

# Utjecaj farmakogenetičkih varijacija metaboličkih enzima i transportnih proteina na nastanak nuspojava inhibitora 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze

---

Mirošević Skvrce, Nikica

Doctoral thesis / Disertacija

2014

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:105:905818>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

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





## Središnja medicinska knjižnica

**Mirošević Skvrce, Nikica (2014) *Utjecaj farmakogenetičkih varijacija metaboličkih enzima i transportnih proteina na nastanak nuspojava inhibitora 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze.* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/2132>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Nikica Mirošević Skvrce**

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija**

**metaboličkih enzima i transportnih**

proteina na nastanak nuspojava  
inhibitora 3-hidroksi-3-metil-glutaril  
koenzim A (HMG-CoA) reduktaze

DISERTACIJA



**Zagreb, 2014.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Nikica Mirošević Skvrce**

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija**

**metaboličkih enzima i transportnih**

proteina na nastanak nuspojava

inhibitora 3-hidroksi-3-metil-glutaril

koenzim A (HMG-CoA) reduktaze

DISERTACIJA

Zagreb, 2014.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Agenciji za lijekove i medicinske proizvode.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Nada Božina

# Sadržaj

---

## Popis upotrijebljenih kratica

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Nuspojave</b>	3
<b>1.2. Interakcije lijekova</b>	4
<b>1.3. Praćenje nuspojava lijekova u Republici Hrvatskoj</b>	5
<b>1.4. Nuspojave statina</b>	6
1.4.1. Miotoksičnost	6
1.4.2. Hepatoksičnost	8
<b>1.5. Polimorfizam metaboličkih enzima</b>	8
1.5.1. Polimorfizam citokroma P450 (CYP)	8
1.5.2. Citokrom P450 2C9 (CYP2C9)	9
<b>1.6. Polimorfizam prijenosnika</b>	10
1.6.1. P-glikoprotein (Pgp)	10
1.6.2. Organski anionski transportni polipeptid 1B1 (OATP1B1)	12
1.6.3. ABCG2 (BCRP)	13
1.6.4. Protein multirezistencije (MRP2)	14
<b>1.7. Veza metaboličkih enzima i prijenosnika</b>	15
<b>1.8. Farmakokinetika statina</b>	15
1.8.1. Simvastatin	16
1.8.2. Atorvastatin	16
1.8.3. Fluvastatin	17
<b>2. HIPOTEZA</b>	18
<b>3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	18
<b>4. ISPITANICI I METODE</b>	19
<b>4.1. Ispitanici</b>	19
<b>4.2. Materijal</b>	20
<b>4.3. Genotipizacija</b>	21
4.3.1. Izdvajanje DNA iz leukocita	21
4.3.2. PCR u stvarnom vremenu	22
4.3.3. Genotipizacija <i>ABCB1</i> 2677G>T/A	22
4.3.4. Genotipizacija <i>CYP2C9</i> , <i>ABCB1</i> , <i>ABCC2</i> , <i>SLCO1B1</i> , <i>ABCG2</i>	24
<b>4.4. Statistička obrada</b>	27

<b>5. REZULTATI</b>	28
<b>5.1. Fluvastatin</b>	28
<b>5.2. Atorvastatin</b>	41
<b>5.3. Simvastatin</b>	52
<b>6. RASPRAVA</b>	62
<b>6.1. Polimorfizam <i>ABCG2</i></b>	62
<b>6.2. Polimorfizam <i>CYP2C9</i></b>	64
<b>6.3. Polimorfizam <i>ABCB1</i></b>	65
<b>6.4. Polimorfizam <i>ABCC2</i></b>	66
<b>6.5. Polimorfizam <i>SLCO1B1</i></b>	66
<b>6.6. Drugi rizični faktori</b>	68
<b>6.7. Značaj rezultata</b>	68
<b>6.8. Ograničenje rezultata</b>	68
<b>7. ZAKLJUČCI</b>	71
<b>8. SAŽETAK</b>	72
<b>9. SUMMARY</b>	73
<b>10. LITERATURA</b>	74
<b>11. ŽIVOTOPIS</b>	90
<b>12. BIBLIOGRAFIJA</b>	91

## POPIS UPOTRIJEBLJENIH KRATICA

ABCB1- o ATP ovisan prijenosnik B1 (engl. *ATP Binding Cassette*)

ABCC2 - o ATP ovisan prijenosnik C2 (engl. *ATP Binding Cassette*)

ABCG2 - o ATP ovisan prijenosnik G2 (engl. *ATP Binding Cassette*)

ALT - alanin aminotransferaza

AST - aspartat aminotrasferaza

BCRP – protein rezistencije na lijekove otkriven u stanicama raka dojke  
(engl. *Breast Cancer Rresistance Protein*)

CPIC – Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenetike  
(engl. *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*)

CAR - konstitutivni receptor za androstan (engl. *Constitutive androstane receptor*)

CK - kreatin kinaza

EM - brzi metabolizator (engl. *Extensive Metabolizer*)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*)

FRET- prijenos energije fluorescentnom rezonancijom  
(engl. *fluorescence resonance energy transfer*)

HALMED – Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode

HLA - humani limfocitni antigeni (engl. *Human Leukocyte Antigens*)

HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A

ICH– Međunarodna konferencija o harmonizaciji  
(engl. *International Conferences on Harmonisation*)

IM - srednje brzi metabolizator (engl. *intermediate metabolizer*)

LD-- neravnotežne veze mutacija u genu (engl. *linkage disequilibrium*)

MDR1- protein višestruke rezistencije na lijekove (engl. *Multi- Drug Resistance Protein*)

MRP2 - protein višestruke rezistencije na lijekove 2 (engl. *Multidrug Resistance Associated Protein2*)

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

PXR X- -receptor za pregnan (engl. *Pregnane X receptor*)

RXR – receptor za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*)



PM - spori/slabi metabolizator (engl. *poor metabolizer*)

SLCO1B1 - gen koji kodira prijenosnik za organske anione (engl. *solute-carrier organic anion transporter*)

SNP – polimorfizam jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*)

T<sub>m</sub> - temperature taljenja (engl. *melting temperature*)

TPMT – tiopurinmetiltransferaza

UM - vrlo brzi metabolizator (engl. *Ultrarapid Metabolize*)

# 1. Uvod

---

Prema rezultatima meta analize prospektivnih studija koje su uključivale hospitalizirane bolesnike u razdoblju od 1966. do 1996., učestalost ozbiljnih nuspojava lijekova bila je 6.7%, a učestalost nuspojava sa smrtnim ishodom 0.32% [1]. Prema navedenim podacima nuspojave lijekova u hospitaliziranih bolesnika su četvrti uzrok smrtnosti u SAD-u, ispred pneumonije i šećerne bolesti.

Jedan od važnih razloga visoke incidencije nuspojava jesu interindividualne razlike u farmakokinetici i farmakodinamici, a koje su često zanemarene u rutinskoj farmakoterapiji. Izbor lijeka i doze se temelji na podacima o prosječnom odgovoru populacije na lijek koji su navedeni u odobrenim informacijama o lijeku, a ne na osobitostima farmakokinetičkih i farmakodinamičkih parametara pojedinca. Genetičko naslijeđe neke osobe, fenotipski izraženo u strukturi, obliku ili koncentraciji proteina, može promijeniti djelovanje lijeka na višestruke načine. Nakon ulaska u organizam lijek stupa u interakciju s različitim enzimima, lipidima i proteinima. Gotovo su svi lijekovi podvrgnuti enzimskoj biotransformaciji koja se najvećim dijelom odvija u jetrima, ali i u drugim organima (crijeva, pluća, mozak i dr.). Lijek također, različitim procesima ulazi u interakcije s plazmatskim i tkivnim proteinima, prolazi kroz membrane i veže se na receptore. Varijante gena koje kvalitativno i kvantitativno mijenjaju osobine enzima, membrana ili receptora mogu rezultirati značajnim varijabilnostima u farmakokinetici i farmakodinamici. Na primjer, genski naslijeđeni nedostatak nekog metaboličkog enzima može usporiti biotransformaciju i izlučivanje lijeka, što može rezultirati toksičnim koncentracijama pri primjeni «standardnih doza». Osim toga promijenjeni genski produkti na mjestu djelovanja lijeka mogu imati za posljedicu jači ili slabiji učinak pri uobičajnim terapijskim koncentracijama lijeka.

Cilj farmakogenetike/farmakogenomike je istraživanje genetičke osnove interindividualnih varijabilnosti u odgovoru na farmakoterapiju. Farmakogenetička ispitivanja su u posljednjih 40 godina na mnogim primjerima pokazala kako interindividualna genska varijabilnost značajno doprinosi varijabilnosti odnosa doza-koncentracija-odgovor na lijek [2-4]. Projekt humanog genoma i razvoj molekularnih analitičkih metoda su omogućili uspješnije

identificiranje pojedinaca i subpopulacija kod kojih je djelotvornost i sigurnost primjene lijeka promijenjena, i koji stoga zahtijevaju individualizaciju terapije prema genotipu [5-7].

Prema dosadašnjim saznanjima, gene koji su povezani s nastankom nuspojava, možemo podijeliti u 3 skupine: 1) geni koji kodiraju metaboličke enzime, 2) geni koji kodiraju prijenosnike i 3) geni koji kodiraju sustav humanog limfocitnog antigena HLA [8]. Tako npr. polimorfne varijante gena koji kodira enzim tiopurin S-metiltransferazu povećavaju rizik razvoja mijelosupresije pri primjeni azatioprina, a nositelji alela HLA-B\*5701 imaju veći rizik razvoja životno ugrožavajućih reakcija preosjetljivosti na abakavir.

Inhibitori 3-hidroksi-3-metil-glutaril koenzim A (HMG-CoA) reduktaze (statini) su najpropisivaniji lijekovi u liječenju hiperkolesterolemije. U velikom broju kliničkih ispitivanja dokazana je učinkovitost u smanjivanju rizika nastanka kardiovaskularnog događaja [9-13]. Međutim, statini imaju mnoge ozbiljne nuspojave kao što su miopatija i rabdomioliza [14-15].

Kako se ovi lijekovi primjenjuju u liječenju kroničnih bolesti i često u istodobnoj terapiji s mnogim drugim lijekovima, mogućnost nastanka nuspojava posebice onih uzrokovanih interakcijama je velika.

Cerivastatin je 2001. povučen iz prometa zbog velikog broja slučajeva ozbiljnih nuspojava od kojih su mnoge bile uzrokovane upravo interakcijama. U Sjedinjenim Američkim Državama zabilježen je 31 smrtni slučaj uzrokovan miotoksičnošću cerivastatina od kojih je 12 slučajeva bilo povezano s istodobnom primjenom gemfibrozila [14].

Promjene u farmakokinetici i prema tome potencijalu za nastanak nuspojava povezanih s dozom mogu se predvidjeti boljim razumijevanjem mehanizma nastanka interakcija i identificiranjem bolesnika sa smanjenom aktivnosti metaboličkih enzima i/ili prijenosnika.

Neka farmakogenetička ispitivanja su pokazala da se promjene u farmakokinetici i posljedične nuspojave statina mogu povezati s polimorfizmima metaboličkih enzima i prijenosnika [16-17].

## 1.1. Nuspojave

Nuspojava lijeka jest svaka štetna i neželjena reakcija na lijek [18,19].

Nuspojave su uzrok oko 5% ukupnog broja hospitalizacija u Europskoj uniji, a učestalost smrtnih ishoda nuspojava iznosi oko 0,1%. Oko 5% bolnički liječenih pacijenata razvijaju nuspojave tijekom hospitalizacije. Slijedom navedenog, nuspojava predstavljaju i farmakoekonomski problem, te prema procjenama razvijene zemlje čak 20% svojeg bolničkog proračuna troše na liječenje nuspojava lijekova. Procjenjuje se da se u Europskoj uniji godišnje potroši oko 200 000 milijardi Eura na zbrinjavanje nuspojava lijekova [20].

Nuspojave lijekova se najčešće dijele na dvije osnovne skupine (tip A i tip B) [21-23]. Nuspojave tipa A su posljedica farmakološkog učinka lijeka. Karakteristike nuspojava tipa A jesu: česte (pojavljuju se u oko 1% bolesnika koji uzimaju određeni lijek), predvidive, u većini slučajeva ovisne o dozi (mogu se povući ili smanjiti svoj intenzitet ukoliko se smanji doza primijenjenog lijeka) i imaju relativno nizak mortalitet. Nuspojave tipa A čine više od 70% svih opisanih nuspojava, a mogu biti posljedica primarnog i sekundarnog farmakološkog učinka lijeka. Nuspojavama primarnog farmakološkog učinka smatraju se simptomi koji su zapravo pojačani primarni učinci lijeka kao što je hipotenzija uzrokovana antihipertenzivima. Nuspojave sekundarnog farmakološkog učinka su one koje se pojavljuju kao posljedica farmakološkog mehanizma djelovanja lijeka, ali je to djelovanje nepovezano s njegovim osnovnim djelovanjem zbog kojeg je lijek bio primijenjen kao npr. edem nogu uzrokovan kalcijevim antagonistima. Nuspojave koje nastaju kao posljedica farmakokinetičkih i farmakodinamskih interakcija također pripadaju skupini nuspojava tipa A. Izbjegavanje ovog tipa nuspojava moguće je obraćanjem pozornosti i prilagođavanjem doze u određenih skupina bolesnika kao što su npr. stariji bolesnici ili bolesnici sa smanjenom funkcijom jetara. Također na temelju poznavanja ovih nuspojava, mogu se odrediti kontraindikacije i posebne mjere opreza za primjenu pojedinog lijeka te je njihovim pridržavanjem moguće kod većine bolesnika smanjiti njihovu pojavnost. Međutim, u bolesnika koji imaju izraženu farmakogenetičku predispoziciju moguće je nastanak nuspojava iako se pridržavamo preporučenog doziranja u odobrenim informacijama o lijeku što govori o potrebi individualizacije terapije prema genotipu u pojedinim bolesnika.

Nuspojave tipa B nisu ovisne o osnovnom farmakološkom učinku. One su neočekivane za pojedinog bolesnika, nisu povezane s dozom lijeka (i najmanja doza može uzrokovati nuspojavu), niske su učestalosti (događaju se u manje od 1% bolesnika koji uzimaju lijek), ali

nažalost imaju visoku smrtnost. Način liječenja, za razliku od liječenja nuspojava tipa A, je prekid uzimanja lijeka i po potrebi davanje antialergijske terapije. Mehanizmi i vrste ovih reakcija jesu: imunoalergijske reakcije, pseudoalergijske reakcije (anafilaktoidne reakcije) intolerancija i idiosinkrazija (neimunološke – nepredvidive reakcije). 25% svih zabilježenih nuspojava spada u tip B i najveći broj ovih nuspojava iskusile su žene. Ove nuspojave se ne mogu predvidjeti osim u slučajevima kada postoji pozitivna anamneza preosjetljivosti na pojedini lijek ili na lijek na koji se može razviti unakrsna preosjetljivost ili kada se farmakogenetičkim testiranjem može dokazati predispozicija kao npr. u slučaju abakavira. Klinička slika anafilaksije, osipa, urtikarije ili angioedema može biti uzrokovana pravom alergijskom kao i pseudoalergijskom reakcijom. Najpoznatija reakcija tipa B je anafilaksija na antibiotike.

Genetički faktori mogu imati ulogu u patogenezi nuspojava tipa A i tipa B.

## 1.2. Interakcije lijekova

Istodobna primjena više lijekova je česta posebno u liječenju kroničnih i zloćudnih bolesti, što dovodi do mogućnosti nastanka interakcija lijek-lijek. Interakcije mogu imati pozitivan učinak, kao npr. pojačavanje učinka istodobnom primjenom više antidijabetika, ali i negativan, kao što je povišenje koncentracije lijeka u plazmi na toksične razine, pretjerani farmakološki učinak lijeka, smanjivanje koncentracije lijeka u plazmi i/ili smanjenje učinka na mjestu djelovanja, što dovodi do nedjelotvornosti [24].

Bolesnik tijekom hospitalizacije prosječno istodobno uzima 5 - 10 lijekova. Što je bolest teža, više se lijekova primjenjuje, a s brojem primijenjenih lijekova eksponencijalno raste mogućnost nastanka nuspojava. Vjerojatnost nastanka nuspojava u bolesnika koji uzima manje od 6 lijekova istodobno je 5 %, dok vjerojatnost nastanka nuspojava raste i iznad 40 % u bolesnika koji uzimaju više od 15 različitih lijekova dnevno [21-22].

7.8 % svih prijavljenih slučajeva nuspojava u kojima je bolesnik uzimao više od jednog lijeka u Republici Hrvatskoj u razdoblju od 2005. do 2008. bile su uzrokovane intrakcijama lijekova [25].

Interakcije se mogu podijeliti na farmakokinetičke i dešavaju se na razini apsorpcije, raspodjele, metabolizma i/ili izlučivanja lijeka i farmakodinamske koje nastaju na razini izravnog djelovanja lijeka na ciljne organe, tkiva ili stanične receptore.

Proteini koji određuju biodostupnost nekog ksenobiotika u organizmu svrstavaju se u metaboličke enzime faze I. (oksidacijska) i faze II. (konjugacijska) te prijenosnike koji se još

nazivaju fazom III. i odgovorni su za prijenos ksenobiotika preko različitih membranskih sustava. Oko 59 % lijekova koji se navode u studijama o nuspojavama podvrgavaju se metabolizmu pomoću polimorfnih enzima faze I., a među njima 86 % otpada na enzime CYP [26].

Membranski prijenosnici, P-glikoprotein (Pgp), proteini višestruke rezistencije na lijekove (MRP) i polipeptidi za prijenos organskih aniona (OATP) izraženi su u mnogim tkivima i organima poput jetara, bubrega, crijeva, posteljice i mozga i imaju značajnu ulogu u apsorpciji, raspodjeli i izlučivanju ksenobiotika. Različiti induktori ili inhibitori mogu utjecati na izražaj pojedinih metaboličkih enzima i prijenosnika te njihov utjecaj na izlučivanje ksenobiotika. Receptori siročići poput receptora X za pregnan (PXR, engl. *Pregnane X receptor*) i konstitutivni receptor za androstan (CAR, engl. *Constitutive androstane receptor*) često se nazivaju »ksenosenzori«. U interakciji s različitim ksenobioticima posreduju u staničnom odgovoru na toksični utjecaj djelujući kao transkripcijski čimbenici za pojedine članove sekrecijskoga detoksikacijskog sustava, uključujući i prijenosnike i metaboličke enzime [27-28].

Izloženost induktorima faze I., faze II. i faze III. može potaknuti stanični stresni odgovor koji rezultira povećanim genskim izražajem koji u konačnici pospješuje izlučivanje tih ksenobiotika.

Nuspojave koje nastaju kao posljedica farmakokinetičkih i farmakodinamskih interakcija pripadaju skupini nuspojava tipa A te se liječenje ovih nuspojava provodi prilagodbom doze lijeka ili prekidom davanja pojedinog lijeka koji stupa u interakciju.

### **1.3. Praćenje nuspojava lijekova u Republici Hrvatskoj**

Praćenja nuspojava u Republici Hrvatskoj ima dugu tradiciju i počinje 1974. godine kada je osnovan Centar za lijekove koji djeluje kao Nacionalni centar za nuspojave lijekova za cijelo područje bivše države i 1978. godine pristupa Programu svjetske zdravstvene organizacije za praćenje nuspojava lijekova. Centar za lijekove je kasnije prešao na Zavod za kliničku farmakologiju u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

Od 10. ožujka 2005. godine Nacionalni centar za nuspojave postaje dio Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED). HALMED vodi Nacionalnu bazu nuspojava lijekova i cjepiva kao dio programa Svjetske zdravstvene organizacije i koji je na taj način izravno povezan i sa Svjetskom bazom nuspojava koja je 01. 01. 2014. sadržavala 8 542 687 prijava

nuspojava lijeka iz čitavog svijeta. U Republici Hrvatskoj prijavljivanje nuspojava jest zakonska obveza svih zdravstvenih radnika [18,19]. Sumnja na nuspojavu lijeka se mora prijaviti Agenciji za lijekove i medicinske proizvode – HALMED-u, putem obrazaca koji su dostupni na Internetskoj stranici Agencije ([www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)) ili elektronskim putem preko iste stranice. Od 2009. godine u Republici Hrvatskoj pacijenti/korisnici lijekova mogu izravno prijaviti sumnju na nuspojavu Agenciji putem posebnog obrasca koji je namijenjen pacijentima.

Nacionalna baza nuspojava (VigiFlow) je 01. siječnja 2014. godine sadržavala 19 060 prijava nuspojava iz Republike Hrvatske. Ovako prikupljeni podaci predstavljaju vrijedno polazište za nadopunu i/ili promjenu dokumentacije o sigurnoj primjeni lijeka. S ulaskom Republike Hrvatske u Europsku uniju Hrvatska baza za nuspojave je povezana i s europskom bazom nuspojava – EudraVigilance Europske agencije za lijekove (EMA) u Londonu te hrvatske prijave postaju dio baze EudraVigilance.

Zdravstveni radnik koji prijavi nuspojavu dobiva individualni odgovor nakon što klinički stručnjaci za područje farmakovigilancije u Agenciji prijavu razmotre, ocjene i unesu u nacionalu bazu nuspojava. Komunikacija s prijaviteljima je izuzetno važna jer se na taj način može izravno utjecati na racionalnu farmakoterapiju i individualizaciju terapije bolesnika. Imajući to u vidu 2008. godine HALMED je započeo suradnju s Kliničkim bolničkim centrom Zagreb i Laboratorijem za farmakogenomiku, na način da se zdravstveni radnici informiraju o mogućnosti farmakogenetičkog testiranja u slučaju kada se farmakogenetička predispozicija smatra rizičnim faktorom za nastanak prijavljene nuspojave, a sve u svrhu prevencije nuspojava tipa A (nuspojave povezane s dozom, ovisne o farmakološkom učinku lijeka) koji se zbog farmakokinetičkih karakteristika za pojedine lijekove kod njih razvijaju [29].

## **1.4. Nuspojave statina**

### **1.4.1. Miotoksičnost**

Najčešća nuspojava statina je toksičnost u skeletnim mišićima koja uključuje mijalgiju (bol), miopatiju (bol uz dokaze o mišićnom oštećenju), i rabdomiolizu (ozbiljno oštećenje mišića s akutnim oštećenjem bubrega) [30]. Učestalost varira ovisno o definiciji, ali sveukupno, statinima izazvana mijalgija je česta, i zapaža se u 1-5% izloženih osoba. Liječnici često mjere razinu serumske kreatin kinaze (CK), kako bi procijenili ozbiljnosti nuspojave. U

slučaju monoterapije statinima, učestalost miopatije je  $\sim 1/1\ 000$ , a učestalost rabdomiolize je  $\sim 1/100\ 000$  [31,32].

Prema odobrenim informacijama o lijeku uzimanje statina treba prekinuti ukoliko su vrijednosti CK  $> 5$  puta iznad gornje granice normale (GGN). Točan mehanizam nastanka miotoksičnosti nije poznat.

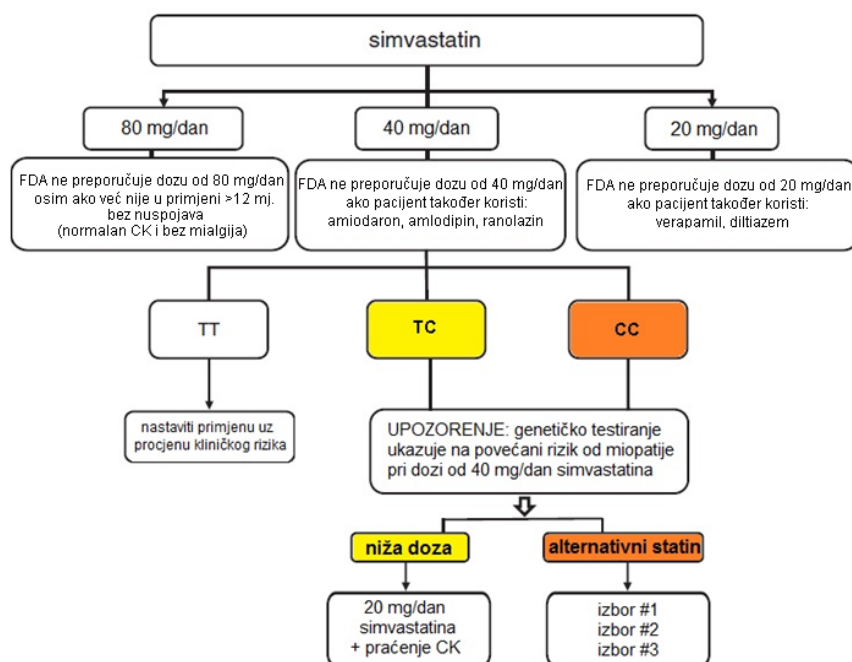
Najnovija istraživanja japanskih autora [33] ukazuju na mehanizam kojim statini induciraju depleciju isoprenoida i inaktivaciju malih GTP-aza, što predstavlja kritičan korak u nastanku miotoksičnosti.

Učestalost nuspojava raste s dozom primijenjenog statina. Miotoksičnost je učinak razreda. Visoke doze simvastatina (80 mg) su povezane s povećanim rizikom za miotoksičnost dok je najmanja učestalost miotoksičnosti povezana sa fluvastatinom i pravastatinom [34].

Čimbenici rizika za razvoj statinima izazvane miotoksičnosti uključuju povećanje doze, interakcije lijek-lijek, stariju dob, nizak indeks tjelesne mase (BMI), ženski spol, metaboličke komorbiditete (npr. hipotiroidizam) te intenzivnu fizičku aktivnost. Pripadnost azijskoj ili afričkoj populaciji također predstavlja veći rizik u odnosu na bjelačku populaciju [34].

Novije studije su ukazale na važnost genetičke predispozicije za nastanak nuspojava statina. Konzorcij *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) izradio je postupnik za primjenu simvastatina prema rezultatima genotipizacija *SLCO1B1* (Slika 1.) [35].

**Slika 1. Postupnik za primjenu simvastatina prema rezultatima genotipizacije *SLCO1B1***





## **1.4.2. Hepatotoksičnost**

Od početka primjene statina bilo je jasno kako kod malog broja bolesnika dolazi do povećanja vrijednosti jetrenih enzima posebice alanin transaminaze (ALT) i aspartat transaminaze (AST). Tipično, kod primjene standardnih doza statina učinak na gama-glutamiltransferazu, alkalnu fosfatazu i bilirubin je minimalan ili izostaje. Povećanje transaminaza obično je asimptomatsko, opaža se unutar prvih 6 mjeseci liječenja te nestaje prekidom liječenja.

Povećanje transaminaza ovisno je o primijenjenoj dozi te je učinak na povećanje transaminaza i bilirubina evidentan kod primjene visokih doza statina. Za razliku od miotoksičnosti, povećanje transaminaza je povezano s boljim učinkom na snižavanje LDL kolesterola [30].

Prema analizi 49 kontroliranih ispitivanja koja su uključila 14 236 bolesnika, 0.2 % bolesnika na placebo ili atorvastatinu 10 mg su imali dugotrajno povećanje transaminaza u usporedbi sa 0.6% bolesnika koji su uzimali 80 mg atorvastatina [36]. Prema odobrenim informacijama o lijeku uzimanje statina treba prekinuti ukoliko su vrijednosti transaminaza >3 puta iznad gornje granice normale.

Miotoksičnost i hepatotoksičnost su također među najčešće prijavljenim nuspojavama statina i u Republici Hrvatskoj [37].

## **1.5. Polimorfizam metaboličkih enzima**

### **1.5.1. Polimorfizam citokroma P450 (CYP)**

Superobitelj gena citokroma P-450 (CYP) kodira skupinu hemoproteina koji kataliziraju oksidacijski metabolizam širokog spektra egzogenih spojeva u koje svrstavamo lijekove, karcinogene i toksine te sudjeluju u biotransformaciji mnogih endogenih supstrata poput steroida, masnih kiselina, prostaglandina i drugih.

Statini se ekstenzivno metaboliziraju putem enzima CYP te iz ovog razloga često stupaju u interakcije lijek-lijek. Utjecaj drugih lijekova na farmakokinetiku statina ovisan je o izoformi enzima CYP koji je uključen u njihov metabolizam. Simvastatin, lovastatin i atorvastatin se dominantno metaboliziraju putem CYP 3A4 [38-40]. Glavni metabolički enzim u biotransformaciji fluvastatina jest CYP2C9 što ga čini jedinstvenim među statinima [41-42]. Pravastatin se gotovo uopće ne metabolizira putem enzima CYP te iz ovog razloga ne stupa u interakcije na razini ovih enzima [43]. Rosuvastatin je u manjoj mjeri podložan metabolizmu u jetrima (10%), najvećim dijelom putem metaboličkih enzima CYP2C9 i CYP2C19 [44]. Pitavastatin se u manjoj mjeri metabolizira putem CYP2C9 [45] te stoga ne stupa značajno u interakcije s drugim lijekovima na razini metaboličkih enzima. Iako je uočena velika interindividualna varijabilnost u aktivnosti enzima CYP3A4 ona se ne može pripisati polimorfizmima gena CYP3A4. Čini se da polimorfizam CYP3A5 ima općenito značajniju ulogu u odnosu na CYP3A4 [46] u metabolizmu lijekova.

Genski polimorfizam određuje tri kategorije fenotipova s obzirom na intenzitet metabolizma. Fenotip dobro izraženog metabolizma (engl. *extensive metabolizer*, *EM*) očekivana je normalna osobina najvećeg dijela populacije. Fenotip slabog metabolizma (engl. *poor metabolizer*, *PM*), koji ima osobinu nagomilavanja specifičnih lijekova-supstrata u organizmu zbog smanjene ili dokinute aktivnosti enzima, autosomno je recesivno svojstvo. Fenotip izrazito pojačanog metabolizma (engl. *ultraextensive metabolizer*, *UEM*), rezultat je amplifikacije odgovornog gena, s osobinom ubrzane razgradnje lijekova-supstrata, a izražen je kao autosomno dominantno svojstvo. Uz ove osnovne fenotipove čest je prijelazni oblik s jednim «divljim» funkcionalnim i drugim mutiranim alelom.

#### **1.5.1.1. Citokrom P450 2C9 (CYP2C9)**

Polimorfizam je u obitelji CYP2C značajan za farmakoterapiju zbog nekih vrlo važnih lijekova - supstrata ovog enzima kao što su antikonvulzivi, antidiabetici, antikoagulanti i antidepresivi [47]. Polimorfizam *CYP2C9* može utjecati na toksičnost lijekova s uskom terapijskom širinom kao što su fenitoin ili varfarin [48,49]. Varfarin ima usku terapijsku širinu i veliku varijabilnost u odgovoru na lijek i iz ovih razloga zahtjeva pažljivu prilagodbu doze kod svakog pojedinog bolesnika. Genetičke varijacije vitamina K epoksid reduktaze koja je ciljno mjesto djelovanja varfarina kao i varijacije gena metaboličkog enzima *CYP2C9*

značajno doprinose (i do 60%) varijabilnosti u odgovoru tj. učinkovitosti/nuspojavama lijeka. Bolesnici s određenim varijacijama gena koji kodiraju navedene enzime sporije uklanjaju varfarin i stoga zahtijevaju niže doze. U takvih pojedinaca, uobičajne doze varfarina dovode do povećanja vrijednosti INR (engl. *International Normalized Ratio*) i često je potrebno duže vrijeme do postizanja stabilne doze varfarina, uz rizik nastanka ozbiljnih krvarenja u razdoblju titriranja doze. Prema najnovijim smjernicama koje je izdala američka administracija za hranu i lijekove (*Food and Drug Administration*- FDA) prema kombinaciji genotipova *CYP2C9* i *VKORC1* raspon doza je od 0.5-7 mg po danu [50].

Prema dosadašnjim istraživanjima učestalost fenotipa slabih metabolizatora u bijeloj populaciji varira od 2-6% [51]. Gen *CYP2C9* je lociran na kromosomu 10q24. Do sada je uz divlji tip, "wt" ili \*1, identificirano 12 različitih mutiranih alela *CYP2C9*. Prema istraživanjima, aleli *CYP2C9\*2* i *CYP2C9\*3* prisutni su u 85 % slabih metabolizatora [52]. U hrvatskoj populaciji njihova učestalost je 3.5 % [53].

Rezultati kliničkog ispitivanja na 24 zdrava dobrovoljca koji su bili heterozigotni ili homozigotni nositelji alela *CYP2C9\*2* (Arg144Cys) i *2C9\*3* (Ile359Leu), koji su uzimali 40 mg racemata fluvastatina u razdoblju od 14 dana pokazali su povezanost farmakokinetičkih parametara i genotipova [16]. Rezultati farmakokinetičke studije Zhou i suradnika na 12 zdravih dobrovoljaca su također ukazali na značajnu povezanost farmakokinetičkih parametara i genotipova *CYP2C9* [54].

## 1.6. Polimorfizam prijenosnika

### 1.6.1. P-glikoprotein (Pgp)

Prijenosnici imaju važnu ulogu u regulaciji apsorpcije, raspodjele i izlučivanja mnogih lijekova. Najbolje do sada proučen prijenosnik je P-glikoprotein (Pgp) kodiran genom *ABCB1* ili *MDR1* (engl. *multidrug resistance*) [55]. Pgp je integralni membranski protein, s funkcijom prijenosa tvari iz stanice i s membrane prema van. Njegova fiziološka funkcija je zaštita stanice od toksičnih tvari. Mnogi su lijekovi supstrati Pgp, stoga aktivnost Pgp utječe na njihove farmakokinetičke parametre, međusobne interakcije i terapijsku učinkovitost. Ta je činjenica prvotno uočena u malignim stanicama gdje visoka ekspresija i aktivnost *MDR1* čini maligne stanice otpornima na terapiju mnogim lijekovima. Pgp je također prisutan u različitim drugim nemalignim stanicama i organima poput crijeva, placente, bubrega, jetara,

gušterače, testisa, krvno-moždane brane, limfocita, te makrofaga s ulogom moduliranja bioraspoloživosti lijeka. U crijevima Pgp kontrolira apsorpciju lijeka nakon ingestije [56]. Do sada je identificirano 15 različitih polimorfizama (SNP) u genu *ABCB1*.

Najviše su istraživana dva SNP: tiha mutacija *ABCB1* 3435 C>T u eksonu 26 (rs1045642) koja je povezana sa duodenalnim izražajem Pgp i *missense* polimorfizam *ABCB1* 2677 G>T/A u eksonu 21 (rs2032582). Rezultati su proturječni u odnosu na izražaj proteina Pgp i koncentracije lijekova. Analiza neravnotežne veze (engl. *linkage disequilibrium, LD*) različitih polimorfizma Pgp pokazuje da je *ABCB1* 3435 C>T u neravnotežnoj vezi barem s jednim funkcionalnim polimorfim lokusom *ABCB1* 2677 G>T/A i s trećim polimorfizmom *ABCB1* 1236 C>T (Gly412Gly *ABCB1*\*8). Kombinacija varijantnih haplotipova za sva tri navedena polimorfizma obilježava se kao P-gp\*2 [57].

*In vitro* ispitivanja su pokazala da je simvastatin supstrat i inhibitor P-glikoproteina [58-61].

Keskitalo i suradnici [62] navode mali učinak *ABCB1* varijanti 1236T, 2677T i 3435T na farmakokinetičke parametre simvastatina (Površina pod krivuljom, PPK) i atorvastatina (PPK i  $t_{1/2}$ ). U usporedbi haplotipova 1236C-2677G-3435C i 1236T-2677T-3435T ustanovljene su za 55-60% više vrijednosti PPK u nositelja kombinacije haplotipova TTT/TTT u odnosu na nositelje haplotipova CGC/CGC.

Povezanost farmakokinetičkih parametara i varijanti gena *ABCB1* pokazala je i studija na zdravim Koreancima [63].

Istraživanja Fiegenbauma i koautora, iako provedena na svega 17 ispitanika na terapiji simvastatinom [64] ukazuju na povezanost polimorfizama *ABCB1* s miotoksičnošću.

*In vitro* ispitivanja su pokazala da je atorvastatin također supstrat i inhibitor P-glikoproteina [59-61, 65-66].

Prema istraživanju Rodriguesa i suradnika na stanicama humanog hepatoma (HepG2) i perifernim mononuklearima, atorvastatin može modulirati ekspresiju i funkciju Pgp [67].

Hermann i suradnici [68] su pokazali da je u bolesnika koji su iskusili miopatiju bioraspoloživost atorvastatina u obliku laktona kao i njegovih aktivnih metabolita bila povećana. Ovo istraživanje nije potvrdilo povezanost varijanti gena *SLCO1B1*, *ABCB1* i *CYP3A5* s pojavom miopatije. Međutim treba naglasiti da se radi o ispitivanju koje je uključivalo svega 14 bolesnika.

Pregledom literature dostupni su rezultati malog broja ispitivanja *in vitro* o ulozi fluvastatina kao supstrata P-glikoproteina i rezultati su nepodudarni [69-71]. Osim toga neke studije navode da fluvastatin nije inhibitor P-glikoproteina [58,61].

Bercovich i suradnici su u svojim istraživanjima dokumentirali povezanost različitih haplotipova gena *MDR1/ABCB1* s djelotvornosti fluvastatina [72]. Haplotip *MDR1*-h10 je bio povezan sa smanjenim učinkom lijeka. Klinička studija na 12 zdravih Kineza pokazala je povezanost genotipova *ABCB1* 3435T i 2677T s promjenom farmakokinetičkih parametara fluvastatina, dok genotip 1236TT nije imao značajan utjecaj [54]. Međutim finska studija [73] nije potvrdila ove nalaze o utjecaju varijanti gena *ABCB1* na farmakokinetiku fluvastatina u bijelačkoj populaciji.

Ako uzmemo u obzir visoku učestalost haplotipova CGC i TTT (učestalosti alela: 34 i 43% u bjelačkoj populaciji) [62] ipak možemo pretpostaviti da bi genetička podložnost mogla utjecati na varijabilnost farmakokinetičkih parametara statina na populacijskoj razini [17].

### 1.6.2. Organski anionski transportni polipeptid 1B1 (OATP1B1)

Organski anionski transportni polipeptid 1B1 (OATP1B1), poznat još i pod imenom OATP-C, OATP2 i LST-1, je membranski polipeptid najvećim dijelom eksprimiran u jetrima, na sinusoidalnoj membrani [74]. Njegova uloga je prijenos različitih endogenih (bilirubin, leukotrien c<sub>4</sub>, estradiol-17β-glukouronid) i egzogenih spojeva (veliki broj statina, aktivni metabolit irinotekana SN-38, metotreksat, rifampicin) iz krvi u hepatocite [75,76]. Prijenosnik OATP1B1 je kodiran genom *SLCO1B1*.

Za dva polimorfizma gena *SLCO1B1* 388A>G (p.Asn130Asp; rs2306283) i 521T>C (p.Val174Ala; rs4149056) je pokazano kako mogu mijenjati prijenosni kapacitet OATP1B1 [77,78]. Njihov učinak na aktivnost OATP1B1 ovisi o međusobnoj kombinaciji u haplotipovima. U slučaju prisutnosti polimorfizma 388A>G bez prisustva polimorfizma 521T>C, haplotip se označava *SLCO1B1*\*1B i povezan je s povećanom aktivnosti prijenosnika OATP1B1 te posljedično smanjenom koncentracijom njegovih supstrata u plazmi [79,80]. Varijanta 521T>C smanjuje prijenosni kapacitet OATP1B1 i posljedično dolazi do povećanih koncentracija njegovih supstrata u plazmi, u oba haplotipa *SLCO1B1*\*5 (prisutan samo 521T>C) i *SLCO1B1*\*15 (c.521T>C prisutan zajedno s c.388A>G) [81].

Učestalost varijantnih alela (haplotipovi *SLCO1B1*\*5 i \*15) je 15-20%, dok je učestalost haplotipa *SLCO1B1*\*1B u bijelaca 25-30 % [82].

Prema nekim studijama simvastatin in vitro inhibira prijenos posredovan s OATP1B1 [59,83]. Rezultati studije na 32 zdrava dobrovoljca ukazali su na utjecaj varijanti gena *SLCO1B1* na farmakokinetiku (PPK, C<sub>max</sub>) simvastatina u obliku kiseline [84].

Studija SEARCH (Study of the Effectiveness of Additional reduction in Cholesterol and Homocysteine) je identificirala genetičku predispoziciju za miopatiju u bolesnika liječenih simvastatinom. Autori su analizirali rezultate iz 2 klinička ispitivanja koja su uključivala 12 000 odnosno 20 000 ispitanika na terapiji simvastatinom u dozi od 80 mg odnosno 40 mg na dan. Nakon obrade nekoliko stotina tisuća genskih biljega u svakog bolesnika koji je iskusio miopatiju uzrokovanu primjenom simvastatina u dozi od 80 mg i usporedbom prevalencije ovih biljega u ispitanika koji su uzimali istu dozu lijeka i nisu razvili nuspojavu, autori su uočili izrazitu povezanost između nastanka miopatije i dvije varijante gena *SLCO1B1* koje su u neravnotežnoj vezi (engl. linkage disequilibrium-LD). Ovaj nalaz je potvrđen i u drugoj studiji u kojoj su ispitanici primali 40 mg simvastatina [85].

In vitro studije ukazuju kako je atorvastatin inhibitor OATP1B1 [59, 83, 86].

Farmakokinetička studija na 32 zdrava dobrovoljca pokazala je utjecaj *SLCO1B1* 521 C>T na bioraspoloživost atorvastatina [87].

Rezultati Morimota i suradnika ukazuju da su nositelji polimorfni varijanti gena *SLCO1B1* podložniji razvoju miotoksičnosti pri primjeni atorvastatina i pravastatina (testirano 7 bolesnika) [88] dok istraživanje Hermanna [68] i suradnika nije potvrdilo povezanost varijanti gena *SLCO1B1*, *ABCB1* i *CYP3A5* s razvojem miopatije u skupini od 14 bolesnika na terapiji atorvastatinom.

Kliničke studije koje su slijedile, na većem broju ispitanika, pokazale su povezanost varijanti gena *SLCO1B1* i nuspojava atorvastatina i simvastatina [89-91]. Klinička studija Brunhama i koautara [90] je pokazala kako je utjecaj polimorfizama gena *SLCO1B1* na nastanak nuspojava simvastatina veći nego na nastanak nuspojava atorvastatina. Druga klinička studija provedena u brazilskoj populaciji nije dokazala povezanost varijanti gena *SLCO1B1* s razvojem nuspojava statina [92].

Prema ispitivanjima *in vitro* fluvastatin jest supstrat prijenosnika OATP1B1 [93-95]. Međutim jedina do sada provedena asocijacijska studija na malom broju ispitanika nije potvrdila povezanost polimorfizma *SLCO1B1* s promjenama u farmakokinetici fluvastatina [96].

### 1.6.3. ABCG2 (BCRP)

Protein ABCG2, također poznat pod nazivom BCRP (engl. *Breast Cancer Resistance Protein*), je membranski protein čija je funkcija prijenos supstrata iz stanice, a ovisan je o energiji

ATP-a [97]. Kodiran je genom *ABCG2*. Nalazi se na apikalnim membranama intestinalnih epitelnih stanica, hepatocita, tubularnim stanicima bubrega i stanicama krvno-moždane barijere. *ABCG2* može smanjiti intestinalnu apsorpciju i prijenos u tkiva te povećati izlučivanje svojih supstrata u jetrima i bubrezima.

Polimorfizam 421C>A (p.Gln141Lys; rs2231142), smanjuje prijenos putem *ABCG2* [97]. Učestalost polimorfizma 421C>A u bjelačkoj populaciji jest 25 - 30 % [97,98].

Površina pod krivuljom inaktivnog laktona simvastatina bila je za 111% veća, a fluvastatina i atorvastatina za 72% veća u ispitanika s genotipom *ABCG2* 421AA u odnosu na koncentracije zabilježene u nositelja genotipa 421CC [98,99]. Ovo povećanje je najvjerojatnije posljedica povećane bioraspoloživosti oralno primjenjenog lijeka zbog smanjenje funkcije efluksnog prijenosnika *ABCG2* povezane s genotipom 421AA. Moguća posljedica opaženih promjena u farmakokinetici je povećani rizik za nastanak miotoksičnosti kod pojedinaca koji uzimaju atorvastatin i fluvastatin, dok je utjecaj na nuspojave simvastatina na osnovu farmakokinetičkih podataka teže predvidjeti. Međutim do sada nisu bile dostupne studije o utjecaju genotipova *ABCG2* na razvoj nuspojava.

#### **1.6.4. Protein multirezistencije (MRP2)**

Protein multirezistencije (MRP2) je membranski protein čija je funkcija prijenos tvari iz stanice, a ovisna je o energiji ATP-a. Nalazi se u jetrima, crijevu i bubregu. Kodiran je genom *ABCC2* koji ima više polimorfni oblika. Njegovi supstrati su organski anioni ili konjugati s glutationom i glukouronidom. Simvastatin, atorvastatin i fluvastatin se izlučuju putem jetara. Rezultati ispitivanja Haenisha i suradnika [100] su pokazali na 31 zdravom dragovoljcu da polimorfizam 1249 G>A u eksonu 10 koji ima za posljedicu zamjenu aminokiseline Val u Ile na poziciji 417 (rs2273697) transportnog proteina dovodi do smanjene bioraspoloživosti talinolola. Rezultati nekoliko studija [101-103] ukazuju da polimorfizam -24 C>T (rs717620) u eksonu 1 modulira funkciju transportnog proteina. Simvastatin i atorvastatin in vitro inhibiraju transport posredovan s MRP2 [58,86]. Lindahl i koautori su nakon ispitivanja na štakorima pokazali da je fluvastatin supstrat *mrp2* [100]. Prema dostupnoj literaturi nisu provedene studije koje su ispitale povezanost polimorfizama gena *ABCC2* s farmakokinetičkim parametrima ili s učinkovitosti/nuspojavama simvastatina, atorvastatina i fluvastatina.

## 1.7. Veza metaboličkih enzima i prijenosnika

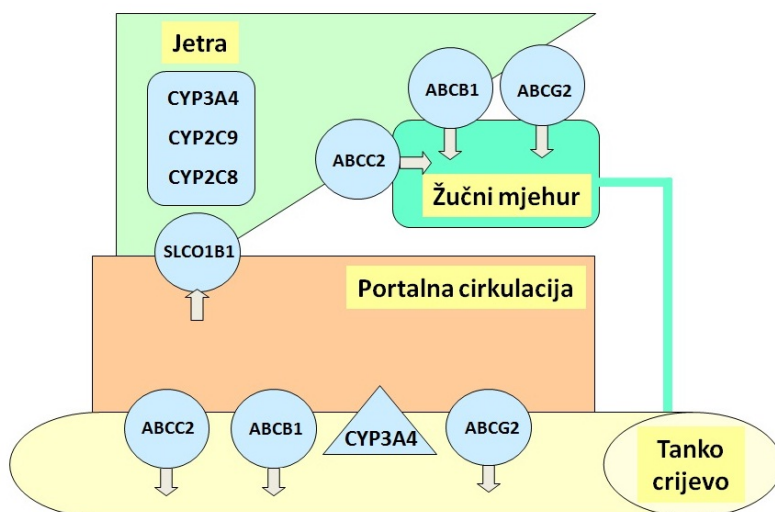
Tkivna rasprostranjenost prijenosnika i enzima CYP se preklapa kao i afinitet za određene supstrate. Npr. CYP3A4 i P-glikoprotein izrazito su izraženi u jetrima i tankom crijevu te imaju veliki broj zajedničkih supstrata i inhibitora što ukazuje na njihovo sinergističko djelovanje [104-106]. Ova je činjenica vrlo važna i na nju treba misliti pri procjeni mogućeg dosega interakcija lijekova [107,108].

Studije su pokazale kako je receptor za pregnan X (PXR) vrlo važan za regulaciju ekspresije metaboličkih enzima CYP3A4 i 2C9 kao i prijenosnika P-glikoproteina [109-115]. Novije studije također ukazuju da je i ekspresija OATP1B1 i MRP2 povezana s PXR [116-117].

## 1.8. Farmakokinetika statina

Različita kemijska struktura pojedinih statina određuje njihov afinitet prema HMG-CoA reduktazi i prema tome njihov farmakološki učinak, farmakokinetička svojstva (npr. distribuciju u tkiva, specifičnost za metaboličke enzime i prijenosnike) te sposobnost stupanja u interakcije s drugim lijekovima. Simvastatin i lovastatin, u obliku laktonskog prstena, su lipofilniji od statina koji se primjenjuju u obliku kiseline jer nemaju zatvoreni prsten. Najhidrofilniji od svih statina je pravastatin. Općenito, lipofilne tvari lako prelaze dvojslojnu lipidnu membranu pasivnom difuzijom i nespecifično se raspodjeljuju u tkiva. Slika 2. prikazuje najznačajnije metaboličke enzime i prijenosnike uključene u metabolizam i izlučivanje statina.

**Slika 2. Metabolički enzimi i prijenosnici statina**





### 1.8.1. Simvastatin

Simvastatin, (1S,3R,7S,8S,8aR)-8-[2-[(2R,4R)-4-hidroksi-6-oksotetrahidro-2H-piran-2-il]etil]-3,7-dimetil-1,2,3,7,8,8a-heksahidronaftalen-1-il 2,2-dimetilbutanoat je semisintetski statin, derivat produkata gljivica. Simvastatin je inaktivni lakton koji *in vivo* reverzibilno prelazi posredstvom karboksiesteraze u kiselinu, aktivni oblik lijeka u mukozi crijeva, plazmi i jetrima. Simvastatin se dobro apsorbira (60-85%). Veže se za proteine plazme (>95%). Poluvijek izlučivanja je 2-5 h. Podložan je ekstenzivnom metabolizmu u mukozi crijeva i jetara te je iz ovog razloga bioraspoloživost simvastatina samo 5 %. U obliku kiseline se metabolizira pretežno putem enzima CYP3A4 te u manjoj mjeri putem CYP2C8 i CYP3A5 [118,119]. Većim se dijelom izlučuje putem žuči, a u manjoj mjeri bubrezima (13%).

### 1.8.2. Atorvastatin

Atorvastatin, (3R,5R)-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilkarbamoil)-5-(propan-2-il)-1H-pirol-1-il]-3,5-dihidroheptanoatna kiselina je slaba kiselina (konstanta disocijacije kiseline,  $pK_a=4.5$ ) i hidrofilan je statin (koeficijent distribucije,  $\log D = 1.53$ ). Kod zdravih dobrovoljaca atorvastatin primijenjen oralno, na tašte, se brzo i potpuno apsorbira ( $\geq 98\%$ ). Ako se uzima zajedno s hranom njegova apsorpcija je usporena. Nakon apsorpcije, atorvastatin se ekstenzivno metabolizira u mukozi tankog crijeva kao i jetrima. Apsolutna bioraspoloživost atorvastatina nakon primijene u dozi od 10 mg je 14 %. Pravidni volumen distribucije jest 381 L. U jetrima biotransformacijom putem enzima CYP3A4 nastaju 2 aktivna metabolita (para- i orto-hidroksi derivati). Kako aktivni metaboliti imaju dugi poluvijek (9-32 h), djelotvornost atorvastatina nije ovisna o vremenu primjene. Poluvijek lijeka iznosi od 7 do 14 h [120,121]. Atorvastatin se u najvećoj mjeri izlučuje putem žuči, a samo 1-2% bubrezima [122].

### 1.8.3. Fluvastatin

Fluvastatin natrij [R\*,S\*-(E)]-(±)-7-[3-(4-fluorofenil)-1-(1-metiletil)-1H-indol-2-il]-3,5-dihidroksi-6-heptenoatna kiselina je prvi u potpunosti sintetski inhibitor 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzima A (statin) reduktaze. Fluvastatin je slaba kiselina ( $pK_a=5.5$ ) i hidrofilniji je u usporedbi s simvastatinom i pravastatinom ( $\log D = 1.74$ ). U zdravih ispitanika fluvastatin primijenjen oralno, na tašte, se brzo i potpuno apsorbira (98%). Ako se uzme zajedno s hranom njegova apsorpcija je usporena. Ciljni organ djelovanja fluvastatina kao i glavno mjesto njegovog metabolizma jesu jetra. Nakon apsorpcije, fluvastatin je podložan ekstenzivnoj presistemskom eliminaciji čija je posljedica niska i izrazito varijabilna bioraspodijelivost. Apsolutna bioraspodijelivost izmjerena u kliničkom ispitivanju koje je uspoređivalo jednokratnu oralnu dozu fluvastatina s intravenskom dozom na 6 zdravih dobrovoljaca bila je  $29 (\pm) 18\%$  [123]. Pravidni volumen distribucije iznosi 330 L. U jetrima se fluvastatin metabolizira u dva hidroksi metabolita i N-deisopropil metabolit. 95% doze izlučuje se putem fecesa od kojih 60% čine gore navedeni metaboliti. Fluvastatin se u najvećoj mjeri biotransformira putem enzima CYP2C9, a u manjoj mjeri i putem CYP3A4 [41,42,124].

Slijedom navedenog ne očekuju se farmakokinetičke interakcije s inhibitorima i supstratima CYP3A4. Iz tog razloga fluvastatin se najčešće propisuje bolesnicima s transplantiranim organom da bi se izbjegla interakcija s imunosupresivima prvenstveno ciklosporinom. Ciklosporin je supstrat enzima CYP3A4 pa lako ulazi u interakcije s drugim statinima čiji je glavni metabolički put upravo CYP3A4. Kod bolesnika sa smanjenom aktivnosti enzima CYP2C9 mogu doći do izražaja interakcije s CYP3A4. Postoje zabilježeni pojedinačni slučajevi nuspojave uzrokovanih upravo interakcijama fluvastatina i CYP3A4 inhibitora/supstrata. Iz navedenog razloga osim interakcija sa supstratima/inhibitorima CYP2C9, potrebno je detaljnije ispitati mogućnost nastanka interakcije između fluvastatina i inhibitora/supstrata CYP3A4 kod bolesnika sa smanjenom aktivnošću enzima CYP2C9 i smanjenom aktivnosti prijenosnika.

## 2. Hipoteza

---

Genske varijante prijenosnika P-glikoproteina (MDR1/ABCB1), proteina multirezistencije (MRP2/ABCC2), ABCG2/BCRP i SLCO1B1/OATP1B1 mogu biti značajne za nastanak nuspojava povezanih s primijenjenom dozom simvastatina, atorvastatina i fluvastatina te mogu poslužiti kao genski biljezi u individualizaciji i optimizaciji terapije ovim lijekovima. Genske varijante enzima citokroma P-450 (CYP 2C9) utječu na nastanak nuspojava povezanih s primijenjenom dozom fluvastatina i mogu poslužiti kao genski biljeg.

## 3. Ciljevi istraživanja

---

Glavni cilj rada je odrediti kolika je prediktivna vrijednost genskih biljega: enzima citokroma P-450 (CYP2C9), P-glikoproteina (MDR1/ABCB1), proteina multirezistencije (MRP2/ABCC2), ABCG2/BCRP i OATP1B1 (SLCO1B1) u nastanku nuspojava povezanih s primijenjenom dozom simvastatina, atorvastatina i fluvastatina, u mono i politerapiji.

Specifični cilj istraživanja jest farmakogenetička analiza bolesnika koji u istodobnoj terapiji uzimaju druge lijekove supstrate metaboličkih enzima i/ili prijenosnika CYP2C9, MDR1, MRP2, ABCG2 i OATP1B1. Poznati supstrati su losartan, irbesartan, varfarin, metronidazol, sulfametoksazol, ibuprofen, indometecin, naproksen, amitriptilin, glipizid, fenitoin, ciklosporin, takrolimus, talinolol, repaglinid, itrakonazol, eritromicin, klaritromicin, ketokonazol, propafenon, verapamil. Usporediti će se prevalencije genskih varijacija u odnosu na prisutnost interakcija i nuspojava.

## 4. Ispitanici i metode

---

### 4.1. Ispitanici

Bolesnici koji su iskusili nuspojavu ovisnu o dozi uzrokovanu fluvastatinom ili simvastatinom ili atorvastatinom prijavljenu Agenciji za lijekove i medicinske proizvode u razdoblju od ožujka 2005. do prosinca 2013. godine su pozvani da sudjeluju u istraživanju.

Prijavitelji nuspojava su također zamoljeni da osim bolesnika s nuspojavama u studiju kao kontrolne ispitanike uključe i bolesnike koji su uzimali statine ali nisu razvili nuspojave.

Dizajn studije jest *case-control*.

Bolesnici koji su potpisali informirani pristanak su uključeni u studiju.

Bolesnici su uzeti u obzir za uključivanje u studiju samo ako su nuspojave koje su iskusili prema kriterijima Karch i Lasagna [125] za ocjenu povezanosti bile ocjenjene kao moguće, vjerojatno ili sigurno povezane s uzimanjem ispitivanog statina dok bolesnici koji su iskusili nuspojavu koja vjerojatno nije povezana sa uzimanjem lijeka nisu uzeti u obzir za uključivanje u studiju.

Smjernice Karch i Lasagna uključuju sljedeće kriterije pri ocjeni povezanosti:

- vremensku povezanosti između uzimanje lijeka i nuspojave,
- procjenu je li opažena nuspojava očekivana nuspojava lijeka,
- moguće prisustvo alternativnog uzroka nuspojave,
- poboljšanje bolesnikovog stanja nakon prestanka uzimanja lijeka i
- procjenu je li došlo do ponavljanja nuspojave pri ponovnom uvođenju lijeka, nakon što je bio isključen iz terapije.

Nuspojave su ocijenjene ozbiljnima ukoliko su zadovoljeni kriteriji: smrt osobe, po život opasno stanje, potrebu za bolničkim liječenjem ili produljenje već postojećega bolničkog liječenja, trajni ili teški invaliditet ili nesposobnost, prirođenu anomaliju/manu od rođenja i ostala medicinski značajna stanja prema smjernicama *International Conferences on Harmonisation (ICH) E 2A* [126] i *CIOMS V* [127]. Za sve ispitanike bilježeni su sljedeći podaci: godine i spol, ime i doza statina, konkomitantna terapija, komorbiditeti, podaci o rizičnim faktorima za nastanak nuspojave statina (smanjena funkcija bubrega ili jetara,

perioperativno razdoblje, multisistemske bolesti, mala tjelesna težina i hipotiroidizam). Izvor podataka za bolesnike koji su iskusili nuspojavu bio je propisani Obrazac za prijavu nuspojave. Izvor podataka za bolesnike koji nisu iskusili nuspojavu bio je Obrazac koji je sadržavao sva polja kao i Obrazac za prijavu nuspojave osim podataka o nuspojavi. U slučaju da Obrasci nisu sadržavali sve potrebne podatke dodatno je kontaktiran prijavitelj.

Nuspojave uzrokovane miotoksičnošću i hepatotoksičnošću statina bile su definirane kako slijedi: 1) mialgija kao bol u mišićima (neovisno o vrijednostima kreatin kinaze) 2) povećanje vrijednosti kreatin kinaze iznad referentnih vrijednosti 3) miopatija mišićni simptomi s povećanjem vrijednosti kreatin kinaze više od 5 puta iznad gornje referentne vrijednosti 4) rabdomioliza je definirana kao teška mioptija koja uključuje povećanje vrijednosti kreatin kinaze više od 10 puta iznad gornje referentne vrijednosti, oštećenje mišića i otpuštanje mioglobina što može uzrokovati tamno obojenje urina i zatajenje bubrega [128]. Hepatotoksičnost je definirana kao povećanje vrijednosti alanin aminotransferaze sa ili bez povećanja aspartat aminotrasferaze (AST i ALT) iznad gornje referentne vrijednosti. Aktualne interakcije lijek-lijek su detektirane koristeći bazu *Stockley drug interactions* [129]. Također, smo ispitali da li su lijekovi u istodobnoj terapiji inhibitori CYP2C9 i/ili ABCG2 [97, 130-140].

## 4.2. Materijal

### Uzorci

Primarni uzorak: 3-5 ml pune krvi (epruveta s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA).

Sekundarni uzorak: DNA izdvojena iz uzorka pune krvi.

### Oprema

**Mjerni uređaji:** uređaj za PCR u stvarnom vremenu LightCycler 1.2 (Roche, Švicarska)  
uređaj za PCR u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCR System  
(Applied Biosystems, SAD)

### Oprema i pribor:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0.5 -10 µL (Eppendorf, Njemačka)

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne epruvete volumena 50 mL (Sarstedt, Njemačka)
- sterilne mikroepuvete volumena 0.2, 0.5 i 1.5-2.0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- kapilare za uređaj LightCycler (Roche, Švicarska)
- hladni blok za kapilare (2-8°C), (Roche, Švicarska)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom (Applied Biosystems, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice (Applied Biosystems, SAD)
- vrtložna miješalica (Clever Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- centrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- mikrocentrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za kapilare (Roche, Švicarska)

#### Reagensi:

- sterilna destilirana voda za PCR
- LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master HybProbe (Roche, Švicarska)
- $\text{MgCl}_2$  (25 mM) (Roche, Švicarska)
- početnice za ***MDR1 (ABCB1) ex21***, rs2032582, G2677T/A (TIB Molbiol, Njemačka)
  - f 5'-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG-3'
  - r 5'-CGCCTGCTTTAGTTTGA CTCA-3'
- hibridizacijske probe za ***MDR1 (ABCB1) ex21*** G2677T/A (TIB Molbiol, Njemačka)
  - anchor 5'- LCRed640-CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTC-p
  - sensor 5'- TTCCCAGTACCTTCT-fl
- TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)
- TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD):

## 4.3. Genotipizacija

### 4.3.1. Izdvajanje DNA iz leukocita

Izdvajanje DNA iz pune krvi provodilo se metodom izoliranja [141]. Metoda se temelji na odvajanju leukocita iz pune krvi djelovanjem osmotskog tlaka, ostavljajući leukocite

netaknutima i razarajući eritrocite. Kemijskom i enzimskom ekstrakcijom uklanjaju se proteini, RNA i druge makromolekule, nakon čega se DNA pročišćava taloženjem u etanolu i otapa u puferu.

#### **4.3.2. PCR u stvarnom vremenu**

##### ***LightCycler***

*LightCycler*<sup>®</sup> tehnologija kombinira brze temperaturne cikluse koji se koriste i u standardnoj metodi lančane reakcije polimerazom (PCR, od engl. *polymerase chain reaction*) s mjerenjem fluorescencije dobivenih produkata na principu FRET-a (od eng. ***fluorescence resonance energy transfer***, prijenos energije fluorescentnom rezonancijom). Željeni odsječak DNA se umnaža i kvantificira u stvarnom vremenu, što znači da se umnažanje procjenjuje nakon svakog ciklusa. Upotrebom hibridizacijskih proba moguće je ciljano otkrivanje promjena u slijedu nukleotida u DNA, uključujući i promjene u samo jednom nukleotidu (SNP, eng. *single nucleotide polymorphism*), na temelju temperature taljenja ( $T_m$ , eng. *melting temperature*).

##### ***ABI 7500 Real Time PCR System***

Za analizu polimorfizama jednog nukleotida korištena je i metoda PCR u stvarnom vremenu - TaqMan<sup>®</sup>. Metoda se temelji na hibridizaciji ciljnog slijeda DNA i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe te stvaranju fluorescentnog signala zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze za vrijeme amplifikacije.

Za amplifikaciju ciljnog slijeda DNA koristi se TaqMan<sup>®</sup> Drug Metabolism Genotyping Assay (TaqMan<sup>®</sup> DME) koji sadrži specifične početnice i dvije TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe za detekciju alela.

#### **4.3.3. Genotipizacija ABCB1 2677G>T/A**

**Mjerna metoda:** PCR u stvarnom vremenu na uređaju LightCycler

Analiza polimorfnog alela ABCB1 2677G>T/A (rs2032582) provodila se amplifikacijom ulomka gena pomoću specifičnih početnica i detekcijom umnoženih ulomaka pomoću

fluorescentno obilježenih hibridizacijskih proba pri 640 nm. Primijenjena je metoda opisana u literaturi [142-144]. Reakcijska smjesa pripremljena je prema Tablici 1. :

**Tablica 1. Sastojci reakcijske smjese**

Sastojci reakcijske smjese (konc.)	Volumen (μL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
sterilna destilirana voda za PCR	4,0	
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master HybProbe (10x)	1,0	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,0	2,5 mM
početnica f 5'-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG-3' (5 μM)	0,5	0,25 μM
početnica r 5'-CGCCTGCTTTAGTTTGA CTCA-3' (5 μM)	0,5	0,25 μM
<i>anchor</i> proba (3 μM) 5'- LCRed640-CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTCCTCC- p	0,5	0,15 μM
<i>sensor</i> proba (1 μM) 5'- TTCCCAGTACCTTCT-fl	0,5	0,05 μM
PBS	0,5	
DMSO	0,5	
DNA (500 ng/ μL)	1	500 ng
<b>Ukupni volumen reakcijske smjese</b>	<b>10</b>	

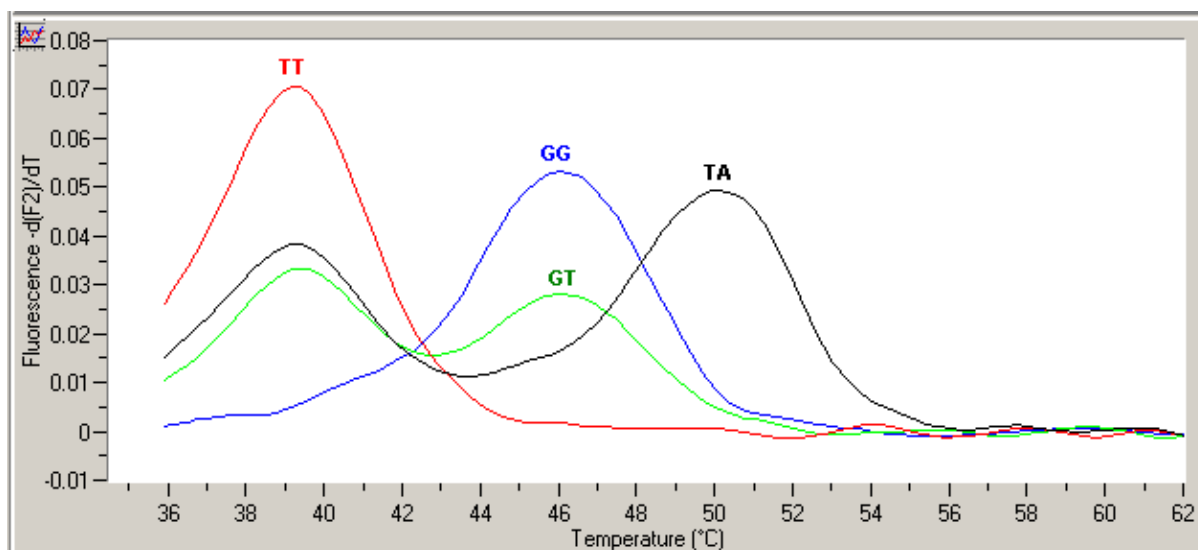
Uvjeti PCR reakcije:

- denaturacija na 95 °C 10 min;
- amplifikacija u 45 ciklusa na 95 °C, 55 °C 5 s i 72 °C 10 s;
- analiza temperature taljenja na 95 °C, 45 °C 5 s, 75 °C;
- hlađenje 40 °C 30 s.

Temperature taljenja očitane su na kanalu F2 pri 640 nm (T<sub>m</sub> za alel G je 46 °C, za alel T 39 °C i za alel A 51 °C). Slika 3. prikazuje analizu ABCB1 G2677T/A.



**Slika 3. Analiza ABCB1 G2677T/A: TT 39 °C; GT 39°C i 46 °C; GG 46 °C; TA 39 °C i 51 °C.**



#### 4.3.4. Genotipizacija *CYP2C9*, *ABCB1*, *ABCC2*, *SLCO1B1* i *ABCG2*

**Mjerna metoda:** TaqMan<sup>®</sup> metoda PCR u stvarnom vremenu

Analize polimorfizama jednog nukleotida provedene su pomoću TaqMan<sup>®</sup> DME reagenasa na uređaju ABI 7500 Real Time PCR System. Tablica 2. pokazuje sastojke pojedinačne reakcijske smjese, a Tablica 3. uvjete PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za TaqMan<sup>®</sup> DME Assay.

**Tablica 2. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese**

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	12.5	1x
TaqMan <sup>®</sup> DME Assay, 20x	1.25	1x
DNA razrjeđenje	11.25	25 ng
<b>Ukupni volumen reakcijske smjese</b>	<b>25</b>	

**Tablica 3. Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za TaqMan<sup>®</sup> DME Assay**

program: INICIJACIJA			
broj segmenta	ciljna temperatura (°C)	trajanje ( <i>hold time</i> ) (s)	ciklusi
1	50	120	1
program: INICIJALNA DENATURACIJA			
broj segmenta	ciljna temperatura (°C)	trajanje ( <i>hold time</i> ) (s)	ciklusi
1	95	600	1
program: DENATURACIJA / AMPLIFIKACIJA			
broj segmenta	ciljna temperatura (°C)	trajanje ( <i>hold time</i> ) (s)	ciklusi
1	92	15	
2	60	90	50

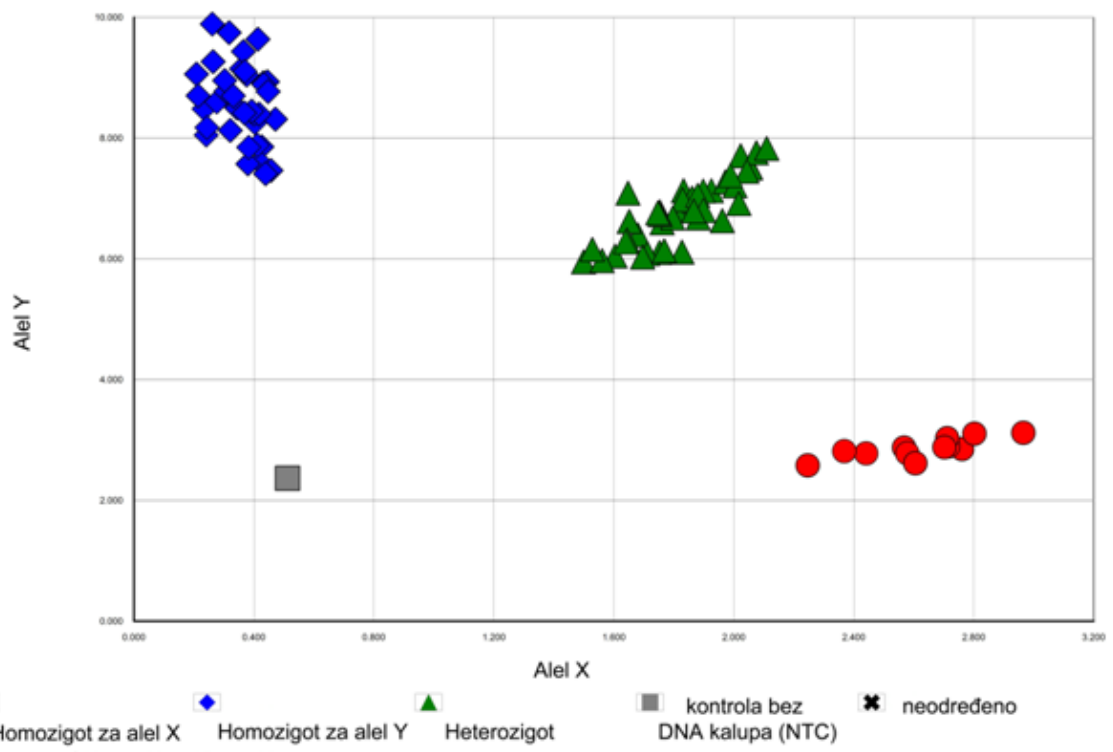
Fluorescentni signal je detektiran i analiziran pomoću računalnog programa *Sequence Detection System (SDS) Software v1.4*. Analizom alelne diskriminacije određeno je da li se radi o homozigotu za divlji alel, heterozigotu ili homozigotu za mutirani alela. Za analizu svakog polimorfizma korišten je specifičan *TaqMan*<sup>®</sup> *DME* reagens s odgovarajućim *ID* brojem (Tablica 4. Reagensi za genotipizaciju na uređaju ABI 7500) . Slika 4. prikazuje analizu alelne diskriminacije na uređaju ABI 7500 Real Time PCR System.

**Tablica 4. Reagensi za genotipizaciju na uređaju ABI 7500**

Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	<i>TaqMan</i> <sup>®</sup> <i>DME Assay ID</i>
<i>ABCG2</i>	rs2231142	421C>A	C_15854163_70
<i>CYP2C9</i> *2	rs1799853	430C>T	C_25625805_10
<i>CYP2C9</i> *3	rs1057910	1075A>C	C_27104892_10
<i>MDR1 (ABCB1) ex12</i>	rs1128503	1236C>T	C_7586662_10
<i>MDR1 (ABCB1) ex26</i>	rs1045642	3435C>T	C_7586657_20
<i>MRP2 (ABCC2) ex1</i>	rs717620	-24C>T	C_2814642_10
<i>MRP2 (ABCC2) ex10</i>	rs2273697	1249G>A	C_22272980_20
<i>SLCO1B1 (OATP1B1)</i>	rs4149056	521T>C	C_30633906_10
<i>SLCO1B1 (OATP1B1)</i>	rs2306283	388A>G	C_1901697_20

\*referentni broj SNP iz baze podataka za SNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database* - *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*)

**Slika 4. Analiza alelne diskriminacije na uređaju ABI 7500 Real Time PCR System**



#### 4.4. Statistička analiza

Za sve analizirane varijable napravljena je deskriptivna statistika.

Hi-kvadrat test je korišten za procjenu distribucije genotipova i devijacije od Hardy-Weinberg ekvilibrija, kao i za usporedbu frekvencije alela i genotipa među podgrupama bolesnika s nuspojavama i bez nuspojava. Normalnost raspodjele kontinuiranih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. U slučajevima kada su kontinuirane varijable odstupale od normalne raspodjele, medijan i interkvartilni raspon su korišteni kao mjere centralne tendencije odnosno varijabilnosti. U slučajevima kada kontinuirane varijable nisu odstupale od normalne raspodjele, aritmetička sredina i standardna devijacija su korištene kao mjere centralne tendencije odnosno varijabilnosti. U slučajevima normalne raspodjele korišten je Studen t-test, a u slučaju odstupanja Mann-Whitney U test.

Prediktivna vrijednost pojedinih genotipova u nastanku nuspojava određena je binarnom logističkom regresijom. Korišten je statistički program SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). U slučaju analize više polimorfnih lokusa primijenjen je test za Hardy-Weinberg ekvilibrij, prema metodi Markovljevih lanaca [145], dok je neravnoteža povezanosti (engl. linkage disequilibrium ili LD) procijenjena metodom omjera vjerodostojnosti (likelihood-ratio test) za lokuse nepoznatih gametičkih faza [146], što je implementirano u programu Arlequin ver. 3.01 [147].

Vrijednosti  $p < 0.05$  su se smatrali značajnima te su svi intervali pouzdanost dani na 95%.

## 5. Rezultati

---

### 5.1. Fluvastatin

U studiju je uključeno pedeset i dvoje bolesnika s transplantiranim bubrezima koji su iskusili miotoksičnost ili hepatotoksičnost povezanu s primjenom fluvastatina te 52 bolesnika s transplantiranim bubrezima koji nisu iskusili nuspojave uzrokovane fluvastatinom, a koji su odgovarali prema godinama, spolu, dozi fluvastatina i primjeni inhibitora kalcineurina (ciklosporin, takrolimus)/selektivnog imunosupresiva (sirolimus) bolesnicima koji su razvili nuspojavu na fluvastatin. U kontrolnoj skupini distribucija godina odgovarala je normalnoj razdiobi međutim distribucija u skupini bolesnika s nuspojavama je značajno odstupala od normalne razdiobe pa je median i interkvartilni raspon izračunat za obje skupine.

Median (interkvartilni raspon) godina u skupini bolesnika s nuspojavama bio je 52,0 (46,3-57,0), a u skupini bolesnika bez nuspojava 53,5 (43,3-58,8). Razlika u godinama između ispitivanih skupina nije bila statistički značajna (Mann-Whitney  $U=1310,0$ ;  $p=0,785$ ). Obje skupine su imale 29 muškaraca i 23 žene. U obje skupine, 46 bolesnika je uzimalo ciklosporin, 4 bolesnika je uzimalo takrolimus i 2 bolesnika su uzimala sirolimus.

Većina nuspojava uzrokovana fluvastatinom bila je uzrokovana miotoksičnošću (90,4 %) i nije bila ozbiljna (86,5%). Dvoje bolesnika je bilo hospitalizirano zbog rabdomiolize i petero zbog miopatije. Bolesnici su iskusili sljedeće nuspojave: mialgija bez povećanja vrijednosti kreatin kinaze ( $n=2$ ), povećanje vrijednosti kreatin kinaze ( $n=31$ ), mialgija uz povećanje vrijednosti kreatin kinaze ( $n=7$ ), miopatija ( $n=5$ ) i rabdomioliza ( $n=2$ ). U samo 3 slučaja, fluvastatin je uzrokovao povišenje transaminaza u serumu i u 2 slučaja povećanje transaminaza zajedno s povišenjem vrijednosti kreatinin kinaze manjim od 3 puta iznad gornje granice referentnog raspona. Svi slučajevi hepatotoksičnosti nisu bili ozbiljni.

Svi bolesnici, iz obje skupine su uzimali barem jedan inhibitor ABCG2. Skupina bolesnika s nuspojavama i skupina bolesnika bez nuspojava nije se statistički značajno razlikovala prema broju inhibitora ABCG2 u terapiji (Mann-Whitney  $U=1247,0$ ;  $p=0,461$ ). Skupine se nisu statistički značajno razlikovale ni po broju bolesnika koji su imali barem jedan inhibitor CYP2C9 u terapiji ( $\chi^2=0,378$ ;  $df=1$ ;  $p=0,539$ ;  $\phi=0,060$ ) niti po broju inhibitora CYP2C9 u terapiji (Mann-Whitney  $U=1277,0$ ;  $p=0,560$ ).

Kada se uzmu u obzir svi bolesnici, iz obje skupine, medijan (interkvartilni raspon) broj inhibitora ABCG2 bio je 2 (1-2), dok je broj inhibitora CYP2C9 bio 0 (0-1) i razlika u broju inhibitora ABCG2 i CYP2C9 je bila statistički značajna ( $z=-8,67$ ;  $p<0,001$ ). Trideset i osam bolesnika koji su iskusili nuspojavu i četrdeset i tri kontrolna ispitanika su imale barem jedan rizični čimbenik za nastanak nuspojave (disfunkciju bubrega ili jetre, šećernu bolest, hipotiroidizam i interakcije lijek-lijek) različit od genetičke predispozicije za nastanak nuspojave fluvastatina, međutim razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,396$ ;  $df=1$ ;  $p=0,237$ ;  $\phi=0,12$ ,  $OR=0,57$ ,  $95\% CI =0,22-1,46$ ).

Tablica 5. prikazuje karakteristike bolesnika, a Tablica 6. prikazuje broj pojedinih inhibitora ABCG2 i CYP2C9 u terapiji bolesnika koji su uzimali fluvastatin.

**Tablica 5. Opis ispitanika u skupini bolesnika na fluvastatinu**

	<b>Nuspojave</b>		<b>Kontrole</b>	
	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>
<b>Spol</b>				
muškarci	29	(55,8)	29	(55,8)
žene	23	(44,2)	23	(44,2)
<b>Ciklosporin/Takrolimus/Sirolimus</b>				
ciklosporin	46	(88,5)	46	(88,5)
takrolimus	4	(7,7)	4	(7,7)
sirolimus	2	(3,8)	2	(3,8)
<b>Hipotiroidizam</b>				
ne	48	(92,3)	51	(98,1)
da	4	(7,7)	1	(1,9)
<b>Šećerna bolest</b>				
ne	47	(90,4)	44	(84,6)
da	5	(9,6)	8	(15,4)
<b>Poremećaj funkcije jetara</b>				
ne	49	(94,2)	46	(88,5)
da	3	(5,8)	6	(11,5)
<b>Poremećaj funkcije bubrega</b>				
ne	40	(76,9)	34	(65,4)
da	12	(23,1)	18	(34,6)
<b>Inhibitor ABCG2</b>				
ne	0	(0,0)	0	(0,0)
da	52	(100,0)	52	(100,0)

**Tablica 6. Inhibitori ABCG2 i CYP2C9 u terapiji bolesnika liječenih fluvastatinom**

Inhibitori ABCG2		n (%)		Inhibitori CYP2C9		n (%)	
1	37	(35.6)	0	67	(64.4)		
2	47	(45.2)	1	33	(31.7)		
3	20	(19.2)	2	4	(3.8)		
ukupno	104	(100.0)	ukupno	104	(100.0)		
Inhibitori ABCG2				Inhibitori CYP2C9			
ciklosporin	92	(88.5)	pantoprazol	26	(70.3)		
pantoprazol	27	(26.0)	trimetoprim / sulfametoksazol	4	(10.8)		
lacidipin	25	(26.9)	amiodaron	2	(5.4)		
amlodipin	20	(19.2)	valsartan	2	(5.4)		
takrolimus	8	(7.7)	esomeprazol	1	(2.7)		
nifedipin	5	(4.8)	fluvoksamin	1	(2.7)		
doksazosin	5	(4.8)	flukonazol	1	(2.7)		
sirolimus	3	(2.9)	telmisartan	1	(2.7)		
felodipin	2	(1.9)	kandesartan	1	(2.7)		
lerkadipin	1	(1.0)	losartan	1	(2.7)		
esomeprazol	1	(1.0)	klopidogrel	1	(2.7)		
diltiazem	1	(1.0)					

Između bolesnika s nuspojavama i kontrolnih ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na raspodjelu genotipova *ABCG2* 421C>A ( $\chi^2=8,559$ ;  $df=2$ ;  $p=0,014$ ; Cramerov  $\phi=0.29$ ). Petnaest ispitanika s nuspojavama (28,8%) te 4 ispitanika bez nuspojava (7,7%) bili su nositelji genotipa *ABCG2* 421CA. Iako je učestalost alela *ABCG2* 421A bila veća u skupini bolesnika s nuspojavama nego u skupini bolesnika bez nuspojava razlika nije dosegla statističku značajnost (Yates- korekcija  $\chi^2=3,390$ ;  $df=1$ ;  $p=0,065$ ). Kako bismo validirali rezultate hi-kvadrat testa s Yates korekcijom napravili smo logističku regresiju čiji rezultati ukazuju kako bolesnici s alelom A imaju 2,75 puta (95% CI=1,02-7,40) povećan rizik za nastanak nuspojava. Ispitanici nositelji genotipova *ABCG2* 421CA ili AA (uzeti zajedno) su imali gotovo četiri puta veći rizik za nastanak nuspojava nego nositelji genotipa



*ABCG2* 421CC ( $\chi^2=6,190$ ;  $df=1$ ;  $p=0,013$ ;  $\phi=0,24$ ,  $OR=3,81$ ; 95%  $CI=1,27-11,45$ ).

Distribucija genotipova i alela *ABCG2* 421C>A između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 7.

**Tablica 7. Učestalost genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u ispitanika sa i bez nuspojava fluvastatina**

	n	Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>Genotipovi</b>							
CC	37		47	8,559	<b>0,014</b>	1	
CA	15		4			<b>4,76</b>	<b>(1,46-15,57)</b>
AA	0		1			-	
ukupno	52		52				
<b>Aleli</b>							
C	89		98	3,390	0,065	1	
A	15		6			<b>2,75</b>	<b>(1,02-7,40)</b>
ukupno	104		104				

Kratice: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije,  $df=2$  za genotipove,  $df=1$  za alele; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Razlika između učestalosti pojedinih genotipova *CYP2C9* između skupine s nuspojavama i kontrolne skupine također je bila statistički značajna ( $\chi^2=8,122$ ;  $df=3$ ;  $p=0,044$ ; Cramer's  $\phi=0,28$ ). Šest ispitanika s nuspojavama (11,5%) bili su nositelji genotipa  $*1/*3$ , dok niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine nije bio nositelj ovog genotipa. Niti jedan ispitanik, iz obje skupine nije bio nositelj genotipa  $*3/*3$ . U skupini bolesnika s nuspojavama, 14/52 (26,9%) ispitanika su bili nositelji genotipa  $1*/2*$ , a 2/52 (3,8%) bili su nositelji genotipa  $*2/*2$ . U kontrolnoj skupini 11/52 (21,2%) ispitanika su bili nositelji genotipa  $1*/2*$ , a 1 (1,5%) nositelj genotipa  $*2/*2$ .

Razlika u učestalosti alela *CYP2C9* između skupine s nuspojava i kontrolne skupine je također bila statistički značajna ( $\chi^2=7,514$ ;  $df=2$ ;  $p=0,023$ ; Cramer  $\phi=0,19$ ). Distribucija genotipova i alela *CYP2C9* između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 8.

Ispitanici čiji se genotip *CYP2C9* sastojao od jednog mutiranog ( $*2$  ili  $*3$ ) i jednog divljeg ili oba mutirana alela (zajedno homozigotni i heterozigotni nositelji mutiranih alela) su imali 2,5 puta povećan rizik za nastanak nuspojava ( $\chi^2=4,370$ ;  $df=1$ ;  $p=0,037$ ;  $\phi=0,21$ ;  $OR=2,44$ ; 95%  $CI=1,05-5,71$ ).

**Tablica 8. Učestalost genotipova i alela *CYP2C9* u ispitanika sa i bez nuspojava fluvastatina**

	Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI	Specifični test*				
							$\chi^2$	P	P <sub>c</sub>	OR	95% CI
<b>Genotipovi</b>											
*1/*1	30	40	8,122	<b>0,044</b>	1						
*1/*2	14	11			1,70	(0,68-4,26)					
*1/*3	6	0			-						
*2/*2	2	1			2,67	(0,23-30,80)					
ukupno	52	52									
<b>Aleli</b>											
*1	80	91	7,514	<b>0,023</b>	1		3,287	0,070	0,138	0,48	(0,23-0,997)
*2	18	13			1,58	(0,73-3,42)	0,607	0,436	1,000	1,47	(0,68-3,17)
*3	6	0			-		4,290	<b>0,038</b>	0,114	-	
ukupno	104	104									
<b>Genotipovi</b>											
wt/wt	30	40	4,375	0,112	1						
wt/mt	20	11			<b>2,42</b>	<b>(1,01-5,82)</b>					
mt/mt	2	1			2,67	(0,23-30,80)					
ukupno	52	52									
<b>Aleli</b>											
wt	80	91	4,370	<b>0,037</b>	1						
mt	24	13			<b>2,10</b>	<b>(1,003-4,40)</b>					
ukupno	104	104									

kratice: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa, df=3 za genotipove, df=2 za alele i genotipove grupirane kao mt (mutirani) ili wt (divlji); df=1 za alele grupirane kao mt ili wt; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda; mt = \*2or\*3;

\*specifični test za alele koji uspoređuje individualne alele nasuprot drugih; df=1 za hi-kvadrat; P<sub>c</sub> – P razina statističke značajnosti korigirana prema Bonferroni korekciji.

Multipli regresijski modeli su korišteni kako bi se ispitala povezanost između genotipova i ishoda nakon što su obzir uzeti drugi čimbenici. Rezultati su prikazani u Tablici 9. Kako je

broj ispitanika homozigotnih nositelja mutantnog alela *CYP2C9* bio malen, a samo jedan ispitanik je bio nositelj genotipa *ABCG2* 421 AA, oba polimorfizma su dihomotizirana prije multivarijantne analize. Inicijalni model je sadržavao sljedeće varijable: godine, spol, rizične faktore osim interakcije s ciklosporinom, genotip *ABCG2*, genotip *CYP2C9*, inhibitor *CYP2C9*, interakcije između genotipova *CYP2C9* i *ABCG2*, interakcije između genotipa *CYP2C9* i inhibitora. Budući da je p vrijednost za interakciju između genotipova *CYP2C9* i *ABCG2* bila veća (Wald  $\chi^2=1,304$ ;  $df=1$ ;  $p=0,310$ ) nego p vrijednost za interakciju između genotipova *CYP2C9* i inhibitora (Wald  $\chi^2=1,84$ ;  $df=1$ ;  $p=0,073$ ), interakcija između genotipova *CYP2C9* i *ABCG2* je isključena iz prediktivnog modela. Razlika između modela koji je uključivao interakciju i modela koji nije uključivao interakciju nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,033$ ;  $df=1$ ;  $p=0,309$ ) što bi značilo da interakcija nije bila značajna, te je bila isključena iz prediktivnog modela. Kada je model koji je sadržavao interakciju između genotipa *CYP2C9* i inhibitora uspoređen s modelom bez interakcija, razlika između modela je bila statistički značajna ( $\chi^2=4,830$ ;  $df=1$ ;  $p=0,028$ ). Ova interakcija je zadržana u prediktivnom modelu, i uključenje ove interakcije u model je povećao Nagelkerke R kvadrat koeficijent s 0,14 na 0,19.

Nakon što su u obzir uzeti drugi klinički faktori utjecaj *ABCG2* 421C>A je ostao statistički značajan prediktor nuspojava fluvastatina (OR=4,89, Wald  $\chi^2=1,587$ ;  $df=1$ ;  $p=0,012$ ; 95% CI =1,42-16,89).

Primjena inhibitora *CYP2C9* nije bila statistički značajan prediktor nuspojava u skupini bolesnika koji su bili homozigotni nositelji divljeg tipa alela, *CYP2C9*\*1/\*1 (OR=0,78; Wald  $\chi^2=0,195$ ;  $df=1$ ;  $p=0,659$ ; 95% CI=0,25-2,39) i kada su rezultati prilagođeni za utjecaj kliničkih faktora. Međutim, skupina homozigotnih i heterozigotnih nositelja mutiranih alela *CYP2C9* (\*2,\*3), je imala povećani rizik za nastanak nuspojava ukoliko je njihova terapija

uključivala inhibitor CYP2C9 (OR=6,59; Wald  $\chi^2=4,876$ ; df=1; p=0,027; 95% CI=1,24-35,08).

**Tablica 9. Rezultati multivarijantne analize za nuspojave fluvastatina**

	n	nuspojave	kontrole	OR	95%CI
<b>Godine*</b>		54 (43,3-58,8)	52 (46,3-57,0)	1,0	(0,96-1,04)
<b>Spol</b>					
ženski	23		23	1	
muški	29		29	1,50	(0,61-3,70)
<b>Rizični faktor izuzev farmakogenetičke predispozicije</b>					
ne	14		9	1	
da	38		43	0,52	(0,18-1,51)
<b>ABCG2</b>					
CC	37		47	1	
CA ili AA	15		5	<b>4,89</b>	<b>(1,42-16,89)</b>
<b>CYP2C9</b>					
wt/wt (*1/*1)	30		40	1	
wt/mt or mt/mt	22		12	0,76	(0,22-2,66)
<b>Inhibitor CYP2C9 ako CYP2C9 wt/wt</b>					
ne	23		27	1	
da	7		13	0,78	(0,25-2,39)
<b>Inhibitor CYP2C9 ako CYP2C9 wt/mt or mt/mt</b>					
ne	9		8	1	
da	13		4	<b>6,59</b>	<b>(1,24-35,08)</b>
<b>Genotip CYP2C9</b>				8,49	(1,18-60,85)
<b>x CYP2C9 inhibitor</b>					

\*Median (interkvartilni raspon)

Varijante gena *SLCO1B1*, *ABCC2*, *ABCB1* nisu pokazale statistički značajan utjecaj na nastanak nuspojava fluvastatina. Između bolesnika s nuspojavama i kontrolnih ispitanika utvrđena je statistički značajna razlika s obzirom na raspodjelu genotipa *ABCB1* 1236 CT, međutim nakon korekcije za multiplo testiranje razlika više nije bila statistički značajna ( $\chi^2=2,470$ ;  $p=0,116$ ; 95% CI=1,24-35,08).

Rezultati za varijante gena *ABCB1*, *SLCO1B1* i *ABCC2*, prikazani su u tablicama 10-13.

**Tablica 10. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 3435T>C i 1236C>T u ispitanika sa i bez nuspojava fluvastatina**

	n Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR (95% CI)
<b>3435C&gt;T</b>					
<b>genotipovi</b>					
CC	13	8	1,629	0,443	1
CT	26	31			0,52 (0,19-1,44)
TT	13	13			0,62 (0,19-1,98)
ukupno	52	52			
<b>aleli</b>					
C	52	47	0,308	0,579	1
T	52	57			0,83 (0,48-1,42)
ukupno	104	104			
<b>1236C&gt;T</b>					
<b>genotipovi</b>					
CC	23	13	4,327	0,115	1
CT	23	32			<b>0,41 (0,17-0,97)</b>
TT	6	7			0,48 (0,13-1,75)
ukupno	52	52			
<b>aleli</b>					
C	69	58	2,022	0,155	1
T	35	46			0,64 (0,37-1,12)
ukupno	104	104			

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 11. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 2677G>T/A u ispitanika sa i bez nuspojave fluvastatina**

	n Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR	(95% CI)
<b>Genotipovi</b>						
GG	19	15	1,540	0,819	1	
GT	24	25			0,76	(0,32-1,83)
TT	8	9			0,70	(0,22-2,26)
GA	0	1			-	
TA	1	1			0,79	(0,05-13,69)
ukupno	52	51				
<b>Aleli</b>						
G	62	56	0,725	0,696	1	
T	41	44			0,84	(0,48-1,47)
A	1	2			0,45	(0,04-5,12)
ukupno	104	102				
<b>Genotipovi</b>						
GG	19	15	0,594	0,743	1	
GT ili GA	24	26			0,73	(0,30-1,75)
TT ili TA	9	10			0,71	(0,23-2,19)
ukupno	52	51				
<b>Aleli</b>						
G	62	56	0,295	0,587	1	
T ili A	42	46			0,83	(0,47-1,43)
ukupno	104	102				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=4 za izvorne genotipove, df=2 za grupirane genotipove, df=2 za izvorne alele, df=1 za grupirane alele; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 12 . Učestalost genotipova i alela *SLCO1B1* 388A>G i 521T>C u ispitanika sa i bez nuspojava fluvastatina**

	n Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR (95% CI)
<b>388A&gt;G</b>					
genotipovi					
AA	19	14	1,512	0,470	1
AG	26	29			0,66 (0,28-1,58)
GG	6	9			0,49 (0,14-1,70)
ukupno	51	52			
aleli					
A	64	57	1,031	0,310	1
G	38	47			0,72 (0,41-1,26)
ukupno	102	104			
<b>521T&gt;C</b>					
genotipovi					
TT	35	37	0,189	0,910	1
TC	16	14			1,21 (0,52-2,84)
CC	1	1			1,06 (0,06-17,56)
ukupno	52	52			
aleli					
T	86	88	0,035	0,851	1
C	18	16			1,15 (0,55-2,40)

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda



**Tablica 131. Učestalost genotipova i alela *ABCC2* -24C>T i 1249G>A u ispitanika sa i bez nuspojava fluvastatina**

	n Nuspojave	Kontrole	$\chi^2$	P	OR (95% CI)
<b>-24C&gt;T</b>					
<b>genotipovi</b>					
CC	35	32	0,391	0,822	1
CT	16	19			0,77 (0,34-1,75)
TT	1	1			0,91 (0,06-15,23)
ukupno	52	52			
<b>aleli</b>					
C	86	83	0,126	0,722	1
T	18	21			0,83 (0,41-1,66)
ukupno	104	104			
<b>1249G&gt;A</b>					
<b>genotipovi</b>					
GG	30	28	0,207	0,902	1
GA	18	19			0,88 (0,39-2,02)
AA	4	5			0,75 (0,18-3,07)
ukupno	52	52			
<b>aleli</b>					
G	78	75	0,099	0,753	1
A	26	29			0,86 (0,47-1,60)
ukupno	104	104			

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica

vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijatni

omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Učestalosti ispitivanih genotipova i alela nisu odstupale od Hardy-Weinbergove ravnoteže.

## 5.2. Atorvastatin

U studiju je bilo uključeno šezdeset bolesnika koji su iskusili nuspojave povezane s dozom atorvastatina i šezdeset bolesnika koji su uzimali atorvastatin i nisu iskusili nuspojave (kontrolna skupina). Kontrolna skupina ispitanika je odgovarali prema godinama, spolu, dozi atorvastatina i primjeni inhibitora kalcineurina (ciklosporin, takrolimus)/selektivnog imunosupresiva (sirolimus), bolesnicima koji su razvili nuspojavu na atorvastatin. U skupini bolesnika s nuspojavama distribucija godina odgovarala je normalnoj razdiobi međutim u kontrolnoj skupini je značajno odstupala od normalne razdiobe pa je median i interkvartalni raspon izračunat za obje skupine.

Median (interkvartalni raspon) godina u skupini bolesnika s nuspojava bio je 56,00 (48,00-65,75), a u skupini bolesnika bez nuspojava 60,50 (53,25-74,50). Razlika u godinama između ispitivanih skupina nije bila statistički značajna (Mann-Whitney U=1431,500; 0,053). Objе skupine su imale 30 muškaraca i 30 žena. Primijenjena doza atorvastatina nije se statistički razlikovala između ispitivanih skupina (Mann-Whitney U=1238,000; p=0,262). U skupini s nuspojavama 10 bolesnika je uzimalo ciklosporin, a u skupini bez nuspojava 7 bolesnika je uzimalo ciklosporina te razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,617$ ; df=1; p=0,432;  $\phi=0,072$ ). Po jedan bolesnik iz obje skupine je uzimao takrolimus. Većina nuspojave uzrokovana atorvastatinom bila je uzrokovana miotoksičnošću (56,7%) i nije bila ozbiljna (76,7%). Bolesnici su iskusili sljedeće nuspojave uzrokovane miotoksičnošću atorvastatina: mialgija bez povećanja vrijednosti kreatin kinaze (n=13), povećanje vrijednosti kreatin kinaze (n=13), mialgija bez povećanja vrijednosti kreatin kinaze (n=5), miopatija (n=4) i rabdomioliza (n=2). Dvoje bolesnika je bilo hospitalizirano zbog rabdomiolize i četvero zbog miopatije. U 9 slučajeva, atorvastatin je uzrokovao povišene vrijednosti transaminaza (ALT, AST) u serumu i u 4 slučaja zabilježene su povišene vrijednosti transaminaza zajedno s povišenim vrijednostima kreatin kinaze manjim od 3 puta iznad gornje granice referentnog

raspona. U 6 slučajeva atorvastatin je uzrokovao ozbiljno oštećenje jetre. Skupine se nisu statistički značajno razlikovale ni po broju bolesnika koji su imali barem jedan inhibitor ABCG2 u terapiji ( $\chi^2=0,133$ ;  $df=1$ ;  $p=0,715$ ;  $\phi=-0,064$ ) niti po ukupnom broju inhibitora ABCG2 u terapiji (Mann-Whitney  $U=1734,500$ ;  $p=0,706$ ).

Četrdeset i dvoje bolesnika koji su iskusili nuspojavu i pedeset i tri kontrolna ispitanika su imali barem jedan rizični faktor za nastanak nuspojava (disfunkciju bubrega ili jetre, šećernu bolest, hipotiroidizam i interakciju lijek-lijek), različit od genetičke predispozicije za nastanak nuspojava atorvastatina, i je razlika bila statistički značajna ( $\chi^2=6,114$ ;  $df=1$ ;  $p=0,013$ ;  $\phi=-0,226$ ). Median (interkvartilni raspon) broja rizičnih faktora izuzev farmakogenetičke predispozicije u skupini bolesnika s nuspojavama bio je 1 (0-1), a u skupini bolesnika bez nuspojava iznosio je 1 (1-1). Razlika u broju rizičnih faktora između ispitivanih skupina bila je statistički značajna (Mann-Whitney  $U=1470,000$ ;  $p=0,014$ ).

Od pojedinačnih rizičnih faktora broj bolesnika s šećernom bolesti tipa II se statistički značajno razlikovao ( $\chi^2=5,263$ ;  $df=1$ ;  $p=0,022$ ,  $\phi=-0,209$ ), između skupine s nuspojavama ( $n=10$ ) i kontrolne skupine ( $n=21$ ). Ovo se može objasniti činjenicom da su bolesnici u kontrolnoj skupini bili stariji i prema tome imali veći broj rizičnih faktora. U multivarijantnoj logističkoj regresiji koja je uključivala: godine, rizični faktor izuzev farmakogenetičke predispozicije, šećernu bolest, interakcije, genotip *ABCG2* i genotip *SLCO1B1*, varijabla rizični faktor izuzev farmakogenetičke predispozicije (OR=0,462; Wald  $\chi^2=1,278$ ;  $df=1$ ;  $p=0,258$ ; 95% CI =0,121-1,764) i varijabla šećerna bolest (OR=0,724, Wald  $\chi^2=0,402$ ;  $df=1$ ;  $p=0,526$ ; 95% CI =0,267-1,964) više nisu bili značajni prediktori nuspojava. Karakteristike bolesnika u obje ispitivane skupine prikazane su u Tablici 14. U Tablici 15. prikazan su inhibitori ABCG2 u terapiji bolesnika koji su uzimali atorvastatin.

**Tablica 14. Opis ispitanika u skupini bolesnika na atorvastatinu**

	nuspojave		kontrole	
	n	(%)	n	(%)
<b>Spol</b>				
muškarci	30	(50,0)	30	(50,0)
žene	30	(50,0)	30	(50,0)
<b>Ciklosporin/Takrolimus</b>				
ciklosporin	10	(16,7)	7	(11,7)
takrolimus	1	(1,7)	1	(1,7)
<b>Hipotiroizam</b>				
ne	55	(91,7)	48	(80,0)
da	5	(8,3)	12	(20,0)
<b>Šććerna bolest</b>				
ne	50	(83,3)	39	(65,0)
da	10	(16,7)	21	(35,0)
<b>Poremećaj funkcije jetara</b>				
ne	55	(91,7)	56	(93,3)
da	5	(8,3)	4	(6,7)
<b>Poremećaj funkcije bubrega</b>				
ne	50	(83,3)	49	(81,7)
da	10	(16,7)	11	(18,3)
<b>Inhibitor ABCG2</b>				
ne	32	(53,3)	30	(50,0)
da	28	(46,7)	30	(50,0)

**Tablica 15. Inhibitori ABCG2 u terapiji bolesnika koji su uzimali atorvastatin**

Inhibitori ABCG2	nuspojave		kontrole	
	n	(%)	n	(%)
Amlodipin	11	28,2%	11	23,9%
Ciklosporin	10	25,6%	7	15,2%
Esomeprazol	1	2,6%	1	2,2%
Felodipin	1	2,6%	1	2,2%
Lacidipin	6	15,4%	6	13,0%
Lanzoprazol	–	–	1	2,2%
Lercadipin	–	–	4	8,7%
Nifedipin	2	5,1%	–	–
Pantoprazol	7	17,9%	12	26,1%
Takrolimus	1	2,6%	2	4,3%
Ukupno	39	100,0%	45	100,0%

Razlika u učestalosti genotipova *ABCG2* 421C>A između skupine s nuspojavama i skupine bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=7,222$ ;  $df=2$ ;  $p=0,015$ ; Cramer's  $\phi=0,245$ ). Petnaest ispitanika s nuspojavama te 5 ispitanika bez nuspojava bili su heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421CA . Heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421CA imaju 3,75 puta (CI=1,265 – 11,120) povećan rizik za nastanak nuspojava atorvastatina. Jedan ispitanik s nuspojavama bio je homozigotni nositelj genotipa *ABCG2* 421 AA dok niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine nije bio nositelj ovog genotipa. Razlika u učestalosti alela A između skupine s nuspojavama i bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=7,206$ ;  $df=1$ ;  $p=0,012$ ; Cramer's  $\phi=0,173$ ; Yates korekcija  $\chi^2=6,055$ ;  $p=0,014$ ). Bolesnici s alelom A su imali 3,796 puta povećan rizik za nastanak nuspojava (CI=1,353-10,654). Distribucija genotipova i alela *ABCG2* 421C>A između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 16.

**Tablica 16. Učestalost genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u ispitanika sa i bez nuspojava atorvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>n</b>						
<b>genotipovi</b>			7.222	<b>0.015</b>		
CC	44	55			1	
CA	15	5			<b>3,750</b>	<b>1,265 - 11,120</b>
AA	1	0			-	
ukupno						
<b>aleli</b>			6.055	<b>0.014</b>		
C	103	115			1	
A	17	5			<b>3,796</b>	<b>1,353-10,654</b>
ukupno						

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Razlika u učestalosti genotipova *SLCO1B1* 388 A>G između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,072$ ; df=2; p=0,585; Cramer's  $\phi=0,095$ ). Dvadeset i devet bolesnika s nuspojavama (48,3%) te 27 bolesnika bez nuspojava (45%) bili su heterozigotni nositelji genotipa *SLCO1B1* 388AG dok su 13 (21,7%) bolesnika s nuspojavama i 10 (16,7%) bez nuspojava bili homozigotni nositelji *SLCO1B1* 388 AG. Razlika u učestalosti alela G između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,091$ ; df=1; p=0,296; Cramer's  $\phi=0,067$ , Yates korekcija  $\chi^2=0,835$ , p=0,361). Razlika u učestalosti genotipova *SLCO1B1* 521 T>C između skupine s nuspojavama i bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=6,229$ ; df=2; p=0,044; Cramer's  $\phi=0,228$ ). Dvadeset i dva bolesnika s nuspojavama (36,6%) te 16 bolesnika bez nuspojava (26,7%) bili su heterozigoti za *SLCO1B1* 521 TC. Četiri ispitanika s nuspojavama bili su homozigoti i imali su genotip *SLCO1B1* 521 CC dok niti jedan ispitanik iz kontrolne skupine

nije bio nositelj ovog genotipa. Razlika u učestalosti alela C između skupine s nuspojavama i bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=5,271$ ;  $df=1$ ;  $p=0,022$ ; Cramer's  $\phi=0,148$ , Yates korekcija  $\chi^2=4,545$ ,  $p=0,033$ ). Bolesnici s alelom C su imali 2,167 puta (CI=1,110-4,231) povećan rizik za nastanak nuspojava atorvastatina.

Distribucija genotipova i alela *SLCO1B1* između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 17.

**Tablica 17. Učestalost genotipova i alela *SLCO1B1* 388A>G i 521T>C u ispitanika sa i bez nuspojava atorvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
	n					
<b>388A&gt;G</b>						
<b>genotipovi</b>			1.072	0.585		
AA	18	23			1	
AG	29	27			1,372	0,611-3,083
GG	13	10			1,661	0,593- 4,651
ukupno						
<b>aleli</b>			0.835	0.361		
A	65	73			1	
G	55	47			1,314	0,787-2,195
ukupno						
<b>521T&gt;C</b>						
<b>genotipovi</b>			<b>6,229</b>	<b>0,044</b>		
TT	34	44			1	
TC	22	16			1,779	0,812-3,898
CC	4	0			-	
ukupno						
<b>aleli</b>			<b>4.545</b>	<b>0.033</b>		
T	90	104			1	
C	30	16			<b>2,167</b>	<b>1,110 -4,231</b>
ukupno						

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije,  $df=2$  za genotipove,  $df=1$  za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Za ispitivanje povezanosti između genotipova i ishoda nakon što su u obzir uzeti drugi rizični čimbenici korišteni su multipli regresijski modeli. Rezultati su prikazani u Tablici 18. Kako je broj ispitanika, homozigotnih nositelja varijantnog alela *SLCO1B1* 521C bio malen, a samo jedan ispitanik je bio homozigot za *ABCG2* 421 A, oba polimorfizma su

dihomotizirana prije multivarijatne analize. Model je sadržavao sljedeće varijable: godine, rizične faktor bez genetičke predispozicije, šećernu bolest, interakcije, genotip *ABCG2*, genotip *SLCO1B1*.

Nakon što su u obzir uzeti drugi rizični faktori utjecaj *ABCG2* 421C>A je ostao statistički značajan prediktor nuspojava atorvastatina (OR=4,386, Wald  $\chi^2=6,478$ ; df=1; p=0,006; 95% CI =1,405-13,693). Nakon što su u obzir uzeti drugi rizični faktori utjecaj *SLCO1B1* 521T>C nije ostao statistički značajan prediktor nuspojava atorvastatina (OR=2,023, Wald  $\chi^2=2,737$ ; df=1; p=0,098; 95% CI =0,878-4,663).

**Tablica 18. Rezultati multivarijatne analize nuspojava atorvastatina**

n	nuspojave	kontrola	Multivariate	
			OR	(95% CI)
<b>Godine*</b>	56.00 (48.00-65.75)	60.50 (53.25-74.50)	0,982	0,948-1,017
<b>Rizični faktor izuzev farmakogenetičke predispozicije</b>				
ne	18	7	1	
da	42	53	0,462	0,121-1,764
<b><i>ABCG2</i></b>				
CC	44	55	1	
CA ili AA	16	5	<b>4,386</b>	<b>1,405-13,693</b>
<b><i>SLCO1B1</i></b>				
TT	34	44	1	
TC ili CC	26	16	2,023	0,878-4,663
<b>Šećerna bolest</b>				
ne	50	39	1	
da	10	21	0,724	0,267-1,964
<b>Interakcije</b>				
ne	29	19	1	
da	31	41	0,627	0,218-1,800

\*Median (interkvartilni raspon)

Razlika u učestalosti polimorfizama gena *ABCB1* i *ABCC2* između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna. Rezultati analize za pojedine genotipove i alele prikazani su u tablicama 19, 20 i 21.



**Tablica 19. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 2677G>T/A u ispitanika sa i bez nuspojava atorvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
n						
<b>2677G&gt;T/A</b>						
<b>genotipovi</b>			2,822	0,420		
GG	18	16			1	
GT	31	32			0,862	0,374-1,985
TT	7	11			0,566	0,177-1,809
TA	4	1			3,556	0,359-35,197
ukupno	60	60				
<b>aleli</b>			2,215	0,330		
G	67	64			1	
T	49	55			0,851	0,508-1,425
A	4	1			3,821	0,416-35,107
ukupno	120	120				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, *ABCB1* 2677 G>T/A, df=3 za genotipove, df=2 za izvorne alele; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 20. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 3435T>C i 1236C>T u ispitanika sa i bez nuspojave atorvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
n						
<b>3435C&gt;T</b>						
<b>genotipovi</b>			3,979	0,137		
CC	13	6			1	
CT	33	33			0,462	0,157-1,360
TT	14	21			0,308	0,095-1,002
ukupno	60	60				
<b>aleli</b>			3,326	0,068		
C	59	45			1	
T	61	75			0,620	0,371-1,038
ukupno	120	120				
<b>1236C&gt;T</b>						
<b>genotipovi</b>			1,457	0,692		
CC	19	16			1	
CT	32	32			0,842	0,369-1,924
TT	9	120			0,689	0,228-2,078
ukupno						
<b>aleli</b>						
C	70	65	0,406	0,524	1	
T	50	55			0,847	0,507-1,414
ukupno	120	120				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 21. Učestalost genotipova i alela *ABCC2* -24C>T i 1249G>A u ispitanika sa i bez nuspojava atorvastatina**

	n	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>-24C&gt;T</b>							
<b>genotipovi</b>				2,575	0,276		
CC	34		40			1	
CT	26		19			1,610	0,762-3,400
TT	0		1			-	
ukupno	60		60				
<b>aleli</b>				0,661	0,416		
C	94		99			1	
T	26		21			1.304	0,687-2,474
ukupno	120		120				
<b>1249G&gt;A</b>							
<b>genotipovi</b>				0,040	0,980		
GG	40		39			1	
GA	18		19			0,924	0,423-2,017
AA	2		2			0,975	0,131-7,269
ukupno	60		60				
<b>aleli</b>				0,238	0,626		
G	98		95			1	
A	22		25			0,947	0,495-1,811
ukupno	120		120				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

### Analize podskupine bolesnika koja je razvila miotoksičnost

Razlika u učestalosti genotipova *ABCG2* 421C>A između skupine s miotoksičnošću (n=34) i skupine bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=7.190$ ; df=1; p=0.007; Cramer's  $\phi=0.277$ ). Deset od 34 ispitanika koji su iskusili miotoksičnost atorvastatina te 5 ispitanika od 60 ispitanika bez nuspojava su heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421CA . Heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421CA imaju 4,583 puta (CI=1,414-14,852) povećan rizik za nastanak miotoksičnosti atorvastatina u usporedbi s nositeljima divljeg genotipa *ABCG2* 421CC. Niti jedan ispitanik nije bio homozigotni nositelj genotipa *ABCG2* 421 AA . Razlika u učestalosti alela A između skupine ispitanika s miotoksičnošću i skupine bez nuspojava bila

je statistički značajna i nakon korekcije za multiplo testiranje ( $\chi^2=6,566$ ;  $df=1$ ;  $p=0,010$ ; Cramer's  $\phi=0,187$ ; Yates korekcija  $\chi^2=5,209$ ;  $p=0,022$ ). Nakon što su u obzir uzeti drugi klinički faktori utjecaj *ABCG2* 421C>A je ostao statistički značajan prediktor miotoksičnosti atorvastatina (OR=4,180, Wald  $\chi^2=4,415$ ;  $df=1$ ;  $p=0,036$ ; 95% CI =1,101-15,869). Model je sadržavao sljedeće varijable: godine, rizični faktor bez genetičke predispozicije, šećernu bolest, inhibitor *ABCG2*, genotip *ABCG2* i genotip *SLCO1B1*. Tablica 22. prikazuje distribuciji genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u podskupini koja je razvila miotoksičnost na atorvastatin. Ostali genotipovi koji su imali više varijanti imali su nedovoljan broj ispitanika za analizu. Ostale podskupine nuspojava nisu imale dovoljan broj ispitanika za analizu.

**Tablica 22. Učestalost genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u podskupini koja je razvila miotoksičnost na atorvastatin**

	miotoksičnost	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
n						
<b>genotipovi</b>			7,199	0,007		
CC	24	55			1	
CA	10	5			<b>4,583</b>	<b>1,414-14,852</b>
AA	34	60			-	
ukupno						
<b>aleli</b>			6,566	0,010		
C	58	115			1	
A	10	5			<b>3,966</b>	<b>1,296-12,141</b>
ukupno	68	120				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije,  $df=2$  za genotipove,  $df=1$  za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

### 5.3. Simvastatin

U studiju je bilo uključeno pedeset bolesnika koji su iskusili nuspojave povezane s dozom simvastatina i pedeset bolesnika koji su uzimali simvastatin i nisu iskusili nuspojave (kontrolna skupina). Kontrolna skupina ispitanika je odgovarala prema godinama, spolu, dozi simvastatina i primjeni inhibitora kalcineurina (ciklosporin, takrolimus)/selektivnog imunosupresiva (sirolimus), skupini bolesnika koji su razvili nuspojavu na simvastatin. U skupini bolesnika s nuspojavama i u skupini bolesnika bez nuspojava distribucija godina odgovarala je normalnoj razdiobi. Median (interkvartilni raspon) godina u skupini bolesnika s nuspojava bio je 59,00 (51,50-67,00), a u skupini bolesnika bez nuspojava 63,00 (53,00-69,50). Razlika u godina između ispitivanih skupina nije bila statistički značajna ( $t=-0,969$ ;  $df=98$ ;  $p=0,335$ ). Obje skupine su imale 23 muškaraca i 27 žena. U skupini s nuspojavama 13 bolesnika je uzimalo ciklosporin, a u skupini bez nuspojava 12 bolesnika je uzimalo ciklosporina te razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,053$ ;  $df=1$ ;  $p=0,817$ ;  $\phi=0,023$ ). Dva bolesnik iz skupine s nuspojavama i 4 bolesnika iz skupine bez nuspojava su uzimali takrolimus. Primijenjena doza simvastatina nije se statistički razlikovala između ispitivanih skupina (Mann-Whitney  $U=1160,500$ ;  $p=0,511$ ).

Većina nuspojava uzrokovana simvastatinom bila je uzrokovana miotoksičnošću (68 %) i nije bila ozbiljna (86%). Bolesnici su iskusili sljedeće nuspojave uzrokovane miotoksičnošću simvastatina: mialgija bez povećanja vrijednosti kreatin kinaze ( $n=8$ ), povećanje vrijednosti kreatin kinaze ( $n=12$ ), mialgija s povećanjem vrijednosti kreatin kinaze ( $n=8$ ), miopatija ( $n=4$ ) i rabdomioliza ( $n=2$ ).

U 9 slučajeva, simvastatin je uzrokovao povišene vrijednosti transaminaza u serumu i u 3 slučaja zabilježene su povišene vrijednosti transaminaza zajedno s povišenim vrijednostima kreatin kinaze manjim od 3 puta iznad gornje granice referentnog raspona. U 1 slučaju

simvastatin je uzrokovao ozbiljno oštećenje jetre. U 3 slučaja simvastatin je uzrokovao nuspojave povezane sa dozom koje nisu bile uzrokovane miotoksičnosti i hepatotoksičnosti simvastatina Tablica 23. prikazuje karakteristike bolesnika. Tablica 24. prikazuje inhibitor ABCG2 u terapiji simvastatina.

**Tablica 23. Opis slučajeva ispitanika na simvastatinu**

	nuspojave		kontrola	
	n	(%)	n	(%)
<b>Spol</b>				
muškarci	23	(46,0)	23	(46,0)
žene	27	(54,0)	27	(54,0)
<b>Ciklosporin/Takrolimus</b>				
ciklosporin	13	(26,0)	12	(24,0)
takrolimus	2	(4,0)	4	(8,0)
<b>Hipotiroidizam</b>				
ne	46	(92,0)	43	(86,0)
da	4	(8,0)	7	(14,0)
<b>Šećerna bolest</b>				
ne	42	(84,0)	32	(64,0)
da	8	(16,0)	18	(36,0)
<b>Poremećaj funkcije jetara</b>				
ne	46	(92,0)	48	(96,0)
da	4	(8,0)	2	(4,0)
<b>Poremećaj funkcije bubrega</b>				
ne	43	(86,0)	39	(78,0)
da	7	(14,0)	11	(22,0)
<b>Inhibitor ABCG2</b>				
ne	24	(48,0)	23	(46,0)
da	26	(52,0)	27	(54,0)

**Tablica 24. Inhibitori ABCG2 u terapiji bolesnika koji su uzimali simvastatin**

Inhibitori ABCG2	Nuspojave		Kontrole	
	n	(%)	n	(%)
amlodipin	7	23,3%	12	30,0%
ciklosporin	12	40,0%	10	25,0%
lacidipin	3	10,0%	5	12,5%
pantoprazol	3	10,0%	6	15,0%
takrolimus	2	6,7%	5	12,5%
lanzoprazol	3	10,0%	1	2,5%
Ukupno	30	100,0%	39	100,0%

Ispitivane skupine se nisu statistički značajno razlikovale ni po broju bolesnika koji su imali barem jedan inhibitor ABCG2 u terapiji ( $\chi^2=0,040$ ;  $df=1$ ;  $p=0,814$ ;  $\phi=0,020$ ) niti po ukupnom broju inhibitora ABCG2 u terapiji (Mann-Whitney  $U=1180,000$ ;  $p=0,602$ ).

Četrdeset i jedan bolesnik s nuspojavama i trideset i devet bolesnika bez nuspojava su imali barem jedan rizični faktor za nastanak nuspojava (oštećenu funkciju bubrega ili jetre, šećernu bolest, hipotiroidizam i interakcije lijek-lijek), različit od genetičke predispozicije za nastanak nuspojava simvastatina i razlika nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,250$ ;  $df=1$ ;  $p=0,803$ ;  $\phi=0,050$ ). Median (interkvartilni raspon) broja rizičnih čimbenika izuzev farmakogenetičke predispozicije u skupini bolesnika s nuspojava i u skupini bolesnika bez nuspojava bio je 1 (1-2). Razlika u broju rizičnih čimbenika između ispitivanih skupinama nije bila statistički značajna (Mann-Whitney  $U=1013,000$ ;  $p=0,083$ ).

Od pojedinačnih rizičnih faktora broj bolesnika s šećernom bolesti tipa II se statistički značajno razlikovao ( $\chi^2=5,198$ ;  $df=1$ ;  $p=0,039$ ,  $\phi=0,228$ ) između skupine s nuspojavama ( $n=8$ ) i kontrolne skupine ( $n=18$ ). Ovo se može objasniti činjenicom da su bolesnici u kontrolnoj skupini bili stariji.

Razlika u učestalosti genotipova *ABCG2* 421C>A između skupine s nuspojavama i skupine bez nuspojava nije bila statistički značajna ( $\chi^2=4,820$ ;  $df=2$ ;  $p=0,090$ ; Cramer's  $\phi=0,220$ ). Četrnaest ispitanika s nuspojavama te 6 ispitanika bez nuspojava bili su heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421 CA. Jedan ispitanik bez nuspojava bio je homozigotni nositelj genotipa *ABCG2* 421 AA dok niti jedan ispitanik iz skupine s nuspojavama nije bio nositelj ovog genotipa. Razlika u učestalosti alela A između skupine s nuspojavama i bez nuspojava

nije bila statistički značajna ( $\chi^2=1,839$ ;  $df=1$ ;  $p=0,175$ ; Cramer's  $\phi=0,096$ ; Yates korekcija  $\chi^2=1,277$ ;  $p=0,258$ ). Distribucija genotipova i alela *ABCG2* 421C>A između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 25.

**Tablica 25. Učestalost genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u ispitanika sa i bez nuspojava simvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
n						
<b>genotipovi</b>			4,820	0,090		
CC	36	43			1	
CA	14	6			2,787	0,0972-7,995
AA	0	1			-	
ukupno	50	50				
<b>aleli</b>			1,277	0,258		
C	86	92			1	
A	14	8			1,872	0,748-4,684
ukupno	100	100				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije,  $df=2$  za genotipove,  $df=1$  za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Razlika u učestalosti genotipova *SLCO1B1* 388 A>G između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,522$ ;  $df=2$ ;  $p=0,770$ ; Cramer's  $\phi=0,072$ ). Devetnaest bolesnika s nuspojavama te 20 bolesnika bez nuspojava bili su heterozigotni nositelji genotipa *SLCO1B1* 388 AG dok su 13 bolesnika s nuspojavama i 10 bez nuspojava bili homozigotni nositelji *SLCO1B1* 388 GG. Razlika u učestalosti alela G između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna ( $\chi^2=0,512$ ;  $df=1$ ;  $p=0,474$ ; Cramer's  $\phi=0,051$ , Yates korekcija  $\chi^2=0,327$ ,  $p=0,567$ ). Distribucija genotipova i alela *SLCO1B1* između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 26.



**Tablica 26. Učestalost genotipova i alela *SLCO1B1* u ispitanika sa i bez nuspojave simvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
	n(%)					
<b>388A&gt;G</b>			0,522	0,770		
<b>genotipovi</b>						
AA	18	20			1	
AG	19	20			1,056	0,0432-2,581
GG	13	10			1,444	0,510-4,094
ukupno	50					
<b>aleli</b>			0,512	0,474		
A	55	60			1	
G	45	40			1,227	0,700-2,152
ukupno	100	100				
		0				
<b>521T&gt;C</b>						
<b>genotipovi</b>			2,778	0,096		
TT	28	36			1	
TC	22	14			2,020	0,879-4,645
CC	0	0				
ukupno						
<b>aleli</b>			1,660	0,198		
T	78	86			1	
C	22	14			1,733	0,829-3,620
ukupno	100	100				
		0				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

Razlika u učestalosti genotipova *SLCO1B1* 521 T>C između skupine s nuspojavama i bez nuspojave nije bila statistički značajna ( $\chi^2=2,778$ ; df=1; p=0,096; Cramer's  $\phi=0,167$ ). Dvadeset i dva bolesnika s nuspojavama te 14 bolesnika bez nuspojave bili su nositelji genotipa *SLCO1B1* 521 TC. Niti jedan ispitanik nije bio homozigot za genotip *SLCO1B1* 521 CC. Razlika u učestalosti alela C između skupine s nuspojavama i bez nuspojave nije bila statistički značajna ( $\chi^2=2,168$ ; df=1; p=0,141; Cramer's  $\phi=0,104$ , Yates korekcija  $\chi^2=1,660$ , p=0,198).

Za ispitivanje povezanosti između genotipova i ishoda nakon što su u obzir uzeti *confounderi* korišteni su multipli regresijski modeli. Rezultati su prikazani u Tablici 27 . Kako je samo jedan ispitanik bio homozigot za *ABCG2* 421 A , oba polimorfizma su dihomotizirana prije multivarijatne analize. Model je sadržavao sljedeće varijable: godine, šećernu bolest, inhibitor *ABCG2*, genotip *ABCG2* i genotip *SLCO1B1*.

Nakon što su u obzir uzeti drugi klinički faktori utjecaj *ABCG2* 421C>A nije ostao statistički značajan prediktor nuspojava simvastatina (OR=2,511, Wald  $\chi^2=2,919$ ; df=1; p=0,088; 95% CI =0,873-7,218). Nakon što su u obzir uzeti drugi klinički faktori utjecaj *SLCO1B1* 521T>C nije ostao statistički značajan prediktor nuspojava simvastatina (OR=2,116, Wald  $\chi^2=2,768$ ; df=1; p=0,096; 95% CI =0,875-5,116).

**Tablica 27. Rezultati multivarijatne analize za nuspojave simvastatina**

	n	nuspojave	kontrola	Multivariate		
				OR	(95% CI)	
<b>Godine*</b>	59.00	(51.50-67.00)	63.00	(53.00-69.50)	0,990	0,955-1,027
<b><i>ABCG2</i></b>						
CC	36		43		1	
CA ili AA	14		7		2,511	0,873-7,218
ukupno						
<b><i>SLCO1B1</i></b>						
TT	28		36		1	
TC ili CC	22		14		2,116	0,875-5,116
Ukupno						
<b>Šećerna bolest</b>						
ne		42	32		1	
da		8	18		0,307	0,112-0,846
Ukupno						
<b><i>ABCG2</i> inhibitor</b>						
ne	24		23		1	
da	26		27		1,245	0,527-2,940
ukupno						

\*Median (interkvartilni raspon)

Razlika u učestalosti polimorfizama gena *ABCB1* i *ABCC2* između skupine s nuspojavama i bez nuspojava nije bila statistički značajna. Rezultati analize za pojedine genotipove i alele prikazani su u tablicama 28, 29 i 30.

**Tablica 28. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 2677G>T/A u ispitanika sa i bez nuspojava simvastatina**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>n</b>						
<b>2677G&gt;T/A</b>						
<b>genotipovi</b>			3,100	0,541		
GG	16	16			1	
GT	22	27			0,815	0,334-1,990
TT	9	4			2,250	0,574-8,824
TA	1	2			0,500	0,041-6,082
AA	2	1			2,000	0,164-24,328
ukupno	50	50				
<b>aleli</b>			0,537	0,764		
G	54	59			1	
T	41	37			1,211	0,679-2,157
A	5	4			1,366	0,349-5,351
ukupno	100	100				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=4 za genotipove, df=2 za alele; OR = univarijatni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 29. Učestalost genotipova i alela *ABCB1* 3435T>C i 1236C>T u ispitanika sa i bez nuspojave simvastatina**

	n	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>3435C&gt;T</b>							
<b>genotipovi</b>				1,472	0,479		
CC	11	11				1	
CT	24	29				0,828	0,306-2,239
TT	15	10				1,500	0,472-4,771
ukupno	50	50					
<b>aleli</b>				0,500	0,479		
C	46	51				1	
T	54	49				1,222	0,701-2,129
ukupno	100	100					
<b>1236C&gt;T</b>							
<b>genotipovi</b>				0,182	0,913		
CC	18	17				1	
CT	25	27				0,874	0,371-2,061
TT	7	6				1,102	0,308-3,947
ukupno	50	50					
<b>aleli</b>							
C	61	61				1	
T	39	39				1	
ukupno	100	100					

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

**Tablica 30. Učestalost genotipova i alela *ABCC2* -24C>T i 1249G>A u ispitanika sa i bez nuspojava simvastatina**

			$\chi^2$	P	OR	95% CI
	n	nuspojave	kontrole			
<b>-24C&gt;T</b>			1,507	0,471		
<b>genotipovi</b>						
CC	34	30			1	
CT	16	19			0,743	0,325-1,698
TT	0	1			-	
ukupno	50	50				
<b>aleli</b>			0,829	0,363		
C	84	79			1	
T	16	21			0,717	0,349-1,471
ukupno	100	100				
<b>1249G&gt;A</b>						
<b>genotipovi</b>			1,176	0,555		
GG	29	32			1	
GA	18	17			1,168	0,509-2,684
AA	3	1			3,310	0,326-33,627
ukupno	50	50				
<b>aleli</b>			0,741	0,389		
G	76	81			1	
A	24	19			1,346	0,683-2,653
ukupno	100	100				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije, df=2 za genotipove, df=1 za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

### **Analiza podskupine bolesnika koja je razvila miotoksičnost na primjenu simvastatina**

Razlika u učestalosti genotipova *ABCG2* 421C>A između skupine s miotoksičnošću (n=34) i skupine bez nuspojava bila je statistički značajna ( $\chi^2=5.477$ ; df=2; p=0.039; Cramer's  $\phi=0.260$ ). Jedanaest od 34 ispitanika koji su iskusili miotoksičnost simvastatina te 6 ispitanika od 50 ispitanika bez nuspojava bili su heterozigotni nositelji genotipa *ABCG2* 421C>A .

Distribucija genotipova i alela *ABCG2* 421C>A između ispitivanih skupina je prikazana u Tablici 31. Nositelji genotipa *ABCG2* 421CA imaju 3,903 puta (CI=1,195-12,753) povećan rizik za nastanak miotoksičnosti simvastatina prema rezultatima multivarijantne logističke

regresije koja je uzela u obzir sve genotipove svih ispitivanih transportera. Jedan ispitanik bez nuspojavama bio je homozigotni nositelj genotipa *ABCG2* 421 AA dok niti jedan ispitanik koji je razvio miotoksičnost nije bio nositelj ovog genotipa. Razlika u učestalosti alela A između skupine s miotoksičnosti i bez nuspojava nije bila statistički značajna nakon korekcije za multiplo testiranje ( $\chi^2=4,357$ ;  $df=1$ ;  $p=0.037$ ; Cramer's  $\phi=0.167$ ; Yates korekcija  $\chi^2=3.359$ ;  $p=0.067$ ). Nakon što su u obzir uzeti drugi klinički faktori utjecaj *ABCG2* 421C>A je ostao statistički značajan prediktor miotoksičnosti simvastatina (OR=3,095, Wald  $\chi^2=4,013$ ;  $df=1$ ;  $p=0,045$ ; 95% CI =1,025-9,350). Model je sadržavao sljedeće varijable: godine, šećernu bolest, inhibitor *ABCG2*, genotip *ABCG2* i genotip *SLCO1B1*.

Ostali genotipovi nisu pokazali statistički značajnu povezanost u podskupini bolesnika koji su razvili miotoksičnost.

Podanalize nisu napravljene za ostale vrste nuspojava zbog malog broja ispitanika u ostalim podskupinama.

**Tablica 31. Učestalost genotipova i alela *ABCG2* 421C>A u podskupini koja je razvila miotoksičnost na simvastatin**

	nuspojave	kontrole	$\chi^2$	P	OR	95% CI
<b>n</b>						
<b>genotipovi</b>			5.477	0.039		
CC	23	43			1	
CA	11	6			3,428	1,123-10,465
AA	0	1			-	
ukupno	34	50				
<b>aleli</b>			3.359	0.067		
C	57	92			1	
A	11	2			2,750	1,035-7,306
ukupno	68	100				

KRATICE: p = razina statističke značajnosti, rezultat hi-kvadrat testa; kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti dobivene uz korištenje Yatesove korekcije,  $df=2$  za genotipove,  $df=1$  za alele; OR = univarijantni omjer izgleda (engl. odds ratio); 95% CI = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda

## 6. Rasprava

---

Više je razloga koji su nas potaknuli na provođenje opisanog istraživanja. Statini pripadaju među najpropisivanije lijekove i spadaju u one rijetke lijekove koji doprinose smanjivanju različitih uzroka pobola i smrtnosti (engl. *all-cause mortality*). Međutim istraživanja također pokazuju da svaki peti pacijent na terapiji statinima iskusi neki oblik nuspojave od kojih su najčešći mialgija ili miopatija. Nadalje podaci upozoravaju da od tih pacijenata koji su iskusili nuspojavu više od polovine prestaje uzimati lijek [148]. Također postoje neslaganja između podataka o nuspojavama statina koje opisuju/prijavljaju sami pacijenti i podataka dobivenih u kliničkim ispitivanjima [149]. Dodatno, primjena statina kod transplatiranih bolesnika predstavlja klinički problem zbog značajnih interakcija s najčešće korištenim imunosupresivima posebice ciklosporinom koji povećava PPK statina ovisno o vrsti statina 2 do 25 puta [71]. Iz svega navedenog nametnula se potreba za objektivnim pristupom ispitivanju uzroka nuspojava statina. U tom kontekstu postavili smo hipotezu kako farmakogenetički pristup može doprinijeti, a identificiranje farmakogenetičke predispozicije unaprijediti personalizirani pristup u primjeni statina. Kako su nuspojave statina najčešće povezane s dozom lijeka odnosno farmakokinetičkim parametrima, u istraživanju smo željeli ispitati ulogu metaboličkih enzima i prijenosnika u moduliranju toksičnosti statina. Dosadašnja ispitivanja utjecaja farmakogenetike na toksičnost statina uglavnom su bila usmjerena na ispitivanje varijanti gena *SLCO1B1* i u najvećem broju se odnose na miotoksičnost simvastatina i atorvastatina dok podaci o farmakogenetičkoj predispoziciji za nastanak drugih nuspojava statina kao i podaci o utjecaju drugih gena nisu bili dostupni [85,88-92].

### 6.1. Polimorfizam *ABCG2*

Ovo je prva studija koja je povezala utjecaj varijanti gena *ABCG2* na nastanak nuspojava simvastatina, atorvastatina i fluvastatina ovisnih o primijenjenoj dozi lijeka [150]. Prijenosnik *ABCG2* može aktivno izbacivati različite endogene i egzogene supstrate preko različitih bioloških membrana [151]. Na taj način *ABCG2* može ograničiti oralnu bioraspoloživost posredovanjem u unosu lijeka na razini enterocite te posredovanjem u hepatobilijarnom i renalnom izlučivanju. Funkcija ovog prijenosnika ovisna je i o polimorfnim varijantama gena. To je potvrđeno i našim rezultatima.

Nositelji polimorfizma *ABCG2* 421C>A, odgovornog za smanjenu funkciju *ABCG2*, imali su povećan rizik za nastanak nuspojava atorvastatina ovisnih o dozi u usporedbi s bolesnicima koji nisu bili nositelji navedenog polimorfizma. Rezultati naše studije se slažu s rezultatima farmakokinetičke studije Keskitala i suradnika [98], PPK atorvastatina bila je za 72% veća u ispitanika nositelja genotipa *ABCG2* 421 AA u odnosu na nositelje genotipa *ABCG2* 421 CC ( $p = 0.049$ ).

Sličnu smo povezanost ustanovili i s nuspojavama pri primjeni simvastatina. I u ovoj skupini ispitanika su nositelji inaktivnog alela *ABCG2* 421C>A, odgovornog za smanjenu funkciju *ABCG2*, imali povećan rizik za nastanak nuspojava simvastatina u usporedbi s bolesnicima koji nisu imali navedeni polimorfizma. Ta je povezanost bila posebno izražena u ispitanika koji su razvili miotoksičnost. I ovi su rezultati u suglasju s rezultatima farmakokinetičke studije Keskitala i suradnika [99], PPK laktone simvastatina bila je za 111% veća u ispitanika nositelja genotipa *ABCG2* 421 AA u odnosu na ispitanike s genotipom *ABCG2* 421 CC ( $p = 0.005$ ). Omjer PPK simvastatin kiselina:lakton bio je 46% manji u nositelja genotipa *ABCG2* 421 AA u odnosu na ispitanike s genotipom 421CC ( $p = 0.017$ ). Prema rezultatima farmakokinetičke studije varijanta gena *ABCG2* ima veći utjecaj na laktonski oblik simvastatina nego na kiselinu. Simvastatin je inaktivni lakton koji *in vivo* reverzibilno prelazi posredstvom karboksijesteraze u kiselinu, aktivni oblik lijeka u mukozi crijeva, plazmi i jetrima. Prema rezultatima farmakokinetičke studije očekuje se manji utjecaj varijante gena *ABCG2* na smanjenje prijenosa/iznosa pretežno kiseline simvastatina putem prijenosnika *ABCG2* u žuč i posljedično povećanje koncentracija simvastatina u jetri nego na smanjenje iznosa pretežno laktone simvastatina u tankom crijevu i povećanje koncentracija laktone simvastatina u krvi.

Slijedom navedenog, opažene promjene farmakokinetičkih parametara laktone i kiseline simvastatina tako i nastanak nuspojava opažen u našoj studiji može se u najvećoj mjeri objasniti povećanom bioraspoloživosti zbog smanjenog iznosa laktone simvastatina putem prijenosnika *ABCG2* u tankom crijevu što objašnjava veći utjecaj varijante gena *ABCG2* na skupinu bolesnika koji su razvili miotoksičnost simvastatina nego na skupinu bolesnika koja je uz bolesnike koji su razvili miotoksičnost uključivala i bolesnike koji su razvili i hepatotoksičnost.

Polimorfizam *ABCG2* je također bio značajan za nastanak nuspojava fluvastatina. I u skupini ispitanika na terapiji fluvastatinom nositelji polimorfizma, *ABCG2* 421C>A, odgovornog za smanjenu funkciju prijenosnika *ABCG2* su imali povećan rizik za nastanak nuspojava



fluvastatina u usporedbi s bolesnicima koji nisu nositelji navedenog polimorfizma. U našu studiju su bili uključeni bolesnici kojima je transplantiran bubreg jer je fluvastatin lijek izbora među statinima i pretežno se koristi u ovoj skupini bolesnika. Kao što je već navedeno većina statina se metabolizira putem enzima CYP3A4. Kako je to i metabolički put ciklosporina koji se kao imunosupresiv najčešće propisuje transplantiranim bolesnicima, u slučaju potrebe za primjenom statina, koja je česta u transplantiranih bolesnika, odabire se fluvastatin koji se metabolizira putem CYP2C9, sa svrhom izbjegavanja interakcije s ciklosporinom na razini enzima CYP. I ovi rezultati naše studije se slažu s rezultatima farmakokinetičke studije Keskitala i suradnika [99], u kojoj je PPK fluvastatina bio 97% ( $p = 0.015$ ) odnosno 72% ( $p = 0.009$ ), veći u ispitanika nositelja genotipa *ABCG2* 421C AA u odnosu na ispitanike s genotipom CA i CC. Kao što je već izneseno standardna imunosupresivna terapija uključuje inhibitore kalcineurina, za koje su istraživanja pokazala da su i inhibitori prijenosnika *ABCG2* [152-154]. U našoj studiji ispitanicima s transplantiranim bubregom bilo je propisano i više drugih lijekova inhibitora prijenosnika *ABCG2* što upućuje na zaključak kako propisivači često nisu svjesni o mogućim interakcijama lijekova na razini prijenosnika, odnosno o inhibitornim svojstvima prema *ABCG2* različitih lijekova koji se propisuju u konkomitantnoj terapiji bolesnicima s transplantiranim organima. Kao što je već istaknuto, u kliničkoj praksi za sada uglavnom postoji svijest o interakcijama na razini enzima CYP te prijenosnika P-glikoproteina. U bolesnika s velikim brojem rizičnih faktora kao što su to bolesnici s transplantiranim organom i koji imaju povećan rizik za nastanak nuspojava statina je od posebne važnosti identificirati sve rizične faktore uključujući farmakogenetičku predispoziciju kako bi se nuspojave mogle predvidjeti i izbjeći.

## 6.2. Polimorfizam *CYP2C9*

Rezultati naše studije su nadalje pokazali kako i varijante gena koji kodira metabolički enzim *CYP2C9* uz varijante gena koji kodira membranski prijenosnik *ABCG2* predstavljaju dodatnu farmakogenetičku predispoziciju za nastanak nuspojava fluvastatina povezanu s dozom u transplantiranih ispitanika. Potvrđena je značajnija uloga alela *CYP2C9*\*3 u razvoju toksičnosti fluvastatina dok za alel *CYP2C9*\*2 taj učinak nije dokazan. Naši rezultati su u suglasju sa rezultatima farmakokinetičke studije Kirchheiner i suradnika u kojoj je također alel *CYP2C9*\*3 imao značajan utjecaj na farmakokinetiku fluvastatina, dok to nije potvrđeno za alel *CYP2C9*\*2 [16]. Naši rezultati kao i rezultati studije Kirchheiner i suradnika su na tragu rezultata prethodnih studija koje su i za druge lijekove-supstrate *CYP2C9* potvrdile

dominantniju ulogu polimorfnog alela *CYP2C9\*3* u moduliranju farmakokinetičkih parametara te nastanak nuspojava u usporedbi s alelom *CYP2C9\*2* [130,131]. Razlog je što genotip *CYP2C9\*3/\*3* smanjuje aktivnost enzima na samo 10% aktivnosti „divljeg“ genotipa *CYP2C9\*1/\*1*, dok za genotip *CYP2C9\*2/\*2* ta aktivnost opada za oko 40%. Nadalje rezultati ove studije upućuju kako bi primjena genotipizacije za *CYP2C9* posebno bila korisna za individualizaciju terapije bolesnika nositelja polimorfnog alela *CYP2C9* a kojima je u terapiju nužno uključiti lijek koji je inhibitor enzima *CYP2C9*, jer se rizik u ovoj podskupini povećava i za 6 puta u odnosu na bolesnike koji nisu nositelji inaktivnog alela i u terapiji nemaju propisan lijek koji je i inhibitor *CYP2C9*. Rezultati dobiveni u ovoj studiji su u suglasju s rezultatima Kumara i suradnika [155] koji su također zaključili kako alel *CYP2C9\*3* može povećati značaj interakcije u slučaju primjene inhibitora *CYP2C9*. I u kineskoj je populaciji na zdravim ispitanicima zabilježena značajna interindividualna varijabilnost farmakokinetičkih parametara fluvastatina povezana između ostalog i s alelom *CYP2C9\*3* [54].

### 6.3. Polimorfizam *ABCB1*

Varijante gena *ABCB1* nisu imale značajan utjecaj na nastanak nuspojava simvastatina, atorvastatina i fluvastatina. Naši rezultati su prema tom nalazu u suglasju s rezultatima prethodnih studija [62,63] koji su pokazali kako varijante gena *ABCB1* imaju minimalan učinak na farmakokinetiku atorvastatina i simvastatina te nemaju učinak na farmakokinetiku fluvastatina. Naši rezultati su potvrdili opažanja opisana u studiji na 14 ispitanika, Hermanna i koautora u kojoj se ističe premda su varijante gena *ABCB1* imale skroman učinak na farmakokinetiku atorvastatina, nisu bile povezane s razvojem miopatije [68]. Ipak moramo napomenuti da smo zabilježili značajnu povezanost polimorfizma *ABCB1* 1236C>T s nastankom nuspojava fluvastatina koja se izgubila nakon korekcije za multiplo testiranje. S obzirom na ovaj nalaz istraživanje bi svakao bilo vrijedno nastaviti i uključiti veći broj ispitanika. I neka novija istraživanja iznose podatke o povezanosti polimorfizama *ABCB1* uz polimorfizam *CYP2C9\*3*, s interindividualnom varijabilnosti farmakokinetičkih parametara fluvastatina u kineskoj populaciji. Ovdje treba istaknuti različitu učestalost farmakogenetičkih polimorfizama za mnoge enzime i prijenosnike lijekova a koja je zabilježena na populacijskoj razini i između pojedinih i rasa [156].

## 6.4. Polimorfizam *ABCC2*

Nema podataka o utjecaju varijanti gena *ABCC2* na farmakokinetičke parametre niti na nuspojave simvastatina, atorvastatina i fluvastatina. Naša studija je prva studija koja ispitala učinak i pokazala kako ne postoji značajan utjecaj varijanti gena na nastanak nuspojava ispitivanih statina. Ovaj gen smo uključili u ispitivanje jer kodira prijenosnik s značajnom ulogom u prijenosu lijekova- supstrata na hepatobilijarnoj barijeri, pa je bila pretpostavka da bi mogao biti značajan prediktor nuspojava statina, što nismo mogli potvrditi na ovom broju ispitanika.

U ispitivanju rijetkog SNP *ABCC2* 1446C>G ( učestalost ~1–2.5% u bijeloj rasi) je ustanovljena povezanost s promjenama u farmakokinetici pravastatina [160]. PPK pravastatina je bila za 67% manja u heterozigotnih nositelja ovog SNP u usporedbi s ispitanicima nositeljima divljeg genotipa, vjerojatno zbog povećane ekspresije MRP2. Za druge SNP za koje su različite studije dokazale njihovu ulogu i utjecaj na ekspresiju proteina MRP2 (npr. -24C>T, 3563T>A i 4544G>A) nisu dokazane povezanosti sa promjenama u farmakokinetici pravastatina [160,161].

Istraživanja su ipak za neke druge lijekova dokazala uloga polimorfizama *ABCC2* u varijabilnoj bioraspoloživosti ili nuspojavama lijeka. Tako se varijabilna farmakokinetika mikofenolne kiseline u transplantiranih bolesnika povezuje upravo s polimorfizmom *C-24T*, koji je bio analiziran i u našoj studiji, pri čemu je sporije izlučivanje mikofenolne kiseline bilo zapaženo u nositelja varijantnog alela koji određuje slabiju aktivnost prijenosnika *ABCC2* [157].

Genetička varijabilnost *ABCC2* se povezuje i s nuspojavama valproične kiseline [158], a genotipizacija se preporučuje za bolje predviđanje koncentracija metotreksata u liječenju akutne limfoblastične leukemije u pedijatrijskoj populaciji [159].

## 6.5. Polimorfizam *SLCO1B1*

Svi statini su supstrati transportnog polipeptida OATP1B1 međutim učinak polimorfizama gena *SLCO1B1* koji kodira taj polipeptid na pojedine statine se značajno razlikuje.

Najveći utjecaj ovaj polimorfizam ima na simvastatin, površina ispod krivulje koncentracija-vrijeme aktivnog oblika simvastatina, a to je kiselina simvastatina je bila 221% veća u pojedinaca sa genotipom *SLCO1B1* 521 CC u odnosu na vrijednosti zabilježene u nositelja

genotipa *SLCO1B1* 521 TT [84]. Genotip *SLCO1B1* 521TC općenito ima umjeren utjecaj na povećanje koncentracije statina. Zabilježeno je povećanje PPK za 144% ( $p < 0.001$ ) u ispitanika s genotipom *SLCO1B1* 521 CC u odnosu na ispitanike s genotipom *SLCO1B1* 521 TT te povećanje za 61% ( $p = 0.049$ ) u odnosu na ispitanike s genotipom *SLCO1B1* 521 TC koji su uzimali atorvastatin [87]. SEARCH studija je pokazala značajan utjecaj polimorfizma *SLCO1B1* 521C>A na nastanak miopatije izazvane simvastatinom dok je polimorfizam *SLCO1B1* 388A>G bio povezan sa nešto povećanim učinkom lijeka [85]. Zbog značajne povezanosti nuspojava simvastatina s polimorfizmom *SLCO1B1* konzorcij CPIC je izdao i smjernice o individualizaciji terapije simvastatinom na temelju nalaza genotipizacije za *SLCO1B1* 521C>A. Smjernica je prikazana u uvodnom dijelu [35].

Polimorfizam *SLCO1B1* 521T>C smanjuje prijenos supstrata putem prijenosnika OATP1B1 u jetra i povećava koncentraciju njegovih supstrata u plazmi što može povećati rizik za razvoj nuspojava prvenstveno miotoksičnosti simvastatina i atorvastatina što je dokazano u ispitivanjima [85,89-92]. Zbog navedenog mehanizma ne očekuje se utjecaj polimorfizam 521T>C na razvoj hepatotoksičnosti statina. Naša skupina bolesnika koji su razvili nuspojave uključivala je bolesnike koji su razvili miotoksičnost ali i hepatotoksičnost. Dvadeset i dva bolesnika s nuspojavama simvastatina od kojih je 13 razvilo miotoksičnost te 14 bolesnika bez nuspojava bili su nositelji genotipa *SLCO1B1* 521 CA, međutim ova razlika nije dosegla statistički značaj već pokazuje samo trend (OR= 2,020,  $p = 0,098$ , CI=0,879-4,645) najvjerojatnije zbog relativno malog broja ispitanika u testiranoj podskupini. Podskupine pacijenata s pojedinim genotipom *SLCO1B1* koji su razvili miotoksičnost na atorvastatin nisu bile dovoljno velike da bi omogućile dodatnu analizu u podskupini bolesnika koji su razvili miotoksičnost. Polimorfizam *SLCO1B1* 521 C>A nije imao utjecaj na nastanak nuspojava fluvastatina što je u suglasju s farmakokinetičkom studijom koja nije pokazala utjecaj ovog polimorfizma na farmakokinetičke parametre u ispitivanjima Niemia i suradnika [96].

Polimorfizam gena *SLC01B1* 388A>G povećava prijenos simvastatina i atorvastatina putem prijenosnika OATP1B1 u jetra te bi trebao povećati njihov učinak i hepatotoksičnost međutim studije koji su ispitivale utjecaj ove varijante gena na djelotvornost nisu uspjela dati definitavan dokaz [162], a naša studija je imala premalen broj ispitanika sa razvijenom hepatotoksičnosti da bi odgovorila na ovo pitanje.

## 6.6. Drugi rizični faktori

Naša studija nije pokazala statistički značaj prethodno opisanih rizičnih faktora već samo trend vjerojatno stoga jer je broj bolesnika s pojedinim rizičnim faktorom bio malen.

Najnovija su ispitivanja identificirala nove genske lokuse (QTL- *quantitative trait loci*) koji ulaze u značajne interakcije sa simvastatinom, uključujući i rs9806699, cis-eQTL, za gen glicin amidinotransferazu (GATM) koji kodira enzim važan u sintezi kreatina.

Ustanovljena je povezanost lokusa s pojavnosti statinom inducirane miotoksičnosti. Nadalje su pokusi u staničnim kulturama hepatocita demonstrirali da GATM može djelovati kao funkcionalna veza između statinima posredovanog sniženja kolesterola i osjetljivosti prema statinima inducirane miopatije [163].

## 6.7. Značaj rezultata

Kako su polimorfizmi gena *ABCG2* i *CYP2C9* česti, opaženi rezultati su klinički značajni. Učestalost polimorfizma *ABCG2* 421C>A je ~10-15% u bijelačkoj populaciji [97, 99]. Aleli *CYP2C9*\*2 i \*3 su također česti u bjelačkoj populaciji (1% populacije su homozigotni nosioci, a 22% su heterozigotni nosioci *CYP2C9*\*2; 0.4% populacije su homozigotni nosioci i 15% heterozigotni nosioci *CYP2C9*\*3; 1.4 % su heterozigotni nosioci *CYP2C9*\*2\*3) [83]. Ukoliko se rezultati predočenog istraživanja potvrde, iznosim smjernice koje bi se mogle primijeniti za individualizaciju terapije fluvastatinom, atorvastatinom i simvastatinom (Slika 5-7).

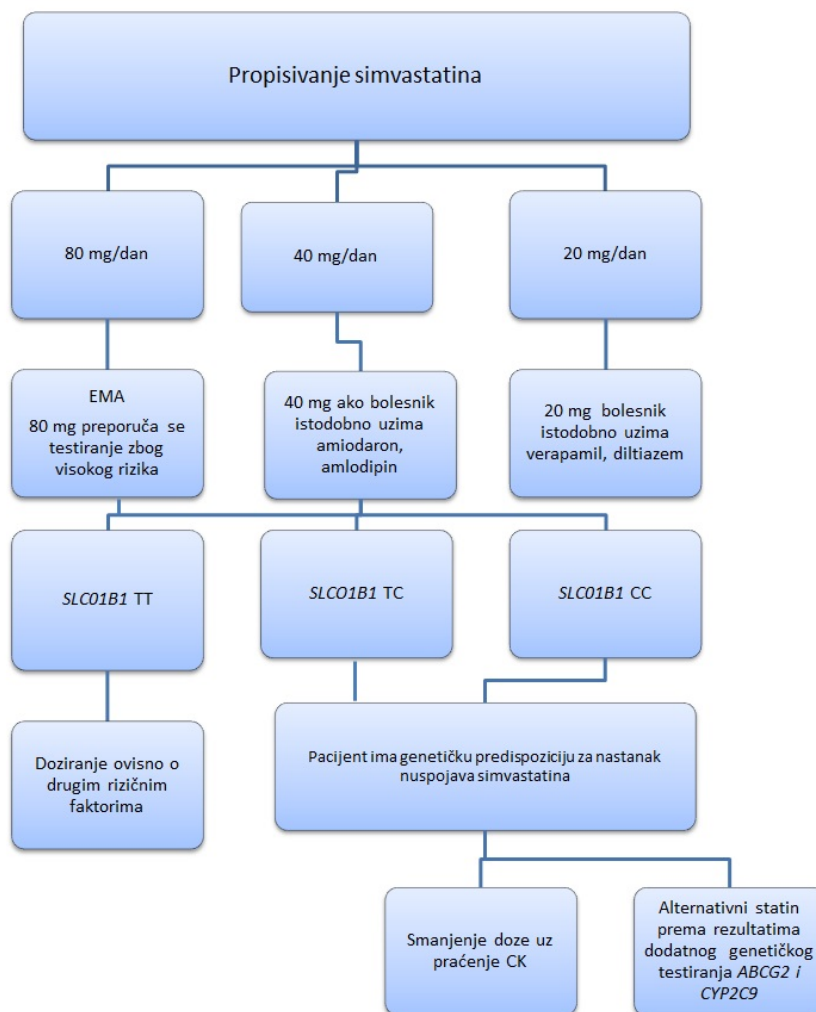
## 6.8. Ograničenja studije

Bolesnicima s transplantiranim bubregom često se u liječenje uključuje veliki broj lijekova koji su supstrati i/ili inhibitori prijenosnika *ABCG2* te se iz ovog razloga rezultati ove studije trebaju s oprezom primjenjivati na druge skupine bolesnika na fluvastatinu koji mogu imati drugačije lijekove u konkomitantnoj terapiji. Farmakogenetička predispozicija je jedan od više rizičnih čimbenika za nastanak nuspojava i treba je uzeti u obzir u prosudbi zajedno s drugim rizičnim faktorima. Metoda odabira ispitanika s nuspojavama bi mogla imati utjecaj na rezultate studije. Osigurali smo preduvjet da kontrolni ispitanici potječu iz iste populacije kao i ispitanici s nuspojavama pozivajući prijavitelje nuspojava da uključe u studiju bolesnike bez nuspojava. Teško je ocijeniti povezanost nuspojave i lijeka u bolesnika koji uzimaju veliki broj lijekova. Pokušali smo upravljati ovim problemom tražeći iscrpne dodatne podatke. Bolesnici kojima je transplantiran bubreg se pažljivo i redovno prate te se o tome

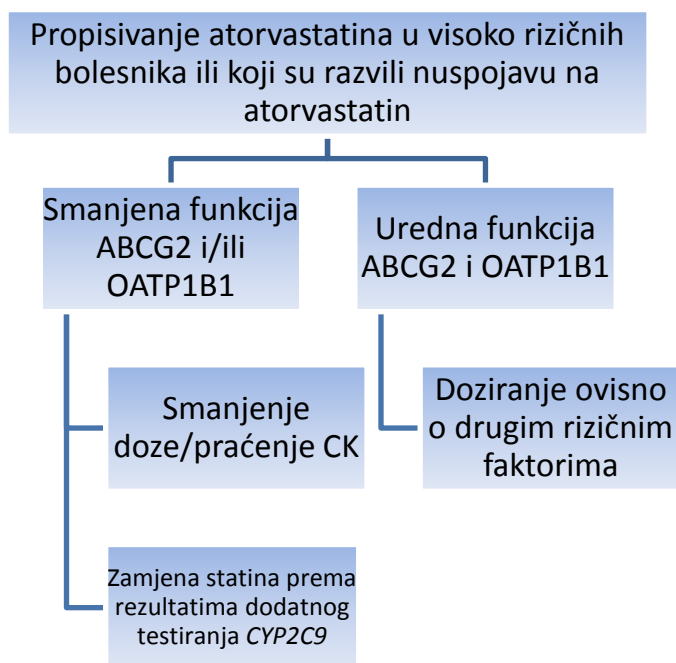
vodi iscrpna evidencija stoga je kvaliteta traženih podatka u transplantiranih bolesnika bila na visokoj razini.

Rezultate ispitivanja, pogotovo one koji se prezentiraju po prvi put potrebno je potvrditi u replikacijskim studijama na drugim ispitanicima te u drugim populacijama, što je slijedeći korak. Najnovija istraživanja izvještavaju o polimorfizmu CYP3A4\*22 (rs35599367 C>T u intronu 6), s učestalosti 5-7% u bjelačkoj populaciji [164]. Dokazana je povezanost ovog polimorfizma s nižom jetrenom ekspresijom i aktivnosti CYP3A4 te posljedično učincima na metabolizam statina, takrolimusa i ciklosporina. Stoga bi trebalo u budućim istraživanjima nuspojava statina čiji metabolizam ovisi i o funkciji CYP3A4, uz nove genetičke markere dokazane u ovoj studiji, ispitati i ulogu CYP3A4\*22.

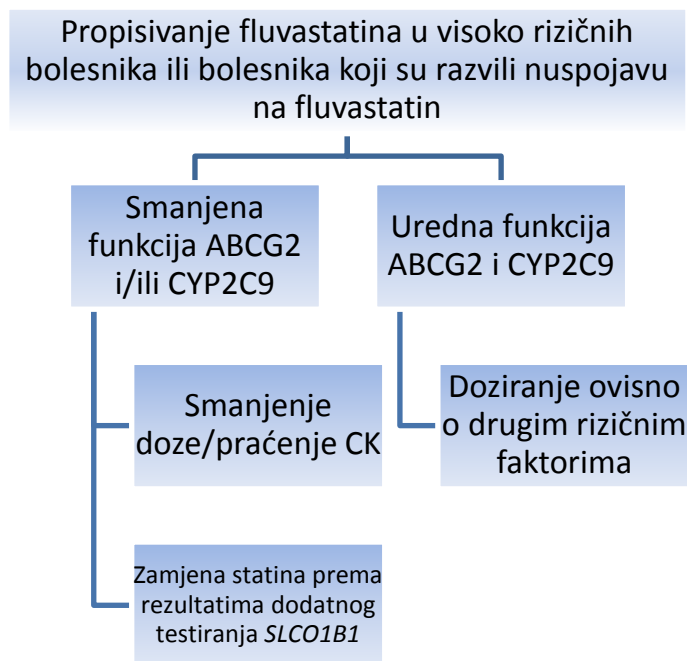
**Slika 5. Postupnik za primjenu simvastatina prema rezultatima genotipizacije**



**Slika 6. Postupnik za primjenu atorvastatina prema rezultatima genotipizacije**



**Slika 7. Postupnik za primjenu fluvastatina prema rezultatima genotipizacije**



## 7. Zaključci

---

1. Prezentirana studija je prva povezala utjecaj farmakogenetike na nastanak nuspojava fluvastatina. Otkrili smo kako varijante u genima koji kodiraju metabolički enzim CYP2C9 i prijenosnik ABCG2 predstavljaju farmakogenetičku predispoziciju za nastanak nuspojava fluvastatina.
2. Rizik za nastanak nuspojava fluvastatina u nositelja varijantne gena *ABCG2 421C>A* povećan je gotovo 5 puta u usporedbi s nositeljima divljeg gena.
3. *CYP2C9\*3* ima značajnu ulogu u razvoju toksičnosti fluvastatina dok za alel *CYP2C9\*2* taj učinak nije pokazan.
4. Rizik za nastanak nuspojava fluvastatina u podskupini bolesnika koji su nosioci inaktivnog alela *CYP2C9* i u terapiji imaju barem jedan inhibitor CYP2C9 povećava se i za 6 puta u odnosu na bolesnike koji nisu nositelji inaktivnog alela i u terapiji nemaju propisan lijek koji je i inhibitor enzima CYP2C9.
5. Prema nama dostupnim podacima iz literature ova studija je također po prvi put pokazala utjecaj varijante gena *ABCG2* na nuspojave atorvastatina i simvastatina.
6. Rizik za nastanak nuspojava atorvastatina u nositelja varijante gena *ABCG2 421C>A* povećan je 4 puta u usporedbi s nositeljima divljeg gena.
7. Rizik za nastanak miotoksičnosti simvastatina u nositelja varijante gena *ABCG2 421C>A* povećan je 3 puta u usporedbi s nositeljima divljeg gena.
8. Za varijante gena *ABCB1* i *ABC2* nismo dokazali utjecaj na nastanak nuspojava atorvastatina, fluvastatina i simvastatina.
9. Pokazana je uloga farmakogenetičke predispozicije ne samo na miotoksičnost statina već i na hepatotoksičnost.



## 8. Sažetak

---

Inhibitori 3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim-A (HMG-CoA) reduktaze (statini) najpropisivaniji su lijekovi u liječenju hiperkolesterolemije. U velikom broju kliničkih ispitivanja dokazana je njihova učinkovitost u smanjivanju rizika nastanka kardiovaskularnog događaja. Međutim, statini mogu imati i ozbiljne nuspojave kao što su miopatija i rabdomioliza. Novi identificirani rizični faktori za nastanak toksičnosti statina su genetičke varijante metaboličkih enzima i prijenosnika. Glavni cilj rada bio je odrediti učinak genskih varijanti *CYP2C9*, *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2* i *SLCO1B1* na nastanak nuspojava povezanih s primijenjenom dozom simvastatina, atorvastatina i fluvastatina. U studiju je bilo uključeno 162 bolesnika koji su iskusili nuspojave povezane s dozom atorvastatina, fluvastatina i simvastatina te 162 bolesnika koji su uzimali ispitivane statine i nisu iskusili nuspojave (kontrolna skupina). Kontrolna skupina ispitanika je prema godinama, spolu, dozi i primjeni ciklosporina odgovarala bolesnicima koji su razvili nuspojavu. Rezultati studije pokazuju kako su varijante gena *ABCG2* 421C>A i *CYP2C9*\*3 povezane s nastankom nuspojava fluvastatina, a varijante gena *ABCG2* 421C>A i *SLCO1B1* 521 C>A s nuspojavama atorvastatina i simvastatina. Naša studija je prva povezala varijante gena *ABCG2* s nastankom nuspojava statina. Naša je studija također prva ispitala i pokazala važnost farmakogenetičke predispozicije za nastanak nuspojava fluvastatina.

## 9. Summary

---

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors (statins) are widely used for the treatment of hypercholesterolemia. Their efficacy in preventing cardiovascular events has been shown by a large number of clinical trials. However, adverse drug reactions (ADRs), sometimes serious, including myopathy or rhabdomyolysis, are associated with the use of statins.

Newly identified risk factors for statin induced toxicity are genetic variants of drug metabolizing enzymes and membrane transporters. The aim of our study was to show influence of *ABCB1*, *ABCC2*, *ABCG2*, *SLCO1B1* and *CYP2C9* gene variants on development of atorvastatin, simvastatin and fluvastatin induced, dose related ADRs. One hundred sixty two patients that experienced statin induced ADRs and 162 controls matched for age, gender, dose and cyclosporine use were enrolled in the study. We found that *ABCG2* 421C>A and *CYP2C9*\*3 variants were associated with fluvastatin induced ADRs, *ABCG2* 421C>A and *SLCO1B1* 521 C>A variants were associated with simvastatin and atorvastatin ADRs. Our study first linked statin ADRs and *ABCG2* variants. Also, our study first showed importance of pharmacogenetic predisposition for developing fluvastatin ADRs.

## 10. Literatura

---

1. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998; 279: 1200-05.
2. Kalow W. Pharmacogenetic research: a revolutionary science. *J Psychiatry Neurosci* 1999; 24: 139-40.
3. Weber WW. Populations and genetic polymorphisms. *Mol Diagn* 1999; 4: 299-307.
4. Motulsky AG. Drug reactions, enzymes and biochemical genetics. *JAMA* 1957; 165: 835-7.
5. Grant DM. Pharmacogenomics and the changing face of clinical pharmacology. *Can J Clin Pharmacol* 1999; 6: 131-2.
6. Sadée W. Genomics and drugs: finding the optimal drug for the right patient. *Pharm Res* 1998; 15: 959-63.
7. Kurth JH. Pharmacogenomics: future promise of a tool for identifying patients at risk. *Drug Info J* 2000; 34: 223-7.
8. Wilke RA, Lin DW, Roden DM, Watkins PB, Flockhart D, Zineh I, Giacomini KM, Krauss RM. Identifying genetic risk factors for serious adverse drug reactions: current progress and challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(11): 904-16.
9. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 19; 344(8934):1383-9.
10. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med* 1998; 339(19): 1349-57.
11. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group *N Engl J Med*. 1995; 333(20): 1301-7.
12. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average

cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 1996; 335(14): 1001-9.

13. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA, Langendorfer A, Stein EA, Kruyer W, Gotto AM Jr. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998; 279(20): 1615-22.

14. Staffa JA, Chang J, Green L. Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis. *N Engl J Med* 2002; 346(7): 539-40.

15. Thompson PD, Clarkson P, Karas RH. Statin-associated myopathy. *JAMA* 2003; 289(13): 1681-90.

16. Kirchheiner J, Kudlicz D, Meisel C, Bauer S, Meineke I, Roots I, Brockmüller J. Influence of CYP2C9 polymorphisms on the pharmacokinetics and cholesterol-lowering activity of (-)-3S,5R-fluvastatin and (+)-3R,5S-fluvastatin in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 74(2): 186-94.

17. Niemi M. Transporter pharmacogenetics and statin toxicity. *Clin Pharmacol Ther*. 2010; 87: 130-133.

18. Zakon o lijekovima. Narodne novine, 2013. Svez. 76.

19. Pravilnik o farmakovigilanciji. Narodne novine, 2013. Svez. 83

20. Commission of the European Communities. Annex 2 of the Report on the impact assessment of strengthening and rationalising EU Pharmacovigilance. Sept 2008.

21. Macolić Šarinić V. Nuspojave lijekova i interkacije. U: Božidar Vrhovac ur. *Interna medicina*. IV izdanje. Zagreb : Naklada Ljevak, 2008, str. 207-12.

22. Macolić Šarinić, V. Nuspojave lijekova i medicinskih proizvoda. U: Igor Francetić i Željko Reiner. *Farmakoterapijski priručnik*. 6. izdanje. Zagreb : Medicinska naklada, 2010, str. 11-18.

23. Edwards, Ralph I; Aronson, J K. Adverse drug reactions: Definitions, Diagnosis and Management. : *Lancet* 2000;356:1255-9.

24. Francetić I, Huić M. Nuspojave i interakcije. U: Igor Francetić i Dinko Vitezić. *Klinička farmakologija*, 2. izdanje Zagreb : Medicinska naklada, 2013, str. str. 207-214.

25. Mirosevic Skvrce N, Macolic Sarinic V, Mucalo I, Krnic D, Bozina N, Tomic S. Adverse drug reactions caused by drug-drug interactions reported to Croatian Agency

for Medicinal Products and Medical Devices: a retrospective observational study. *Croat Med J.* 2011;52(5):604-14.

26. Božina N. Farmakogenomika-genetski polimorfizmi. U: Igor Francetić i Dinko Vitezić. *Klinička farmakologija*, 2. izdanje Zagreb : Medicinska naklada, 2013, str. 243-267.

27. DeGorter MK, Xia CQ, Yang JJ, Kim RB. Drug transporters in drug efficacy and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2012;52:249-73.

28. Cascorbi I. P-glycoprotein: tissue distribution, substrates, and functional consequences of genetic variations. *Handb Exp Pharmacol* 2011;(201):261-83

29. Božina N. i Macolić Šarinić V. *Farmakogenomika i farmakovigilancija*. 1 izdanje. Zagreb. Medicinska naklada, 2013.

30. Armitage J. The safety of statins in clinical practice. *Lancet.* 2007;370(9601):1781-90.

31. 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.

32. Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. *Expert Opin Drug Saf* 2011;10(3):373-87.

33. Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis. *J Pharmacol Sci.* 2013;123(4):289-94.

34. 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 Safety* 2010; 33(3):171-87.

35. Wilke RA, Ramsey LB, Johnson SG i sur. Clinical Pharmacogenomics Implementation Consortium (CPIC). The clinical pharmacogenomics implementation consortium: CPIC guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2012;92(1):112-7.

36. Newman C, Tsai J, Szarek M, Luo D, Gibson E. Comparative safety of atorvastatin 80 mg versus 10 mg derived from analysis of 49 completed trials in 14 236 patients. *Am J Cardiol* 2006; 97(1):61-7

37. Skvrce NM, Bozina N, Sarinić VM, Tomić S. Adverse drug reactions of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors reported to agency for medicinal products and medical devices]. *Lijec Vjesn.* 2010;132(9-10):277-82.
38. 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.
39. Prueksaritanont T, Gorham LM, Ma B, Liu L, Yu X, Zhao JJ, Slaughter DE, Arison BH, Vyas KP. 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.
40. Lennernäs H, Clinical pharmacokinetics of atorvastatin. *Clin Pharmacokinet* 2003; 42(13): 1141-60.
41. Transon C, Leemann T, Dayer P. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; 50(3): 209-15.
42. Transon C, Leemann T, Vogt N, Dayer P. In vivo inhibition profile of cytochrome P450TB (CYP2C9) by (+/-)-fluvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 1995 Oct; 58(4): 412-7.
43. Hatanaka T. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clin Pharmacokinet* 2000; 39(6): 397-412.
44. White CM. A review of the pharmacologic and pharmacokinetic aspects of rosuvastatin. *J Clin Pharmacol* 2002; 42(9): 963-70.
45. Fujino H, Saito T, Tsunenari Y, Kojima J. Effect of gemfibrozil on the metabolism of pitavastatin-determining the best animal model for human CYP and UGT activities. *Drug Metabol Drug Interact* 2004; 20(1-2): 25-42.
46. Durand P, Debray D, Kolaci M, Bouligand J, Furlan V, Fabre M, Letierce A, Verstuyft C, Becquemont L. Tacrolimus dose requirement in pediatric liver transplantation: influence of CYP3A5 gene polymorphism. *Pharmacogenomics.* 2013;14(9):1017-25.
47. Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphism in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 52: 349-355.

48. Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphism on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; 96(5): 1816-19.
49. 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.
50. FDA Approves Updated Warfarin (Coumadin) Prescribing Information New Genetic Information May Help Providers Improve Initial Dosing Estimates of the Anticoagulant for Individual Patients. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncement/2007/ucm108967.htm>
51. Takahashi H, Wilkinson G.R, Caraco Y, Muszkat M, Kim R.B, Kashima T. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype- matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 253-63.
52. 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: 47-49.
53. 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.
54. Zhou Q, Ruan ZR, Yuan H, Zeng S. CYP2C9\*3(1075A>C), MDR1 G2677T/A and MDR1 C3435T are Determinants of Inter-subject Variability in Fluvastatin Pharmacokinetics in Healthy Chinese Volunteers. *Arzneimittelforschung* 2012;62(11):519-24. .
55. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance- associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1295-302.
56. Van Asperen J, van Tellingen O, Beijnen JH. The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol Res* 1998; 37: 429-435.
57. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH. Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist*. 2011;16(6):820-34.
58. Sakaeda T, Fujino H, Komoto C, Kakumoto M, Jin JS, Iwaki K, Nishiguchi K, Nakamura T, Okamura N, Okumura K. Effects of acid and lactone forms of eight HMG-

CoA reductase inhibitors on CYP-mediated metabolism and MDR1-mediated transport. *Pharm Res* 2006; 23(3): 506-12.

59. Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, Lin J, Mills JB, Xu JJ, Smolarek TA. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2005; 33(4): 537-46.

60. Wang E, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein. *Pharm Res* 2001;18(6):800-6.

61. Bogman K, Peyer AK, Török M, Küsters E, Drewe J. HMG-CoA reductase inhibitors and P-glycoprotein modulation. *Br J Pharmacol* 2001; 132(6): 1183-92.

62. 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.

63. Lee YJ, Lee MG, Lim LA, Jang SB, Chung JY. Effects of SLCO1B1 and ABCB1 genotypes on the pharmacokinetics of atorvastatin and 2-hydroxyatorvastatin in healthy Korean subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2010;48(1):36-45.

64. Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, Van der Sand LC, Ferreira ME, Pires RC, Hutz MH. 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): 551-8.

65. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3473-8.

66. Wu X, Whitfield LR, Stewart BH. Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter. *Pharm Res* 2000;17(2): 209-15

67. Rodrigues AC, Curi R, Britto LR, Rebbechi IM, Hirata MH, Bertolami MC, Bernik MM, Dorea EL, Hirata RD. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760(12): 1866-73.



68. Hermann M, Bogsrud MP, Molden E, Asberg A, Mohebi BU, Ose L, Retterstøl K. Exposure of atorvastatin is unchanged but lactone and acid metabolites are increased several-fold in patients with atorvastatin-induced myopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79(6): 532-9.
69. Lindahl A, Sandström R, Ungell AL, Lennernäs H.J Concentration- and region-dependent intestinal permeability of fluvastatin in the rat. *Pharm Pharmacol* 1998; 50(7): 737-44.
70. Lindahl A, Sjöberg A, Bredberg U, Toreson H, Ungell AL, Lennernäs H. Regional intestinal absorption and biliary excretion of fluvastatin in the rat: possible involvement of mrp2. *Mol Pharm* 2004; 1(5): 347-56.
71. Neuvonen PJ, Niemi M, Backman JT. Drug interactions with lipid-lowering drugs: mechanisms and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(6): 565-81.
72. Bercovich D, Friedlander Y, Korem S, Houminer A, Hoffman A, Kleinberg L, Shochat C, Leitersdorf E, Meiner V. The association of common SNPs and haplotypes in the CETP and MDR1 genes with lipids response to fluvastatin in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2006; 185(1): 97-107.
73. Keskitalo, J.E., Kurkinen, K.J., Neuvonen, M., Backman, J.T., Neuvonen, P.J. Niemi, M. No significant effect of ABCB1 haplotypes on the pharmacokinetics of fluvastatin, pravastatin, lovastatin, and rosuvastatin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009; 68: 207–213.
74. König, J., Cui, Y., Nies, A.T. & Keppler, D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000; 278: 156–164.
75. Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609(1): 1-18.
76. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004; 447(5): 653-65.
77. Kameyama Y, Yamashita K, Kobayashi K, Hosokawa M, Chiba K. Functional characterization of SLCO1B1 (OATP-C) variants, SLCO1B1\*5, SLCO1B1\*15 and SLCO1B1\*15+C1007G, by using transient expression systems of HeLa and HEK293 cells. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(7): 513-22.

78. Tirona RG, Leake BF, Merino G, Kim RB. Polymorphisms in OATP-C: identification of multiple allelic variants associated with altered transport activity among European- and African-Americans. *J Biol Chem* 2001; 276(38): 35669-75.
79. Mwinyi J, Johne A, Bauer S, Roots I, Gerloff T. Evidence for inverse effects of OATP-C (SLC21A6) 5 and 1b haplotypes on pravastatin kinetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004; 75(5): 415–421.
80. Maeda K, Ieiri I, Yasuda K, Fujino A, Fujiwara H, Otsubo K, Hirano M, Watanabe T, Kitamura Y, Kusuhara H, Sugiyama Y. Effects of organic anion transporting polypeptide 1B1 haplotype on pharmacokinetics of pravastatin, valsartan, and temocapril. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2006; 79(5): 427–439.
81. Nishizato Y, Ieiri I, Suzuki H, Kimura M, Kawabata K, Hirota T, Takane H, Irie S, Kusuhara H, Urasaki Y, Urae A, Higuchi S, Otsubo K, Sugiyama Y. Polymorphisms of OATP-C (SLC21A6) and OAT3 (SLC22A8) genes: consequences for pravastatin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(6): 554-65.
82. Pasanen, M.K., Neuvonen, P.J. & Niemi, M. Global analysis of genetic variation in SLCO1B1. *Pharmacogenomics* 2008; 9, 19–33.
83. Hsiang B, Zhu Y, Wang Z, Wu Y, Sasseville V, Yang WP, Kirchgessner TG. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem* 1999; 274(52): 37161-8.
84. Pasanen MK, Neuvonen M, Neuvonen PJ, Niemi M. SLCO1B1 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of simvastatin acid. *Pharmacogenet Genomics.* 2006; 16(12): 873-9.
85. The SEARCH Collaborative Group SLCO1B1 Variants and Statin-Induced Myopathy — A Genomewide Study. *N Engl J Med* 2008; 359(8): 789-99.
86. Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316(2): 762-71.
87. 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.

88. Morimoto K, Oishi T, Ueda S, Ueda M, Hosokawa M, Chiba K. A novel variant allele of OATP-C (SLCO1B1) found in a Japanese patient with pravastatin-induced myopathy. *Drug Metab Pharmacokinet* 2004; 19(6): 453-5.
89. Voora D, Shah SH, Spasojevic I, Ali S, Reed CR, Salisbury BA, Ginsburg GS. The SLCO1B1\*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(17):1609-16
90. Brunham LR, Lansberg PJ, Zhang L et al. Differential effect of the rs4149056 variant in SLCO1B1 on myopathy associated with simvastatin and atorvastatin. *Pharmacogenomics J*. 2011;12(3): 233-237.
91. 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.
92. Santos PC, Gagliardi AC, Miname MH, Chacra AP, Santos RD, Krieger JE, Pereira AC. SLCO1B1 haplotypes are not associated with atorvastatin-induced myalgia in Brazilian patients with familial hypercholesterolemia. *Eur J Clin Pharmacol*. 2012;68(3):273-9.
93. Noé J, Portmann R, Brun ME, Funk C. Substrate-dependent drug-drug interactions between gemfibrozil, fluvastatin and other organic anion-transporting peptide (OATP) substrates on OATP1B1, OATP2B1 and OATP1B3. *Drug Metab Dispos* 2007; 35(8): 1308-14.
94. Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D. Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol*. 2005; 68(4):1031-8.
95. Sakamoto K, Mikami H, Kimura J. Involvement of organic anion transporting polypeptides in the toxicity of hydrophilic pravastatin and lipophilic fluvastatin in rat skeletal myofibres. *Br J Pharmacol* 2008; 154(7): 1482-90.
96. Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. SLCO1B1 polymorphism and sex affect the pharmacokinetics of pravastatin but not fluvastatin., *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(4): 356-66.
97. Robey RW, To KK, Polgar O, Dohse M, Fetsch P, Dean M, Bates SE. ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009; 61(1): 3–13.

98. 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.
99. 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.
100. Haenisch S, May K, Wegner D, Caliebe A, Cascorbi I, Siegmund W. Influence of genetic polymorphisms on intestinal expression and rifampicin-type induction of ABCC2 and on bioavailability of talinolol. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18(4): 357-65.
101. Daly AK, Aithal GP, Leathart JB, Swainsbury RA, Dang TS, Day CP. Genetic susceptibility to diclofenac-induced hepatotoxicity: contribution of UGT2B7, CYP2C8 and ABCC2 genotypes. *Gastroenterology* 2007; 132(1): 272-81.
102. Rau T, Erney B, Göres R, Eschenhagen T, Beck J, Langer T. High-dose methotrexate in pediatric acute lymphoblastic leukemia: impact of ABCC2 polymorphisms on plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80(5): 468-76.
103. Haenisch S, Zimmermann U, Dazert E, Wruck CJ, Dazert P, Siegmund W, Kroemer HK, Warzok RW, Cascorbi I. Influence of polymorphisms of ABCB1 and ABCC2 on mRNA and protein expression in normal and cancerous kidney cortex. *Pharmacogenomics J* 2007; 7(1): 56-65.
104. Yasuda K, Lan LB, Sanglard D, Furuya K, Schuetz JD, Schuetz EG. *Pharmacol Exp Ther.* Interaction of cytochrome P450 3A inhibitors with P-glycoprotein. 2002; 303(1): 323-32.
105. Benet LZ, Cummins CL, Wu CY. Unmasking the dynamic interplay between efflux transporters and metabolic enzymes. *Int J Pharm* 2004; 277(1-2): 3-9.
106. Zhang Y, Benet LZ. The gut as a barrier to drug absorption: combined role of cytochrome P450 3A and P-glycoprotein. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(3): 159-68.
107. Ho RH, Kim RB. Transporters and drug therapy: implications for drug disposition and disease. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78(3): 260-77.
108. Mizuno N, Niwa T, Yotsumoto Y, Sugiyama Y. Impact of drug transporter studies on drug discovery and development. *Pharmacol Rev* 2003; 55(3): 425-61.
109. Geick A, Eichelbaum M, Burk O. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* 2001; 276(18): 14581-7.

110. Synold TW, Dussault I, Forman BM. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nat Med.* 2001; 7(5): 584-90.
111. Chen Y, Ferguson SS, Negishi M, Goldstein JA. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308(2): 495-501.
112. Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol.* 1999; 56(6): 1329-39.
113. Tirona RG, Kim RB. Nuclear receptors and drug disposition gene regulation. *J Pharm Sci* 2005; 94(6): 1169-86.
114. Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA. Coordinate transcriptional regulation of bile acid homeostasis and drug metabolism. *Arch Biochem Biophys* 2005 433(2): 397-412.
115. Handschin C, Meyer UA. Induction of drug metabolism: the role of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2003; 55(4): 649-73.
116. Gui C, Miao Y, Thompson L, Wahlgren B, Mock M, Stieger B, Hagenbuch B. Effect of pregnane X receptor ligands on transport mediated by human OATP1B1 and OATP1B3. *Eur J Pharmacol* 2008; 584(1): 57-65.
117. Staudinger JL, Madan A, Carol KM, Parkinson A. Regulation of drug transporter gene expression by nuclear receptors. *Drug Metab Dispos* 2003; 31(5): 523-7.
118. Prueksaritanont T, Gorham LM, Breslin MJ, Hutchinson JH, Hartman GD, Vyas KP, Baillie TA. In vitro and in vivo evaluations of the metabolism, pharmacokinetics, and bioavailability of ester prodrugs of L-767,679, a potent fibrinogen receptor antagonist: an approach for the selection of a prodrug candidate. *Drug Metab Dispos* 1997; 25(8): 978-84.
119. Prueksaritanont T, Ma B, Yu N. The human hepatic metabolism of simvastatin hydroxy acid is mediated primarily by CYP3A, and not CYP2D6. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(1): 120-4.
120. Lins RL, Matthys KE, Verpooten GA, Peeters PC, Dratwa M, Stolear JC, Lameire NH. Pharmacokinetics of atorvastatin and its metabolites after single and multiple dosing in hypercholesterolaemic haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18(5): 967-76.

121. Gibson DM, Bron NJ, Richens A, Hounslow NJ, Sedman AJ, Whitfield LR. J Effect of age and gender on pharmacokinetics of atorvastatin in humans. *Clin Pharmacol* 1996 Mar; 36(3):242-6.
122. Stern RH, Yang BB, Horton M, Moore S, Abel RB, Olson SC. Renal dysfunction does not alter the pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction of atorvastatin. *J Clin Pharmacol* 1997; 37(9):816-9.
123. Herd JA, Ballantyne CM, Farmer JA, Ferguson JJ 3rd, Jones PH, West MS, Gould KL, Gotto AM Jr. Effects of fluvastatin on coronary atherosclerosis in patients with mild to moderate cholesterol elevations (Lipoprotein and Coronary Atherosclerosis Study [LCAS]). *Am J Cardiol* 1997; 80(3): 278-86.
124. Scripture CD, Pieper JA. Clinical pharmacokinetics of fluvastatin. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40(4): 263-81.
125. Karch FE, Lasagna L. Adverse drug reactions. A critical review. *JAMA*. 1975; 234(12): 1236- 41.
126. 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).
127. Current challenges in Pharmacovigilance: Pragmatic approaches, Reports of CIOMS (Council for International Organizations for Medicinal Sciences) Working group V. CIOMS, Geneva, Switzerland (2001).
128. Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am J Cardiol*. 2006 ;97(8A):52C-60C.
129. Stockley's Drug Interactions. Baxter K (Ed.), Pharmaceutical Press, London, UK. <http://www.medicinescomplete.com> (Accessed: March 31, 2011).
130. Wang B, Wang J, Huang SQ, Su HH, Zhou SF. Genetic polymorphism of the human cytochrome P450 2C9 gene and its clinical significance. *Curr. Drug Metab.* 2009;10(7): 781-783.
131. He SM. Clinical drugs undergoing polymorphic metabolism by human cytochrome P450 2C9 and the implication in drug development. *Curr. Med. Chem.* 2011;18(5):667-713.
132. Holstein A, Hahn M, Patzer O, Seeringer A, Kovacs P, Stingl J. Impact of clinical factors and CYP2C9 variants for the risk of severe sulfonylurea-induced hypoglycemia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2011;67(5): 471-476.

133. Kamiyama E, Yoshigae Y, Kasuya A, Takei M, Kurihara A, Ikeda T. Inhibitory effects of angiotensin receptor blockers on CYP2C9 activity in human liver microsomes. *Pharmacokinet.* 2007;22(4):267-275.
134. Taavitsainen P, Kiukaanniemi K, Pelkonen O. In vitro inhibition screening of human hepatic P450 enzymes by five angiotensin-II receptor antagonists. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2000;56(2):135-140.
135. Wen X, Wang JS, Backman JT, Laitila J, Neuvonen PJ. Trimethoprim and sulfamethoxazole are selective inhibitors of CYP2C8 and CYP2C9, respectively. *Drug Metab. Dispos.* 2002;30(6):631-635.
136. Enokizono J, Kusuhara H, Sugiyama Y. Regional expression and activity of breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in mouse intestine: overlapping distribution with sulfotransferases. *Drug Metab. Dispos.* 2007;35(6): 922-928.
137. Takara K, Sakaeda T, Kakumoto M et al. Effects of alpha-adrenoceptor antagonist doxazosin on MDR1-mediated multidrug resistance and transcellular transport. *Oncol. Res.* 2009;17(11-12): 527-533.
138. Adkison KK, Vaidya SS, Lee DY et al. Oral sulfasalazine as a clinical BCRP probe substrate: pharmacokinetic effects of genetic variation (C421A) and pantoprazole coadministration. *J. Pharm. Sci.* 2010;99(2):1046-1062.
139. Breedveld P, Zelcer N, Pluim D et al. Mechanism of the pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer. Res.* 2004;64(16):5804-5811.
140. Suzuki K, Doki K, Homma M et al. Co-administration of proton pump inhibitors delays elimination of plasma methotrexate in high-dose methotrexate therapy. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2009;67(1):44-49.
141. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Feb 11;16(3):1215.
142. Applied Biosystems, TaqMan Drug Metabolism Genotyping Assays Protocol, 2010
143. Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O et al. Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Anal Biochem* 2004; 334:201-3.
144. Oselin K, Gerloff T, Mrozikiewicz PM et al. 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;17:463-9.

145. Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 1992; 48, 361-372.
146. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. *Heredity* 1996; 76, 377-383.
147. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetic Data Analysis. University of Bern, Switzerland. 2006
148. Wei MY, Ito MK, Cohen JD, Brinton EA, Jacobson TA. Predictors of statin adherence, switching, and discontinuation in the USAGE survey: understanding the use of statins in America and gaps in patient education. *J Clin Lipidol.* 2013;7(5):472-83
149. Zhang H, Plutzky J, Skentzos S, Morrison F, Mar P, Shubina M, Turchin A. Discontinuation of statins in routine care settings: a cohort study. *Ann Intern Med* 2013;158(7):526-34.
150. 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.
151. Schnepf R, Zolk O. Effect of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 on pharmacokinetics: experimental findings and clinical implications. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(3):287-306.
152. Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin. Cancer. Res.* 2005;11(6) :2320-2326.
153. Gupta A, Dai Y, Vethanayagam RR et al. Cyclosporin A, tacrolimus and sirolimus are potent inhibitors of the human breast cancer resistance protein (ABCG2) and reverse resistance to mitoxantrone and topotecan. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 2006;58(3): 374-383.
154. Minocha M, Khurana V, Qin B, Pal D, Mitra AK. Co-administration strategy to enhance brain accumulation of vandetanib by modulating P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediated efflux with m-TOR inhibitors. *Int. J. Pharm.* 2012;434(1-2):306-314.
155. Kumar V, Brundage RC, Oetting WS, Leppik IE, Tracy TS. Differential genotype dependent inhibition of CYP2C9 in humans. *Drug Metab. Dispos.* 2008;36(7):1242-1248.



156. Tomita Y, Maeda K, Sugiyama Y. Ethnic variability in the plasma exposures of OATP1B1 substrates such as HMG-CoA reductase inhibitors: a kinetic consideration of its mechanism. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 ;94(1):37-51.
157. Naesens M, Kuypers DR, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Multidrug resistance protein 2 genetic polymorphisms influence mycophenolic acid exposure in renal allograft recipients. *Transplantation* 2006;82(8):1074-84
158. Yi JH, Cho YJ, Kim WJ, Lee MG, Lee JH. Genetic Variations of ABCC2 Gene Associated with Adverse Drug Reactions to Valproic Acid in Korean Epileptic Patients. *Genomics Inform.* 2013;11(4):254-62.
159. Lopez-Lopez E, Ballesteros J, Piñan MA, Sanchez de Toledo J, Garcia de Andoin N, Garcia-Miguel P, Navajas A, Garcia-Orad A. Polymorphisms in the methotrexate transport pathway: a new tool for MTX plasma level prediction in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23(2):53-61
160. Ho RH, Choi L, Lee W, Mayo G, Schwarz UI, Tirona RG, Bailey DG, Michael Stein C, Kim RB. *Pharmacogenet Genomics.* Effect of drug transporter genotypes on pravastatin disposition in European- and African-American participants. 2007;17(8):647-56.
161. Niemi M, Arnold KA, Backman JT, Pasanen MK, Gödtel-Armbrust U, Wojnowski L, Zanger UM, Neuvonen PJ, Eichelbaum M, Kivistö KT, Lang T. Association of genetic polymorphism in ABCC2 with hepatic multidrug resistance-associated protein 2 expression and pravastatin pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics.* 2006;16(11):801-8.
162. Pasanen MK, Miettinen TA, Gylling H, Neuvonen PJ, Niemi M. Polymorphism of the hepatic influx transporter organic anion transporting polypeptide 1B1 is associated with increased cholesterol synthesis rate. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(10):921-6.
163. Mangravite LM, Engelhardt BE, Medina MW, Smith JD, Brown CD, Chasman DI, Mecham BH, Howie B, Shim H, Naidoo D, Feng Q, Rieder MJ, Chen YD, Rotter JI, Ridker PM, Hopewell JC, Parish S, Armitage J, Collins R, Wilke RA, Nickerson DA, Stephens M, Krauss RM. A statin-dependent QTL for GATM expression is associated with statin-induced myopathy. *Nature* 2013;502(7471):377-80.

164. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RH. CYP3A4\*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* 2013;14(1):47-62.

## 11. Životopis

---

Rođena sam 1979. godine u Dubrovniku gdje sam završila opću gimnaziju. 2004. godine diplomirala sam na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu u Zagrebu, smjer farmacija. Nakon završenog fakulteta odradila sam staž u ljekarni. U razdoblju od 2004. do 2007. sudjelujem na projektu Europske unije TEMPUS "New Pharmacy Curricula Development and Implementation".

Od 2005. godine zaposlena sam u Odsjeku za farmakovigilanciju i racionalnu farmakoterapiju Agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED). 2012. godine postajem glavni koordinator Povjerenstava za sigurnu primjene lijekova HALMED-a. 2007. godine na Medicinskom fakultetu sam upisala doktorski studij Biomedicina i zdravstvo, a 2012. magisterij Farmakovigilancija i farmakoepidemiologija u organizaciji konzorcija EU2P u kojem sudjeluje 7 europskih fakulteta.

Objavila sam četiri znanstvena rada čiji sam prvi autor. Dva rada su objavljena u časopisima koje citira Current Contents i dva u časopisu koji citira Science Citation Index. Sudjelovala sam na nekoliko međunarodnih i domaćih znanstvenih skupova. Na 2. Zajedničkom kongresu EFLM i UEMS dobila sam prvu nagradu za najbolji poster pod naslovom „*ABCG2* gene variant and fluvastatin adverse drug reactions in renal transplant recipients“.

## 12. Bibliografija

---

### Znanstveni radovi u časopisima

1. Mirošević Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolić Šarinić 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.
2. Mirošević Skvrce N, Macolić Sarinić V, Mucalo I, Krnić D, Božina N, Tomić S. Adverse drug reactions caused by drug-drug interactions reported to Croatian Agency for Medicinal Products and Medical Devices: a retrospective observational study. *Croat Med J.* 2011;52(5):604-14.
3. Mirošević Skvrce N, Božina N, Sarinić Macolić V, Tomić S. Adverse drug reactions of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitors reported to Agency for medicinal products and medical devices. *Lijec Vjesn.* 2010;132(9-10):277-82.
4. Mirošević Skvrce N, Arapović S, Krnić D, Macolić Šarinić V, Žeželić S, Bagatin K, Leventić J, Tomić S. Adverse drug reactions of psychopharmacs. *Psychiatr Danub.* 2010; 22 (3):236-240.