastatin, simvastatin, and pravastatin on non-high-density lipoprotein cholesterol, apolipoproteins, and lipid ratios in patients with hypercholesterolemia: additional results from the STELLAR trial. *Clin Ther.* 2004;26(9):1388-99.
88. Davidson MH. Rosuvastatin: a highly efficacious statin for the treatment of dyslipidaemia, *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(3):125-141.
89. Rosenson RS. Rosuvastatin: a new inhibitor of HMG-coA reductase for the treatment of dyslipidemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003;1(4):495-505.
90. Turner RM, Pirmohamed M. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *J Clin Med.* 2019;9(1):22.

91. Wang RW, Kari PH, Lu AY, Thomas PE, Guengerich FP, Vyas KP. Biotransformation of lovastatin. IV. Identification of cytochrome P450 3A proteins as the major enzymes responsible for the oxidative metabolism of lovastatin in rat and human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1991; 290(2): 355-61.
92. Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, i sur. In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(10): 1191-9.
93. Lennernäs H, Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(13): 1141-60.
94. White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42(9): 963-70.
95. Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJG, Agundez JAG. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2001; 57(1): 47-49.
96. Božina N, Granić P, Lalić Z. Tramišak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian Population. *Croat Med J.* 2003;44(4): 425-428.
97. Van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics.* 2001; 11(4): 287-91.
98. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(3):317-23.

99. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(16):1295-302.
100. Van Asperen J, van Tellingen O, Beijnen JH. The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol Res.* 1998; 37(6): 429-35
101. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, i sur. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011;21(3):152-61.
102. Su J, Xu H, Yang J, Yu Q, Yang S, Zhang J, i sur. ABCB1 C3435T polymorphism and the lipid-lowering response in hypercholesterolemic patients on statins: a meta-analysis. *Lipids Health Dis.* 2015;14:122.
103. Hoenig MR, Walker PJ, Gurnsey C, Beadle K, Johnson L. The C3435T polymorphism in ABCB1 influences atorvastatin efficacy and muscle symptoms in a high-risk vascular cohort. *J Clin Lipidol.* 2011;5(2):91–96.
104. Ferrari M, Guasti L, Maresca A, Mirabile M, Contini S, Grandi AM, i sur. Association between statin-induced creatine kinase elevation and genetic polymorphisms in SLCO1B1, ABCB1 and ABCG2. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70(5):539–547.
105. Becker ML, Visser LE, van Schaik RH, Hofman A, Uitterlinden AG, Stricker BH. Influence of genetic variation in CYP3A4 and ABCB1 on dose decrease or switching during simvastatin and atorvastatin therapy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2010;19(1):75-81.
106. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, i sur. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(5):551– 558.

107. Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M i sur. ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61(1): 3–13.
108. Keskitalo JE, Pasanen MK, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of the ABCG2 c.421C>A single nucleotide polymorphism on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, and simvastatin. *Pharmacogenomics.* 2009; 10(10), 1617–1624.
109. Lehtisalo M, Taskinen S, Tarkiainen EK, Neuvonen M, Viinamäki J, Paile-Hyvärinen M, i sur. A comprehensive pharmacogenomic study indicates roles for SLCO1B1, ABCG2 and SLCO2B1 in rosuvastatin pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol.* 2023;89(1):242-252.
110. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, i sur. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm Res.* 2009;26(2):469-79.
111. Fohner AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for ABCG2. *Pharmacogenet Genomics.* 2017;27(11):420-427. Erratum in: *Pharmacogenet Genomics.* 2018;28(5):138.
112. Tomlinson B, Hu M, Lee VW, Lui SS, Chu TT, Poon EW, i sur. ABCG2 polymorphism is associated with the low-density lipoprotein cholesterol response to rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(5):558-62.
113. Hall AS, Jackson BM, Farrin AJ, Efthymiou M, Barth JH, Copeland J, i sur. SPACE ROCKET Trial Group. A randomized, controlled trial of simvastatin versus rosuvastatin in patients with acute myocardial infarction: the Secondary Prevention of Acute Coronary Events--Reduction of Cholesterol to Key European Targets Trial. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2009;16(6):712-21.

114. Hu M, Lui SS, Mak VW, Chu TT, Lee VW, Poon EW, i sur. Pharmacogenetic analysis of lipid responses to rosuvastatin in Chinese patients. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(10):634-7.
115. Wan Z, Wang G, Li T, Xu B, Pei Q, Peng Y, i sur. Marked Alteration of Rosuvastatin Pharmacokinetics in Healthy Chinese with ABCG2 34G>A and 421C>A Homozygote or Compound Heterozygote. *J Pharmacol Exp Ther*. 2015;354(3):310-315.
116. Wu HF, Hristeva N, Chang J, Liang X, Li R, Frassetto L, i sur. Rosuvastatin Pharmacokinetics in Asian and White Subjects Wild Type for Both OATP1B1 and BCRP Under Control and Inhibited Conditions. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2751-2757.
117. Song Y, Lim HH, Yee J, Yoon HY, Gwak HS. The Association between ABCG2 421C>A (rs2231142) Polymorphism and Rosuvastatin Pharmacokinetics: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmaceutics*. 2022;14(3):501.
118. Zhang W, Yu BN, He YJ, Fan L, Li Q, Liu ZQ, i sur. Role of BCRP 421C>A polymorphism on rosuvastatin pharmacokinetics in healthy Chinese males. *Clin Chim Acta*. 2006;373(1-2):99-103.
119. Turner RM, Pirmohamed M. Statin-Related Myotoxicity: A Comprehensive Review of Pharmacokinetic, Pharmacogenomic and Muscle Components. *J Clin Med*. 2019;9(1):22.
120. Sivkov A, Chernus N, Gorenkov R, Sivkov S, Sivkova S, Savina T. Relationship between genetic polymorphism of drug transporters and the efficacy of Rosuvastatin, atorvastatin and simvastatin in patients with hyperlipidemia. *Lipids Health Dis*. 2021;20(1):157. !!!!!
121. Xiang Q, Chen SQ, Ma LY, Hu K, Zhang Z, Mu GY, i sur. Association between SLCO1B1 T521C polymorphism and risk of statin-induced myopathy: a meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(6):721-729.

122. Postmus I, Trompet S, Deshmukh HA, Barnes MR, Li X, Warren HR, i sur. Pharmacogenetic meta-analysis of genome-wide association studies of LDL cholesterol response to statins. *Nat Commun.* 2014;5: Oct 28;5:5068. doi: 10.1038/ncomms6068.
123. Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG, Maxwell WD, McLeod HL, Voora D, i sur. The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(1):112–117.
124. Ramsey LB, Johnson SG, Caudle KE, Haidar CE, Voora D, Wilke RA, i sur. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(4):423-8.
125. Karch FE, Lasagna L. Adverse drug reactions. A critical review. *JAMA.* 1975;234(12):1236-1241.
126. Danan G, Teschke R. RUCAM in Drug and Herb Induced Liver Injury: *Int J Mol Sci.* 2015;17(1):14.
127. ICH E2A guideline: note for guidance on clinical safety data management: definitions and standards for expedited reporting. In: CPMP/ICH/377/95. European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), London, UK, 1–10 (1995).
128. Council for International Organizations of Medical Sciences. Current Challenges in Pharmacovigilance: Pragmatic Approaches. Report of CIOMS Working Group V. CIOMS, Geneva, Switzerland (2001).
129. Aithal GP, Watkins PB, Andrade RJ, Larrey D, Molokhia M, Takikawa H, i sur., Case definition and phenotype standardization in drug-induced liver injury. *Clin Pharmacol Ther.* 2011; 89(6): 806–815.
130. Baxter K. Stockley's drug interactions. Pharmaceutical Press, London, UK. www.medicinescomplete.com

131. Robey RW, Ierano C, Zhan Z, Bates SE. The challenge of exploiting ABCG2 in the clinic. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011; 12(4): 595–608.
132. Applied Biosystems , TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol, 2010
133. Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O i sur. Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Anal Biochem.* 2004; 334(1);201-3.
134. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM i sur. MDR1 polymorphisms G2677T in exon 21 and C3435T in exon 26 fail to affect rhodamine 123 efflux in peripheral blood lymphocytes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2003;17(4):463-9.
135. Ranganathan P, Pramesh CS, Aggarwal R. Common pitfalls in statistical analysis: Logistic regression. *Perspect Clin Res.* 2017;8(3):148-151.
136. Božina N, Vrkić Kirhmajer M, Šimičević L, Ganoci L, Mirošević Skvrce N, Klarica Domjanović I, i sur. Use of pharmacogenomics in elderly patients treated for cardiovascular diseases. *Croat Med J.* 2020;61(2):147-158.
137. Božina T, Ganoci L, Karačić E, Šimičević L, Vrkić-Kirhmajer M, Klarica-Domjanović I, i sur. ABCG2 and SLCO1B1 gene polymorphisms in the Croatian population. *Ann Hum Biol.* 2022;49(7-8):323-331.
138. Božina N, Šimičević L, Pećin I, Božina T, Reiner Z. The pharmacogenomics of hpolipemics: ABCG2 as a potential predictor of hepatotoxicity. *Biochem Med (Zagreb)* 8;28, Suppl1:S190
139. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther.* 2017;32(1):11-21.
140. Linde R, Peng L, Desai M, Feldman D. The role of vitamin D and SLCO1B1*5 gene polymorphism in statin-associated myalgias. *Dermatoendocrinol.* 2010;2(2):77-84.

141. Keskitalo JE, Kurkinen KJ, Neuvonen M, Backman JT, Neuvonen PJ, Niemi M. No significant effect of ABCB1 haplotypes on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, lovastatin, and rosuvastatin. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68(2):207-13.
142. Bai X., Zhang B., Wang P., Wang G. L., Li J. L., Wen D. S., i sur. Effects of SLCO1B1 and GATM gene variants on rosuvastatin-induced myopathy are unrelated to high plasma exposure of rosuvastatin and its metabolites. *Acta Pharmacol Sin*. 2019;40(4)492–499.
143. Lin J, Zhang Y, Zhou H, Wang X, Wang W. CYP2C9 Genetic Polymorphism is a Potential Predictive Marker for the Efficacy of Rosuvastatin Therapy. *Clin Lab*. 2015;61(9):1317-24.
144. Finkelman RD, Wang TD, Wang Y, Azumaya CT, Birmingham BK, Wissmar J, Mosqueda-Garcia R. Effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics of rosuvastatin in healthy Taiwanese subjects. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2015;4(1):33-40.
145. Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2009;86(2):197-203.
146. Akimoto H, Negishi A, Oshima S, Okita M, Numajiri S, Inoue N, i sur. Onset timing of statin-induced musculoskeletal adverse events and concomitant drug-associated shift in onset timing of MAEs. *Pharmacol Res Perspect*. 2018;6(6):e00439.
147. Pasanen MK, Fredrikson H, Neuvonen PJ, Niemi M. Different effects of SLCO1B1 polymorphism on the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther*. 2007;82(6):726-33.
148. Canestaro WJ, Brooks DG, Chaplin D, Choudhry NK, Lawler E, Martell L i sur. Statin pharmacogenomics: opportunities to improve patient outcomes and healthcare costs with genetic testing. *J Pers Med*. 2012;2(4):158-74.

149. Vrkić Kirhmajer M, Macolić Šarinić V, Šimičević L, Ladić I, Putarek K, Banfić L i sur. Rosuvastatin-Induced Rhabdomyolysis - Possible Role of Ticagrelor and Patients' Pharmacogenetic Profile. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018;123(4):509-518.
150. Chasman DI, Giulianini F, MacFadyen J, Barratt BJ, Nyberg F and Ridker PM Genetic determinants of statin-induced low-density lipoprotein cholesterol reduction: the Justification for the Use of Statins in Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER) trial. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(2)257–64.
151. Turner RM, Radman I, Bozina N, Alfirevic A. Pharmacogenetics and statin-related myopathy: what do we know? *Pharmacogenomics*. 2020;21(12):821-825.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Radman je rođena 28. prosinca 1987.g. u Zagrebu. Završila je Opću VII. gimnaziju u Zagrebu s odličnim uspjehom. 2007.godine upisuje Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

U okviru studentske razmjene 2011. godine boravila je mjesec dana u Košicama u Slovačkoj gdje je provodila praksu u Klinici za bolesti srca i krvnih žila.

Nakon završenog pripravničkog staža u KBC-u Sestre milosrdnice i položenog državnog ispita u prosincu 2014. godine, radila je kao liječnica obiteljske medicine u Domu zdravlja Zagreb Istok.

2016. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij “Biomedicina i zdravstvo” na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu iz područja kliničke farmakologije te se aktivno počinje baviti znanstvenim radom . U siječnju 2017. godine započinje specijalizaciju iz područja oftalmologije i optometrije u KBC-u Sestre milosrdnice. Specijalistički ispit položila je 08.07. 2021. u Klinici za očne bolesti KBC Sestre milosrdnice time stječe naziv specijalista oftalmologije i optometrije. Autor je brojnih inozemnih i domaćih publikacija te aktivno sudjeluje na oftalmološkim inozemnim i hrvatskim kongresima. Predavač je u nastavi na Zdrastvenom veleučilištu (University of Applied Health Sciences) na 3. godini Stručni studija sestrinstva. Voditelj je tima za eksplantaciju očnog tkiva. Članica je Hrvatskog oftalmološkog društva, Hrvatskog kontaktološkog društva, ECLSO i Hrvatskog društva za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju. Od 10. mjeseca 2023. godine nacionalni predstavnik mladih oftalmologa Hrvatske u SOE (European Society of Ophtalmology).

