

# Uloga polimorfizama gena dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-glukuronil-transferaze u toksičnosti kemoterapije fluoropirimidinima i irinotekanom

---

**Bilić, Ivan**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2016**

*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:105:171332>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivan Bilić**

**Uloga polimorfizama gena  
dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-  
glukuronil-transferaze u toksičnosti  
kemoterapije fluoropirimidinima i  
irinotekanom**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2016.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Ivan Bilić**

**Uloga polimorfizama gena  
dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-  
glukuronil-transferaze u toksičnosti  
kemoterapije fluoropirimidinima i  
irinotekanom**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2016.

Rad je izrađen u Klinici za onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Voditelj rada: prof dr sc Nada Božina

## ZAHVALA I POSVETA

Zahvaljujem na bezrezervnoj podršci u prvom redu mojoj mentorici prof.dr.sc. Nadi Božina, te prof.dr.sc. Damiru Vrbanecu i prof.dr.sc. Stjepku Pleštini, kao i svim djelatnicima Medicinskog fakulteta i Katedre za patofiziologiju koji su potpomagali moj rad i profesionalni napredak.

Posebna hvala suradnicama gospođi Zrinki Mirković, kem. teh. i gospođi Maji Mezak, bacc. med. lab. diagn, kao i svim medicinskim sestrama i liječnicima Klinike za onkologiju za njihovu nesebičnu pomoć kod sakupljanja i obrade uzoraka te prikupljanja podataka. Bez njih ovaj rad ne bi bio moguć.

Velika hvala također i dr.sc. Marku Kraliku za pomoć pri statističkoj obradi podataka.

Djelo posvećujem onkološkim bolesnicima. Njihov boljitak je glavni smisao ovog istraživanja.

Posebna posveta također i mojoj obitelji.

Svima ću uvijek biti zahvalan na strpljenju, suradnji i mogućnosti da učeći jedni od drugih poboljšavamo zajednički život.

## Popis oznaka i kratica

5'dFCR	5'-deoksi-5-fluorocitidin
5'dFUR	5'-deoksi-5-fluorouridin
5-FU	5-fluorouracil
6-MP	6-merkaptopurin
ABCB1	ili MDR1 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette 1</i> , podobitelj B, član br. 1
ABCC1	ili MRP1 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj C, član br. 1
ABCC2	ili MRP2 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj C, član br. 2
ABCC3	ili MRP3 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj C, član br. 3
ABCC4	ili MDR4 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj C, član br. 4
ABCC5	ili MRP5 – Multispecifični transporter organskih aniona; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj C, član br. 5
ABCG2	ili MXR, CD338 – Transporter ksenobiotika; od engl. <i>ATP-binding cassette</i> , podobitelj G, član br. 2
ANC	Apsolutni broj neutrofila (od engl. <i>Absolute neutrophil count</i> )
APC	Inaktivni derivat SN-38 (7-etil-10-[4-N-(5-aminopentanoična kiselina)-1-piperidino] karboniloksikamptotekin)
BCHE	Butiril-kolinesteraza (pseudokolinesteraza)
c.	Oznaka kodirajućeg lanca uzvojnice DNA
CDA	Citidin deaminaza
CES1	Karboksilesteraza 1
CES2	Karboksilesteraza 2
CH <sub>2</sub> THF	Metil-tetrahidrofolat
CPIC	Clinical pharmacogenetics implementation consortium
CRC	Kolorektalni karcinom (od engl. <i>Colorectal cancer</i> )
CTCAE	Uobičajeni terminološki kriteriji neželjenih događaja (od engl. <i>Common Terminology Criteria for Adverse Events</i> )
CYP	Citokromi P450 (korijenski simbol čitave superobitelji)
CYP2A6	Citokrom P450, obitelj 2, podobitelj A, polipeptid 6
CYP2D6	Citokrom P450, obitelj 2, podobitelj D, polipeptid 6
CYP3A4	Citokrom P450, obitelj 3, podobitelj A, polipeptid 4
CYP3A5	Citokrom P450, obitelj 3, podobitelj A, polipeptid 5
DHF	Dihidrofolat
DHFR	Dihidrofolat reduktaza
DHFU	Dihidrofluorouracil
DNA	Deoksiribonukleinska kiselina (od engl. <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DPD	Dihidropirimidin-dehidrogenaza
DPWG	Dutch pharmacogenetics working group
DPYD	Gen za dihidropirimidin-dehidrogenazu
DPYS	ili DHP; Dihidropirimidinaza
dTMP	Deoksitimidin monofosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
dUMP	Deoksiuridin monofosfat
dUTP	Deoksiuridin trifosfat
EGFR	Receptor za endotelni čimbenik rasta (od engl. <i>Endothelial growth factor receptor</i> )
ELF	Kombinacijski protokol s 5-FU i etopozidom u bolusnoj primjeni tijekom 3 dana
EMA	Europska agencija za lijekove (od engl. <i>European Medicines Agency</i> )
ERCC2	ili XPD (od lat. <i>Xeroderma pigmentosum D</i> ) – enzim ekscizijskog popravka; od engl. <i>Excision repair cross-complementation group 2</i>

FAC	Kombinacijski protokol s 5-FU, adriamicinom i ciklofosamidom u bolusnoj primjeni svaka 3 tjedna
FAD	Flavin-adenin dinukleotid
FBAL	Fluoro- $\beta$ -alanin
FDA	Američka administracija za hranu i lijekove (od engl. <i>Food and Drug Administration</i> )
FdUDP	Fluorodeoksiuridin difosfat
FdUMP	Fluorodeoksiuridin-monofosfat
FdUTP	Fluorodeoksiuridin- trifosfat
FG	Farmakogenetika
FGM	Farmakogenomika
FMN	Flavin mononukleotid
FOLFIRI	Kemoterapijski protokol infuzijskog fluorouracila i irinotekana
FOLFOX	Kemoterapijski protokol infuzijskog fluorouracila i oksaliplatine
FP	Fluoropirimidini
FPGS	Folilpoliglutamat sintaza – enzim folatnog ciklusa
FRET	Fluorescentno rezonantni prijenos energije (od engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> ili <i>Förster resonance energy transfer</i> )
FUDP	Fluorouridin-difosfat
FUDR	Fluorodeoksiuridin
FUMP	Fluorouridin-monofosfat
FUPA	Fluoro- $\beta$ -ureidopropionat
FUR	Fluorouridin
FUTP	Fluorouridin-trifosfat
G6PD	Glukoza-6-fosfat dehidrogenaza
GC	Plinska kromatografija (od engl. <i>Gas chromatography</i> )
GPCO	Francuska grupa za kliničku onko-farmakologiju (od franc. <i>Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique</i> )
HapB3	Haplotip B3 – naslijeđena kombinacija nekoliko SNP-ova u genu za DPYD: (c.1236G>A, c.1129-5923C>G, c.483+18G>A, c.959-51T>G i c.680+139G>A)
HPLC	Visokotlačna tekućinska kromatografija (od engl. <i>High-pressure liquid chromatography</i> )
IP	Interval pouzdanosti
K <sub>3</sub> EDTA	Tri-kalijeva sol etilendiamintetraoctene kiseline (od engl. <i>Ethylenediaminetetraacetate</i> )
LSF	(od engl. <i>Late SV40 Factor</i> ) ili TFCP2 Transkripcijski čimbenik CP2 – regulator izraženosti <i>DPYD</i>
LV	Leukovorin (5-formiltetrahidrofolat)
M4	Derivat irinotekana nastao deetilacijom kamptotekinskog nastavka
mCRC	Metastatski kolorektalni karcinom (od engl. <i>Metastatic colorectal cancer</i> )
mRNA	Glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. <i>Messenger ribonucleic acid</i> )
MTHFR	Metil-tetrahidrofolat reduktaza
N	Broj ispitanika u (pod)skupini
NADPH	Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NAT2	N-acetiltransferaza 2
NCBI	Nacionalni centar za biotehnološke informacije SAD
NCT	Registarski broj kliničke studije na portalu <a href="http://www.clinicaltrials.gov">www.clinicaltrials.gov</a>
NIH	Nacionalni instituti zdravlja (od engl. <i>National institutes of health</i> )
NPC	Inaktivni derivat SN-38 (7-etil-10-[4-(1-piperidino)-1-amino] karboniloksikamptotekin)
OPRT	Orotat fosforibozil transferaza
OR	Omjer izgleda (od engl. <i>Odds ratio</i> )
ORO	Opažateljstvo izvještavanje o ishodu (od engl. <i>Observer reported outcome</i> )
P	P-vrijednost, signifikantnost upotrijebljenog statističkog testa
PBMC	Mononuklearne stanice periferne krvi (od engl. <i>Peripheral blood mononuclear cells</i> )

PCR	Polimerazna lančana reakcija (od engl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PGRN	Farmakogenomička istraživačka mreža (od engl. <i>Pharmacogenomics Research Network</i> )
PharmGKB	Farmakogenomička baza znanja – od engl. <i>Pharmacogenomics knowledge base</i>
PPAT	Fosforibozil pirofosfat amidotransferaza
PRO	Bolesnikovo izvještavanje o ishodu (od engl. <i>Patient reported outcome</i> )
PRPP	Fosforibozil pirofosfat
RNA	Ribonukleinska kiselina (od engl. <i>Ribonucleic acid</i> )
RNPGx	Francuska nacionalna FG mreža (od franc. <i>Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière</i> )
RR	Ribonukleotid reduktaza
RRM1	Ribonukleotid reduktaza M1
RRM2	Ribonukleotid reduktaza M2
rs	Generički prefiks jednonukleotidnog polimorfizma javne internetske baze SNP pri Nacionalnom centru za biotehnoške informacije SAD (NCBI)
RT-PCR	PCR u realnom vremenu ili kvantitativni PCR (od engl. <i>Real-time PCR</i> )
S-1	Fuoropirimidin nove generacije, kombinacija tegafura, gimeracila (inhibitor DPD) i oteracila (inhibitor OPRT)
SERM	Selektivni modulator estrogenskih receptora
SLC22A7	Transporter organskih aniona; od engl. <i>Solute carrier family 22</i> , član br. 7
SLC29A1	Transporter nukleozida; od engl. <i>Solute carrier family 29</i> , član br. 1
SLCO1B1	ili OATP1B1; Transporter organskih aniona; od engl. <i>Solute carrier organic anion transporter family</i> , član 1B1
SMUG1	Uracil-DNA glikozilaza, ekscizijski enzim, od engl. <i>Single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1</i>
SN-38	7-etil-10-hidroksi kamptotekin
SN-38G	7-etil-10-hidroksi kamptotekin - glukuronid
SNP	Jednonukleotidni polimorfizam (od engl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
TDG	Timidin-DNA glikozilaza, ekscizijski enzim
TFCP2	Transkripcijski čimbenik CP2
THF	Tetrahidrofolat
TK1	Timidin kinaza 1
TP1	Topoizomeraza 1
TP53	Tumorski protein 53; p53 ili LFS1 (od engl. <i>Li-Fraumeni syndrome</i> )
TPMT	Tiopurin s-metiltransferaza
TYMP	Timidin fosforilaza
TYMS	Timidilat sintaza
UCK1	Uridin-citidin kinaza 1
UCK2	Uridin-citidin kinaza 2
UDP	Uridin difosfat
UGT1A1	UDP – glukuronil transferaza, podobitelj 1A, član br. 1
UGT1A10	UDP – glukuronil transferaza, podobitelj 1A, član br. 10
UGT1A9	UDP – glukuronil transferaza, podobitelj 1A, član br. 9
UK	Uridin-kinaza
UMPS	Uridin-monofosfat sintetaza
UPB1	ili BUP1 $\beta$ -ureidopropionaza 1
UPP1	Uridin-fosforilaza 1
UPP2	Uridin-fosforilaza 2
VEGF-A	Vaskularni endotelni čimbenik rasta A (VEGF-A, od engl. <i>Vascular endothelial growth factor A</i> )
XELOX	Kemoterapijski protokol kapecitabina i oksaliplatine
XRCC3	Enzim popravka DNA homolognom rekombinacijom, od engl. <i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>



## Sadržaj

1	Uvod .....	1
1.1	Kemoterapija fluoropirimidinima .....	1
1.1.1	Metabolizam fluoropirimidina .....	2
1.1.2	Učinci fluoropirimidina .....	4
1.1.3	Kombinacijski protokoli s fluoropirimidinima .....	5
1.2	Farmakogenetika .....	9
1.2.1	Povijest .....	9
1.2.2	Farmakogenetika vs. farmakogenomika .....	11
1.2.3	Smisao, uloga i ograničenja farmakogenetike .....	12
1.2.4	Izvori farmakogenetičkih informacija .....	12
1.2.5	Farmakogenetika u onkologiji .....	14
1.3	Dihidropirimidin-dehidrogenaza .....	16
1.3.1	Varijabilnost aktivnosti DPD .....	17
1.3.2	Deficijencija dihidropirimidin-dehidrogenaze .....	19
1.3.3	Deficijencija DPD kao farmakogenetički sindrom .....	21
1.3.4	Mogućnosti fenotipske analize DPD-deficijencije .....	23
1.4	Polimorfizmi <i>DPYD</i> .....	26
1.4.1	Nefunkcionalne inačice <i>DPYD</i> .....	26
1.4.2	Ostale hipofunkcionalne inačice .....	29
1.5	UDP – glukuronil transferaze .....	33
1.5.1	Polimorfizmi <i>UGT1A1</i> .....	33
1.5.2	Kliničke posljedice nedostatne aktivnosti <i>UGT1A1</i> .....	34
1.5.3	<i>UGT1A1</i> i metabolizam irinotekana .....	35
2	Hipoteza .....	37
3	Ciljevi rada .....	38
4	Ispitanici i metode .....	39
4.1	Ispitanici .....	39
4.2	Nuspojave kemoterapije .....	40
4.3	Izdvajanje DNA .....	40
4.4	Određivanje polimorfizma <i>DPYD</i> metodom TaqMan® .....	40
4.4.1	Potrebna oprema i reagensi .....	41
4.5	Određivanje polimorfizma <i>UGT1A1</i> metodom LightCycler® .....	43
4.5.1	Potrebna oprema i reagensi .....	43
4.6	Statistička analiza .....	46
5	Rezultati .....	47
5.1	Dob, spol i etničko podrijetlo .....	47
5.2	Protokoli liječenja i primarna sijela tumora .....	49
5.3	Nuspojave kemoterapije .....	51
5.3.1	Spol ispitanika i toksičnost kemoterapije .....	55
5.3.2	Brzina nastanka nuspojava .....	56
5.4	Genotipizacija <i>DPYD</i> i <i>UGT1A1</i> .....	57
5.4.1	Genotipizacija <i>DPYD</i> *2A .....	59
5.4.2	Genotipizacija c.496A>G .....	60
5.4.3	Genotipizacija c.2846A>T .....	61
5.4.4	Genotipizacija c.1236G>A .....	62
5.4.5	Genotipizacija <i>DPYD</i> *13 .....	64
5.4.6	Genotipizacija <i>UGT1A1</i> *28 .....	64
5.5	Zbirna analiza povezanosti i utjecaja genotipova i alela <i>DPYD</i> na toksičnost .....	66
5.6	Analiza utjecaja genotipova <i>DPYD</i> na toksičnost mono-fluoropirimidinskih protokola (kapecitabin, Mayo i de Gramont) .....	68
5.7	Analiza utjecaja genotipova <i>DPYD</i> na toksičnost pri primjeni protokola FOLFIRI .....	69
6	Rasprava .....	71
7	Zaključci .....	81
8	Sažetak .....	82
9	Summary .....	83
10	Popis literature .....	84
11	Biografija .....	97

# 1 Uvod

## 1.1 Kemoterapija fluoropirimidinima

Antitumorska aktivnost fluoriranog uracila dokazana je 50-ih godina 20. stoljeća tijekom istraživanja na eksperimentalnom modelu jetrenih tumora u štakora. Eksploatirana je visoka razina selektivnog unosa uracila u tumorske stanice (više nego u normalnim tkivima), pri čemu je fluor iskorišten kao odranije poznati enzimski inhibitor. (1) Metoda sinteze supstance objavljena je iste godine. Seminalni radovi objavljeni tih godina postuliraju dvostruki učinak fluorouracila: enzimskom blokadom timidilat-sintaze (TYMS) i ugradnjom lažnih nukleotida u DNA i RNA, što će se opetovano potvrditi u kasnijim analizama. Supstanca je analog uracila koji se od ishodišne molekule razlikuje po supstituiranom atomu fluora umjesto vodika na C-5 poziciji pirimidinskog prstena. Autori 5-fluorouracila (fluorouracil, 5-FU) temeljili su rad na dotad akumuliranim spoznajama o utjecaju lažnih metabolita na sastav nukleinskih kiselina s toksičnim posljedicama na stanični ciklus i viabilnost stanica. Time je 5-FU u spoznajnom smislu nastavak plejade supstanci kreiranih u laboratoriju istraživačkog para Hitchings GH i Elion G koji su Nobelovom nagradom nagrađeni utemeljitelji racionalnog dizajna lijekova, te su zaslužni za otkriće i razvoj važne skupine lijekova antimetabolita (primjerice tiogvanin, merkaptopurin, azatioprin, alopurinol). Obzirom na kasnija otkrića novih lijekova njemu sličnog mehanizma djelovanja, 5-FU je objedinjen u skupinu agensa zajedničkog naziva fluoropirimidini.

Fluoropirimidini (FP), uključujući 5-FU i njegove predlijekove (primjerice kapecitabin, tegafur, S-1) su učinkoviti citostatici široko prihvaćeni za onkološko liječenje kolorektalnog karcinoma. Također, pojedini od njih su dio terapijskih protokola za tumore glave i vrata, karcinoma želuca, gušterače, dojke, cerviksa te neoplazmi drugih sijela. Kao i svi antimetaboliti učinak ostvaruju dezorganizacijom strukture DNA i RNA nakon inkorporiranja u njihovu primarnu sekvencu. Osim toga, kao lažni/inhibitorni supstrat neposredno koče TYMS čime induciraju nedostatak timidina, što dodatno utječe na strukturu i funkciju nukleinskih kiselina. Zbirni učinak je arest staničnog ciklusa i stanična smrt u visoko proliferativnim tkivima (prvenstveno tumorskim, ali i hematopoetskim, gastrointestinalnim i dr.). Neposredni učinak ne ostvaruju unesene supstance nego njihovi aktivni metaboliti stvoreni poglavito u jetri odnosno tumorskim stanicama (i ostalim tkivima) s izraženim enzimima pretvorbe.

### 1.1.1 Metabolizam fluoropirimidina

5-FU brzo ulazi u stanicu uracilskim olakšanim transportom (2). Prolazi aktivacijski metabolizam sukladan uracilu koji rezultira nastankom triju glavnih bioloških aktivnih produkata: fluorouridin-trifosfat (FUTP, ugrađuje se u RNA), fluorodeoksiuridin- trifosfat (FdUTP, za ugradnju u DNA) i fluorodeoksiuridin-monofosfat (FdUMP, inhibira TYMS).

Sinteza aktivnih metabolita ovisi o nekoliko enzima. Uridin-monofosfat sintetaza (UMPS ili orotat fosforibozil transferaza – OPRT) pretvara molekulu 5-FU u fluorouridin-monofosfat (FUMP), uz fosforibozil pirofosfat (PRPP) kao kofaktor. Produkt (FUMP) se u daljnjem reakcijskom slijedu, uz pomoć kinaza, pretvara u difosfat (FUDP) te konačno u aktivni FUTP. Postoji i redundantni put stvaranja FUTP u kojem se FUMP stvara preko intermedijera fluorouridina (FUR) uz sudjelovanje uridin-fosforilaze (UPP1) i uridin-citidin kinaze (UCK1). Postoje dva biokemijska puta stvaranja deoksi-oblika metabolita 5-FU: (1) ribonukleotid reduktaza (RR) izravno katalizira pretvorbu FUDP u fluorodeoksiuridin difosfat (FdUDP) koji se uz pomoć kinaze fosforilira u aktivni oblik FdUTP ili defosforilacijom prelazi u FdUMP; (2) timidin fosforilaza (TYMP) pretvara 5-FU u fluorodeoksiuridin (FUDR) koji daljnjom pretvorbom uz sudjelovanje timidin kinaze (TK1) daje aktivni metabolit FdUMP.

Kvantitet svih opisanih reakcija, odnosno ravnotežne koncentracije aktivnih metabolita pod permisivnim su utjecajem aktivnosti dihidropirimidin dehidrogenaze (DPD) koja razgrađuje većinu unesenog 5-FU u dihidrofluorouracil (DHFU). Brojni enzimi sudjeluju u složenim biokemijskim putevima pretvorbe fluoropirimidina. Genetička i epigenetička regulacija, kao i okolišni čimbenici mogu pri tome utjecati na njihovu učinkovitost i tako doprinosti varijabilnosti nelinearne farmakokinetike FP koja se bilježi u studijama. (3, 4) Najznačajniju ulogu u genskom utjecaju na metabolizam imaju polimorfizmi gena za DPD (što je prikazano u posebnom poglavlju i predstavlja glavni predmet proučavanja u ovom radu), no također je u nekoliko studija pokazana važnost polimorfizama ostalih gena čiji transkripcijski produkti sudjeluju u metabolizmu FP (primjerice DPYS, TYMS, MTHFR, BUP1). (5-8) Slika 1 shematski prikazuje metaboličke puteve farmakokinetike FP.



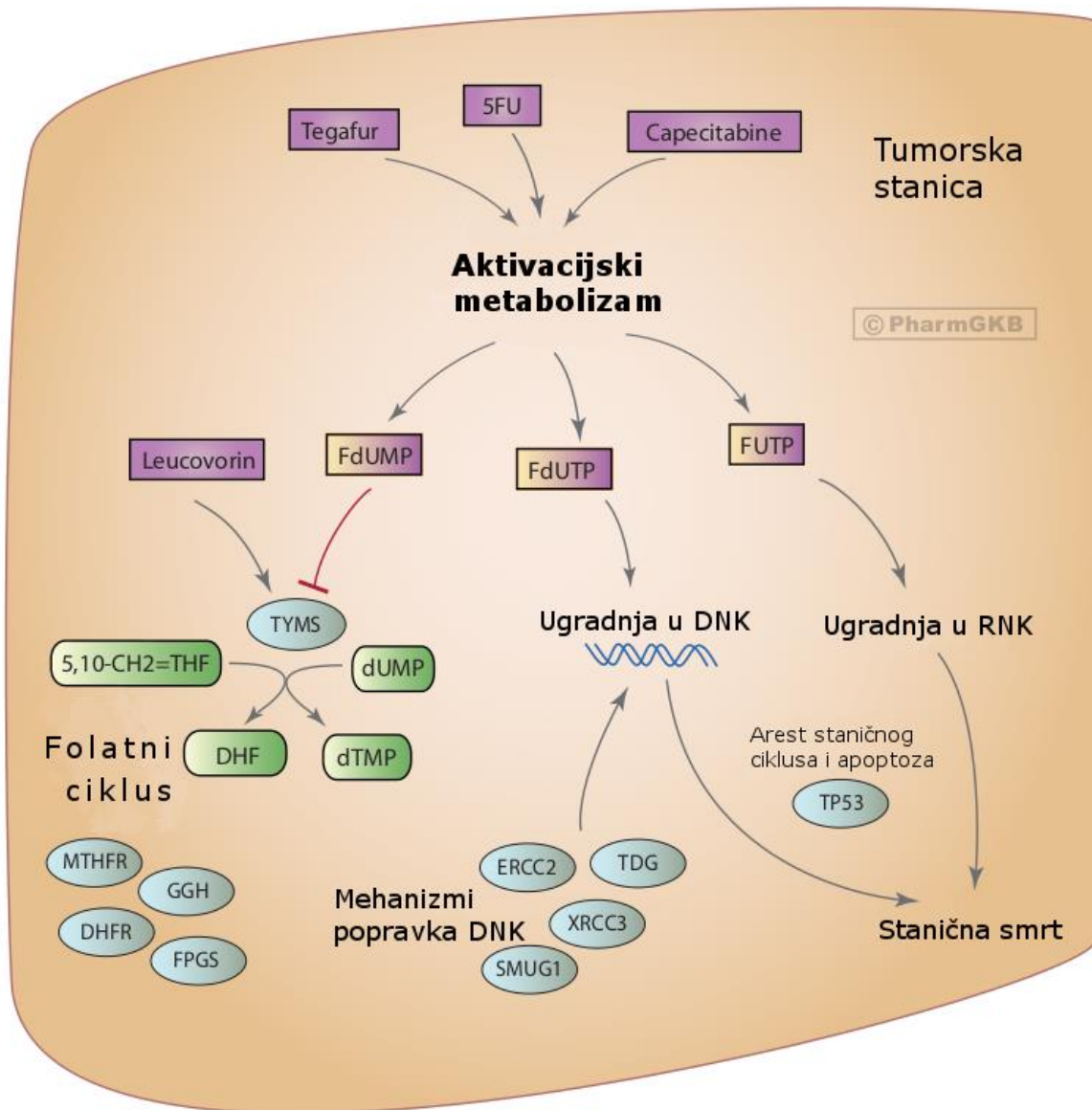
DPYS – dihidropirimidinaza, UPB -  $\beta$ -ureidopropionaza, TK – timidin kinaza, TYMS – timidilat sintaza. Tablica je sačinjena prema literaturnom navodu (9) uz dozvolu nositelja autorskih prava.

### 1.1.2 Učinci fluoropirimidina

Aktivni metabolit 5-FU FdUMP stvara stabilni tercijarni kompleks s TYMS i reduciranim metil-tetrahidrofolatom ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) kao kofaktorom, s posljedičnom disfunkcijom enzima i nedostatnom sintezom timidina potrebnog za sintezu (replikaciju i popravak) DNA. (10) Inhibitorski učinak FdUMP izravno ovisi o staničnoj zalihi  $\text{CH}_2\text{THF}$ , što je osnova za danas uobičajenu koadministraciju leukovorina (LV, 5-formiltetrahidrofolat) s 5-FU u većini kemoterapijskih protokola za liječenje kolorektalnog karcinoma. LV se unutarstaničnom enzimskom konverzijom pretvara u  $\text{CH}_2\text{THF}$ . (11)

Inhibicijom TYMS nastaje deplecija stanične rezerve deoksitimidin monofosfata (dTMP) i susljedno deoksitimidin trifosfata (dTTP) što onemogućuje doprinos timinske komponente izgradnji DNA, a istodobno remeti homeostazu ugradnje ostalih baza (purinskih, kao i citozina) putem više regulatornih petlji povratne sprege. Istodobno se zbog blokade TYMS akumulira reaktant deoksiuridin monofosfat (dUMP) koji se fosforilira u aktivni trifosfatni oblik dUTP, koji se kao i FdUTP, dok je prisutan u suvišku može ugrađivati u DNA. Mehanizmi popravka ne uspijevaju korigirati fluorom i uracilom izmijenjenu sekvencu DNA, već naprotiv ugrađuju dodatne lažne prekursore. Rezultantno nastaju opsežna oštećenja DNA koja mogu uključivati i lomove tračaka, te dovode do aresta staničnog ciklusa i stanične smrti.

U RNA se lažni metabolit FUTP obilno ugrađuje oštećujući izravno i neizravno obradu i posttranslacijsku modifikaciju svih staničnih oblika RNA, uključujući i inhibiciju poliadenilacije mRNA. Posljedično, remeti se stanični metabolizam i vitalni procesi, što također doprinosi nastanku stanične disfunkcije i smrti. (12) Među glavne nuspojave FP ubrajaju se mijelosupresija (poglavito neutropenija), proljev, aftozni stomatitis (mukozitis), kardiotsičnost, inapetencija, palmoplantarni dermatitis (sindrom šaka-stopalo, posebno izražen kod kapecitabina). Žene su pod nešto većim rizikom od razvoja nuspojava FP. (13) Slika 2 shematski opisuje biološke učinke FP.



**Slika 2. Shematski prikaz bioloških učinaka FP.**

Nakon aktivacijske pretvorbe u aktivne metabolite FdUMP, FdUTP i FUTP (u jetri ili tumorskoj stanici) nastaje inhibicija TYMS što rezultira nedostatkom timidinskih prekursora te ugradnja lažnih metabolita u DNA i RNA što bitno kompromitira homeostazu nukleinskih kiselina te rezultira staničnom smrću. Mehanizmi popravka (enzimi ERCC, TDG, XRCC, SMUG) pri tome doprinose disfunkciji ugradnjom lažnih metabolita. MTHFR, GGH, DHFR, FPGS – enzimi ciklusa folata. TP53 – ili p53 tumorski protein 53. Za detaljne podatke o mehanizmima i tumačenja upotrijebljenih kratica molim videti tekst i popis oznaka i kratica. Sačinjeno prema literaturnom navodu (9) uz dozvolu nositelja autorskih prava.

### 1.1.3 Kombinacijski protokoli s fluoropirimidinima

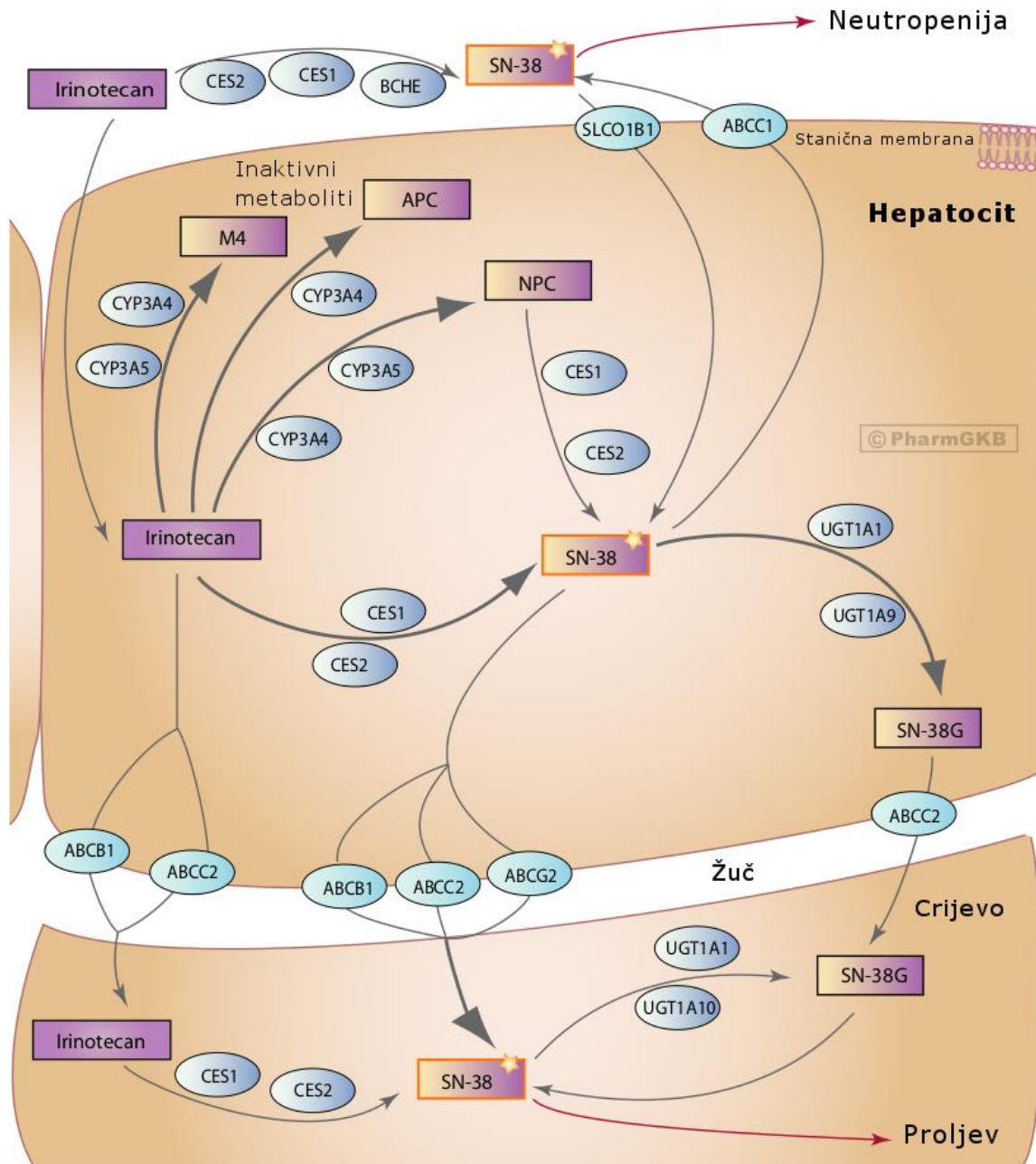
Nakon uvođenja u kliničku medicinu 60-tih godina 20. stoljeća, terapija s 5-FU donijela je značajan pomak u liječenju solidnih tumora, poglavito kolorektalnog karcinoma. Oko 20 godina iza toga spoznaje se da su polikemoterapijski protokoli znatno učinkovitiji od monoterapije. Zbog toga se u većini indikacija danas primjenjuju kombinacijski protokoli FP

i drugih citostatika. Najčešće se u terapiji kolorektalnog karcinoma koriste kombinacije kontinuirane infuzije 5-FU s irinotekanom odnosno oksaliplatinom (protokoli FOLFIRI odnosno FOLFOX). Također je uobičajena i kombinacija kapecitabina i oksaliplatine (protokol XELOX).

### Irinotekan

Irinotekan je derivat kamptotekina (derivat dobiven iz kineskog drveta *Camptotheca acuminata*, opisan prvi put 1966. godine) i pripada inhibitorima topoizomeraze I (TP1) – enzima zaduženog za odvijanje spiralne zavojnice DNA (smanjivanje torzijskog stresa i opuštanje uzvojnice tijekom procesa replikacije, rekombinacije, popravka i transkripcije). To je predlijek koji se metabolizira u aktivni oblik SN-38 (7-etil-10-hidroksi-kamptotekin, oko 1000x potentniji inhibitor TP1 od irinotekana). (14) SN-38 stabilizira kompleks TP1 i DNA sprečavajući ligaciju lanca, inducirajući tako jednostruke i dvostruke lomove tračaka DNA, što uzrokuje arest staničnog ciklusa i staničnu smrt. Farmakokinetika i farmakodinamika irinotekana pod permisivnom je ulogom enzima UGT1A1 koji glukuronidacijom inaktivira većinu SN-38 (vidi poglavlje o UGT1A1). (15) Među glavne nuspojave irinotekana ubrajaju se neutropenija, proljev, mučnina i povraćanje, abdominalni bolovi, anemija. Slika 3 pokazuje shematski tijek metabolizma irinotekana.





**Slika 3. Metabolički putevi farmakokinetike irinotekana.**

Biolški aktivan metabolit irinotekana SN-38 polučuje većinu antitumorskih i toksičnih učinaka. Prisutan je i u krvi i u žuči, a podložan je i enterohepatičkom kruženju. Oznake u slici: ABCC, ABCB, ABCG i SLC – medijatori olakšanog transporta organskih molekula. CYP – generički prefiks enzima (citokroma) P450 – kataliziraju inaktivacijsku pretvorbu irinotekana. UGT – UDP-glikozil transferaze – zadužene za aktivaciju irinotekana. Za detaljne podatke o mehanizmima i tumačenja upotrijebljenih kratica molim videti tekst i popis oznaka i kratica. Sačinjeno prema literaturnom navodima (16-18) uz dozvolu nositelja autorskih prava.

### Oksaliplatina

Oksaliplatina (diaminocikloheksan-oksalatoplatina) najnoviji je derivat odranije poznatog i važnog citostatika cisplatine. Zajedno s ostalim derivatima platine u širokoj je upotrebi u liječenju solidnih tumora. Supstanca je otkrivena i prvi put istražena njena antitumorska



aktivnost 1976. godine u Japanu, (19) no u širu kliničku upotrebu dolazi 90-ih godina 20. stoljeća kad je dokazana učinkovitost dodatka oksaliplatine polikemoterapijskim protokolima temeljenih na FP u liječenju kolorektalnog karcinoma (CRC, od engl. *colorectal carcinoma*). Jedini od novijih antineoplastika djelotvoran je i u adjuvantnom kontekstu liječenja, (20) te je stoga najčešće upotrebljavani lijek za liječenje CRC, osim FP. Nažalost, upotreba oksaliplatinskih protokola ograničena je razvojem kumulativne neurotoksičnosti (periferna polineuropatija) kod većine bolesnika. Među ostale značajne nuspojave oksaliplatine ubrajaju se trombocitopenija, mučnina i povraćanje, proljev. (21)

Cisplatin i karboplatin stariji su i uobičajeni citostatici u polikemoterapijskim protokolima s FP za liječenje karcinoma želuca, glave i vrata te žučnog trakta. Razvoj neuropatije je isto čest ograničavajući čimbenik, ali rjeđe nego nefrotoksičnost – inače najčešća nuspojava starijih platinskih derivata.

### Bioterapija

Najnovija faza razvoja kombinacijskih protokola za liječenje metastatskog CRC (mCRC) obilježena je otkrićem učinkovitosti selektivnih, necitostatskih lijekova koji inhibiraju angiogenezu i staničnu proliferaciju. Učinak ostvaruju izravnom interakcijom s tumorigenom molekularnom zahvatnom točkom, etiopatogenetski važnom tijekom procesa onkogeneze. U toj skupini prednjače dva inhibitora arteficijalna protutijela: bevacizumab i cetuksimab. (22) Bevacizumab inhibira vaskularni endotelni čimbenik rasta A (VEGF-A, od engl. *Vascular endothelial growth factor A*). Lijek interferira s angiogenezom u tumoru, djelujući posredno na krvnu opskrbu, tkivni tlak, kao i biološku dostupnost konkomitantno primijenjenih citostatika. Među glavne nuspojave bevacizumaba ubrajaju se infuzijske reakcije, tromboze i embolički incidenti, arterijska hipertenzija, krvarenja. Cetuksimab inhibira receptor za endotelni čimbenik rasta (EGFR, od engl. *Endothelial growth factor receptor*) prekidajući tako pobudni unutarstanični prijenos signala za staničnu proliferaciju. Među glavne nuspojave cetuksimaba ubrajaju se infuzijske reakcije i papulo-pustulozni osip. Isti farmakološki princip inhibicije EGFR koristi i novije protutijelo panitumumab, sa usporedivom učinkovitošću u liječenju mCRC. Osim inhibitornih protutijela, u novije vrijeme dokazan je učinak malih molekula sa sličnim farmakološkim zahvatnim točkama (primjerice anti-VEGF agens aflibercept, multikinazni inhibitor regorafenib).

## 1.2 Farmakogenetika

Aplikacija lijeka stožerna je metoda medicinske djelatnosti. Stoga klinička farmakologija zauzima važno mjesto u biomedicinskoj znanosti. Jedna od središnjih uloga kliničke farmakologije je razjašnjenje varijabilnosti kliničkog odgovora na primijenjenu supstancu, što uključuje učinak lijeka i izazvanu toksičnost. Farmakogenetika (FG) kao grana kliničke farmakologije daje izravan doprinos raščlambi genetičkog doprinosa farmakokinetici i farmakodinamici medikamenata. To je interdisciplinarna struka koji uključuje farmakologe, genetičare, kliničare različitih specijalnosti, biokemičare, biologe kao i stručnjake drugih biomedicinskih grana.

Ključne determinante distribucije i metabolizma lijekova su membranski transporter i biotransformacijski enzimi koji izravno ovise o genskom kodu, kao i posttranslacijskoj obradi. Stoga većina istraženih FG parova gen-lijek uključuje polimorfizme članova upravo tih dvaju funkcijskih skupina.

### 1.2.1 Povijest

Pojam farmakogenetike skovan je u predgenomskoj eri, 50-ih godina 20. stoljeća, nakon otkrića genetički determinirane toksične reakcije na antituberkulotik izoniazid i antimalarik primakin te konačno nakon istraživanja Wenera Kalowa i suradnika o sukcinilkolinskoj apneji. Uvođenje **izonijazida** značilo je velik pomak u liječenju tuberkuloze. Nakon početka široke primjene uslijedila je spoznaja o nasljednoj varijabilnosti metaboliziranja lijeka, zbog hipofunkcionalnosti N-acetiltransferaze 2 (NAT2). (23) Spori acetilatori češće su razvijali perifernu neuropatiju zbog kompeticije lijeka sa supstratima piridoksinskog puta (vitamin B6), pri čemu se razvija patogenetski tijek sličan hipovitaminozi. Zbog toga je suplementacija piridoksinom danas obvezatna tijekom izonijazidske terapije. Osim toga spori acetilatori (nositelji alela NAT2\*5, \*6, \*7 i drugih) povezani su i sa češćom pojavom hepatotoksičnosti. Nakon uvođenja **primakina** u terapiju malarije detektira se podskupina bolesnika s hemolitičkom reakcijom na primjenu lijeka. (24) S vremenom se veći broj lijekova s potencijalom takve hemolitičke patogeneze pridružuje primakinu (primjerice dapson, nitrofurantoin, metilensko plavilo i dr.). Svi takvi lijekovi pripadaju kemijskim oksidansima. Posljedična hemoliza je ubrzo povezana s enzimskim deficitom eritrocitne glukoza-6-fosfat

dehidrogenaze (G6PD). Precizan mehanizam destrukcije eritrocita nije razjašnjen, no očigledno uključuje oksidativnu patogenezu budući da je biokemijski put G6PD-NADPH jedini način oporavka oksidiranog glutationa – važnog antioksidansa u eritrocitima. (25) Budući da su eritrociti deficijentni za G6PD rezistentniji na plazmodij, nasljedna enzimska deficijencija endemska je u područjima s više malarije. Stoga je to i najčešća farmakogenetički značajna enzimopatija u svijetu, koja zahvaća približno 400 milijuna ljudi globalno. Radi se o visoko polimorfnom enzimu: postoji oko 300 disfunkcionalnih genskih inačica G6PD. Nadalje, u istraživanjima varijabilnosti učinka depolarizirajućeg miorelaksansa **sukcinilkolina** uočen je ekstremni efekt u malog broja bolesnika nazvan sukcinilkolinska apnea. Radi se o protrahiranoj paralizi koja zahtijeva višesatnu arteficijelnu ventilaciju tijekom oporavka od anestezije. Reakcija je uzrokovana naslijeđenom hipofunkcionalnom inačicom butiril-kolinesteraze (pseudokolinesteraza) s niskim afinitetom vezivanja supstrata. Prvi opisi temeljili su se na spektrofotometrijskim istraživanjima afiniteta enzima i supstrata, dok su kasnije uslijedile deskripcije više disfunkcionalnih varijanti gena za pseudokolinesterazu. (26)

Sumirajući rezultate tih pionirskih istraživanja termin „farmakogenetika“ prvi put upotrebljava Friedrich Vogel 1959. godine u svom članku „Moderne Probleme der Humangenetik“. (27) 1962. godine Kalow objavljuje prvi udžbenik FG (*Pharmacogenetics: Heredity and the response to drugs*). (28)

Kasnija istraživanja rezultiraju otkrivanjem farmakogenetičke varijabilnosti među najznačajnijom skupinom enzima za biotransformaciju, superporodicom enzima citokroma P450 (CYP). Konkretno, tijekom rane faze istraživanja predliješkova **sparteina** (antiaritmik, blokator natrijskih kanala) i **debrisokina** (antihipertenziv, simpatikolitik – blokator katekolaminske sinteze) mala podskupina zdravih ispitanika razvijala je značajne nuspojave uz minimalne koncentracije detektabilnih metabolita lijekova u urinu (loši/spori metabolizatori od engl. *poor metabolizers*). (29) Metabolizam tih dvaju lijekova lociran je na isti enzim (tada nazvan spartein/debrisokin hidroksilaza) koji je u probanda s nuspojavama hipofunkcionalan. (30) Kasnije dolazi spoznaja da enzim spada u jetrene biotransformacijske enzime (P450) i da se radi o CYP2D6, te da se hipofunkcionalnost nasljeđuje autosomno recesivno. (31) CYP2D6 je jedan od najznačajnijih polimorfnih enzima P450 budući da sudjeluje u biotransformaciji nekoliko stotina lijekova (procijenjeno je da može imati utjecaj na učinkovitost oko 25% svih medikamenata uobičajenih u suvremenoj kliničkoj medicini). (32)

Dosadašnjim istraživanjima detektirano je preko sto klinički relevantnih parova gen-lijek (primjerice varfarin, statini, paroksetin), čija je ovisnost o naslijeđenim funkcijskim inačicama

gena dobro opisana i genotipizacija je postala dio smjernica za primjenu lijeka kao i uputa o lijeku. (33) Opsežnija elaboracija kliničke uspješnosti farmakogenetike te dosad istraženih parova gen-lijek prelazi tematske okvire ove disertacije.

### 1.2.2 Farmakogenetika vs. farmakogenomika

Pojmovi farmakogenetika i farmakogenomika (FGM) često se u suvremenim znanstvenim tekstovima koriste kao istoznačnice. FG je nastala ranije, daleko prije ere projekta humanog genoma, dok je FGM nastala s rezultatima primijenjene istraživačke metodologije za pretragu kompletnog transkriptoma, metaboloma i drugih funkcionalnih podskupina gena. (34)

Podatak da ista doza lijeka kod dva fenotipski slična pacijenta može izazvati dijametralno suprotne nuspojave, vodi logičnom zaključku da ključ za nalaženje odgovora može ležati u iznenađujuće visokoj varijabilnosti genoma pronađenoj i publiciranoj tijekom projekta sekvenciranja humanog genoma.

FG determinira pojedine gene s jakim utjecajem na učinak jednog lijeka. Budući da se primjenom FG spoznaja dobiva ograničena mogućnost predikcije (metodologija daje limitiranu specifičnost i osjetljivost), dio uočene varijabilnosti reakcije na lijek ostaje neprotumačen. FGM pak počiva na realnoj pretpostavci da je učinak lijeka multifaktorijski determinirana pojava te uzima u obzir desetine pa i stotine genski reguliranih molekularnih čimbenika. (35)

FGM pristup istraživanju nikad ne uključuje samo jedan gen i/ili polimorfizam, već nekoliko desetaka ili stotina gena koji u konkretnom pokusnom modelu mogu reagirati na aplicirani lijek. Glavna razlika između FG i FGM je u metodologiji, tako da poistovjećivanje tih dvaju pojmova nije posve pogrešno budući da se polje istraživanja i svrha preklapaju. Pojedini istraživači mogu koristiti obje razine genetičkog istraživanja u svom radu, ovisno o studijskim ciljevima i/ili specijaliziranosti laboratorijske opreme i osoblja. Načelno se može reći da FG evoluirala u FGM.

Kod bolesnika izloženih posebno jakim toksičnim reakcijama FG metodologija primijenjena na poznate čimbenike farmakokinetike predmetnog lijeka može dati značajne rezultate u prikazu molekularno-genetičkih osobitosti enzima metaboličkog puta.

Istraživanje prezentirano u okviru ove doktorske disertacije karakterizira se kao FG analiza obzirom na upotrijebljene metode i broj analiziranih gena i njihovih inačica.

### 1.2.3 Smisao, uloga i ograničenja farmakogenetike

Ideal farmakogenetike je poznavanje svih relevantnih genetičkih determinanti farmakokinetike, farmakodinamike i toksičnosti pojedinog lijeka, praktično provođenje preliminarnog genotipiziranja kandidata za terapiju lijekom, te konačno odabir i aplikacija medikamenta uz uvažavanje genotipa i fenotipa. Uobičajeno je takav pristup nazvati personaliziranim liječenjem (36), ili u novije vrijeme preciznom medicinom – manje idealiziranim pojmom (37), obzirom na prepreke proizašle iz nerazumijevanja većine dekodirane genske sekvence humanog genoma, pri čemu još dugo neće biti moguće liječiti uistinu personalizirano – prilagođeno svim genskim uvjetovanim predispozicijama kod pojedinca.

Akumulirana spoznaja o farmakogenetičkoj uvjetovanosti pojedinog medikamenta nabraja genske determinante (polimorfizme gena zaduženih za prijenos i metabolizam) relevantne za specifični par gen-lijek. Posljedična promjena funkcije može dovesti do pojačanog ili sniženog učinka lijeka u nositelja genskog zapisa. Stoga je uobičajeno temeljem FG analize kategorizirati probanda kao **sporog**, **intermedijarnog** ili **ekstenzivnog** metabolizatora. U pojedinim slučajevima postoje i ekstremne inačice koje se kadšto nazivaju **ultra brzi** metabolizatori.

Premda su FG i FGM etablirane znanstvene discipline i na visokom stupnju razvoja, i dalje dio varijabilnosti učinka za većinu lijekova ostaje nerazjašnjen, pri čemu se može raditi o neotkrivenim genskim regulacijama, učincima spola, dobi, epigenetskim ili okolišnim čimbenicima.

Obzirom na ograničenja dosad stečenog kvantuma FG znanja koji je daleko od sveobuhvatnog, danas dostupne FG baze podataka su u neprestanoj mijeni i nadopuni, te su ovisne o doprinosu iz globalne istraživačke zajednice.

Imajući u vidu važnost i izravni potencijal promjene ustaljenih praksi, ukupna FG spoznaja nadilazi uobičajene uzuse i mogla bi se smatrati globalnim nasljeđem čovječanstva i sve važnijim prilogom uobičajenoj biomedicinskoj edukaciji odnosno kliničkoj praksi.

### 1.2.4 Izvori farmakogenetičkih informacija

Ubrzani razvoj molekularnih istraživačkih metoda i njihova primjena u biomedicinskom području u postgenomskoj eri, uzrokuje brz priljev publiciranih podataka o interakciji lijekova i organizma. Nakon objave sekvence humanog genoma 2000. godine euforično se iščekivala

raščlamba etiopatogeneze većeg broja bolesti kao i ostvarenje personalizirane (tj. učinkovite i netoksične) medikamentozne terapije. Međutim, brzo postaje jasno da je nužan ogroman broj daljnjih primijenjenih istraživanja kao i popriličan vremenski odmak, da bi se kvantum podataka dobivenih dekodiranjem genoma stavio u pravi kontekst za pojedinu bolest, lijek, etničku skupinu. (38)

Radi brzine priljeva istraživačkih rezultata postaje jasna potreba za sustavnim prikupljanjem, pregledom i uređenjem koncentriranih FG informacija "na jednom mjestu".

Među prvim sustavnim bazama podataka o FG je Farmakogenomička baza znanja (PharmGKB, od engl. *Pharmacogenomics Knowledge Base*) osnovana 2000. godine u sklopu Sveučilišta Stanford u Sjedinjenim državama, te je u međuvremenu prerasla u glavnu javno dostupnu, internetski temeljenu, specijaliziranu kolekciju publikacija i genetičko-kliničkih informacija o relevantnim parovima gen-lijek. (16) Također, formiraju se profesionalna društva na nacionalnoj osnovi, tako primjerice 2005. započinje s radom Nizozemska FG radna grupa (od engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group* - DPWG) koja sustavnim proučavanjem i izradom smjernica te utjecajem na svoj nacionalni sustav zdravstva prednjači kako u spoznajnom tako i izvedbenom dijelu korištenja FG znanja. Postoje i druga udruženja, obično u sklopu nacionalnih farmakoloških i drugih organizacija koja zahvaljujući objedinjavanju "domaćih" i međunarodnih FG spoznaja publiciraju nacionalne smjernice odnosno nadnacionalne preporuke koje se publiciraju u relevantnim međunarodnim časopisima. Tako primjerice Francuska udružena radna grupa osnovana od strane nacionalne FG mreže (RNPGx, od franc. *Réseau National de Pharmacogénétique Hospitalière*) i Grupe za kliničku onko-farmakologiju (GPCO-Unicancer, od franc. *Groupe de Pharmacologie Clinique Oncologique*) izdaje 2015. godine smjernice za doziranje irinotekana prema genotipu *UGT1A1*. (39)

Sukladno s takvim nastojanjima, 2009. godine osnovan je međunarodni FG konzorcij *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium* (CPIC) u sklopu Nacionalnog instituta za zdravlje (NIH) u Sjedinjenim državama, koji prati i sumira globalno relevantne publicirane FG podatke uključivo i prethodno spomenute nacionalne preglede, te objavljuje ili prenosi dostupne smjernice s deklariranom razinom dokaza, koje u datom trenutku omogućuju najveću moguću razinu generalizacije i primjene dostupnog FG znanja. (40) CPIC se razvio kao združeni projekt Farmakogenomičke istraživačke mreže (PGRN, od engl. *Pharmacogenomics Research Network*) zajedno sa spomenutom bazom podataka PharmGKB u organizacijskom i financijskom smislu. CPIC i PharmGKB su izrasli u dva praktički neodvojiva udruženja koja danas predstavljaju nezaobilazni konzultativni i stalno dostupni izvor za pretkliničke i kliničke istraživače odnosno liječnike praktičare (dostupno na internetskoj adresi [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)).

### 1.2.5 Farmakogenetika u onkologiji

FG u onkologiji proučava ne samo varijabilnost naslijeđenog (zametnostaničnog, engl. *germline*) genoma, već i polimorfizam nenasljednog, somatskog, tumorskog genoma. Glavna dakle posebnost onkološke FG proizlazi iz činjenice da antitumorski odgovor može ovisiti o nestabilnom genomu tumora kao i o nasljednom, osobnom genomu. Naslijeđeni genotip relevantan je za toksičnost kemoterapije i tumorski odgovor, dok je proučavanje tumorskog genotipa važno za terapijsku učinkovitost.

Načelno se može ustvrditi da dizajn novih onkoloških lijekova u sklopu farmaceutske industrije u potpunosti počiva na detaljnim i opsežnim FG analizama tumorskog genoma. Mutacije signalnih molekula koje uzrokuju nekontrolirani tumorski rast (tzv. tumorotvorni upravljači od engl. *oncogenic drivers*) najpogodnije su putativne ciljne zahvatne točke za razvoj antitumorskih lijekova. (41) U protekloj dekadi temeljem takve strategije industrija je razvila nekoliko učinkovitih revolucionarnih lijekova koji su značajno promijenili tijek liječenja više skupina onkoloških bolesnika. Detaljniji opis FG istraživanja tumorskog genoma kao i na njima temeljen razvoj lijekova prelazi okvire teme ove doktorske disertacije.

Premda je FG izučavanje tumorskog genoma omogućilo razvoj nove generacije onkoloških terapeutika - molekularnih ili bioloških lijekova (kadšto nazvanih i „pametni“ lijekovi) i time se približila intenciji prilagođene, personalizirane terapije, popisi nuspojava onkološke farmakoterapije se nažalost nisu skratili. Istovjetni biokemijski signalni putevi koriste se i u tijelu i u tumoru, rezultirajući interferencijom antitumorskog lijeka ne samo s tumorigenom regulacijom, već i s fiziološkim prijenosom signala, nanoseći time nezaobilaznu štetu tijekom liječenja, donekle slično kao i klasični, citostatski onkološki tretmani. (42) Pojavom biološke terapije nuspojave nisu nestale, već su se korjenito promijenili njihovi profili.

Farmakoterapijsku praksu u onkologiji (i citostatsku i biološku) prati visoka incidencija načelno prihvatljivih nuspojava, no katkad zbog posebne nepredvidljive predilekcije nastaju vrlo teške pa i letalne toksične reakcije koje mogu biti uvjetovane farmakogenetički. Zbog letalnosti malignih bolesti u nijednoj drugoj grani kliničke medicine regulatorna tijela i bolesnici ne bi prihvatili izlaganje toliko visokom riziku neželjenih reakcija na lijek. Sumnje na mogućnost postojanja relevantnih FG sindroma u onkologiji nastaju 80-ih i 90-ih godina 20. stoljeća, nakon kliničkih opisa posebno teških nuspojava (idiosinkrazija) kemoterapije kod bolesnika koji niti po bubrežnoj ili jetrenoj disfunkciji, kao niti po dobi, nutritivnom statusu,

fazi liječenja, životnom stilu ili komedikaciji nisu bili pod rizikom za razvitak toksičnosti. Prvo FG otkriće u okviru liječenja malignih bolesti dogodilo se kod primjene tiopurina **azatioprina** i **6-merkaptopurina** (6-MP). To su antimetaboliti koji se koriste za liječenje akutne limfoblastične leukemije (osim toga su imunosupresivi te protuupalni lijekovi). Nakon metaboličke aktivacije ugrađuju se u DNA i induciraju arest staničnog ciklusa i staničnu smrt. (43) Glavni inaktivacijski enzim navedenih tiopurina je tiopurin S-metiltransferaza (TPMT) koja metilacijom intermedijera smanjuje zalihu supstrata za stvaranje aktivnih tiogvaninskih nukleotida. Zbog polimorfnosti gena za TPMT na velikom broju ispitanika pokazana je distribucija u brze, intermedijarne i loše (spore) metabolizatore. (44) Potpuna odsutnost enzimske aktivnosti može se očekivati s učestalošću od oko 0,33% u općoj populaciji. Spori metilatori ne mogu eliminirati tiopurinske derivate iz cirkulacije čime se pospješuje toksični učinak lijekova. Rane studije obiteljskog stabla potvrdile su opisani fenotip kao nasljedno genetičko svojstvo. Glavne hipofunkcijske inačice gena (*TPMT\*2*, *\*3A* i *\*3C*) ubrzavaju proteolizu enzima, smanjujući poluživot i količinu aktivnog genskog produkta. Standardne doze azatioprina i 6-merkaptopurina mogu biti letalne kod bolesnika bez enzimske aktivnosti TPMT zbog izazivanja refrakterne mijelosupresije s posljedičnim teškim infekcijama i sepsom. Intermedijarni fenotip (heterozigotnost za hipofunkcionalnu mutaciju) u nekim je studijama također povezan s boljim odgovorom na liječenje, naspram divljeg tipa (brzog metabolizatora). Prospektivna genotipizacija TPMT ili fenotipsko testiranje enzimske aktivnosti prije aplikacije azatioprina i 6-MP dio je recentnih smjernica za njihovu primjenu. (45) Premda etničke razlike, epigenetski čimbenici kao i varijabilnost u genima za ostale enzime metabolizma tiopurina umanjuju osjetljivost i specifičnost testiranja, analize koštanja i učinkovitosti potvrđuju testiranje TPMT kao jedan od prvih uspješnih parova gen-lijek u FG općenito. Stoga se genotipizacija TPMT smatra paradigmom onkološke FG.

Osim u kontekstu toksičnosti, FG analiza nasljednog genoma može imati značajnu ulogu i za terapijski odgovor, primjerice kod tamoksifena. **Tamoksifen** je selektivni modulator estrogenih receptora (SERM) koji je već nekoliko desetljeća zlatni standard u liječenju hormonski pozitivnog karcinoma dojke. Metaboličkom konverzijom pomoću CYP2D6 i CYP3A4/5 tamoksifen prelazi u aktivni oblik endoksifen koji prekida prijenos signala estrogenog receptora, što je jedan od glavnih onkogenih signalnih puteva u stanicama hormonski-pozitivnog karcinoma dojke. Polimorfizmi *CYP2D6* mogu imati kritičnu ulogu u odgovoru tumorske bolesti na tamoksifen. (46) Preko 75 alela opisano je u *CYP2D6* lokusu s različitim funkcionalnim posljedicama: od sporih do ultra-brzih metabolizatora.



Hipofunkcionalni genotipovi (spori i intermedijarni metabolizatori) u recentnim i zadovoljavajuće dizajniranim studijama pokazuju lošiji odgovor (bržu progresiju bolesti) tijekom tamoksifenske terapije. (47) U tijeku su daljnje studije o kliničkoj važnosti polimorfizama *CYP2D6* u liječenju tamoksifenom, obzirom na ranije, kontradiktorne rezultate. (48) Stoga smjernice za korištenje tamoksifena još uvijek decidirano ne preporučuju genotipizaciju *CYP2D6* prije uvođenja lijeka u terapiju.

Opis FG spoznaja o citostaticima irinotekanu i fluoropirimidinima u užem smislu su predmet proučavanja ove doktorske disertacije, te se njihov detaljan opis nalazi u poglavljima koja slijede.

Spoznaje o toksičnosti i učinkovitosti protutumorskih lijekova obzirom na genetičku varijabilnost u izravnoj su ovisnosti o uspjehu onkoloških FG istraživanja u post-genomskoj eri. Stoga su potrebne nove studije poboljšanog dizajna s ciljem definiranja prognostičkih i prediktivnih genetičkih biomarkera radi individualiziranja i poboljšanja onkološke terapije. (49)

### 1.3 Dihidropirimidin-dehidrogenaza

Dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD; EC1.3.1.2) je prvi enzim u metaboličkom putu razgradnje pirimidina. Fiziološki, enzim je zadužen za katalitičku razgradnju (uz NADPH kao kofaktor) suviška timina i uracila, pretvarajući ih u biološki uglavnom inaktivne degradacijske produkte izlučive urinom, no dio produkata enzimske pretvorbe može ući u biokemijske cikluse recikliranja te doprinijeti sintezi aminokiselina. Evolucijsku važnost DPD moguće je iščitati iz činjenice da izostanak njezine funkcije (potpuno izražena teška nasljedna deficijencija DPD, pri čemu enzimska aktivnost DPD ne doseže niti 1%), može dovesti do izrazite neurološke toksičnosti praćene konvulzivnim simptomima i/ili zaostajanjem u mentalnom i fizičkom rastu i razvoju. Također se rjeđe može povezati i sa sindromom autizma. (50)

Temeljem analiza sekvence i mehanizama katalize, u literaturi se opisuje pet funkcijskih domena u enzimu: dvije vezivne domene za željezo-sumpor (Fe-S) skupine (po jedna na C-terminalnom odnosno N-terminalnom kraju), NADPH-vezivna domena, FMN domena i FAD-vezivna domena koja je ujedno i aktivno mjesto vezivanja i pretvorbe pirimidinske molekule. Protein djeluje kao homodimer i tijekom katalize dolazi do naizmjeničnog koordiniranog prijenosa elektrona s jednog na drugi monomer (51). Monomer sadrži 1025 aminokiselina

( $M_r=111$  kD). Sekvenca je 93% homologna između humanog i svinjskog proteina, a razlika u 74 aminokiseline zahvaća većinom površinska mjesta bez utjecaja na kritična kofaktorska i supstratna vezivna mjesta.

DPD konvertira unutarstanični 5-FU u dihidrofluorouracil (DHFU) koji je supstrat dihidropirimidinaze (DPYS) te se posljedično pretvara u fluoro- $\beta$ -ureidopropionat (FUPA).  $\beta$ -ureidopropionaza 1 (UPB1) nastavlja biokemijski put te katalizira prijelaz u fluoro- $\beta$ -alanin (FBAL, vidi sliku 1.). Zahvaljujući transkripcijskoj izraženosti i afinitetu, ovim putem biokemijske pretvorbe se inaktivira 80 do 90% unesenog 5-FU.

Gen za DPD (nazvan *DPYD*) sadrži 23 egzona, ukupno 4399 nukleotida, nalazi se na kraćem kraku kromosoma 1 (1p21.3), bliže centromeri. Zauzima regiju veličine oko 950 kb, parovi baza od 97.077.43 do 97.921.059. Transkripcijski čimbenik CP2 (TFCP2, LSF,  $\alpha$ -globinski čimbenik prijepisa) identificiran je kao pozitivni regulator izraženosti DPD (52).

DPD je citoplazmatski enzim. Obilato je eksprimiran u jetrenom parenhimu gdje se i odvija većina biotransformacijskih reakcija, ali se nalazi i u fibroblastima, monocitima, limfocitima, granulocitima, trombocitima, mozgu, probavnom traktu, testisu, jajniku, slinovnici i drugim tkivima, a izražen je i u tumorskim stanicama. Budući da je uzorkovanje jetrenog tkiva nepraktično, većina publiciranih studija enzimske aktivnosti DPD odnosno analiza gena za DPD bazira se na mjerenjima u citosolu perifernih mononuklearnih stanica odnosno genotipizaciji DNA ekstrahirane iz periferne krvi. Postoje studije koje pokazuju korelaciju enzimske aktivnosti izmjerene u uzorcima jetrenog tkiva sa aktivnošću iz mononukleara periferne krvi.

### 1.3.1 Varijabilnost aktivnosti DPD

Enzimska aktivnost DPD pokazuje značajnu interindividualnu varijabilnost. U publiciranim serijama zdravih dobrovoljaca minimalna i maksimalna enzimska aktivnost DPD razlikovale su se od 3 do 20 puta. Tako je primjerice u kohorti od 124 zdrava dobrovoljca (53) mjerenjem enzimske aktivnosti u citosolu perifernih mononukleara pokazan interval aktivnosti DPD od 0,024 do 0,354 nmol/min/mg proteina (15-erostruka razlika). Aktivnost enzima iz periferne krvi bila je u korelaciji s enzimskom aktivnošću iz jetrenog tkiva (gdje se odvija većina biotransformacije FP). Ista studija pokazala je da navedeni varijabilitet aktivnosti DPD slijedi zakonitost normalne distribucije te nije pokazana ovisnost o dobi, spolu i rasi. Obzirom na značajnu disperziju aktivnosti, studije enzimske aktivnosti koje uključuju ispitanike s deficijencijom DPD trebale bi uključivati referentne vrijednosti za čim veći uzorak promatrane

populacije kako bi se mogao odrediti prag vrijednosti koji diskriminira funkcionalni i nefunkcionalni enzim. Autori navedene studije zaključuju da se kao kriterij disfunkcije DPD može uzeti minimalna aktivnost ispod vrijednosti 95%-tnog distribucijskog intervala (prag vrijednosti iznosi 0,064 nmol/min/mg prot).

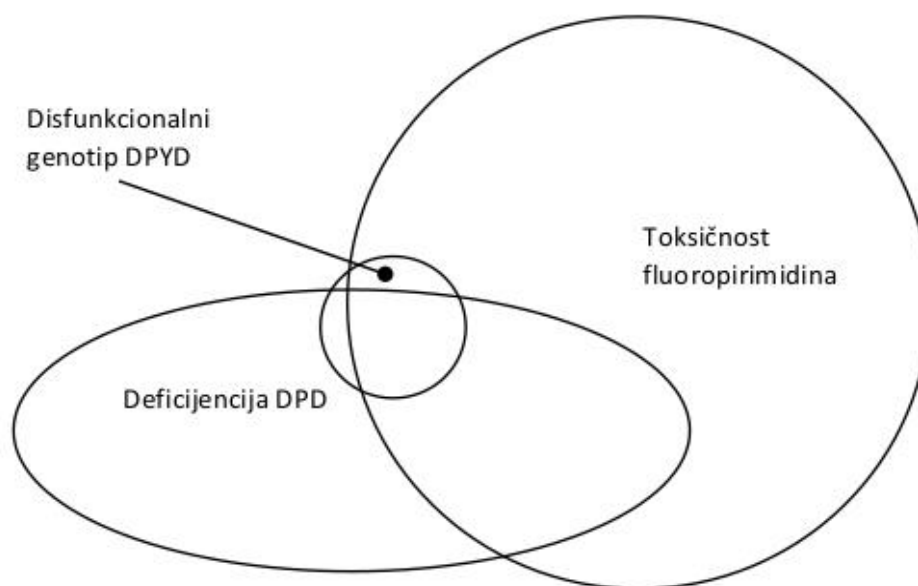
Mjerenja aktivnosti DPD na uzorcima bolesničke onkološke populacije u suglasju su s rezultatima dobivenim na zdravim dobrovoljcima. Tako primjerice Etienne MC i suradnici izvješćuju razliku od 18 puta u aktivnosti DPD na kohorti neselekcioniranih, konsekutivnih bolesnika s tumorom. (54)

Postoji velik broj studija koje, osim intervala distribucije aktivnosti DPD kod zdravih dobrovoljaca i onkoloških bolesnika, istražuju enzimski aktivitet kod bolesnika koji trpe značajnu toksičnost tijekom liječenja s FP. Pri tome je važno naglasiti da pacijenti s značajnim nuspojavama fluoropirimidina (donekle suprotno očekivanju) ne odstupaju od navedenih rezultata u pogledu varijabiliteta aktivnosti DPD. Izmjereni intervali aktivnosti među bolesnicima s toksičnošću FP pokazuju razlike od 15 i više puta između minimalne i maksimalne izmjerene aktivnosti DPD. Tako primjerice studija Magne N i suradnika izravno uspoređuje enzimsku aktivnost kod bolesnika s toksicitetom 5-FU s aktivnošću kod neselekcioniranih onkoloških bolesnika. (55) Premda je dokazana statistički značajna razlika u prosječnoj aktivnosti ( $P=0,02$ ), većina izmjerenih vrijednosti kao i distribucije aktivnosti se uglavnom poklapaju, uz nešto niže minimalne izmjerene vrijednosti u skupini bolesnika s nuspojavama.

Istraživanja enzimske aktivnosti DPD nedvosmisleno ukazuju (osim interindividualne) i na pojavu intraindividualne disperzije aktivnosti DPD. Pri tome se ne misli samo na tkivnu distribuciju enzima (koja je najviša u jetri), nego na cirkadijanu oscilatornost aktivnosti DPD. Primjerice u studiji Grem JL i suradnika mjerenjem aktivnosti DPD u uzorku mononuklearnih stanica periferne krvi na maloj skupini zdravih dobrovoljaca ( $n=6$ ) definirana je izrazita varijabilnost tijekom 24 sata u istog ispitanika (od 4 do 21,1 pmol/min/ $10^6$  stanica). Također, bila je prisutna značajna interindividualna razlika maksimalne zabilježene aktivnosti DPD (do 4,8 puta između ispitanika) (56).

Periodi minimalne enzimske aktivnosti nastaju 6 do 9 sati nakon vršnih vrijednosti. Predvidiva maksimalna enzimska aktivnost u danu je u prijednevnom satima, tako da je uzimanje uzoraka za mjerenje aktivnosti DPD u perifernim mononuklearima preporučljivo obavljati između 8 i 10 sati ujutro. (57)

Osim genetičkih determinanti i cirkadijanog ritma, prehrana, spol te drugi epigenetički i ne-genetički čimbenici kadšto se opisuju kao mogući čimbenici utjecaja na aktivnost DPD. U realnosti manji dio bolesnika s toksičnošću na terapiju s FP su nositelji polimorfizama *DPYD*. Također niti svi ispitanici s dokazanom deficijentnom DPD nemaju detektabilnih polimorfizama u genu za DPD. Drugim riječima FG na sadašnjem stupnju spoznaje može tek djelomice objasniti pojavnost toksičnosti FP. Veći dio nuspojava ne može povezati s genetičkim biomarkerima. Teorijski shematski prikaz međusobnih odnosa fenotipa (deficijencija DPD i toksičnost FP) i genotipa *DPYD* prikazani su u Slici 4.



**Slika 4. Shematski prikaz teorijskih odnosa između genske greške DPD, enzimske disfunkcije DPD i toksičnosti fluoropirimidinske terapije.**

Mogući fiziološki, epigenetski, okolišni kao i učinci genskih grešaka drugih enzima relevantnih za farmakokinetiku i farmakodinamiku FP mogu doprinositi nastanku toksičnih reakcija. Veličine nacrtanih oblika su proizvoljne i ne odražavaju stvarnu incidenciju toksičnosti i deficijencije naspram genskih grešaka *DPYD*.

### 1.3.2 Deficijencija dihidropirimidin-dehidrogenaze

Snižena enzimaska aktivnost DPD naziva se deficijencijom DPD. Obično se vrijednosti niže od 95%-tne percentile raspona distribucije aktivnosti u promatranoj populaciji uzimaju kao dijagnostički kriterij za disfunkciju DPD (vidi prethodni odjeljak). Kadšto se u novijim studijama granica na 99%-tnoj percentili uzima kao znak potpune nedostatnosti, dok se ispitanici s vrijednostima između 95-99%-tne percentile uzimaju u obzir kao parcijalno

nedostatni. (58) Prisutnost deficijencije u izravnoj je ovisnosti o genotipu *DPYD*, premda su opisani slučajevi niske aktivnosti DPD bez detektabilnih nefunkcionalnih polimorfizama u genu za DPD. Teška (homozigotna) deficijencija DPD može se klinički prezentirati metaboličkim defektom i naziva se timin-uracilurija te se može dijagnosticirati zahvaljujući pojačanoj urinskoj koncentraciji pirimidina. Patofiziološki tijek uključuje stotruko povećanje koncentracija timina i uracila u serumu i cerebrospinalnom likvoru s izravnim i neizravnim neurotoksičnim i drugim učincima. Prvi registrirani bolesnik opisan je u literaturi 1984. Radilo se o djetetu s nerazjašnjenim konvulzijama kod kojeg je kromatografijom dokazana do 1000 puta povećana koncentracija pirimidina u urinu i odsutnost enzimske aktivnosti DPD u kultiviranim fibroblastima. (59) Kasnije publicirane serije slučajeva obuhvatile su nekoliko desetaka bolesnika iz više nepovezanih i geografski udaljenih obitelji. Neki su slučajevi potjecali iz obitelji sa konsangvinitetom.

Do otkrića timin-uracilurije došli su kliničari temeljem rezultata biokemijskih studija urina, krvi i likvora povezanih sa kliničkom slikom neurorazvojno ugrožene djece s epilepsijom. Pirimidinemija i pirimidinurija su bili dominantni nalazi, premda je i u kasnijim prikazima pretpostavljena prisutnost patoloških metabolita pirimidina koji međutim nisu dokazani. Prema objavljenim studijama obiteljskog stabla, bolest se prenosi autosomno recesivno (svi objavljeni slučajevi timin-uracilurije su homozigoti). U smislu genetičkog obilježja (engl. *genetic trait*), deficijentni polimorfizmi pokazuju autosomno kodominantnu ekspresiju (jer oba alela doprinose nastanku genskog produkta).

Opisana neurološka bolest posljedična deficijenciji DPD je ekstremno rijetka i pribraja se u skupinu nasljednih metaboličkih bolesti te s obzirom na simptomatologiju pripada u područje ekspertize pedijatrijskih neurologa i endokrinologa (odnosno specijalista za metaboličke bolesti). Konstitucija odnosno vanjski fenotip (izgled koji bi omogućio dijagnozu temeljem fizikalnog pregleda) još nije ujednačeno determiniran, obzirom na nisku incidenciju, te se dijagnoza temelji na biokemijskoj analizi krvi i urina, odnosno genotipizaciji. Kao kuriozitet ostaje nerazjašnjena varijabilnost u kliničkom očitovanju potpune deficijencije DPD, budući da se najveći broj dokumentiranih slučajeva enzimopatije odnosi na asptomatske bolesnike homozigotne za neku od nefunkcionalnih inačica *DPYD*. Zbog nepoznatih metaboličkih i neurorazvojnih determinanti velik broj nefunkcionalnih homozigota *DPYD* normalno prolaze intrauterini razvoj i djetinjstvo, te se eventualno otkrivaju u odrasloj dobi ukoliko ih se genotipizira u kontekstu kemoterapije fluoropirimidinima.

U novije vrijeme interes za ovu bolest naglo raste nakon spoznaje da enzimski nedostatak DPD može dovesti do jake toksičnosti nakon izlaganja organizma fluorouracilu ili drugim FP tijekom liječenja tumorske bolesti.

Očito je da teška i potpuno izražena deficijencija DPD kao nozološki entitet predstavlja jednu ekstremnu stranu spektra snižene enzimskih sposobnosti DPD, dok je veći dio relativne enzimskih hipofunkcionalnosti prisutne u populaciji zapravo isključivo farmakogenetički entitet koji postaje značajan samo kod onkoloških bolesnika - kandidata za terapiju s FP.

### 1.3.3 Deficijencija DPD kao farmakogenetički sindrom

Detektiranje deficijencije DPD omogućuje personaliziranu onkološku terapiju s FP, jer se osjetljivim bolesnicima može primijeniti reducirana doza koja ostvaruje antitumorski učinak uz minimalizaciju toksičnosti. Pri tome su danas načelno dostupne i fenotipske i genotipske metode dijagnosticiranja, no obje skupine tehnika još uvijek su zbog skupoće odnosno nedovoljne preciznosti tek ograničeno primjenjive i nisu ušle u svakodnevnu kliničku uporabu (vidi slijedeće odjeljke o recentnoj metodologiji za detekciju deficijencije DPD).

Prvi klinički slučaj koji je objedinio spoznaju o toksičnosti FP i defektu metabolizma pirimidina objavljen je 1985. godine (60). Radilo se o 27-godišnjoj bolesnici operiranoj zbog lokalno uzapredovalog visokorizičnog oblika karcinoma dojke koja je nakon prve aplikacije adjuvantnog protokola CMF (ciklofosamid peroralno tijekom 14 dana, metotreksat i 5-FU putem intravenskog bolusa 1. i 8. dan ciklusa) razvila žestoku toksičnu reakciju 17. dana ciklusa uz pojavu stomatitisa, leukopenije, trombocitopenije, alopecije, proljeva, vrućice i gubitka tjelesne težine. Bolesnica je primala potpurnu terapiju te je za desetak dana oporavila krvnu sliku i opće stanje. Pet tjedana poslije prvog ciklusa nastavljena je kemoterapija uz izostavljanje metotreksata i redukciju doze 5-FU. Oko 14. dana drugog ciklusa nastaju jednake nuspojave kao iza prvog ciklusa, od kojih se bolesnica oporavlja, no tri tjedna nakon zadnje aplikacije 5-FU nastaje progresivna neurotoksičnost sa smetnjama govora, cerebelarnom ataksijom, i poremećajima svijesti koji progrediraju od konfuzije do semikome (sopora). U idućih nekoliko mjeseci bolesnica je polako oporavljala svijest i neurološke ispade, no nastaje progresija osnovne bolesti s metastazama u kosti i jetru uz letalni ishod. Glavna detektirana laboratorijska abnormalnost bile su ekstremno povišene vrijednosti timina i uracila u krvi i urinu. Autori sumnjaju u postojanje nasljedne disfunkcije u metaboličkom putu pirimidina, te pokazuju nemjerljive vrijednosti enzimskih aktivnosti DPD u fibroblastima tada dostupnim

metodama. Provedena je i analiza genetičkog stabla te se osim probanda (bolesnice) jednako povišene vrijednosti timina i uracila nalaze u tjelesnim tekućinama bolesničinog brata.

Usljedilo je više kliničkih izvještaja o slučajevima timin-uracilurije povezane s deficijencijom DPD (61), odnosno s izmijenjenom farmakokinetikom 5-FU (62) i konačno o povezanosti nasljednog sindroma sa sniženom aktivnosti DPD odnosno sa novootkrivenim mutacijama/polimorfizmima gena *DPYD* u slučajevima nuspojava na FP (63). U prvo vrijeme radi se o fenotipski definiranim slučajevima, dočim se u kasnijim radovima uključuje genotipizacija pa i korelacija s kliničkom učinkovitosti lijeka. (64)

Nakon otkrića i publikacije nefunkcionalnih genskih varijanti *DPYD* kod bolesnika s timin-uracilurijom i toksičnom reakcijom na FP terapiju, stvorena je pretpostavka da se aberantna farmakokinetika fluorouracila i njegovih derivata može predvidjeti mjerenjem aktivnosti DPD, odnosno genotipizacijom *DPYD*. U studijama koje su uslijedile detektirano je više genskih inačica *DPYD* (vidi kasniji odjeljak) koje su povezane s fluoropirimidinskom toksičnošću, te su istraživane u kontekstu moguće deficijencije DPD.

Ukoliko postoji homozigotnost za disfunkcionalni alel *DPYD*, razvije se potpuna deficijencija DPD, koja može fenotipski biti izražena već u djetinjstvu, ali se češće susreće kao asimptomatsko stanje. U terminima klasične farmakogenetike takve ispitanike nazivamo sporim metabolizatorima. Dijagnosticirani status sporog metabolizatora prema genotipu *DPYD* predstavlja apsolutnu kontraindikaciju za liječenje fluoropirimidinima, prema važećim smjernicama. Procijenjena učestalost kompletne deficijencije DPD je vrlo niska, a češće se susreće djelomična disfunkcija, prisutna kod heterozigotnih nositelja hipofunkcionalnih polimorfizama (intermedijarni metabolizatori). Stanje je također asimptomatsko, a manifestira se tijekom liječenja fluoropirimidinima (učestalost glavnih nozogenih mutacija *DPYD* se u različitim populacijskim studijama kreće u rasponu od 0,0035 do 6%). Za primjenu FP kod parcijalne deficijencije DPD postoje trenutno važeće smjernice u kojima se sugerira redukcija doze za pojedini genotip (vidi kasniji odjeljak o farmakogenetičkim preporukama za doziranje u poglavlju Rasprava).

Nakon tridesetak godina istraživanja, dosad otkriveni i testirani polimorfizmi predstavljaju privremeni korpus dokaza o relevantnosti genotipa *DPYD* za terapiju fluoropirimidinima. Popis nozogenih polimorfizama se ne može smatrati konačnim i vjerojatno će se širiti i nadopunjavati. Nadalje, usporedba publiciranih studija sugerira geografsku odnosno etničku različitost u važnosti pojedinih polimorfizama povezanih s rizikom toksičnosti

fluoropirimidina. Potankosti o pojedinim relevantnim polimorfizmima *DPYD* opisane su u slijedećem odjeljku.

Međutim, ne može se farmakokinetičke nepodudarnosti fluoropirimidina svesti samo na zajednički nazivnik polimorfizama u *DPYD* i varijabilne aktivnosti DPD. Varijabilne koncentracije 5-FU i njegovih metabolita opisane su i kod bolesnika s divljim tipom gena za DPD odnosno kod ispitanika bez dokazane disfunkcije DPD. Također, toksične reakcije na FP bilježe se i kod bolesnika s normalnim krivuljama biotransformacije 5-FU. (65)

Farmakokinetika FP ovisi i o aktivnosti (i nekim dokazanim polimorfizmima) drugih enzima pirimidinskog metaboličkog puta. Osim genetičkih, potencijalni čimbenici utjecaja na metabolizam FP uključuju epigenetske i negenetičke čimbenike (komorbiditeti, dob, spol). Tako primjerice Chansky K i suradnici na *post hoc* analizi (N=1074) bilježe učestaliju i težu pojavu toksičnosti fluoropirimidina kod žena. (66) Nadalje Schwab M i suradnici bilježe ženski spol, genotip *DPYD* i modalitet davanja 5-FU kao pozitivne prediktore toksičnosti FP te detektiraju interakciju genotipa *DPYD* i spola u multivarijantnoj analizi pri čemu je signifikantno jači utjecaj heterozigotnog statusa za *DPYD* polimorfizme kod muškaraca. (67)

Identifikacija relevantnih genskih inačica *DPYD* kao i traženje potpunijeg skupa čimbenika utjecaja na enzimsku aktivnost DPD, te farmakokinetiku i toksičnost FP predstavlja veliko područje intenzivnog istraživanja i teško je predvidjeti koliko će vremena biti potrebno za dobivanje jasne slike i time mogućnosti preciznog definiranja individualne reakcije na FP kod pojedinog bolesnika.

#### 1.3.4 Mogućnosti fenotipske analize deficijencije DPD

Laboratorijska metodologija izravne procjene enzimске aktivnosti omogućila je otkriće i prve studije bolesnika s deficijencijom DPD. Osim povijesne značajnosti, varijabilnost gena *DPYD* i nedovoljno poznata značajnost otkrivenih polimorfizama čine fenotipsku karakterizaciju logičnim prvim korakom za dijagnosticiranje deficijencije DPD. Postoji nekoliko publiciranih, reproducibilnih i validiranih protokola.

##### 1.3.4.1 Mjerenje enzimске aktivnosti u citosolu perifernih mononuklearnih stanica

Mononuklearne stanice periferne krvi lako su dostupan uzorak te su zamijenile povijesno važnu kulturu fibroblasta kao model za mjerenje aktivnosti DPD. To je *ex vivo* test u kojem se izolirani mononukleari ispitanika (većinom limfociti – separirani centrifugiranjem pune krvi



kroz Ficoll-polimer) inkubiraju s radioaktivno označenim supstratom DPD (5-FU ili timinom). Nakon stanične lize produkti enzimske reakcije u citosolu određuju se kromatografski (HPLC) uz pomoć radioaktivno-osjetljivog senzora. Postoje i inačice testa bez radioaktivnog obilježavanja, ali je osjetljivost manja. Kod DPD-deficijentnih ispitanika mjere se snižene vrijednosti produkata enzimske reakcije. (68) Zbog duge uporabe, proširenosti i validacije, metoda predstavlja „zlatni standard“ prema kojem se drugi testovi mogu komparirati. (69) Nasuprot tome, korelacija testa sa izmjerenom farmakokinetikom FP nije jednoznačno dokazana što dodatno ukazuje na složenost determinanti dinamike koncentracija metabolita FP (70). Mjerenja iz smrznutih uzoraka su reproducibilna, što je vrlo važno za tehničku primjenjivost mjerenja, premda su tu apsolutne vrijednosti enzimske aktivnosti niže. Nažalost, moguća varijabilna količina limfocita u uzorku, opsežna obrada uzoraka i relativna ekskluzivnost opreme i izotopa čine tehniku još uvijek rezerviranom za eksperimentalni kontekst, te nije zaživjela kao klinička metoda.

#### 1.3.4.2 Uracilski izdisajni test

Izotopno obilježeni uracil ( $2\text{-}^{13}\text{C}$ -uracil) uzima se oralno kao vodena otopina na početku testa, te se uzorkuje izdahnuti zrak pomoću balonskih kontejnera. Analiza se obavlja centralizirano u posebno opremljenim laboratorijima. Radioaktivni  $\text{CO}_2$  je snižen kod DPD-deficijentnih ispitanika (71). Testiranje i uzorkovanje su komforni zbog čega je test opsežno validiran, no skupoća analitičke opreme i izotopa, te odgoda analize zbog transporta uzoraka u centralni laboratorij čine metodu nepraktičnom za širu kliničku uporabu.

#### 1.3.4.3 Mjerenje endogenog omjera dihidrouracil/uracil (DHU/U)

Fiziološka funkcija DPD je pretvorba uracila u dihidrouracil te se omjeri reaktanta/produkta mogu određivati u plazmi ili urinu, kao mjera funkcije DPD. To je *in vivo* test endogenih pirimidina koji se bazira na kromatografskoj analizi (HPLC ili GC). (72) Metoda je opsežno validirana te je u dobroj korelaciji s kinetikom metabolita FP (73), no objavljeni su i prikazi iznimnih slučajeva kod kojih je usprkos normalnom omjeru DHU/U detektirana visoka koncentracija 5-FU i metabolita. (74) Moguće je mjerenje i iz zamrznutih uzoraka, a analitička oprema je uglavnom dostupna u većim kliničkim laboratorijima, tako da je tehnika recentno u uporabi, no uglavnom za istraživačku primjenu, a ne kao metoda probira.

#### 1.3.4.4 Test opterećenja uracilom

Uracil kao supstanca je relativno jeftin (nasuprot izotopnog uracila) i nakon peroralnog davanja farmakokinetičke krivulje reaktanata i produkata enzimske reakcije pokazuje dobru diskriminaciju između normalnih i DPD-deficijentnih ispitanika (75). Test je još u fazi validacije i zahtijeva višestruko uzorkovanje krvi za definiranje adekvatne krivulje klirensa uracila. Publicirana je i pojednostavljena verzija testa s ograničenim uzorkovanjem (120 minuta nakon uzimanja uracila) te pokazuje obećavajuće rezultate (76). Detekcija metabolita također se obavlja kromatografski. Potencijalno je široko primjenjiva u kliničkim centrima, no kao i sve kromatografske metode vremenski je, kao i u pogledu opreme zahtjevna, tako da se uglavnom još uvijek primjenjuje u okviru istraživačkih studija.

#### 1.3.4.5 Mjerenje koncentracije lijeka

Koncentracija 5-FU ili metabolita (DHFU) u krvi nakon aplikacije testne doze lijeka može se izmjeriti kromatografski (77). Kao i druge farmakokinetičke studije zahtijevaju višestruka uzimanja krvi, no također su objavljeni rezultati pojednostavljenih ispitivanja sa jednom ili dvije točke uzorkovanja. Objavljene su i studije mjerenja pomoću protutijela (imunoesej) kovalentno povezanih s nanočesticama čija je aglutinacija ovisna o koncentraciji lijeka, čime se određivanje može automatizirati. (78) Imuno-metoda je patentno zaštićena i nije zasad šire dostupna te je vezana za slanje uzoraka u centralni laboratorij. Preliminarni rezultati su obećavajući, no potrebna su daljnja istraživanja, usporedba s etabliranim tehnikama mjerenja te studije na većim uzorcima. (79)

Osim toga, potencijalna negativnost praćenja koncentracije lijeka je mogući razvoj toksičnih nuspojava kod DPD-deficijentnih ispitanika već nakon davanja testne doze lijeka ( $300 \text{ mg/m}^2$  u intravenskom bolusu). Metoda je dosad validirana na relativno malim uzorcima te još uvijek nije u široj primjeni.

Zaključno se može konstatirati da razmjerna skupoća, dugotrajnost i složenost, kao i nedostatak publicirane integralne i usporedne analize, još uvijek fenotipske testove čine neprimjenjivima za redovitu kliničku uporabu (80), već se primjenjuju kao eksperimentalna tehnika za znanstveno-istraživačke svrhe, najčešće u kombinaciji s genotipiziranjem.

Obzirom na razrađenost i sve jeftiniju i precizniju tehniku genotipiziranja, probir za deficijenciju DPD u pravilu se temelji na analizi genotipa *DPYD*.

## 1.4 Polimorfizmi *DPYD*

Normalni gen za DPD ubraja se u skupinu visoko varijabilnih gena. Postoji vrlo velik broj poznatih polimorfizama *DPYD*, tako da se definicija divljeg tipa gena treba promatrati kao dinamičan proces koji ovisi o objavljenim polimorfnim lokusima nepovezanim s poremećajem izraženosti/funkcije genskog produkta. U raznim populacijskim studijama do maksimalno 6% bijelaca (prosječno oko 1%) ima polimorfizme *DPYD* koji mogu utjecati na enzimsku aktivnost DPD.

Puni popis detektiranih polimorfizama *DPYD* je dugačak i po svemu još uvijek nezavršen. (81) Studije *DPYD* na većim uzorcima bolesnika s toksičnošću FP, metodološki temeljene na sekvenciranju, u pravilu zabilježe još poneku dosad neobjavljenu inačicu. (82)

### 1.4.1 Nefunkcionalne inačice *DPYD*

Važnost objavljenih polimorfizama *DPYD* povezanih s rizikom enzimske disfunkcije i farmakogenetičke toksičnosti varira ovisno o dosad obavljenim istraživanjima i akumuliranoj spoznaji. Tako primjerice prvi sistematski pregled i smjernice za doziranje FP prema genotipu *DPYD* objavljen 2011. godine (83) navodi 12 inačica *DPYD* kao inaktivne (\*2A, \*3, \*7, \*8, \*10, \*11, \*12, \*13, 496A>G, IVS10-15T>C, 1156G>T, 1845G>T) i dvije (\*9B, \*10) kao smanjeno aktivne, dok se 4 varijante koje su ranije bile smatrane hipofunkcionalnima kategoriziraju kao aktivne (\*4, \*5, \*6, \*9A). Dvije godine kasnije objavljene su još uvijek važeće smjernice farmakogenetičkog konzorcija CPIC (84) koje nakon detaljne analize svih do tada dostupnih izvora, kao konsenzusno prihvaćene i uz visoku razinu dokaza sigurno nefunkcionalne inačice ističu tek tri: *DPYD*\*2A, *DPYD*\*13 i c.2846A>T. Najnovije studije temeljem kliničkih i laboratorijskih podataka kao nefunkcionalne uključuju i varijante 1236G>A i 496A>G, ali o tim dvjema inačicama u literaturi postoje također i kontradiktorni pokazatelji tako da se dokazi za njihovu važnost još uvijek smatraju nekonzistentnima i nisu uključene u smjernice za doziranje FP prema genotipu.

*DPYD*\*2A (rs3918290, c.1905+1G>A ili IVS14+1G>A)

*DPYD*\*2A je najlaboriranija mutacija *DPYD*. Prvi put je opisana 1996. godine (85). Ime potiče (kao i drugi ranije opisani polimorfizmi) iz rada autora McLeod HL i suradnika (86) u kojem je prvi put sustavno opisana (sad već djelomice opsoletna) nomenklatura alela *DPYD*. To je SNP na granici 14. introna na mjestu za izrezivanje (engl. *splice recognition site*) koja izaziva

defekt izrezivanja egzona tijekom posttranslacijske obrade i gubitak kompletnog 14. egzona iz krajnjeg produkta koji time postaje enzimski nefunkcionalan. Opisana učestalost varira od približno 0,005 do 2% u bjelačkoj populaciji s iznimkom nordijskih nacija gdje se bilježe frekvencije do 3,5%. (87) Također, postoje studije koje opisuju veću učestalost u Afroamerikanaca. (58) Ta mutacija najkonzistentnije pokazuje negativne funkcijske posljedice na aktivnost DPD kako u transfekcijskim modelima *in vitro* (88), tako i u fenotipskim mjerenjima *ex vivo* i *in vivo*, te u kliničkim opservacijama povezanost s toksičnim reakcijama. Sveobuhvatna meta-analiza objavljena 2013. godine analizirajući najvažnije pozitivne i negativne studije zaključuje da razina spoznaje o polimorfizmu dopušta njegovu klasifikaciju kao funkcijski značajnog. (89)

Nadalje, u studiji reduciranja doze kapecitabina prema kliničkoj toksičnosti (odnosno postizanju tolerabilnosti na lijek) pokazano je statistički značajno veće sniženje doze (50%) kod heterozigota za *DPYD\*2A* naspram nositelja divljeg tipa *DPYD* (samo 10% redukcije doze). (90)

Zaključno, genski produkt varijante *DPYD\*2A* u većini objavljenih modela i studija praktični uopće nema rezidualne enzimske aktivnosti.

#### *DPYD\*13* (rs55886062, c.1679T>G, I560S)

*DPYD\*13* je SNP u 13. egzonu koji kodira za supstituciju izoleucina valinom na 560. mjestu u primarnoj proteinskoj sekvenci te sudjeluje u stabilizaciji tercijarne strukture. Mehanizam nastanka enzimske disfunkcije nije u potpunosti jasan, no čini se da nastaje konformacijska promjena, budući da je mutacijom destabilizirana strukturno važna domena. (91) Polimorfizam je prvi put opisan 2000. godine (92). U bjelačkoj populaciji pojavljuje se rjeđe od *DPYD\*2A* s opisanom učestalošću između 0,07 i 0,1%. Na kliničkoj razini pokazuje jasnu povezanost s toksičnim reakcijama na FP. Manji broj studija fenotipske karakterizacije postoji za tu mutaciju s divergentnim rezultatima. Izmjerena enzimska aktivnost bila je manja od 1,7 do 500 puta, u jednom slučaju i potpuno nemjerljiva. (93) Spomenuta transfekcijska *in vitro* studija (Offer SM, 2014) pokazala je 25% rezidualne aktivnosti DPD kod homozigotne ekspresije. Postoji više pojedinačnih prikaza slučajeva koji povezuju teški oblik toksičnosti FP s heterozigotnošću za *DPYD\*13*. (94)

Temeljem iznesenoga zaključeno je da ta varijanta znatno može smanjiti enzimsku aktivnost genskog produkta *DPYD*, vjerojatno u ovisnosti i o drugim, još nedovoljno poznatim genetičkim ili epigenetičkim čimbenicima.

*c.2846A>T* (rs67376798, D949V)

*c.2846A>T* je polimorfizam prvi put opisan 2000. godine (van Kuilenburg AB i sur.). Varijanti nije pridijeljena haplotipna oznaka (\*) i broj, uvažavajući stav autora koji ju je prvi publicirao, kao i novije smjernice za nazivanje polimorfizama. SNP 2846A>T nastaje u 22. egzonu gena DPD što rezultira zamjenom asparagina s valinom na poziciji 949 u enzimu. Posljedično nastaju smetnje vezivanja kofaktora odnosno prijenosa elektrona tijekom katalize. Rezultantna disfunkcija enzima u većini studija bila je manja nego kod *DPYD\*2A* i \*13. Nisu, međutim, publicirana istraživanja enzimске aktivnosti u PMBC, no *in vitro* homozigotna transfekcija te inačice uzrokuje 41%-tno smanjenje aktivnosti DPD (rezidualna aktivnost od 59% nasuprot wt). Klinički je zabilježena potreba za 25%-tnom redukcijom doze kod heterozigota za 2846A>T liječenih kapecitabinom kako bi tolerirali liječenje. Također, nekoliko studija pokazuje povezanost tog genotipa sa značajnim nuspojavama kod primjene FP. (95)

*c.1236G>A* (haplotip B3, rs 75017182, *c.1129-5923C>G*)

SNP *c.1236G>A* prvi put je opisan 2005. godine kao funkcionalna sinonimna varijacija (96), no inhibitorni potencijal detektiran je 2010. (97) kad je opisan kompletni haplotip koji uključuje duboku intronsku varijaciju *c.1129-5923C>G* koja uzrokuje aberantno izrezivanje transkripcijskog produkta. Inačica je nešto učestalija nego dosad opisani polimorfizmi (2,6 do 6,3% u europskoj bjelačkoj populaciji). Opisani SNP je u *cis*-poziciji s još tri međusobno povezana naslijeđena intronska SNP-a: *c.483+18G>A*, *c.959-51T>G* i *c.680+139G>A* koji su vjerojatno funkcijski inertni. Svi navedeni polimorfizmi nazvani su haplotip B3 (hapB3). Poremećaj izrezivanja uzrokuje inserciju 44-baznog fragmenta u zrelu mRNA za DPD i rezultira pomakom okvira čitanja te preuranjenim stop-kodonom u egzonu 11. Izmjerena aktivnost DPD u citosolu PBMC nositelja varira od 6 puta manje pa do posve istovjetne divljem tipu DPD. Dva recentno publicirana slučaja homozigotnosti za taj polimorfizam pokazuju 50% rezidualne enzimске aktivnosti. Postoji nekoliko radova o kliničkoj povezanosti s toksičnim reakcijama na FP, uključujući i letalni ishod (98), ali postoje i kontradiktorna izvješća bez jasnog povećanog rizika za nositelje, tako da se stavovi eksperata razlikuju glede ove varijaciju (primjerice Rosmarin D 2014). Premda su uključeni u neke smjernice za doziranje FP prema genotipu *DPYD*, razina dokaza je niža nego za dosad opisane polimorfizme.

*c.496A>G* (rs2297595, M166V)

Inačica *c.496A>G* kodira za tranziciju adenina u gvanin (A496G) i posljedičnu supstituciju metionina valinom na 166. mjestu u proteinu (M166V). Locirana je u egzonu 6. Relativno je česta u europskoj populaciji (oko 10%). Polimorfizam je prvi puta opisan 2000. godine kod dva pacijenta s kolorektalnim tumorom i značajnim nuspojavama nakon primjene 5-FU, u istom radu kao i SNP *c.2846A>T* (autori van Kuilenburg AB i sur.). Međutim, za razliku od nozogenog *c.2846A>T*, polimorfizam *c.496A>G* u kasnijim studijama pokazuje divergentan učinak na aktivnost DPD. *In vitro* i *ex vivo* studije nisu izravno pokazale sniženu aktivnost DPD. Nekoliko studija dokumentira povezanost s toksičnim nuspojavama (99) tijekom fluoropirimidinskog liječenja neoplazija želuca, dojke i kolorektuma (100). Nadalje postoje i negativne studije (101) kod kojih nije zabilježen povećan rizik toksičnosti FP kod nositelja *c.496A>G* (primjerice spomenuta velika njemačka studija autora Schwab M i sur. iz 2008.). Štoviše, *in vitro* transfekcijska studija pokazuje aktivnost DPD višu od divljeg tipa *DPYD*, a u jednoj kliničkoj studiji heterozigotnost za *c.496A>G* bila je protektivna za pojavu hematotoksičnosti kod žena liječenih s FP (102). Nasuprot tome, već spomenuta recentno objavljena serija pacijenata s nuspojavama FP, autora Falvella FS i suradnika, u multivarijantnoj analizi pokazuje statistički značajan utjecaj *c.496A>G* na nastanak toksičnosti. (99)

#### 1.4.2 Ostale hipofunkcionalne inačice

Dosadašnjim istraživanjima sekvence *DPYD* u kontekstu toksičnosti FP akumulirano je preko stotinu genskih inačica koje se povezuju s disfunkcijom enzima i/ili nuspojavama terapije FP. Osim toga, dostupno je ukupno preko tisuću uglavnom smislenih (od engl. *sense*) sekvencijskih inačica koje ne utječu na strukturu i funkciju proteina. Uglavnom se radi o jednonukleotidnim polimorfizmima (SNP) smještenim u egzonima, premda je opisano nekoliko intronskih varijacija povezanih s utjecajem na funkciju genskog produkta. Neki od točkastih polimorfizama objedinjavaju se u haplotipe, pošto je pokazana neravnoteža povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*) jer se nasljeđuju spregnuto.

Najveći broj objavljenih inačica sporadično je povezan s DPD-deficijencijom ili FP-toksičnošću, a detektirane se u susljednim studijama iznimno rijetko. Često je prva publikacija SNP-a i jedina dostupna u literaturi koja ga konkretno stavlja u kontekst smanjene funkcije DPD, dočim su kasniji citati dijelom revijalnih radova i meta-analiza, bez nove argumentacije u epidemiološkom ili funkcijskom smislu.

Niska pojavnost pojedine genske inačice nipošto nije samo po sebi argument da ju se treba smatrati neznačajnom ili enzimski funkcionalnom. Takvi polimorfizmi nisu uključeni u važeće smjernice samo zato jer nedostaje kvantiteta odnosno statistička razina dokaza. Drugim riječima, prerijetko se javljaju u populaciji da bi se reproducirale studije i obavila dodatna istraživanja funkcije.

#### 1.4.2.1 Vrlo rijetki polimorfizmi

Među vrlo vjerojatno disfunkcionalne genetske inačice *DPYD* ubraja se nekoliko slijedećih polimorfizama koji su otkriveni u slučajevima bolesnika s dokazanom timin-uracilurijom ili kod bolesnika s fatalnim nuspojavama nakon primjene FP.

##### *257C>T*

Opisan je kod homozigota s deficijencijom DPD. Polimorfizam prileži regiji za vezivanje Fe-S skupine, vjerojatno interferirajući s njezinim vezivanjem. (91)

##### *545T>A*

Pronađen je kod bolesnika s fatalnom nuspojavom na FP (mučnina i povraćanje, neurotoksičnost, aritmije, cerebralna smrt) i s dokazanom deficijencijom DPD. (103)

##### *632A>G*

Mutacija je detektirana kod homozigota s verificiranom disfunkcijom DPD. Funkcijski najvjerojatnije uzrokuje destabilizaciju veznog mjesta za FAD prostetičku skupinu. (91)

##### *1108A>G*

Varijanta je detektirana kod homozigota s dokazanom deficijencijom DPD. Prema smještaju u molekuli, najvjerojatnije kompromitira vezanje NADPH. (91)

##### *1109delTA*

Mutacija je pronađena kod bolesnika s fatalnim toksicitetom nakon primjene FP. Uzrokuje pomak okvira čitanja i stop-kodon. (100)

##### *1475C>T*

Varijanta je opisana kod homozigota s dijagnosticiranom timin-uracilurijom. Prema poziciji u strukturi molekule može spriječiti vezivanje FAD. (91)

#### 1651G>A

SNP je detektiran kod roditelja bolesnika s potpunom deficijencijom DPD (DNA bolesnika je bila nedostupna). Mutacija bi po smještaju mogla interferirati s vezanjem FMN i izazivati poremećaj tercijarne strukture proteina. (82)

#### 2329G>T

Greška je pronađena kod dva bolesnika s fatalnom nuspojavom na kemoterapiju s FP. U oba slučaja bolesnici su bili složeni heterozigoti s dva disfunkcionalna alela. U jednom od slučajeva izmjerena je i snižena enzimaska aktivnost DPD u citosolu PBMC – dotični bolesnik bio je nositelj i 545T>A polimorfizma. (103)

#### 2933A>G

Prisutnost SNP-a dokazana je kod homozigota s dijagnosticiranom deficijencijom DPD. Prema strukturnom smještaju greška najvjerojatnije remeti tercijarnu strukturu i protok elektrona tijekom katalize. (91)

#### 2983G>T

Inačica je zabilježena u slučaju homozigotnog bolesnika s verificiranom deficijencijom DPD. Nalazi se u motivu za vezanje Fe-S skupine te izaziva poremećaj protoka elektrona. U transfekcijskom modelu na E. Coli genski produkt nije imao rezidualne enzimске aktivnosti. (104)

#### 1.4.2.2 Učestaliji potencijalno hipofunkcionalni polimorfizmi

Osim navedenih primjera za iznimno rijetke inačice, dostupni su podaci za više polimorfizama koji se češće bilježe u studijama, ali se smatraju kontradiktornima u pogledu učinka, pošto je zbir objavljenih rezultata glede enzimске funkcije nekonzistentan.

#### 1129-15T>C

Radi se o relativno čestom polimorfizmu u bijeloj rasi (približno 10% frekvencije). Nalazi se u intronu 10 i pretpostavlja se da remeti izrezivanje pre-mRNA nakon prijepisa. Prema nekim radovima u spregnutom je nasljeđivanju s već opisanim SNP 496G>A (cis-smještaj ili neravnoteža povezanosti – engl. *linkage disequilibrium*). Nekonzistentno se povezuje s FP-



toksičnošću. (100) Nije testiran u kontekstu izravnog učinka na enzimsku aktivnost. Novija prospektivna studija (N=243) nalazi višu učestalost u grupi bolesnika bez toksičnosti nakon FP. (105)

#### *2194G>A (DPYD\*6)*

To je jedan od prvih detektiranih polimorfizama *DPYD* koji je povezivan s toksičnim reakcijama na FP. Detektiran je i kod bolesnika s timin-uracilurijom, kao i u slučaju izmjerene deficijencije DPD i toksičnosti nakon primjene FP (69). Zahvaća visoko konzervirani lokus zadužen za interakciju sa supstratom. To je inačica s najmanje konzistentnim rezultatima, budući da postoje studije zbog kojih je u važećim smjernicama za doziranje FP prema *DPYD* genotipu ubrojen u funkcionalne varijacije (ne izaziva smanjenu enzimsku učinkovitost DPD). Nasuprot tome, u recentnoj velikoj studiji (N=1545) povezanosti genotipa *DPYD* s nuspojavama na primjenu adjuvantnog protokola FOLFOX, signifikantno se povezuje s toksičnošću gradusa 3 i više (106).

#### *2657G>A (DPYD\*9B)*

SNP je prvi puta detektiran kod homozigota s deficijencijom DPD. Zahvaća visoko konzervirani lokus unutar gena. U transfekcijskom testu na *E.Coli* pokazuje rezidualnu enzimsku aktivnost od 25%. Sporadično je i nekonzistentno povezan s toksičnošću nakon primjene FP. (90)

#### *1896T>C*

Radi se o polimorfizmu više učestalosti u Azijaca. Sporadično je povezan s povećanjem koncentracije cirkulirajućeg fluorouracila i s većim rizikom nastanka post-kemoterapijske neutropenije. (100)

Opisani učestaliji polimorfizmi u preglednoj literaturi su bez iznimke kategorizirani kao nejasni odnosno potencijalno hipofunkcionalni jer dosad objavljeni podaci ne dopuštaju sigurniji zaključak. Radi se o sporadičnim prikazima slučaja, retrospektivno dobivenim podacima, studijama s malim brojem ispitanika, ili analizama nehomogenih uzoraka (primjerice nakon primjene različitih kemoterapijskih protokola).

## 1.5 UDP – glukuronil transferaze

UDP-glukuronil transferaze čine superobitelj enzima zaduženih za ugljikohidratnu konjugaciju lipofilnih endogenih molekula (hormona, metabolita) i ksenobiotika (lijekova i toksina). Nekoliko stotina spojeva ubraja se u njihove supstrate sa zajedničkim obilježjem da ih vezivanje šećernog nastavka - primarno glukuronida, čini vodotopljivijima i time izlučivijima žuči ili urinom. Unutar superobitelji definirane su prema sekvencijskoj podudarnosti četiri obitelji: UGT1A, UGT2, UGT3A i UGT8. (107)

UGT8 je zapravo jedan enzim koji katalizira ključan korak tijekom sinteze galaktocerebrozida (prijenos galaktoze na ceramid) (108), a sudjeluje i u metabolizmu žučnih kiselina (109). UGT3 je najnovije definirana podskupina sa dva poznata enzima. Kao šećerni donor koristi se N-acetilglukozamin koji se katalitički veže na ursodeoksikolnu kiselinu i 17 $\alpha$ -estradiol. (110)

UGT2 obitelj broji deset enzima u dvije podskupine (UGT2 A i B) koji dominantno koriste glukuronid kao kofaktor te sudjeluju u metabolizmu steroida, fenolnih odoranata i drugih policikličkih aromatskih ugljikovodika, uključivo i produkata lipidne peroksidacije membrana.(111)

UGT1A je najbolje istražena obitelj s najvećim (i najraznolikijim) brojem poznatih supstrata te je opisana u zasebnom odjeljku.

UGT enzimi su izraženi na membranama endoplazmatskog retikuluma i jezgrine ovojnice (što korespondira mikrosomima u *in vitro* uvjetima). Tkivna ekspresija se razlikuje - većina ih je izražena i u jetri i ekstrahepatičnim tkivima (crijevo, bubreg). Ekskluzivno izvanjetreno izraženi su primjerice UGT1A7, UGT1A8 i UGT1A10.

### 1.5.1 Polimorfizmi *UGT1A1*

Zbog velikog broja medikamenata koji su supstrati UGT1A, farmakogenetički najznačajniju obitelj enzima UGT čini 9 inačica prepisanih iz gena *UGT1A*. Gen *UGT1A* lociran je na kromosomu 2q37, protežući se kroz približno 200 kB. Različite inačice enzima kreiraju se dijeljenjem početnog egzona (od engl. *exon sharing*, također i *alternative splicing*).

Zbog velike učestalosti polimorfizama kao i utjecaja na farmakokinetiku i farmakodinamiku lijekova najznačajniji član te obitelji je *UGT1A1*. Izražen je dominantno u jetri, ali se nalazi i u tankom i debelom crijevu te želucu. Postoji preko stotinu publiciranih genskih inačica *UGT1A1* sa različitim (pozitivnim ili negativnim) funkcijskim utjecajem.

Nakon otkrića, validacije i publikacije pojedinog polimorfizma, inačici je pridijeljena haplotipna oznaka (\*) praćena brojem, koja jednoobrazno terminološki kategorizira gensku varijantu. Slobodno dostupni popis objavljenih inačica dostupan je primjerice na internetskoj adresi <http://omim.org/entry/191740>. (112) Obzirom na populacijsku proširenost, za bijelu i crnu rasu farmakogenetički je najznačajniji polimorfizam *UGT1A1*\*28. Inačice \*36 i \*37 sa značajnom učestalošću prisutne su isključivo kod crnačke populacije, te varijanta \*6 kod Azijaca.

Kod genskih inačica \*28, \*36, \*37 i \*6 djelomice je promijenjena glukuronidacijska aktivnost genskog produkta (naspram normalnog, "divljeg" tipa gena – genotipska oznaka \*1 ili 6/6), ali bez vitalne ugroze homeostatskih procesa u organizmu.

Polimorfizam *UGT1A1*\*28 nastaje insercijom dodatnog TA-ponavljanja u TATA-slijed (od engl. "*TATA-box*" ) promotorske regije egzona za *IA1*. Kod divljeg tipa gena u istoj regiji nalazimo 6 TA ponavljanja, dok verzija \*28 ima 7 TA parova. Varijanta \*36 ima jedan manje TA-slijed u promotorskoj regiji (genotip 5/5 kod homozigota) te prema dostupnim studijama pokazuje jaču glukuronidacijsku aktivnost pa prema tome nije relevantna za razvoj toksičnosti. Polimorfizam \*37 sastoji se od osam ponavljanja TA-slijeda (genotip 8/8 kod homozigota odnosno 6/8 kod heterozigota) te je povezan s hipofunkcijom enzima *UGT1A1*, no klinička očitovanja ne prelaze ona zabilježena kod tipičnog Gilbertova sindroma (vidi kasniji odjeljak o kliničkoj prezentaciji). Inačica \*6 značajno je prisutna kod Azijaca i sastoji se od tranzicije na 211. mjestu gena *UGT1A1* sa posljedičnom zamjenom glicina argininom na poziciji 71 proteinskog lanca (genotipska oznaka *211G>A*, Arg71Gly, rs4148323). Rezultatni genski produkt \*6 ima enzimsku aktivnost istovjetnu polimorfizmu 7/7 (\*28) i klinički korespondira tipičnom Gilbertovu sindromu.

Minimalna sekvencijska razlika divljeg i mutiranog tipa zahtjeva primjenu molekulsko-dijagnostičkih tehnika visoke razlučivosti za adekvatno detektiranje nositelja - primjerice TaqMan® inačica polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (od engl. *RealTime PCR*) ili sekvenciranje promotorske regije. (113)

### 1.5.2 Kliničke posljedice nedostatne aktivnosti *UGT1A1*

Dosad spomenute hipofunkcijske inačice dovode kod homozigota do blage, djelomične insuficijencije (intermedijarni fenotip, aktivnost enzima je oko 30%, Gilbertov sindrom). Kliničke posljedice intermedijarnog fenotipa očituju se kao benigna tranzitorna hiperbilirubinemija. Stanje najčešće ostane supkliničko ili se otkriva obično u adolescenciji ili odrasloj dobi, premda nosi rizik i od pojačane neonatalne žutice. Akutne bolesti, stres ili

gladovanje, kao i medikacija hepatotropnim, glukuronidaciji podložnim lijekovima, mogu latentnu disfunkciju učiniti manifestnom i dovesti do kliničke žutice. I u tim slučajevima žutica je najčešće samoograničavajuća i eventualno popraćena tek blagom trbušnom nelagodnom.

Opisano je 77 mutacija sa zahvaćanjem nekog od 5 egzona *UGT1A1* koje uzrokuju potpunu enzimsku nedostatnost manifestiranu kao neonatalni sindrom teške žutice s neurološkim i drugim letalnim posljedicama (kompletni izostanak enzimske aktivnosti, Crigler-Najjarov sindrom tipa I). (114) Budući da ne postoji redundantni enzim u organizmu, nastaje nakupljanje bilirubina unutar središnjeg živčanog sustava (kernikerus) s neizbježnim letalnim ishodom, ukoliko se ne poduzme eksangvinotransfuzija, fototerapija i kasnije transplantacija jetre. (107)

Također postoji djelomična teška nedostatnost (sačuvano je nešto rezidualne enzimske aktivnosti, Crigler-Najjarov sindrom tipa II) sa sličnim, ali blažim kliničkim tijekom kao kod tipa I sindroma. U tim slučajevima terapija induktorima *UGT1A1* (fenobarbital) učinkovito smanjuje nakupljanje bilirubina i omogućuje kontrolu simptoma i dugotrajno preživljenje. Kernikerus se, međutim, također može razviti u kritičnim stanjima kao što su sepsa ili politrauma.

### 1.5.3 *UGT1A1* i metabolizam irinotekana

Obzirom na benignost Gilbertova sindroma, genotipizacija nositelja *UGT1A1*\*28 nadišla je isključivo pretklinički kontekst u biomedicinskim istraživanjima tek u kasnim 90-im godinama prošlog stoljeća, kad je postala važna u farmakogenetičkom smislu. Naime, tada je spoznato da je aplikacija irinotekana kod homozigotnih nositelja *UGT1A1*\*28 povezana s pojavom jake toksičnosti i s razvojem značajno većih koncentracija bioaktivnog intermedijera irinotekana (SN-38). Osim toga, neke studije povezuju Gilbertov sindrom se snažnijim farmakodinamskim djelovanjem (antitumorski učinak), no rezultati nisu konkluzivni te novija meta-analiza ne potvrđuje ovisnost učinka irinotekana s genotipom. (115)

U studijama koje su uslijedile irinotekan je u nositelja *UGT1A1*\*28 signifikantno povezan s rizikom neutropenije, proljeva i mukozitisa. Tako primjerice u studiji Ando i sur. (116) nositelji genotipa 7/7 imaju peterostruko veći rizik od leukopenije i proljeva 4. stupnja. Studije s primjenom irinotekana u visokim dozama (250-350 mg/m<sup>2</sup>) ukazuju i na veći rizik (9x) od nastanka nuspojava. Heterozigoti također pokazuju povišen rizik od toksičnosti, no s manjim povećanjem rizika naspram divljeg genotipa (6/6). Tako primjerice neutropenija nastaje kod 12,5% ispitanika s genotipom 6/7 i u 0% pacijenata s genotipom 6/6. Razmjer dosegnute

neutropenije (tzv. nadir apsolutnog broja neutrofila – ANC, od engl. *absolute neutrophil count*) korelira s genotipom: najniži je kod 7/7, intermedijaran kod 6/7, a najmanji kod nositelja 6/6. (117)

Proljev je u manjoj mjeri bilježen u novijim studijama, zbog vigorozne simptomatske terapije loperamidom što prevenira razvoj težih oblika dijarealnog sindroma.

Rizik smrti od komplikacija neutropenije i mukozitisa u nekim je studijama dosegao i 7% što je i dovelo do izdavanja preporuka od strane meritornih regulatornih tijela (FDA, EMA od engl. *Food and Drug Administration* odnosno *European Medicines Agency*) o potrebi prethodnog testiranja na prisutne relevantne inačice *UGT1A1* prije primjene irinotekana. Slijedom toga, upozorenje o povećanom riziku za toksičnost postalo je dio uputa o lijeku proizvođača pripravaka irinotekana.

Navedena povećanja rizika ovise o primijenjenoj dozi irinotekana, tako da kod suvremenijih protokola (doze do 200 mg/m<sup>2</sup>) rizici nuspojava za nositelje genotipa 6/7 i 7/7 postaju manji te je time manja i prediktivna vrijednost genotipskog probira za polimorfizme *UGT1A1*. Publicirane smjernice stoga zaključuju da je testiranje obvezatno ukoliko se planira primjena 200 i više mg/m<sup>2</sup> irinotekana po ciklusu, dok se genotipizacija *UGT1A1* ostavlja na odluku liječniku kod nižih doza lijeka. (118)

## 2 Hipoteza

Bolesnici s toksičnim nuspojavama fluoropirimidina i irinotekana nose polimorfizme gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu *DPYD\*2A* (*c.1905+1G>A* ili *IVS 14+1 G>A*), *DPYD\*13* (*c.1679T>G*), *c.2846A>T*, *c.1236G>A* i *c.496A>G* odnosno *UGT1A1* (*UGT1A1\*28*) učestalije nego pacijenti bez nuspojava.

### 3 Ciljevi rada

OPĆI CILJ: Ispitati utjecaj polimorfizama *DPYD* (*DPYD\*2A*, *DPYD\*13*, *c.2846A>T*, *c.1236G>A* i *c.496A>G*) i *UGT1A1\*28* na razvoj nuspojava kemoterapije fluoropirimidinima i irinotekanom.

SPECIFIČNI CILJEVI:

1. Odrediti učestalost polimorfizama *DPYD* (*DPYD\*2A*, *DPYD\*13*, *c.2846A>T*, *c.1236G>A* i *c.496A>G*) u ispitanika na terapiji fluoropirimidinima.
2. Odrediti učestalost polimorfizma *UGT1A1\*28* u ispitanika na terapiji irinotekanom.
3. Usporediti učestalosti polimorfizama *DPYD* (*DPYD\*2A*, *DPYD\*13*, *c.2846A>T*, *c.1236G>A* i *c.496A>G*) i *UGT1A1\*28* u ispitanika koji su razvili stupanj 3 i 4 nuspojava uz terapiju fluoropirimidinima i irinotekanom u odnosu na kontrolnu skupinu (stupanj 0, 1 i 2 nuspojava).
4. Procijeniti doprinos ispitivanih farmakogenetičkih markera u predviđanju razvoja nuspojava.

## 4 Ispitanici i metode

### 4.1 Ispitanici

Istraživanjem je obuhvaćeno 305 ispitanika liječenih fluoropirimidinskom kemoterapijom, od čega je bilo 147 žena i 158 muškaraca. Prosječna dob bila je 65 godina (raspon od 29 do 88 godina). Etnički, prema mjestu rođenja, većina ispitanika bila je hrvatskog podrijetla (85,6%). Svi su bili liječeni kemoterapijom koja je sadržavala FP. Većina ispitanika primala je kemoterapiju zbog CRC (79,4%), ali su u istraživanje bili uključeni i bolesnici na terapiji s FP zbog drugih indikacija (20,6%). Podjednako su bili zastupljeni ispitanici liječeni adjuvantno (postoperativna kemoterapija za lokaliziranu i lokalno uznapredovalu tumorsku bolest s ciljem smanjenja rizika od recidiva bolesti; 48,5%) i zbog metastatske bolesti (51,5%). Konkomitantnom radioterapijom (istovremena primjena zračenja i kemoterapije) ukupno je bilo liječeno 37 ispitanika (12,1%). Bioterapiju je zajedno s kemoterapijom primalo ukupno 75 bolesnika. Od toga je inhibitor VEGF-a bevacizumab primalo 67 bolesnika (22%), a inhibitor EGFR-a cetuksimab ukupno 8 bolesnika (2,6%). Osim kemoterapije, ukupno 221 ispitanik (72,4%) uzimao je komedikaciju zbog kroničnih, pre-egzistentnih komorbiditeta (arterijska hipertenzija, šećerna bolest, stabilna koronarna bolest, hipertrofija prostate, stabilna hipotireoza, kronični bolovi, nesаница, peptička bolest). Tablica 1 zbirno prikazuje početna obilježja ispitanika uključenih u studiju.

**Tablica 1. Karakteristike ispitanika (N=305) uključenih u istraživanje. Prosječna dob je 65 godina (raspon 29 – 88).**

	Broj ispitanika	Udio (%)
Žene	147	48,2
Muškarci	158	51,8
Hrvatsko etničko podrijetlo	261	85,6
Kolorektalni karcinom	253	79,4
Druga primarna sijela	52	20,6
Lokalizirana bolest	148	48,5
Metastatska bolest	157	51,5
Bioterapija	75	24,6
Radioterapija	37	12,1
Komedikacija	221	72,4



## 4.2 Nuspojave kemoterapije

Kod ispitanika su prikupljeni podaci o nuspojavama temeljem anamneze, fizikalnog pregleda i nalaza laboratorijskih pretraga. Težina nuspojava izražena je ordinalnom skalom u 4 stupnja (gradusa) temeljem međunarodno prihvaćenog i često primjenjivanog popisa uobičajenih kriterija toksičnosti neželjenih događaja (CTCAE od engl. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*) verzija 4.0. (119)

Obzirom da je cilj istraživanja procjena povezanosti genski uvjetovane predispozicije s jačinom nuspojava, uzeta je u obzir samo rana pojava nuspojava – tijekom prva tri mjeseca od početka primjene određenog kemoterapijskog protokola. Navedeni rok od tri mjeseca od početka liječenja, za nastup toksičnih reakcija - arbitrarno je ustanovljen, budući da se kod genski uvjetovanih toksičnih reakcija na kemoterapiju očekuje brz nastup nuspojava.

Kod pojedinog ispitanika registrirane su i kategorizirane po jačini sve izražene nuspojave. Jačina izraženosti nuspojave iskorištena je kao kriterij za razvrstavanje ispitanika u promatranu odnosno kontrolnu skupinu. U promatranu skupinu uključeni su bolesnici s jednom ili više toksičnih reakcija stupnja 3 i 4 prema CTCAE, a u kontrolnu skupinu oni s jednom ili više reakcija 1. i 2. stupnja. Ispitanici bez nuspojava kategorizirani su kao gradus 0 i također pridijeljeni kontrolnoj skupini.

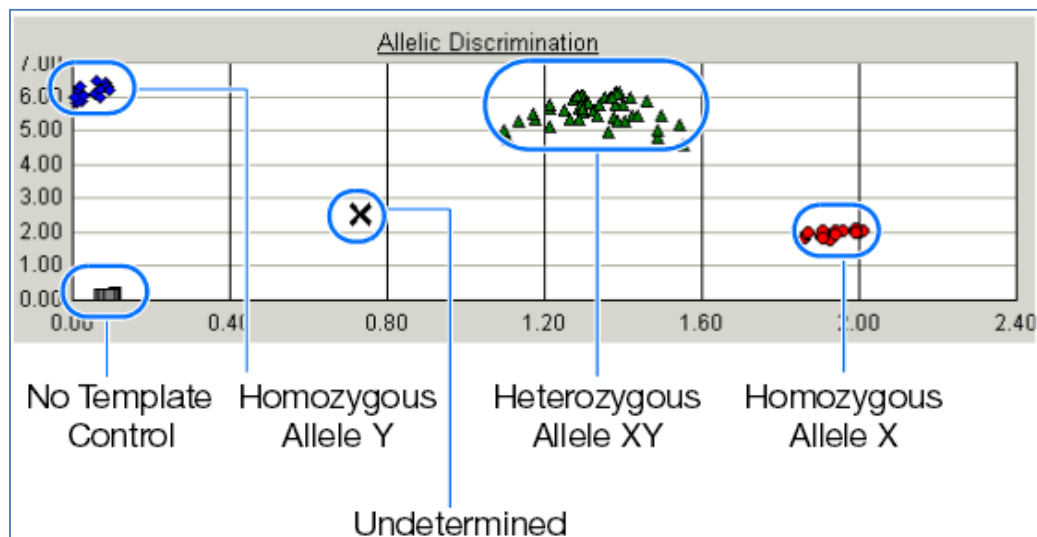
## 4.3 Izdvajanje DNA

Za izdvajanje DNA uzorkovano je 3 mL periferne krvi u epruvete s antikoagulantom K<sub>3</sub>EDTA. Za genotipizaciju korištena je DNA izdvojena pomoću reagensa BioSprint 15 DNA Blood Kit (Qiagen, Njemačka) na uređaju KingFisher mL (Thermo Labsystems, Finska), prema uputama proizvođača.

## 4.4 Određivanje polimorfizama *DPYD* metodom TaqMan<sup>®</sup>

Za određivanje polimorfizama *DPYD* korištena je metoda TaqMan<sup>®</sup> lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) koja se koristi pri određivanju polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). U genotipizaciji svakog SNP-a su korištene specifične početnice i dvije TaqMan<sup>®</sup> fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe od kojih je svaka komplementarna pojedinom alelu te je obilježena s fluoroforima VIC<sup>®</sup> ili FAM<sup>™</sup>. Stvaranje fluorescentnog signala s jednom ili obje probe ukazuje na njihovo vezanje tijekom reakcije PCR te pokazuje prisutnost odgovarajućih alela. Detekcija umnoženih alela provodila se metodom alelne diskriminacije pomoću računalnog programa *7500 Software* verzija 2.3 (Applied Biosystems, SAD), sukladno

uputama proizvođača. Na slici 5 prikazana je snimka zaslona navedenog programa s grafikonom fluorescencija dvaju navedenih fluorofora korištenih za obilježavanje produkta PCR.



**Slika 5. Alelna diskriminacija (engl. *Allelic discrimination*) na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR uz pomoć programskog paketa 7500 Software verzija 2.3 (Applied Biosystems, SAD)**

Prikazana je izvorna snimka zaslona s grafikonom distribucije očitanih fluorescencija fluoroforom (VIC<sup>®</sup> odnosno FAM<sup>™</sup>) označenih produkata PCR, grupiranih prema intezitetima fluorescencija (*No Template Control* – negativna kontrola bez DNA kalupa, *Homozygous Allele Y* – Homozigotni alel Y, *Undetermined* – neuspjela determinacija, potrebno je ponoviti test, *Heterozygous Allele XY* – Heterozigotni alel XY, *Homozygous Allele X* - Homozigotni alel X).

#### 4.4.1 Potrebna oprema i reagensi

Mjerni uređaj: Uređaj za PCR u stvarnom vremenu ABI 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, SAD)

#### Oprema:

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

- mikrocentrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitarske pločice (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi:

- TaqMan® Drug Metabolism Genotyping kit (Applied Biosystems, SAD)
- TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, SAD)

Za analizu svakog pojedinog polimorfizama *DPYD* koristi se odgovarajući kit za TaqMan® DME Assay (Tablica 2.). Priprema reakcijske smjese (Tablica 3.) i uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 za genotipizaciju *DPYD* (Tablica 4.) izvedeni su prema uputama proizvođača.

**Tablica 2. Specifikacija reagensa za genotipizaciju polimorfizama *DPYD***

Gen - alel	db SNP** (rs#)	c. DNA	TaqMan® DME Assay ID
<i>DPYD *2A (IVS14+1G&gt;A)</i>	rs3918290	c.1905+1G>A	C__30633851_20
<i>DPYD 496A&gt;G</i>	rs2297595	c.496A>G	C__16187014_20
<i>DPYD *13</i>	rs55886062	c.1679T>G	C__11985548_10
<i>DPYD 2846A&gt;T</i>	rs67376798	c.2846A>T	C__27530948_10
<i>DPYD 1236G&gt;A</i>	rs56038477	c.1236G>A	C__25596099_30

\*\* standardna oznaka polimorfizma u bazi podataka *Single Nucleotide Polymorphism Database* Nacionalnog centra za biotehnoške informacije SAD (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI)

**Tablica 3. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju polimorfizama *DPYD***

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

**Tablica 4. Uvjeti reakcije PCR za genotipizaciju na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR**

	<b>1. ciklus</b>	<b>PCR (50 ciklusa)</b>		
Pre-PCR očitavanje	<b>INICIJACIJA</b>	<b>DENATURACIJA</b>	<b>amplifikacija</b>	Post-PCR očitavanje
temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje	temperatura/ trajanje
60 °C / 1 min	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	92 °C / 15 s	60 °C / 90 s	60 °C / 1 min

#### 4.5 Određivanje polimorfizma *UGT1A1* metodom LightCycler®

Za određivanje polimorfizama *UGT1A1*\*28 (TA6/7) korištena je metoda LightCycler® temeljena na RT-PCR. Genotipizacija se provodila identifikacijom produkata PCR pomoću temperature taljenja (engl. *melting temperature*,  $T_m$ ) koja se očitava mjerenjem fluorescencije nastale vezanjem hibridizacijskih fluorescentnih proba i umnoženih alela na određenoj temperaturi reakcijske smjese, po principu prijenosa energije fluorescentnom rezonancijom FRET (od engl. *fluorescence resonance energy transfer*). Umnoženi aleli detektirani su temeljem oblika krivulja temperature taljenja uz pomoć izvornog programskog paketa integriranog u uređaj, sukladno uputama proizvođača. Prikaz krivulja detekcije alela nalazi se u slici 6.

##### 4.5.1 Potrebna oprema i reagensi

Mjerni uređaj: Uređaj za PCR u stvarnom vremenu LightCycler® 1.2 Roche (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)

Oprema:

- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0,5-10  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100  $\mu$ L (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2; 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- kapilare za uređaj LightCycler® (Roche Diagnostics, Švicarska)
- hladni blok za kapilare (2-8°C) (Roche Diagnostics, Švicarska)

- vrtložna miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mikrocentrifuga (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za kapilare (Roche Diagnostics, Mannheim, Njemačka)

Reagensi:

- LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics, Švicarska)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Roche Diagnostics, Švicarska)
- početnice *reverse* i *forward* (TIB MOLBIOL, Njemačka)
- hibridizacijske probe *anchor* i *sensor* (TIB MOLBIOL, Njemačka)
- sterilna destilirana voda PCR čistoće

Priprema reakcijske smjese (Tablica 5.) i uvjeti PCR reakcije na uređaju LightCycler® 1.2 Roche za genotipizaciju *UGT1A1*\*28 (Tablica 6.) izvedeni su prema objavljenoj metodi (120).

**Tablica 5. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju *UGT1A1*\*28**

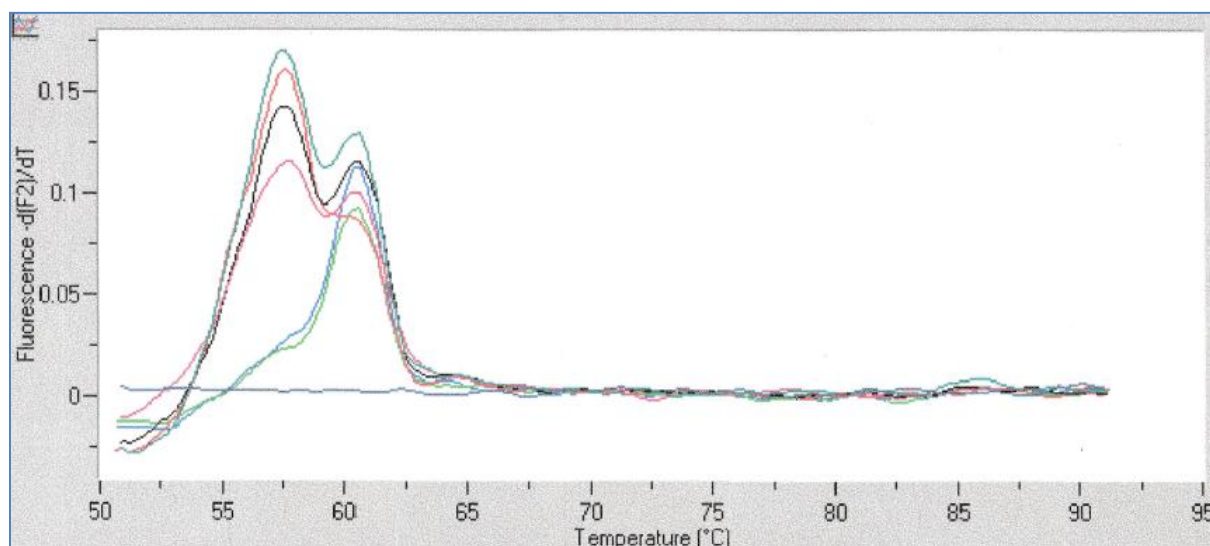
Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)	Konc. u reakcijskoj smjesi
LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe	2	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,2	1x
početnica <i>reverse</i> (10μM)	1	1x
početnica <i>forward</i> (10μM)	1	1x
proba <i>anchor</i> (1μM)	1	1x
proba <i>sensor</i> (7μM)	1	1x
PCR voda	8,8	
DNA	2	10 ng
<b>Ukupni volumen reakcijske smjese</b>	<b>20</b>	

**Tablica 6. Uvjeti PCR reakcije za genotipizaciju *UGT1A1*\*28 na uređaju LightCycler®**

PCR (45 ciklusa)			
DENATURACIJA	AMPLIFIKACIJA	ANALIZA TEMPERATURE TALJENJA	HLADENJE
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
94°C / 10 min	94°C / 10 s 54°C / 20 s 72°C / 9 s	95°C / 30 s 48°C / 30 s 94°C / 1 s	40°C / 30 s

Rezultati su očitavani na fluorescenciji F2 (640 nm) prema temperaturi taljenja za pojedini alel (Slika 6):

- \*1/\*1 (TA6) - 56°C
- \*1/\*28 (TA6/TA7) - 56°C + 60°C
- \*28/\*28 (TA7) - 60°C



**Slika 6. Genotipizacija *UGT1A1*\*28 na uređaju LightCycler® 1.2 Roche**

Snimka zaslona preuzeta iz izvornog programskog paketa prikazuje ovisnost intenziteta fluorescencije o temperaturi reakcijske smjese pri čemu nastaje efekt taljenja (postupne denaturacije) produkta PCR koji omogućuje vezivanje fluorescentno obilježenih hibridizacijskih proba. (*Temperature* – temperatura reakcijske smjese, *Fluorescence* – fluorescencija).

#### 4.6 Statistička analiza

Statistička obrada podataka u ovom istraživanju provedena je uz pomoć programskog paketa SPSS verzija 19 (SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Obzirom da su promatrana obilježja kategorijska (kvalitativna), osnovna varijabla za opis podataka je frekvencija (učestalost) izražena u apsolutnim brojevima (broj ispitanika u skupini) odnosno kao postotni udio. Osim frekvencija kategorijskih (nominalnih) podataka, za opis uzorka korištene su i kvantitativne varijable i prikladne metode deskriptivne statistike odnosno centralne tendencije (medijan, mod, raspon). Kadšto je korištena i aritmetička sredina (srednja vrijednost). Za procjenu značajnosti razlika numeričkih varijabli među skupinama u uzorku korišten je neparametrijski test usporedbe prema Mann-Whitneyu za 2 grupe.

Analiza povezanosti kategorijskih varijabli grupiranih u tablice kontingencije učinjena je pomoću  $\chi^2$ -testa. Za 2x3 i veće tablice korištena je P-vrijednost značajnosti samog testa, dok je za tablice 2x2 korištena Yatesova korekcija kontinuiteta i Fisherov egzaktni test za procjenu statističke značajnosti.

Za statističku analizu utjecaja među kategorijskim varijablama korištena je binarna logistička regresija. Rezultati logističke regresije (omjer izgleda, interval pouzdanosti, P-vrijednost logističke regresije) prikazani su tablično paralelno s rezultatima frekvencija smještenima u tablice kontingencije.

Svi intervali pouzdanosti dati su na 95% vjerojatnosti, a kao statistički značajna smatrana je P-vrijednost manja od 0,05 u svim prikazanim analizama.

## 5 Rezultati

### 5.1 Dob, spol i etničko podrijetlo

U ispitivanom uzorku od 305 bolesnika bilo je 147 žena (48,2%) i 158 muškaraca (51,8%). Medijan dobi uzorka je 66 (raspon od 29 do 88), kod žena 65 (raspon 29-86), a kod muškaraca 67 godina (raspon 37-88). Mod dobi je jednak za čitav uzorak, odnosno po spolu (65 godina). Aritmetička sredina dobi uzorka je 64,98 (standardna devijacija 10,43). Postoji statistički neznačajni trend k razlici prosječne dobi između žena i muškaraca (muškarci prosječno dvije godine stariji: 65,99 vs. 63,9; standardna devijacija 9,68 odnosno 11,13;  $P=0,15$  Mann-Whitney test). Tablica 7 opisuje varijable centralne tendencije za dob ispitanika uključenih u istraživanje.

**Tablica 7. Dob ispitanika uključenih u istraživanje**

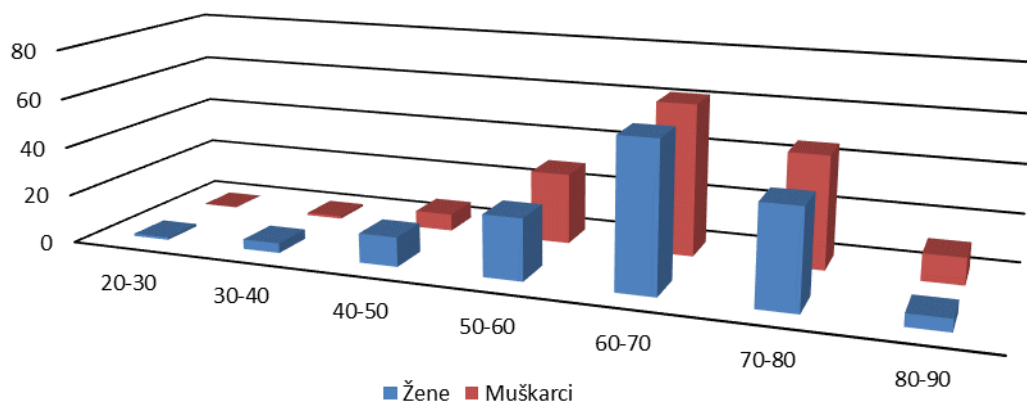
	Uzorak	Žene	Muškarci	
Medijan	66	65	67	
Minimum	29	29	37	
Maksimum	88	86	88	
Mod	65	65	65	
Srednja vrijednost	64,98	63,9	65,99	( $P=0,15$ )
Standardna devijacija	10,43	9,68	11,13	

Razlika distribucije dobi između žena i muškaraca nije statistički značajna ( $P=0,15$ ; Mann-Whitney test)

Razdioba po dobnim kohortama i spolu prikazana je u slici 7. Postoji minimalna nesukladnost distribucije dobnih kohorti u uzorku pri čemu su nešto zastupljeniji stariji muškarci i mlađe žene.

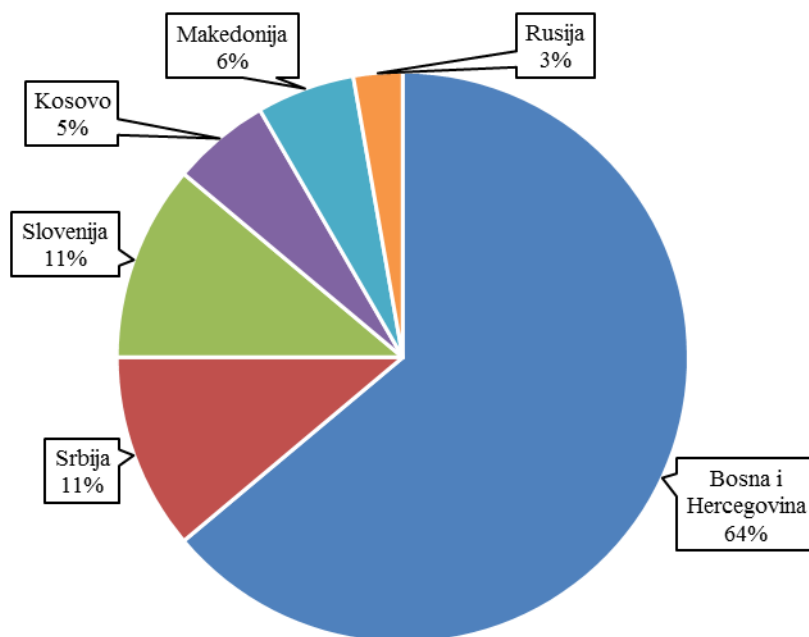
Prema mjestu rođenja definirana je etnička pripadnost ispitanika. Hrvatskog podrijetla bilo je 85,6% ispitanika, a ukupno je istraživani uzorak sadržavao i 11,8% ispitanika podrijetla izvan Hrvatske, većinom iz okolnih regija. U prvom redu su to ispitanici rođeni u Bosni i Hercegovini ( $N=23$ ), zatim Srbiji ( $N=4$ ), Sloveniji ( $N=4$ ), Kosovu ( $N=2$ ), Makedoniji ( $N=2$ ) i Rusiji ( $N=1$ ). Za osam ispitanika u trenutku analize nije bilo dostupan podatak o mjestu rođenja (2,6%). Slika 8 prikazuje geografsko podrijetlo ispitanika rođenih izvan Hrvatske.





**Slika 7. Distribucija uzorka po dobnim kohortama i spolu**

Na prikazanom grafikonu na apscisi su kohorte po dekadama dobi, a na ordinati broj ispitanika.



**Slika 8. Zemljopisno podrijetlo ispitanika rođenih izvan Hrvatske**

Od 305 ispitanika 36 ih je rođeno izvan državnog teritorija (11,8% ukupnog broja ispitanika).

## 5.2 Protokoli liječenja i primarna sijela tumora

Svi uključeni ispitanici primali su kemoterapijski protokol koji je sadržavao FP. 37,6% bolesnika liječeno je kombinacijskim protokolom dvodnevne kontinuirane infuzije 5-FU s irinotekanom (protokol FOLFIRI, aplikacija svaka dva tjedna, N=114), 26,9% primalo je bolusni 5-FU (Mayo protokol, aplikacija 1. do 5. dan, svaka 4 tjedna, N=82), 20,7% liječeno je kapecitabinom (peroralna aplikacija dvaput dnevno od 1. do 14. dana, potom tjedan dana pauze, ponavljanje ciklusa svaka tri tjedna, N=63). Ukupno 9,2% ispitanika liječeno je kombinacijskim protokolom sa oksaliplatinom. Od toga je veći broj bolesnika primao infuzijski protokol FOLFOX (dvodnevna kontinuirana infuzija 5-FU svaka dva tjedna, N=18), a manji broj liječen je kapecitabinom uz oksaliplatinu (protokol XELOX; aplikacija oksaliplatine prvi dan nakon čega počinje dvotjedni period uzimanja kapecitabina pa tjedan dana pauze, N=10). Svega 4 bolesnika (1,3%) obuhvaćena istraživanjem primala su monoterapiju s 5-FU u kontinuiranoj infuziji (dvodnevna infuzija 5-FU, de Gramontov protokol). Preostalih 14 bolesnika (4,6%) primalo je druge kombinacijske protokole koji su sadržavali 5-FU. Tablica 8 prikazuje kemoterapijske protokole primijenjene bolesnicima uključenim u istraživanje.

**Tablica 8. Kemoterapijski protokoli primijenjeni kod bolesnika obuhvaćenih istraživanjem**

Protokol	Broj ispitanika	Udio (%)	Žene	Muškarci
Kontinuirani 5-FU + irinotekan (FOLFIRI)	114	37,4	55	62
Kontinuirani 5-FU + oksaliplatina (FOLFOX)	18	5,9	11	7
Kapecitabin + oksaliplatina (XELOX)	10	3,3	4	6
Kapecitabin	63	20,7	36	27
Bolusni 5-FU (Mayo)	82	26,9	34	48
Kontinuirani 5-FU (de Gramont)	4	1,3	2	2
Ostali (cisplatina+5-FU, FAC, ELF)	14	4,6	5	9

FAC – kombinacija adriamicina, ciklofosfamida i 5-FU u bolusnoj primjeni, ELF – kombinacija etopozida i 5-FU u bolusnoj primjeni. Detaljan opis ostalih kemoterapijskih protokola nalazi se u tekstu.

Većina ispitanika liječena je zbog kolorektalnog karcinoma (CRC, od engl. *Colorectal cancer*), a bolesnika s tumorima drugih sijela bilo je 20,6% (karcinom želuca, dojke, gušterače, jednjaka, žučnjaka, apendiksa, penisa, glave i vrata, žučnih puteva). Tablica 9 prikazuje primarna sijela tumora kod bolesnika s ne-CRC tumorima uključenih u istraživanje.

**Tablica 9. Primarna sijela tumora kod bolesnika obuhvaćenih istraživanjem liječenih od ne-kolorektalnog karcinoma**

Sijelo primarnog tumora	Broj ispitanika	Udio u podskupini ne-CRC bolesnika (%)	Udio u ukupnom uzorku (%)
Želudac	23	44,2	7,5
Dojka	9	17,3	3,0
Gušterača	6	11,5	2,0
Apendiks	3	5,8	1,0
Žučnjak	3	5,8	1,0
Jednjak	3	5,8	1,0
Penis	2	3,8	0,7
Glava i vrat	2	3,8	0,7
Kolangiokarcinom	1	1,9	0,3

CRC-kolorektalni karcinom (od engl. *Colorectal cancer*)

Dodatna obilježja liječenja bolesnika uključenih u istraživanje

Osnovno istraživano obilježje u ovom istraživanju su nuspojave nastale posljedično primjeni kemoterapije, te je stoga posebna pažnja pridana podacima o kemoterapijskom protokolu i izazvanoj toksičnosti. Međutim, budući da se radi o opservacijskom načinu istraživanja ispitanicima nije limitiran nijedan drugi modalitet liječenja indiciran prema važećim smjernicama liječenja tumora odnosno istovremeno prisutnih kroničnih bolesti. Stoga su tijekom istraživanja prikupljeni podaci o istovremenim načinima liječenja osim kemoterapijskog, kao i kontekstu primijenjene terapije obzirom na uznapredovalost tumorske bolesti. Također je ispitana njihova raspodjela među skupinama ispitanika – (1) skupina sa značajnom toksičnošću 3. i 4. stupnja i (2) kontrolna skupina (stupanj toksičnosti 0, 1 i 2). Na taj način nastojali smo što bolje opisati istraživani uzorak, njegovu balansiranost (homogenost) i prezentirati moguće dodatne utjecaje na pojavnost nuspojava.

Oko četvrtine ispitanika (N=75; 24,6%) uz kemoterapijski protokol primalo je biološki lijek. Od toga je 67 bolesnika primalo bevacizumab (31 u skupini sa nuspojavama i 36 u kontrolnoj skupini), a svega 8 bolesnika liječeno je cetuksimabom (2 u skupini s nuspojavama i 6 u kontrolnoj skupini). Istovremenom primjenom zračenja liječeno je ukupno 37 bolesnika, 19 u skupini s nuspojavama, a 18 u kontrolnoj skupini. Kroničnu komedikaciju uzimao je 221 ispitanik, od čega 87 u nuspojavnju i 134 u kontrolnoj skupini. Ukupno 148 uključenih bolesnika liječeno je adjuvantno (postoperativna kemoterapija s ograničenim brojem ciklusa u

cilju prevencije recidiva tumorske bolesti - 72 ispitanika u skupini s toksičnošću i 76 u kontrolnoj skupini), dok je 157 ispitanika liječeno palijativnom kemoterapijom (liječenje s ciljem kontrole neizlječive, metastatske tumorske bolesti - 66 bolesnika u skupini s nuspojavama i 91 bolesnik u kontroli). U tablici 10 zbirno su prikazani podaci o dodatnim obilježjima načina liječenja bolesnika uključenih u istraživanje.

**Tablica 10. Dodatna obilježja tretmana bolesnika uključenih u istraživanje**

	Broj ispitanika (ukupno)	Nuspojave (Gr. 3 i 4) (N=138)		Kontrole (Gr. 0, 1 i 2) (N=167)	
		N	%	N	%
Bioterapija bevacizumab	67	31	22,5	36	21,6
Bioterapija cetuksimab	8	2	1,4	6	3,6
Radioterapija	37	19	13,8	18	10,8
Komedikacija	221	87	63,0	134	80,2
Adjuvantna kemoterapija	148	72	52,2	76	45,5
Palijativna kemoterapija	157	66	47,8	91	54,5

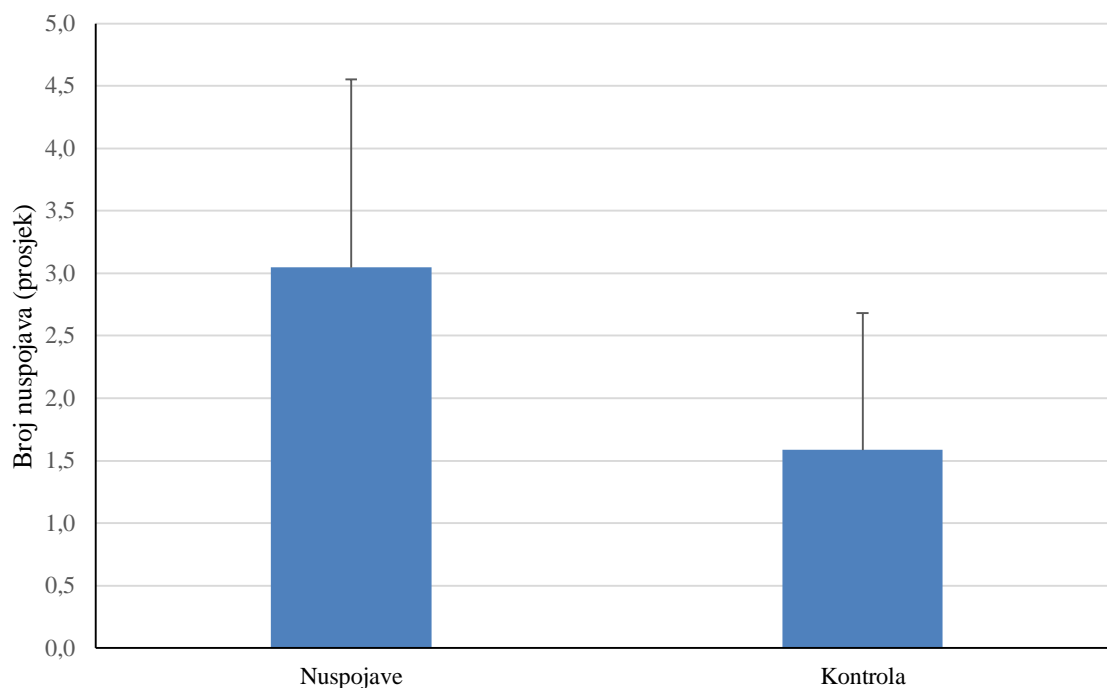
Gr. – gradus (stupanj) jakosti nuspojave prema CTCAE. Postotkom je prikazan udio u podskupini prema jačini toksičnosti.

### 5.3 Nuspojave kemoterapije

Tijekom perioda od tri mjeseca od početka tretmana ukupno 138 bolesnika razvilo je nuspojave gradusa 3 ili više što ih kategorizira u skupinu s toksičnom reakcijom (istraživana skupina). 167 ispitanika prema jačini razvijenih nuspojava spada u kontrolnu skupinu (gradus 0,1 i 2). Od 305 ispitanika ukupno 26 ih nije razvilo nikakvu nuspojavu (gradus 0; N=26; 8,58%) – od tih je ukupno 15 primalo 5-FU u kontinuiranoj infuziji (13 po protokolu FOLFIRI, 2 po protokolu de Gramont), a 5 ispitanika je primalo monoterapiju kapecitabinom, ostalih 6 ispitanika primali su ostale protokole.

Zabilježeno je ukupno 705 slučajeva neželjenih reakcija na kemoterapiju u čitavom uzorku. 282 događaja u kontrolnoj, a 423 događaja u pokusnoj skupini. Premda je kategorizacijski kriterij za uključivanje u skupinu bolesnika s toksičnim reakcijama bio kvalitativan (jačina nuspojave izražena u stupnjevima po CTCAE klasifikaciji), zabilježena je i uvjerljiva razlika

u distribuciji prema ukupnom broju zabilježenih nuspojava kod pojedinog bolesnika. Tako je u istraživanoj skupini većina ispitanika iskusila prosječno 3 nuspojave (mod i medijan broja nuspojava iznosi 3, u rasponu od 1 do 7, srednja vrijednost je 3,065 uz standardnu devijaciju 1,505). U kontrolnoj skupini i mod i medijan broja zabilježenih nuspojava po bolesniku iznosi 1, s rasponom od 0 do 6, uz srednju vrijednost 1,689 i standardnu devijaciju 1,095. Razlika broja nuspojava po ispitaniku se statistički razlikuje između promatrane i kontrolne skupine ( $p < 0,001$  Mann-Whitney test). Slika 9 prikazuje razliku broja nuspojava po ispitaniku između nuspojavne i kontrolne skupine.



**Slika 9. Razlika broja nuspojava po ispitaniku između promatrane i kontrolne skupine**  
 Ukupan broj ispitanika je 305. Zabilježeno je ukupno 705 neželjenih događaja u čitavom uzorku. Visinom stupića prikazane su aritmetičke sredine broja nuspojava (3,065 odnosno 1,689). Naznačene su i standardne devijacije. Razlika je statistički značajna ( $P < 0,01$ ; Mann-Whitney-jev test).

Češće je zabilježeno 8 nuspojava: neutropenija, proljev, mučnina/povraćanje, mukozitis, sindrom šaka-stopalo (palmoplantarni dermatitis), infekcija, umor i bol u trbuhu. Navedene nuspojave pojavile su se više od 13 puta u ukupnom promatranom uzorku. Tih osam čestih nuspojava kategorizira 94,72% ispitanika iz promatrane skupine, dok je za preostalih 5,28% ispitanika uključenih u nuspojavnu skupinu kategorizacijska nuspojava 3. i 4. stupnja spadala u rjeđe zabilježene reakcije (<13 puta ukupno u uzorku). Tablica 11 prikazuje raspodjelu osam čestih nuspojava zabilježenih tijekom istraživanja prema kemoterapijskim protokolima.

**Tablica 11 . Nuspojave i njihova raspodjela prema kemoterapijskim protokolima.**

	Broj ispitanika	Skupine (Jačina toksičnosti)	Broj ispitanika (po skupinama)	FOLFIRI (N=114)		FOLFOX (N=18)		XELOX (N=10)		Kapecitabin (N=63)		Mayo (N=82)		deGramont (N=4)		Ostali (N=14)	
				N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Neutropenija	148	Gr. 3-4	88	42	(37)	4	(22)	1	(6)	7	(11)	30	(37)	0	(0)	4	(29)
		Gr. 1-2	60	26	(23)	6	(33)	3	(30)	7	(11)	13	(16)	1	(25)	4	(29)
Proljev	129	Gr. 3-4	49	8	(7)	0	(0)	0	(0)	14	(22)	26	(32)	0	(0)	1	(7)
		Gr. 1-2	80	27	(24)	3	(17)	3	(30)	20	(32)	19	(23)	2	(50)	6	(43)
Mučnina/povraćanje	91	Gr. 3-4	13	1	(1)	0	(0)	0	(0)	2	(3)	8	(10)	0	(0)	2	(14)
		Gr. 1-2	78	23	(20)	6	(33)	5	(50)	10	(16)	31	(38)	1	(25)	2	(14)
Infekcija	70	Gr. 3-4	50	15	(13)	1	(6)	0	(0)	10	(16)	22	(27)	0	(0)	2	(14)
		Gr. 1-2	20	9	(8)	1	(6)	0	(0)	2	(3)	6	(7)	1	(25)	1	(7)
Mukozitis	66	Gr. 3-4	31	2	(2)	0	(0)	0	(0)	9	(14)	20	(24)	0	(0)	0	(0)
		Gr. 1-2	35	6	(5)	5	(28)	2	(20)	6	(10)	15	(18)	0	(0)	1	(7)
Umor	57	Gr. 3-4	7	1	(1)	0	(0)	0	(0)	3	(5)	3	(4)	0	(0)	0	(0)
		Gr. 1-2	50	11	(10)	3	(17)	3	(30)	13	(21)	13	(16)	0	(0)	7	(50)
Palmoplantarni dermatitis	35	Gr. 3-4	10	0	(0)	0	(0)	0	(0)	9	(14)	1	(1)	0	(0)	0	(0)
		Gr. 1-2	25	1	(1)	0	(0)	1	(10)	15	(24)	8	(10)	0	(0)	0	(0)
Bol u trbuhu	29	Gr. 3-4	5	1	(1)	0	(0)	0	(0)	2	(3)	2	(2)	0	(0)	0	(0)
		Gr. 1-2	24	5	(4)	1	(6)	1	(10)	5	(8)	12	(15)	0	(0)	0	(0)
Ostale	80	Gr. 3-4	20	5	(4)	1	(6)	0	(0)	7	(11)	7	(9)	0	(0)	0	(0)
		Gr. 1-2	60	23	(20)	10	(56)	3	(30)	14	(22)	7	(9)	1	(25)	2	(14)
Ukupno:	705		705	206		41		22		155		243		6		32	

Osim navedenih glavnih nuspojava, ukupno su bila zabilježena 34 druga oblika toksičnih reakcija s učestalošću od 1 do 12 događaja u čitavom uzorku. To su primjerice: periferna polineuropatija (12 slučajeva), inapetencija (10 slučajeva), hiperbilirubinemija (6 slučajeva), trombocitopenija (5 slučajeva) i osip (5 slučajeva). U tablici 12. navedene su nuspojave zabilježene na čitavom promatranom uzorku u manje od 13 slučajeva.

**Tablica 12. Nuspojave zabilježene manje od 13 puta u čitavom istraživanom uzorku**

	<b>Nuspojava</b>	<b>Broj slučajeva u čitavom uzorku</b>
1.	Periferna polineuropatija	12
2.	Inapetencija	10
3.	Hiperbilirubinemija	6
4.	Trombocitopenija	5
5.	Osip	5
6.	Epistaksa	3
7.	Alopecija	3
8.	Disgeuzija	3
9.	Glavobolja	2
10.	Hemeroidi	2
11.	Letalni ishod	2
12.	Kserostomija	2
13.	Prekordijalna opresija	2
14.	Ileus	2
15.	Dehidracija	2
16.	Vrućica	1
17.	Elevacija CK, LDH, GGT	1
18.	Plućna embolija	1
19.	Krv u stolici	1
20.	Anemija	1
21.	Opstipacija	1
22.	Tranzitorna ishemijska ataka	1
23.	Kronična kognitivna disfunkcija	1
24.	Diabetes mellitus	1
25.	Edemi potkoljenica	1
26.	Akutno smeteno stanje	1
27.	Respiratorna insuficijencija	1
28.	Nesanica	1
29.	Undulacija atrijske	1
30.	Anksioznost	1
31.	Toksična kardiomiopatija	1
32.	Oniholiza	1
33.	Hepatalna lezija	1
34.	Dvoslike	1

Kod svih primijenjenih kemoterapijskih protokola zabilježene su toksične nuspojave. Prema prosječnom broju izazvanih nuspojava po ispitaniku, kao i prema udjelu jakih nuspojava 3. i 4. stupnja, najtoksičniji je bio protokol Mayo (bolusna primjena 5-FU). Tablica 13 zbirno prikazuje distribuciju izazvanih toksičnih reakcija prema vrsti kemoterapijskog protokola.

**Tablica 13. Zbirna toksičnost kemoterapijskih protokola**

Protokol (broj bolesnika)	Ukupno nuspojava	Nuspojava po bolesniku (prosjeak)	Gr. 1-2		Gr. 3-4	
			N	%	N	%
FOLFIRI (114)	206	1,8	131	63,6	75	36,4
FOLFOX (18)	41	2,3	35	85,4	6	14,6
XELOX (10)	22	2,2	21	95,5	1	4,5
Kaprecitabin (63)	155	2,5	92	59,4	63	40,6
Mayo (82)	243	3	124	51	119	49
de Gramont (4)	6	1,5	6	100	0	0
Ostali (14)	32	2,3	23	71,9	9	28,1

Kemoterapijski protokoli: FOLFIRI - kontinuirani 5-FU+irinotekan; FOLFOX - kontinuirani 5-FU+oksaliplatina; XELOX - kaprecitabin+oksaliplatina; Mayo - bolusni 5-FU; de Gramont - kontinuirani 5-FU; Ostali - cisplatina+5-FU, FAC – kombinacija adriamicina, ciklofosfamida i 5-FU u bolusnoj primjeni, ELF – bolusni etopozid i 5-FU

### 5.3.1 Spol ispitanika i toksičnost kemoterapije

Nakon kategorizacije ispitanika u promatranu odnosno kontrolnu skupinu prema jačini nuspojava, primijećena je redistribucija po spolu pri čemu je bilo više žena s razvijenom značajnom toksičnošću (stupanj 3 i 4) nego je to bilo očekivano s obzirom na distribuciju spola u čitavom uzorku (78 žena i 60 muškaraca u nuspojavnoj skupini naspram 69 žena i 98 muškaraca u kontrolnoj skupini). Raspodjela ispitanika po spolu pokazuje signifikantnu povezanost s razvitkom toksičnosti ( $\chi^2=6,4$ ;  $P=0,011$  Fisherovim egzaktnim testom). Analiza logističkom regresijom pokazuje umjereno veći rizik za razvitak nuspojava kod žena ( $OR=1,85$ ;  $IP=1,17-2,9$ ;  $P=0,008$ ). Tablica 14 prikazuje rezultate analize povezanosti i utjecaja spola na toksičnost kemoterapije.



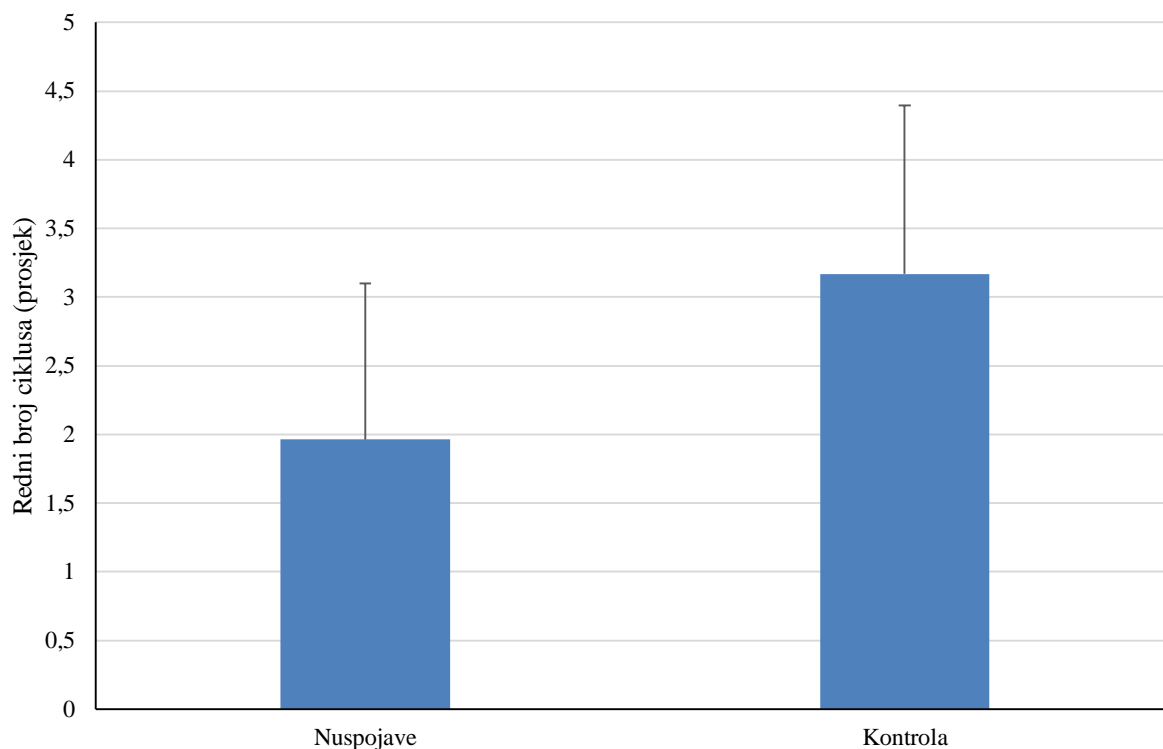
**Tablica 14. Distribucija spola ispitanika u skupinama prema toksičnosti kemoterapije u čitavom uzorku**

Ispitanici	Ukupno	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
Žene	147	78	69	<b>6,4</b>	<b>0,011</b>			
Muškarci	158	60	98			<b>1,85</b>	<b>1,17-2,91</b>	<b>0,008</b>
ukupno	305	138	167					

Kratice:  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Vrijednost je dobivena uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)= 1 za 2x2 tablice. P\* - razina statističke značajnosti dobivena Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijantni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti statističkih varijabli.

### 5.3.2 Brzina nastanka nuspojava

Kao mjera vremena potrebnog za nastanak toksičnosti bilježen je redni broj kemoterapijskog ciklusa iza kojeg se pojavila nuspojava maksimalnog zabilježenog stupnja jačine prema CTCAE kod pojedinog ispitanika. Za promatranu skupinu to su bile reakcije gradusa 3 i 4, a za kontrolnu skupinu reakcije gradusa 1 i 2. Ukoliko su bile prisutne dvije ili više nuspojava istog gradusa, uzeta je u obzir ona koja se pojavila ranije. U skupini s nuspojavama prosječna brzina razvoja toksičnosti bila je statistički značajno veća. Mod brzine nastanka toksičnosti u promatranoj skupini je 1. ciklus, a medijan 2. ciklus. Aritmetička sredina je 1,964 (uz standardnu devijaciju 1,14). U kontrolnoj skupini mod i medijan su 3. ciklus, a aritmetička sredina 3,168 (standardna devijacija 1,23). Statistička značajnost testirana je testom po Mann-Whitney-ju. Dobivena je U-vrijednost od 8002 uz P-vrijednost <0,001. Slika 10 prikazuje grafikon razlike aritmetičke sredine rednog broja ciklusa nastanka nuspojave maksimalne jakosti između promatrane i kontrolne skupine.



#### Slika 10. Prosječna brzina nastanka najjače nuspojave

Visinom stupića prikazana je aritmetička sredina rednog broja kemoterapijskog ciklusa iza kojeg su ispitanici razvili najjaču nuspojavu koju su iskusili tijekom perioda istraživanja (1,964 vs. 3,168). Naznačene su i standardne devijacije. Razlika je statistički značajna ( $P < 0,001$ ;  $U = 8002$  Mann-Whitney-ev test)

#### 5.4 Genotipizacija *DPYD* i *UGT1A1*

Testirana je prisutnost pet polimorfizama u genu za DPD i dobiveni su slijedeći rezultati: **(1)** *c.1905+1G>A (DPYD\*2A)* – ukupno 11 nositelja polimorfizma (frekvencija 3,6% u uzorku), **(2)** *c.496A>G* – 69 nositelja (frekv. 22,6%), **(3)** *c.1679T>G (DPYD\*13)* – nije detektiran nijedan nositelj, **(4)** *c.2846A>T* – ukupno dva nositelja polimorfizma (frekv. 0,65%) i **(5)** *c.1236G>A* – detektirano je 11 nositelja (frekv. 3,6%). Gen za *UGT1A1* testiran je za prisutnost polimorfizma *UGT1A1\*28* kod bolesnika koji su u sklopu FP protokola primali i irinotekan ( $N = 114$ ) – ukupno je pronađeno 66 nositelja (frekv. 57,9%). Tablica 15 zbirno prikazuje rezultate genotipizacije, raspodjelu genotipova u promatranj i kontrolnoj skupini (prema stupnju maksimalne toksičnosti), te rezultate testova povezanosti i logističke regresije.

**Tablica 15. Testirani polimorfizmi gena za DPD i UGT1A1 i njihova raspodjela prema stupnju maksimalne toksičnosti kemoterapije**

Gen	Inačica	Genotip	Stupanj maksimalne toksičnosti		P*	OR (95% IP)	P <sup>lg</sup>
			0-2, N=167 N (%)	3-4, N=138 N (%)			
DPYD	c.1905+1G>A (*2A)	GG	167 (100)	127 (92,03)	<b>0,001</b>	-	-
		GA	0 (0)	10 (7,25)			
		AA	0 (0)	1 (0,72)			
DPYD	c.496A>G	AA	150 (89,82)	86 (62,32)	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,03 (2,7-9,3)</b>	<b>&lt;0,001</b>
		AG	17 (10,18)	49 (35,51)			
		GG	0 (0)	3 (2,17)			
DPYD	c.1679T>G (*13)	TT	167 (100)	138 (100)	-	-	-
		TG	0 (0)	0 (0)			
		GG	0 (0)	0 (0)			
DPYD	c.2846A>T	AA	167 (100)	136 (98,55)	0,296	-	-
		AT	0 (0)	1 (0,72)			
		TT	0 (0)	1 (0,72)			
DPYD	c.1236G>A	GG	159 (95,21)	135 (97,83)	0,356	0,44 (0,1-1,7)	0,234
		GA	8 (4,79)	3 (2,17)			
		AA	0 (0)	0 (0)			
UGT1A1	*28	*1/*1	42 (25,15)	13 (9,42)	<b>&lt;0,001</b>	<b>5,47 (2,1-14)</b>	<b>&lt;0,001</b>
		*1/*28	23 (13,77)	27 (19,57)			
		*28/*28	8 (4,79)	20 (14,49)			

P\* - razina statističke značajnosti kod testa povezanosti ( $\chi^2$ -test). OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, izračun OR nije moguć. Povebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti izračunatih varijabli.

#### 5.4.1 Genotipizacija *DPYD\*2A*

Genotipiziranjem *DPYD\*2A* (*c.1905+1G>A*, *IVS14+1G>A*) pronađeno je kod 305 testiranih ispitanika ukupno 11 nositelja mutacije (učestalost 3,6%), od čega 10 heterozigota i jedan homozigot. Svi nositelji SNP-a *\*2A* razvili su nuspojave 3. i 4. stupnja nakon primjene kemoterapije, što je kod homozigotnog nositelja rezultiralo smrtnim ishodom zbog toksičnosti (mukozitis, proljev, refraktorna neutropenija, septički šok s višesustavnim zatajenjem organa). Razlika distribucije genotipova bila je statistički značajna ( $\chi^2=13,81$ ;  $P=0,001$ ).

**Tablica 16. Učestalost genotipova i alela *DPYD\*2A* (*c.1905+1G>A*) u promatranoj i kontrolnoj skupini**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi c.1905+1G&gt;A</b>							
GG	127	167	<b>13,81</b>	<b>0,001</b>			
GA	10	0			-	-	-
AA	1	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>-dihotomizacija</b>							
wt	127	167	<b>11,61</b>	<b>&lt;0,001</b>			
mut	11	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>Aleli c.1905+1G&gt;A</b>							
G	264	334	<b>12,64</b>	<b>&lt;0,001</b>			
A	12	0			-	-	-
ukupno	276	334					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3, a df=1 za 2x2 tablice. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom, a za tablice 2x2 P dobiven Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti izračunatih varijabli.

Dihotomizacijom genotipova na divlji tip vs. mutirani (wt vs. mut, od engl. *wild type*) razina statistike značajnosti se povećava ( $P<0,001$ ; Fisherov egzaktni test). Analiza distribucije alela (*c.1905+1G* vs. *c.1905+1A*) pokazuje sličan rezultat ( $\chi^2=12,64$ ;  $P<0,001$ ; Fisherov egzaktni

test). Izračun omjera izgleda (OR, od engl. *odds ratio*) nije bio moguć jer nije bilo zabilježenih polimorfizama *DPYD\*2A* u kontrolnoj skupini (ispitanici s nuspojavama stupnja 0, 1 i 2). Tablica 16 prikazuje rezultate genotipizacije *DPYD\*2A* i raspodjelu polimorfizama prema toksičnosti kemoterapije.

#### 5.4.2 Genotipizacija *c.496A>G*

Genotipiziranjem *c.496A>G* pronađeno je kod 305 testiranih ispitanika ukupno 69 nositelja mutacije (učestalost 22,6%), od čega 66 heterozigota i 3 homozigota. Svi homozigoti (*c.496G/G*) su razvili nuspojave 3. stupnja i više (dva ispitanika su primala FOLFIRI protokol i bili su također heterozigoti *UGT1A1\*28*, treći bolesnik je primao monoterapiju kapecitabinom).

**Tablica 17. Učestalost i utjecaj genotipova i alela *DPYD c.496A>G* na razvoj nuspojava 3. i 4. stupnja**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi <i>c.496A&gt;G</i></b>							
AA	86	150	<b>33,42</b>	<b>&lt;0,001</b>			
AG	49	17			<b>5,03</b>	<b>2,73-9,27</b>	<b>&lt;0,001</b>
GG	3	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>-dihotomizacija</b>							
wt	86	150	<b>31,1</b>	<b>&lt;0,001</b>			
mut	52	17			<b>5,335</b>	<b>2,9-9,8</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	138	167					
<b>Aleli <i>c.496A&gt;G</i></b>							
A	221	317	<b>30,55</b>	<b>&lt;0,001</b>			
G	55	17			<b>4,64</b>	<b>2,62-8,21</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	276	334					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3, a df=1 za 2x2 tablice. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom, a za tablice 2x2 P dobiven Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti izračunatih varijabli.

Heterozigoti (*c.496A/G*) su se prema jačini nuspojava razdvojili u obje skupine pri čemu je veći broj bolesnika razvio toksični stupanj 3 i 4 (49 vs. 17 u pokusnoj odnosno kontrolnoj skupini). Razlika distribucije genotipova bila je statistički značajna ( $\chi^2=33,42$ ;  $P<0,001$ ). Dokazan je također statistički značajan utjecaj heterozigotnog statusa na nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja univarijatnom logističkom regresijom (OR=5,03; 95%-tni interval pouzdanosti (IP)=2,73-9,27;  $P<0,001$ ). Drugim riječima heterozigoti za *c.496A>G* imaju oko 5 puta veći rizik za nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja. Dihotomizacijom genotipova (wt vs. mut) dobiveni su približno jednaki rezultati povezanosti mutiranog statusa i toksičnosti ( $\chi^2=31,1$ ;  $P<0,001$ ; Fisherov egzaktni test), kao i univarijatne logističke regresije (OR=5,335; IP=2,9-9,8;  $P<0,001$ ). Nositelji polimorfizma *c.496A>G* imaju oko 5 puta veći rizik za razvoj toksičnosti gradusa 3 i 4. Analiza distribucije alela (*c.496A* vs. *c.496G*) pokazuje sličan rezultat ( $\chi^2=30,55$ ;  $P<0,001$ ; OR=4,64; IP=2,62-8,21;  $P<0,001$ ). Tablica 17 prikazuje rezultate genotipizacije *c.496A>G* i raspodjelu polimorfizama prema toksičnosti kemoterapije.

#### 5.4.3 Genotipizacija *c.2846A>T*

Genotipiziranjem *c.2846A>T* pronađena su kod 305 testiranih ispitanika ukupno 2 nositelja mutacije (učestalost 0,65%), od čega 1 heterozigot i 1 homozigot. Oba nositelja SNP-a *c.2846A>T* razvili su nuspojave 3. ili 4. stupnja nakon primjene kemoterapije,

Heterozigotna nositeljica polimorfizma istovremeno je bila homozigot za *UGT1A1\*28* inačicu (Gilbertov sindrom) i razvila je sepsu i toksičnu kardiomiopatiju nakon prvog ciklusa kemoterapije protokolom FOLFIRI. Homozigotna nositeljica razvila je nakon 3. ciklusa Mayo protokola 3. stupanj mučnine i povraćanja te mukozitisa, praćeno s općom slabošću, te proljevima i neutropenijom 2. stupnja.

Razlika distribucije genotipova nije bila statistički značajna ( $\chi^2=2,44$ ;  $P=0,296$ ). Dihotomizacijom genotipova (wt vs. mut) rezultat ostaje statistički neznačajan ( $P=0,204$ ; Fisherov egzaktni test). Analiza distribucije alela (*c.2846A* vs. *c.2846T*) pokazuje sličan rezultat ( $\chi^2=1,765$ ;  $P=0,092$ ; Fisherov egzaktni test). Izračun OR nije bio moguć jer nije bilo zabilježenih polimorfizama u kontrolnoj skupini. Zbog male frekvencije mutiranih inačica logistička regresija nije bila provediva. Nije pokazan statistički značajan učinak mutiranog statusa za polimorfizam *c.2846A>T* na nastanak toksičnosti gradusa 3 i 4. Tablica 18 prikazuje rezultate genotipizacije *c.2846A>T* i raspodjelu prema toksičnosti kemoterapije.

**Tablica 18. Učestalost genotipova i alela *DPYD c.2846A>T* u promatranjoj i kontrolnoj skupini**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi <i>c.2846A&gt;T</i></b>							
AA	136	167	2,44	0,296			
AT	1	0			-	-	-
TT	1	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>-dihotomizacija</b>							
wt	136	167	0,72	0,204			
mut	2	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>Aleli <i>c.2846A&gt;T</i></b>							
A	273	334	1,765	0,092			
T	3	0			-	-	-
ukupno	276	334					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3, a df=1 za 2x2 tablice. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom, a za tablice 2x2 P dobiven Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, izračun OR nije moguć.

#### 5.4.4 Genotipizacija *c.1236G>A*

Genotipiziranjem *c.1236G>A* pronađeno je kod 305 testiranih ispitanika ukupno 11 nositelja mutacije (učestalost 3,6%). Svi detektirani ispitanici bili su heterozigoti za ispitivani SNP. 3 nositelja *c.1236G>A* razvili su nuspojave 3. i 4. stupnja nakon primjene kemoterapije, dok 8 heterozigotnih nositelja nije razvilo teži oblik toksičnosti.

Jedna nositeljica polimorfizma je složeni heterozigot genotipa *496G/1236A* i razvila je neutropeniju i mučninu s povraćanjem 3. stupnja nakon 2. ciklusa ELF protokola, praćeno s proljevima, malaksalošću i inapetencijom 2. stupnja, u sklopu liječenja metastatskog karcinoma želuca. Heterozigotni nositelj polimorfizma istovremeno je homozigot za *UGT1A1\*28* inačicu (Gilbertov sindrom) te se prezentirao neutropenijom 4. stupnja nakon prvog ciklusa kemoterapije protokolom FOLFIRI. Drugi heterozigotni nositelj polimorfizma

liječen je adjuvantno konkomitantnom kemo-radioterapijom s protokolom Mayo te je razvio proljeve 3. stupnja nakon 3. ciklusa kemoterapije uz zračenje, praćeno mućninom i bolovima u trbuhu 2. stupnja.

Razlika u distribuciji mutiranih genotipova prema skupinama nije bila statistićki znaćajna ( $\chi^2=0,83$ ;  $P=0,356$ ). Logistićkom regresijom pokazan je statistićki nesignifikantan trend k „zaštiti“ od razvitka nuspojava kod nositelja SNP ( $OR=0,44$ ;  $IP=0,115-1,7$ ;  $P=0,234$ ), budući da je veći broj heterozigota detektiran u kontrolnoj skupini. Dihotomizacija genotipova (wt vs. mut) kod polimorfizma *c.1236G>A* nije prikazana zato što nije detektiran niti jedan homozigot, te je stoga raspodjela ućestalosti i statistića analiza nakon dihotomizacije bila istovjetna ućestalostima i rezultatima analize kod genotipova *c.1236G>A*. Tablica 19 prikazuje rezultate genotipizacije *c.1236G>A* prema toksićnosti kemoterapije.

**Tablica 19. Ućestalost genotipova i alela *DPYD c.1236G>A* u promatranjoj i kontrolnoj skupini**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi <i>c.1236G&gt;A</i></b>							
GG	135	159	0,83	0,356			
GA	3	8			0,44	0,115-1,7	0,234
AA	0	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>Aleli <i>c.1236G&gt;A</i></b>							
G	273	326	0,815	0,36			
A	3	8			0,45	0,118-1,7	0,239
ukupno	276	334					

Za polimorfizam *c.1236G>A* izostavljena je dihotomizacija genotipova (wt/mut) jer su izmjerene ućestalosti i vrijednosti izraćunatih statistićkih varijabli nakon dihotomizacije istovjetne nedihotomiziranih genotipovima, zato što nije detektiran niti jedan homozigot u uzorku. Kratice:  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3, a df=1 za 2x2 tablicu. P\* - razina statistiće znaćajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom, a za tablice 2x2 P dobiven Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statistiće znaćajnosti kod logistiće regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost ućestalosti „0“, izraćun OR nije moguć.

Analiza distribucije alela (*c.1236G* vs. *c.1236A*) pokazuje rezultat slićan analizi genotipova ( $\chi^2=0,815$ ;  $P=0,36$ ; Fisherov egzaktni test,  $OR=0,45$ ;  $IP=0,118-1,7$ ;  $P=0,239$ ). Ućinjenom analizom nije pokazana relevantnost polimorfizma *c.1236G>A* glede nastanka toksićnosti.



#### 5.4.5 Genotipizacija *DPYD\*13*

Genotipiziranjem *DPYD\*13* (c.1679T>G) nije pronađen niti jedan polimorfizam kod 305 ispitanika. Stoga za navedenu inačicu nema tabličnog prikaza rezultata, niti je provedena daljnja statistička analiza.

#### 5.4.6 Genotipizacija *UGT1A1\*28*

Polimorfizam gena za *UGT1A1* analiziran je u podskupini ispitanika koji su, osim s FP, kemoterapijski liječeni irinotekanom (protokol FOLFIRI). Enzim ima kritičnu ulogu u metaboličkom putu pretvorbe irinotekana zbog čega je njegov gen nezaobilazan prilikom istraživanja pojavnosti nuspojava uz polikemoterapijske protokole koji sadrže irinotekan.

Genotipiziranjem *UGT1A1\*28* pronađeno je kod 114 testiranih ispitanika ukupno 66 nositelja mutacije (učestalost 57,89%), od čega 43 heterozigota i 23 homozigota.

Heterozigoti (*UGT1A1\*1/\*28*) su zastupljeni u obje skupine prema toksičnosti kemoterapije, pri čemu je veći broj heterozigotnih nositelja razvio 3. i 4. stupanj toksičnosti (24 vs. 19 u pokusnoj odnosno kontrolnoj skupini). Učestalost homozigota (*UGT1A1\*28/\*28*) pokazuje uvjerljiviju razdiobu prema toksičnosti: 19 homozigota prisutno je u skupini sa značajnom toksičnošću naspram 4 homozigota u kontrolnoj skupini. Razlika distribucije genotipova bila je statistički značajna ( $\chi^2=28,46$ ;  $P<0,001$ ). Dokazan je također statistički značaj utjecaja heterozigotnog odnosno homozigotnog statusa na nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja univarijatnom logističkom regresijom (heterozigoti: OR=5,47; IP=2,13-14,04;  $P<0,001$ , homozigoti: OR=20,58; IP=5,6-75,46;  $P<0,001$ ). Drugim riječima heterozigoti za *UGT1A1\*28* imaju oko 5 puta, a homozigoti oko 20 puta veći rizik za nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja nakon primjene kemoterapije po protokolu FOLFIRI. Dihotomizacijom genotipova (wt vs. mut) dobiveni su slični rezultati povezanosti mutiranog statusa i nastanka toksičnosti ( $\chi^2=22,28$ ;  $P<0,001$ ; Fisherov egzaktni test). Univarijatna logistička regresija dihotomiziranih rezultata pokazuje uprosječni rezultat koji predstavlja kombinaciju utjecaja heterozigotnog i homozigotnog statusa (OR=8,101; IP=3,35-19,61;  $P<0,001$ ). Analiza distribucije alela (*UGT1A1\*1* vs. *UGT1A1\*28*) pokazuje statistički značajnu povezanost prisutnosti alela *UGT1A1\*28* i toksičnosti, kao i pojačani rizik za nastanak nuspojava 3. i 4. stupnja kod nositelja *UGT1A1\*28* ( $\chi^2=32,46$ ;  $P<0,001$ ; OR=5,3; IP=2,97-9,46;  $P<0,001$ ). Tablica 20 prikazuje rezultate genotipizacije *UGT1A1\*28* prema toksičnosti kemoterapije.

**Tablica 20. Utjecaj genotipova i alela *UGT1A1*\*28 na toksičnost u podskupini ispitanika liječenih protokolom FOLFIRI**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi</b>							
<b><i>UGT1A1</i>*28</b>							
*1/*1	9	39	<b>28,46</b>	<b>&lt;0,001</b>			
*1/*28	24	19			<b>5,47</b>	<b>2,13-14,04</b>	<b>&lt;0,001</b>
*28/*28	19	4			<b>20,58</b>	<b>5,6-75,46</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	52	62					
<b>-dihotomizacija</b>							
wt	9	39	<b>22,28</b>	<b>&lt;0,001</b>			
mut	43	23			<b>8,101</b>	<b>3,35-19,61</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	52	62					
<b>Aleli</b>							
<b><i>UGT1A1</i>*28</b>							
*1	42	97	<b>32,46</b>	<b>&lt;0,001</b>			
*28	62	27			<b>5,3</b>	<b>2,97-9,46</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	104	124					

Genotipizacija *UGT1A1*\*28 provedena je samo kod bolesnika čiji je kemoterapijski protokol sadržavao irinotekan, zato što *UGT1A1* ima ključnu enzimsku ulogu u metabolizmu irinotekana, a ne fluoropirimidina. Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3, a df=1 za 2x2 tablice. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom, a za tablice 2x2 P dobiven Fisherovim egzaktnim testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti izračunatih varijabli.

## 5.5 Zbirna analiza povezanosti i utjecaja genotipova i alela *DPYD* na toksičnost

U istraživanom uzorku od 305 ispitanika liječenih fluoropirimidinskom kemoterapijom detektirano je ukupno 89 nositelja nekog od testiranih polimorfizama *DPYD*. Ukupno gledajući učestalost mutacija *DPYD* u uzorku iznosi 29,18%. Od pet testiranih genskih inačica detektirali smo nositelje za četiri od njih (\*2A, 496G, 2846T i 1236A) dok su svi ispitanici bili negativni za polimorfizam *DPYD*\*13. U skupinama prema razvijenoj toksičnosti prisutan je nejednaki udio nositelja mutiranog gena *DPYD*. Tako se u skupini sa značajnom toksičnošću (stupanj 3 i 4) nalazi 64, a u kontrolnoj skupini (stupanj 0, 1 i 2) je ukupno 25 nositelja testiranih polimorfizama.

Detektirane mutacije grupiraju se u 9 genotipova od čega su 4 heterozigotna (\*1/\*2A, \*1/496G, \*1/2846T, \*1/1236A), 3 su homozigotna (\*2A/\*2A, 496G/G, 2846T/T), a 2 su složeni heterozigoti (\*2A/496G i 496G/1236A). Složene heterozigote funkcijski smo pribrojili homozigotima jer ispitanici nose dvije mutacije *DPYD*. Nejednakost raspodjele svih detektiranih genotipova u skupine prema toksičnosti statistički je značajna u testu povezanosti ( $\chi^2=52,37$ ;  $P<0,001$ ), dok je procjena rizika za razvitak toksičnosti logističkom regresijom mogla biti učinjena samo za heterozigote genotipa 496G (OR=5,08; IP=2,72-9,49;  $P<0,001$ ) i 1236A (OR=0,48; IP=0,1-2,32;  $P=0,361$ ), obzirom da preostali genotipovi nisu bili detektirani kod ispitanika u kontrolnoj skupini.

Zbirna analiza grupiranih genotipova (wt vs. heterozigoti vs. homozigoti) pokazuje statistički značajno veći broj nositelja mutacija u skupini s nuspojavama stupnja 3 i 4 ( $\chi^2=39,25$ ;  $P<0,001$ ). Regresijskom analizom dokazan je statistički značajan, približno 4 puta veći rizik za razvoj toksičnosti kod heterozigota za mutaciju *DPYD* (OR=4,22; IP=2,44-7,32;  $P<0,001$ ). Analiza prema detektiranim alelima *DPYD* (\*2A, 496G, 2846T, 1236A) također pokazuje statistički značajno veći broj mutiranih alela u skupini s toksičnošću 3. i 4. stupnja ( $\chi^2=54,25$ ;  $P<0,001$ ). Regresijska analiza pokazuje povećanje rizika za toksičnost uz alel 496G (OR=4,92; IP=2,78-8,72;  $P<0,001$ ), dok je regresijska analiza alela 1236A bila statistički neznčajna (OR=0,57; IP=0,15-2,18;  $P=0,412$ ).

Razlika u raspodjeli nositelja testiranih genskih inačica *DPYD* nakon dihotomizacije (wt vs. mut) između skupina je statistički značajna u testovima povezanosti i regresijskoj analizi ( $\chi^2=34,56$ ;  $P<0,001$ ; OR=4,91; IP=2,86-8,44;  $P<0,001$ ).

U tablici 21 prikazani su zbirni rezultati genotipizacije *DPYD* i njihova raspodjela prema težini nuspojava kemoterapije.

**Tablica 21. Analiza utjecaja genotipova i alela *DPYD* na toksičnost u čitavom uzorku (svi kemoterapijski protokoli)**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi</b>							
<b><i>DPYD</i></b>							
*1/*1	74	142	<b>52,37</b>	<b>&lt;0,001</b>			
*1/*2A	7	0			-	-	-
*1/496G	45	17			<b>5,08</b>	<b>2,72-9,49</b>	<b>&lt;0,001</b>
*1/2846T	1	0			-	-	-
*1/1236A	2	8			0,48	0,1-2,32	0,361
*2A/*2A	1	0			-	-	-
496G/G	3	0			-	-	-
2846T/T	1	0			-	-	-
*2A/496G	3	0			-	-	-
496G/1236A	1	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>Aleli</b>							
<b><i>DPYD</i></b>							
*1	203	309	<b>54,25</b>	<b>&lt;0,001</b>			
*2A	12	0			-	-	-
496G	55	17			<b>4,92</b>	<b>2,78-8,72</b>	<b>&lt;0,001</b>
2846T	3	0			-	-	-
1236A	3	8			0,57	0,15-2,18	0,412
ukupno	276	334					
<b>Genotipovi zbirno</b>							
wt/wt	74	142	<b>39,25</b>	<b>&lt;0,001</b>			
wt/mut	55	25			<b>4,22</b>	<b>2,44-7,32</b>	<b>&lt;0,001</b>
mut/mut	9	0			-	-	-
ukupno	138	167					
<b>Genotipovi (dihotomizacija)</b>							
wt	74	142	<b>34,56</b>	<b>&lt;0,001</b>			
mut	64	25			<b>4,91</b>	<b>2,86-8,44</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	138	167					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3 tablicu, df=1 za 2x2 tablicu, df=4 za 2x5 i df=9 za 2x10 tablicu. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x2 prikazan je P dobiven Fisherovim egzaktnim testom, a za ostale tablice (2x3 i više) prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom. OR = univarijantni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, za to obilježje izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti statističkih varijabli.

## 5.6 Analiza utjecaja genotipova *DPYD* na toksičnost mono-fluoropirimidinskih protokola (kapecitabin, Mayo i de Gramont)

Da bismo dodatno ispitali relevantnost testiranih mutacija *DPYD* na nastanak toksičnosti kemoterapije iz analize smo isključili ispitanike koji su primali druge citostatike osim FP. Drugim riječima, dodatnom analizom obuhvatili smo bolesnike liječene isključivo s FP (kapecitabin, protokoli Mayo i de Gramont; N=149). Opravdanost takvog postupka proistječe iz činjenice da enzimska aktivnost DPD utječe isključivo na metabolizam FP.

U podskupini od 149 ispitanika liječenih mono-fluoropirimidinskom kemoterapijom detektirano je ukupno 44 nositelja nekog od testiranih polimorfizama *DPYD*. U skupinama prema razvijenoj toksičnosti prisutan je nejednaki broj nositelja mutiranog gena *DPYD*. Tako se u skupini sa nuspojavama (gr. 3 i 4) nalazi 38, a u kontrolnoj skupini (gr. 0, 1 i 2) je ukupno 6 nositelja testiranih polimorfizama.

Zbirna analiza grupiranih genotipova (wt/heterozigoti/homozigoti) pokazuje statistički značaj razlike broja nositelja mutacija ( $\chi^2=31,39$ ;  $P<0,001$ ). Regresijskom analizom dokazan je statistički značajan, približno 10 puta povećani rizik za razvoj toksičnosti kod heterozigota za mutacije *DPYD* (OR=10,58; IP=4,1-27,4;  $P<0,001$ ). Učinak homozigotnosti nije podložan regresiji jer nije detektiran homozigot u kontrolnoj skupini (frekvencija=0).

Nakon dihotomizacije genotipizacijskih rezultata (wt vs. mut) ponovno je učinjena analiza povezanosti i logistička regresija. Razlika u raspodjeli nositelja testiranih genskih inačica između skupina je statistički značajna ( $\chi^2=29,26$ ;  $P<0,001$ ; OR=11,17; IP=4,32-28,8;  $P<0,001$ ).

Učinjenom analizom dokazan je snažan utjecaj mutiranog statusa *DPYD* u testiranoj podskupini. Sukladno opisanim rezultatima, ukoliko se planira terapija s mono-FP, kod nositelja polimorfizma *DPYD* se zbirno može očekivati oko 11 puta veći rizik za razvoj toksičnosti 3. i 4. stupnja po CTCAE. U tablici 22 prikazani su zbirni rezultati genotipizacije *DPYD* u podskupini bolesnika liječenih s mono-FP terapijom.

**Tablica 22. Analiza utjecaja genotipova *DPYD* na toksičnost u podskupini ispitanika liječenih isključivo fluoropirimidinima**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi <i>DPYD</i></b>							
wt/wt	38	67	<b>31,39</b>	<b>&lt;0,001</b>			
wt/mut	36	6			<b>10,58</b>	<b>4,1-27,4</b>	<b>&lt;0,001</b>
mut/mut	2	0			-	-	-
ukupno	76	73					
<b>Genotipovi (dihotomizacija)</b>							
wt	38	67	<b>29,26</b>	<b>&lt;0,001</b>			
mut	38	6			<b>11,17</b>	<b>4,3-28,8</b>	<b>&lt;0,001</b>
ukupno	76	73					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3 tablicu, df=1 za 2x2 tablicu. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x2 prikazan je P dobiven Fisherovim egzaktnim testom, a za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, za to obilježje izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti statističkih varijabli.

### 5.7 Analiza utjecaja genotipova *DPYD* na toksičnost protokola FOLFIRI

Kako bismo specifično ispitali utjecaj testiranih genskih čimbenika na nastanak toksičnosti kod bolesnika liječenih kombinacijskim protokolom FP i irinotekana (FOLFIRI; N=114), ponovili smo analizu utjecaja genotipova *DPYD* na toksičnost u podskupini bolesnika liječenih tim protokolom. Ovakva dodatna primjena navedenih analiza u toj podskupini proizlazi iz dokazane relevantnosti genotipova *DPYD* za nastanak toksičnosti FP u čitavom uzorku i snažnog učinka statusa *UGT1A1* na nastanak toksičnosti protokola FOLFIRI.

U podskupini od 114 ispitanika liječenih kombinacijom FP i irinotekana detektirano je ukupno 33 nositelja nekog od testiranih polimorfizama *DPYD*. U skupinama prema razvijenoj toksičnosti prisutan je nejednaki broj nositelja mutiranog gena *DPYD*. Tako se u skupini sa nuspojavama (gr. 3 i 4) protokola FOLFIRI nalazi 20, a u kontrolnoj skupini (gr. 0, 1 i 2) je ukupno 13 nositelja testiranih polimorfizama.

Zbirna analiza grupiranih genotipova (wt/heterozigoti/homozigoti) pokazuje statistički značajno veći broj nositelja mutacija u nuspojavnju skupini ( $\chi^2=6,27$ ; P=0,043). Regresijskom analizom nije dokazan statistički značajan utjecaj na razvoj toksičnosti kod heterozigota za

mutacije *DPYD* (OR=2; IP=0,86-4,68; P=0,11). Učinak homozigotnosti nije mogao biti testiran logističkom regresijom jer nije bilo homozigota u kontrolnoj skupini (frekvencija=0). Nakon dihotomizacije rezultata genotipizacije (wt vs. mut) ponovno je učinjena analiza povezanosti i logistička regresija. Razlika u raspodjeli nositelja testiranih genskih inačica između skupina nije statistički značajna ( $\chi^2=3,4$ ; P=0,061; OR=2,36; IP=1,03-5,4; P=0,043). Učinjenom analizom pokazan je minoran, ali statistički značajan utjecaj mutiranog statusa *DPYD* na nastanak toksičnosti protokola FOLFIRI. Temeljem navedenog može se zaključiti da zbirno analizirani polimorfizmi *DPYD* imponiraju relevantni i za nastanak nuspojava prilikom kemoterapijskog liječenja protokolom FOLFIRI. Kod nositelja nekog od polimorfizama *DPYD* se zbirno može očekivati 2 puta veći rizik za razvoj toksičnosti 3. i 4. stupnja po CTCAE.

Načelno se može ustvrditi da se prilikom genskog testiranja radi procjene rizika za razvoj značajnih nuspojava protokola FOLFIRI trebaju osim polimorfizama *UGT1A1* uzeti u obzir i polimorfizmi *DPYD*. U tablici 23 prikazani su zbirni rezultati genotipizacije *DPYD* u podskupini bolesnika liječenih kemoterapijom po protokolu FOLFIRI.

**Tablica 23. Analiza utjecaja genotipova *DPYD* na toksičnost u podskupini ispitanika liječenih protokolom FOLFIRI**

	Nuspojave (gr. 3 i 4)	Kontrole (gr. 0,1 i 2)	$\chi^2$	P*	OR	95% IP	P <sup>lg</sup>
<b>Genotipovi <i>DPYD</i></b>							
wt/wt	32	49	<b>6,27</b>	<b>0,043</b>			
wt/mut	17	13			2	0,86-4,68	0,11
mut/mut	3	0			-	-	-
ukupno	52	62					
<b>Genotipovi (dihotomizacija)</b>							
wt	32	49	3,4	0,061			
mut	20	13			<b>2,36</b>	<b>1,03-5,4</b>	<b>0,043</b>
ukupno	52	62					

Kratice: wt – divlji tip genotipa (od engl. *wild type*), mut – svi mutirani genotipovi (heterozigoti + homozigoti).  $\chi^2$  - vrijednost hi-kvadrata. Kod 2x2 kontingencijskih tablica vrijednosti su dobivene uz korištenje Yatesove korekcije. Stupnjevi slobode (df)=2 za 2x3 tablicu, df=1 za 2x2 tablicu. P\* - razina statističke značajnosti kod testova povezanosti. Za tablice 2x2 prikazan je P dobiven Fisherovim egzaktnim testom, a za tablice 2x3 prikazan je P dobiven  $\chi^2$ -testom. OR = univarijatni omjer izgleda (engl. *odds ratio*); 95% IP = 95%-tni interval pouzdanosti za omjer izgleda. P<sup>lg</sup> - razina statističke značajnosti kod logističke regresije. Ukoliko tablica kontingencije sadrži vrijednost učestalosti „0“, za to obilježje izračun OR nije moguć. Podebljanim brojevima otisnute su statistički značajne vrijednosti statističkih varijabli.

## 6 Rasprava

Tijekom istraživanja uloge polimorfizama gena *DPYD* i *UGT1A1* u nastanku toksičnosti citostatika, prikupljeni su podaci o svakoj reakciji na lijek (FP, irinotekan) kod pojedinog ispitanika kako bismo stekli uvid u sve neželjene događaje nastale tijekom istraživanog perioda od tri mjeseca nakon početka kemoterapije. Nikakve kategorije nuspojava pri tome nisu bile pre-definirane, niti je iz bilježenja toksičnih reakcija bio unaprijed isključen neki tip neželjenog događaja. U studiji nisu bili korišteni instrumenti bolesničkog izvještavanja učinka (PRO, od engl. *patient reported outcome*), što se može smatrati nedostatkom istraživanja. (121) Sve registrirane nuspojave su dobivene uporabom anamneze, fizikalnog pregleda i dijagnostičke obrade te pripadaju u kategoriju „opažateljevog izvještavanja učinka“ (ORO, od engl. *observer reported outcome*). Primjena PRO metodologije za prikupljanje podataka o reakcijama na lijek nesumnjivo bi omogućila dodatni uvid u kvalitetu i posljedice toksičnih reakcija iz perspektive bolesnika, te je u novije vrijeme u sve češćoj uporabi, posebno u studijama onkoloških bolesnika. (122, 123) Navedeno se ne može smatrati ozbiljnom zamjerkom istraživanju jer je koncept još uvijek u tijeku uvođenja i validacije i nije široko prihvaćen. (124). Pretragom literature nismo našli sličnih farmakogenetičkih studija koje bi upotrebljavale takvu metodologiju.

Premda se u publiciranim farmakogenetičkim studijama kadšto susreće bilježenje samo onih nuspojava koje se smatraju specifičnim za određeni lijek (primjerice proljev i neutropenija kod irinotekana), pojednostavljenje definiranja toksičnosti i isključivanje pojedinih nuspojava kao nepoželjnih činilo nam se neopravdanim pristupom za istraživanje genske uvjetovanosti toksičnih reakcija. Naime teško je predvidjeti pojavnost neželjenih reakcija i njihovo značenje u odnosu na cjelovitu gensku pozadinu istraživanog uzorka.

Također, detaljno bilježenje nuspojava koje su se prezentirale kod pojedinog bolesnika u istraživanoj kohorti činilo nam se kao razuman i opravdan postupak jer u dostupnoj literaturi nismo našli podatke o nuspojavama kemoterapijskih protokola temeljenih na FP kod bolesnika hrvatskog podrijetla.

Stoga vjerujemo da smo širokim obuhvatom svih neželjenih reakcija na našem uzorku dobili relevantan uvid u način toksičnog reagiranja naših bolesnika na istraživane kemoterapijske protokole.

Svaka zabilježena nuspojava kategorizirana je po jačini sukladno međunarodno prihvaćenoj ordinalnoj skali (CTCAE ver. 4). Dobiveni semikvantitativni podaci usporedivi su između studija i omogućili su nam dihotomizaciju podataka o toksičnosti te kategorizaciju ispitanika u



skupinu visoke toksičnosti (gradus 3 i 4; promatrana skupina) i skupinu niske toksičnosti (gradus 0, 1 i 2; kontrolna skupina) čime je omogućena planirana analiza povezanosti i utjecaja genskih polimorfizama na nastanak toksičnosti, što je primarni cilj ovog istraživanja. Takav pristup korišten je i u objavljenim studijama na većim kohortama bolesnika. (125)

Mali broj detektiranih nositelja pojedinih polimorfizama *DPYD* onemogućio je detaljniju prosudbu učinka polimorfizama na pojedine tipove nuspojava (neutropenija, mukozitis, proljev) zbog čega su sve analize provedene prema kategoriziranim skupinama ispitanika prema zbirnoj jačini toksičnosti. Smatramo da je u ovom ispitivanju postignut velik broj zabilježenih toksičnih reakcija koje dobro definiraju pokusnu skupinu naspram kontrolne.

Osim po kvalitativnom kriteriju skupine su se dobro razlikovale i po ukupnom broju zabilježenih nuspojava po ispitaniku. Premda je dosegnuto statistički signifikantno razdvajanje po tom kriteriju, smatramo da je ranije odabrani kriterij definiranja po jačini toksične reakcije kvalitetniji kriterij za kategorizaciju ispitanika u skupine prema razvijenoj toksičnosti, zato što je skala za ocjenu jačine toksične reakcije normirana i objektivizirana (CTCAE), dočim broj zabilježenih nuspojava po ispitaniku nije normiran po nijednom dostupnom međunarodnom normativu ili smjernici. Osim toga, percepcija prisutnosti/odsutnosti nuspojave i time njihov ukupni broj po ispitaniku podložni su subjektivnoj procjeni i sposobnosti izražavanja ispitanika, a također i ispitivača.

Genotipizacija *DPYD* načelno je učinkovita metoda procjene rizika za razvoj toksičnosti kemoterapije prije primjene FP. (84) U ovom radu testirali smo sve tri etablirane i u smjernice uključene inačice tog gena (*\*2A*, *\*13*, *c.2846A>T*), pri čemu je statistički značajan rezultat dobiven samo u testovima povezanosti *DPYD\*2A* i toksičnosti 3. i 4. stupnja. Činjenica da nismo uspjeli dokazati statistički značajan utjecaj pojedinačnih mutacija *DPYD* koje su prihvaćene kao funkcijski bitne mogla bi se smatrati nedostatkom ovog istraživanja, no analiza rezultata bila je otežana malim brojem detektiranih nositelja. Moguće uzroke takve pojavnosti treba tražiti kako u relativno malom uzorku obuhvaćenom ovim istraživanjem, tako i u niskoj očekivanoj frekvenciji tih triju varijanti. Nadalje, mogući razlog takvih rezultata može proistjecati iz posebnosti etničke pripadnosti odnosno genskog podrijetla ispitanika. Međutim, o tome ne možemo donositi valjani zaključak temeljem naših rezultata također zbog relativno malog uzorka i činjenice da ovo nije populacijska studija.

Ukoliko se uzme u obzir kvantum publiciranih informacija o *DPYD*\*2A, smatramo da je ipak dosegnut jedan od primarnih ciljeva ovog istraživanja – pokazana je prisutnost polimorfizma i njegova povezanost s toksičnim reakcijama na uzorku bolesnika liječenih fluoropirimidinima u sklopu hrvatskog zdravstvenog sustava (Tablica 16).

Obzirom da smo *a priori* pretpostavili mogućnost malog broja detektiranih nositelja etabliranih polimorfizama *DPYD*, u analizu smo uključili dvije dodatne inačice koje se češće bilježe u europskoj populaciji temeljem recentno objavljenih studija koje ukazuju na njihovu moguću važnost za funkcijski izražaj i aktivnost DPD, barem u nekim etničkim i drugim podskupinama bolesnika. To su *c.496A>G* i *c.1236G>A*. Pri tome je dobiven statistički značajan rezultat za utjecaj *c.496A>G* na nastanak toksičnosti, što je u suglasju sa studijama Gross E (100), Falvella FS (99) i Gentile G (126). Nasuprot toga nekoliko publiciranih studija ne povezuje navedeni polimorfizam i toksičnost FP. Tako primjerice Toffoli G (127) na uzorku od 603 onkološka bolesnika ne nalazi povezanost s nastankom toksičnosti 3. stupnja u prva tri ciklusa kemoterapije. Obzirom da je u našem istraživanju period promatranja bio tri mjeseca, to je omogućilo detekciju više slučajeva toksičnosti nego u studiji Toffolija i suradnika, što je moglo doprinijeti značajnosti rezultata (ukupno 12 nositelja polimorfizma u našem uzorku razvilo je nuspojave iza 4., 5., i 6. ciklusa kemoterapije). Nasuprot tome, za polimorfizam *c.1236G>A* nisu dobiveni statistički značajni rezultati prvenstveno zbog malog broja detektiranih nositelja, kao i relativno malog uzorka, što nije u suglasju s recentno objavljenom meta-analizom koja govori u prilog značajnosti tog polimorfizma na zbirno analiziranim uzorcima iz različitih etničkih grupacija autora Meulendijksa D i suradnika (N=7365). (128)

Polimorfizam *c.496A>G* pridodan je analizi temeljem njemačke studije Gross E i suradnika iz 2008. koja na uzorku 181 bolesnika i 607 zdravih dobrovoljaca pokazuje značajnu učestalost u uzorkovanoj populaciji i povezanost inačice s razvojem toksičnosti kod bolesnika liječenih s FP (OR=4,42; IP=2,12-9,23; P=0,001). (100) Recentna talijanska studija autora Falvella FS i suradnika objavljena 2015. godine na nešto manjem uzorku bolesnika liječenih kombinacijskim protokolima FP, irinotekana i oksaliplatine (N=64) također pokazuje signifikantan utjecaj polimorfizma na nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja (OR 4,93; IP(95%)=1,29-18,87; P=0,021). (99) Nasuprot tome publicirana su izvješća koja ne pokazuju značajan utjecaj polimorfizma na nastanak toksičnosti. Tako primjerice češka studija Kleibl Z i suradnika na uzorku od 124 bolesnika liječena FP-protokolima uz kontrolnu kohortu od 243 ispitanika bez tumorske bolesti ne dobivaju značajnu distribuciju mutiranih genotipova prema toksičnosti, dok u podskupini žena s nuspojavama pokazuju čak zaštitni učinak prisutnosti

polimorfizma na nastanak mutacija. (102) Navedene nekonzistentnosti mogu biti posljedica genetičkih razlika između etnički divergentnih skupina koje su uzorkovane.

Pronađene frekvencije testiranih polimorfizama u ovom uzorku korespondiraju s poznatim podacima iz literature, osim za inačicu *DPYD\*13* za koju nismo pronašli niti jednog nositelja.

Obzirom na niske frekvencije pojedinačnih polimorfizama učinjena je zbirna analiza rezultata genotipizacije svih polimorfizama nakon spajanja prema genotipovima (wt vs. heterozigoti vs. homozigoti). Dodatno k tome, obzirom na vrlo malo detektiranih homozigota, učinjena je dihotomizacija genotipova (wt vs. mut) te je promatran utjecaj svih fuzioniranih varijantnih (mut) oblika naspram nositelja divljeg tipa gena. Takav metodološki pristup uobičajen je u genetičkim analizama i korespondira sa načinima analize u recentno objavljenim radovima (98). Na taj način dokazana je statistički značajna povezanost mutiranog statusa *DPYD* s razvojem toksičnosti i omogućena je provedba logističke regresije. Zahvaljujući tome dokazano je statistički značajno povećanje rizika toksičnosti kod nositelja testiranih polimorfizama *DPYD*.

Dobivene vrijednosti omjera izgleda i prediktivne vrijednosti testiranja *DPYD* veće su ukoliko se analiza primijeni na podskupinu bolesnika liječenih mono-FP terapijom naspram vrijednosti dobivenih analizom utjecaja mutiranog genotipa na čitavom uzorku (kod svih kemoterapijskih protokola). Veća prediktivna vrijednost polimorfizama *DPYD* za toksičnost kod mono-FP protokola može se tumačiti isključenjem utjecaja ne-fluoropirimidinskog citostatika na nastanak toksičnosti, budući da farmakokinetika i farmakodinamika ne-FP lijekova ne ovise o funkciji DPD.

Toksičnost kemoterapije u podskupini ispitanika liječenih protokolom FOLFIRI testirana je na utjecaj polimorfizama *DPYD* i *UGT1A1*. Dokazana je statistički značajna povezanost razvoja nuspojava s mutiranim inačicama *UGT1A1* kao i signifikantan upliv mutacija na nastanak toksičnih reakcija na irinotekansku komponentu protokola u modelu logističke regresije (obzirom da *UGT1A1* ne sudjeluje u metabolizmu FP). Time smo na našem uzorku reproducirali već publicirane rezultate na većim kohortama bolesnika koji dokazuju važnost genotipizacije *UGT1A1* za procjenu rizika toksičnosti irinotekana. (39, 118, 129). Prediktivna vrijednost polimorfizma *UGT1A1* za nastanak nuspojava u suglasju je s važećim smjernicama doziranja irinotekana prema genotipu *UGT1A1* (vidi kasniji odjeljak). Obzirom da visok rizik toksičnosti u našem uzorku imaju i heterozigoti za *UGT1A1\*28*, i uvažavajući činjenicu da je detektirana ukupna učestalost polimorfizma vrlo visoka ( $\approx 58\%$ ), važno je dodatno naglasiti

relevantnost testiranja kandidata za terapiju FOLFIRI-jem u našem podneblju. Pronađena visoka učestalost polimorfizma *UGT1A1*\*28 u suglasju je s izvješćima o prevalenciji inačice na kohortama hrvatskog podrijetla (130-132).

U radu je također dokazan statistički značajan utjecaj polimorfizama *DPYD* na nastanak nuspojava prilikom liječenja protokolom FOLFIRI, što je u suglasju s rezultatima studije Lee AM i suradnika. (133) Izračunati rizik kod nositelja mutiranih inačica *DPYD* bio je manji nego za nositelje polimorfizma *UGT1A1*, što je u prvom redu posljedica bitno manjeg broja detektiranih nositelja inačica *DPYD* u podskupini ispitanika liječenih kombinacijom FP i irinotekana. Obzirom na signifikantnost *DPYD* u skupini liječenoj FOLFIRI-jem, kao i dokazan utjecaj mutiranog statusa *DPYD* na toksičnost FP na čitavom uzorku, može se ustvrditi da je ovim radom dokazano da za procjenu rizika toksičnosti prema genotipu kod bolesnika planiranih za liječenje kombinacijom FP i irinotekana treba uzeti u obzir rezultate genotipizacije obaju gena.

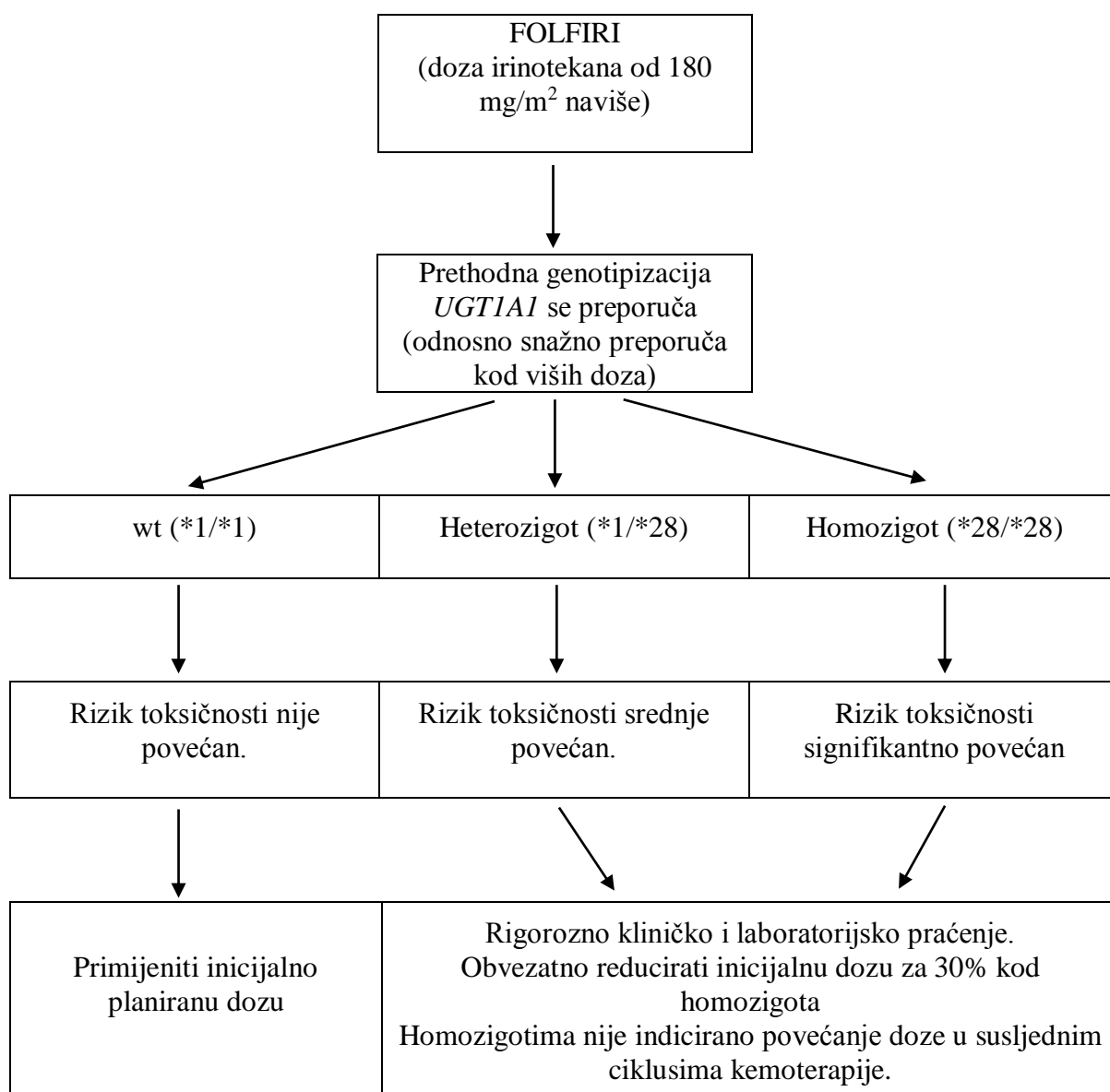
Šira klinička primjenjivost ovdje testiranih inačica *DPYD* još uvijek treba biti potvrđena u studijama na većem uzorku, obzirom da je ovo istraživanje temeljeno na kohorti bolesnika iz jedne institucije i da su etablirane, funkcijski značajne inačice gena vrlo rijetke u općoj populaciji.

Obzirom da je u istraživanju bio značajan udio bolesnika s jakim nuspojavama koji su nositelji divljeg tipa gena za DPD (74/138; 53,6%), farmakogenomski pristup istraživanju koji bi uključivao sekvenciranje pružio bi dodatni uvid u varijabilnost *DPYD*.

Sa stručne strane neosporna je opravdanost genotipizacije *DPYD* prije terapije s FP, odnosno također i *UGT1A1* ukoliko kemoterapija sadrži irinotekan. Ostaje pitanje opravdanosti iz farmakoekonomskog aspekta, premda je i to pitanje recentno raspravljano u znanstvenoj zajednici s jasnim argumentima u prilog genotipizacije. (134) Postoje recentne studije koštanja i učinkovitosti koje ne pokazuju zbirno povećanje troškova liječenja ukoliko se provodi preventivna genotipizacija (najvjerojatnije zbog izbjegnuto nastanka najtežih nuspojava čije zbrinjavanje značajno povećava troškove). (135, 136)

## Farmakogenetičke preporuke u kontekstu deficijencije DPD

U literaturi su dostupne smjernice za doziranje irinotekana prema genotipu *UGT1A1* i fluoropirimidina prema genotipu *DPYD*. Rezultati prezentirani u ovom radu u suglasju su s navedenim smjernicama, osim što polimorfizam *DPYD c.496A>G* nije uključen u publicirane smjernice, obzirom na nekonzistentnost dosad objavljenih rezultata. Slika 11 i tablica 24 prikazuju smjernice doziranja irinotekana odnosno FP prema genotipu.



**Slika 11. Smjernice za primjenu irinotekana prema genotipu *UGT1A1*.**

Standardna početna doza irinotekana u protokolu FOLFIRI je 180 mg/m<sup>2</sup>. Kod bolesnika s visokorizičnom bolešću, koji podnose terapiju, kadšto se u susljednim ciklusima povećava doza do 240 mg/m<sup>2</sup>, pa i više, s ciljem poboljšanja odgovora i jačeg smanjenja tumorskih tvorbi. Sačinjeno prema literaturnom navodu (39).

**Tablica 24. Smjernice za doziranje fluoropirimidina prema genotipu *DPYD*\*2A,\*13 i *c.2846A>T***

Opis genotipa/fenotipa	Genotip	Implikacije za fenotipske postupke	Preporuke za doziranje	Razina dokaza <sup>b</sup>
Homozigot- divlji tip gena, visoka aktivnost DPD (dva funkcionalna alela *1)	*1/*1	Normalna aktivnost DPD i „normalni“ rizik za toksičnost FP	Upotrijebiti doze i način primjene prema uputi o lijeku	Srednja
Heterozigotna ili intermedijarna aktivnost (≈3-5% bolesnika), mogu imati parcijalnu deficijenciju DPD, povišen je rizik toksičnosti FP (jedan funkcionalni alel *1, plus jedan nefunkcionalni alel - *2A, *13 ili <i>c.2846A&gt;T</i> )	*1/*2A; *1/*13; *1/ <i>c.2846A&gt;T</i>	Snižena aktivnost DPD (aktivnost DPD u PBMC na 30% do 70% normalne) i povećan rizik za ozbiljnu i čak fatalnu toksičnost nakon izlaganja FP	Početi liječenje sa barem 50% reduciranom dozom i susljednom titracijom doze <sup>a</sup> prema prezentiranoj toksičnosti ili farmakokinetičkom testu (ako je dostupan)	Srednja
Homozigotna inačica, deficijencija DPD (≈0,2% bolesnika), vrlo visoki rizik toksičnosti FP (dva nefunkcionalna alela - *2A, *13 ili <i>c.2846A&gt;T</i> )	*2A/*2A; *13/*13; <i>c.2846A&gt;T</i> / <i>c.2846A&gt;T</i>	Potpuna deficijencija DPD i vrlo visoki rizik za ozbiljnu i čak fatalnu toksičnost nakon izlaganja FP	Upotrijebiti alternativni lijek	Jaka

<sup>a</sup> Povećati dozu lijeka kod bolesnika koji nemaju nuspojava ili je prezentacija nuspojave tolerabilna kako bi se održala učinkovitost liječenja; sniziti dozu ukoliko bolesnik ne podnosi početnu dozu kako bi se minimalizirala toksičnost. <sup>b</sup> Razina dokaza preporuke objedinjava brojnost i kakvoću analiziranih studija, veličinu uzoraka, reproducibilnost i konzistentnost rezultata, pri čemu je korištena metodologija preporučena u (137), a detaljno objašnjenje za srednju i jaku razinu dokaza dato je u dodatnom materijalu izvornog članka (84). Sačinjeno prema tablicama 1 i 2 iz literaturnog navoda (84).

Dosad publicirane smjernice za doziranje prema rezultatima FG analize kandidata za tretman fluoropirimidinskom kemoterapijom izravno ne uključuju preporuku za preliminarno testiranje, već se jednostavno temelje *ipso facto* na determiniranom genotipu *DPYD*. Pri tome autori smjernica ne ulaze u problematiku potrebe za preventivnom genotipizacijom (ili fenotipizacijom), uvažavajući složenost područja i još uvijek nedovoljan kvantum podataka. Naime veliki broj bolesnika obuhvaćenih FP liječenjem, uz relativno niske prevalencije

validiranih genetičkih markera, vodio bi u vrlo velike brojeve obavljenih testova s malim brojem detektiranih nositelja. Takav pristup je za većinu državnih sustava zdravstvene zaštite još uvijek neopravdan iz pozicije trošenja predviđenih novčanih sredstava. Stoga se preventivno testiranje primjenjuje u malom broju naprednih onkoloških centara, kroz kliničke studije odnosno posebne programe praćenja. Dostupni su rezultati kliničkih studija genotipizacije prethodno terapiji s FP. U njima je pokazana izvedivost metodologije i algoritma pretraga, kao i značajno povećanje sigurnosti za bolesnike na kemoterapiji (101). Granična isplativost dovela je do aplikacije preventivnog testiranja u malom broju naprednih onkoloških centara (138), (139). Osim toga, inicirane su nove studije poboljšanog dizajna i rezultati se iščekuju (primjerice studija br. NCT02324452 u Nizozemskoj).

Autori danas dostupnih smjernica (84) preporučuju način doziranja FP kod dijagnosticiranih bolesnika s deficijencijom DPD (nositelji polimorfizama *DPYD\*2A*, *DPYD\*13* ili *c.2846A>T*). Pri tome se kod homozigotnih nositelja aplikacija FP uopće ne savjetuje, već je preporuka posegnuti za alternativnim citostatskim protokolom koji neće uključivati FP. Kod heterozigota se preporučuje započeti terapiju s drastično sniženim dozama (50% ili više redukcije, na diskreciju ordinirajućeg onkologa) te kasnije titrirati dozu ovisno o razini izazvane toksičnosti.

Osim navedenih smjernica neki autori sugeriraju uvođenje univerzalnog koeficijenta genske aktivnosti (prema engl. *gene activity score*) za *DPYD*. Divljem tipu alela (100% enzimske aktivnosti DPD) dodjeljuje se vrijednost 1. Tako nositelji divljeg tipa alela (wt) imaju vrijednost koeficijenta 2 i počinju terapiju s FP u standardnim dozama. Heterozigotima se ovisno o vrsti polimorfizma, dodjeljuje vrijednost 0 po alelu za *DPYD\*2A* i *\*13* pri čemu ukupna vrijednost iznosi 1 (za jedan wt alel kojeg nose), te počinju terapiju s 50% standardne doze. Heterozigoti za *c.2846A>T* i *c.1236G>A* (HapB3) dobivaju vrijednost 0,5 po zahvaćenom alelu, tako da ukupni koeficijent aktivnost iznosi 1,5, a terapiju počinju s 75% od standardne doze FP. (140)

Reducirana doza se s obzirom na kinetiku genski uvjetovanih nuspojava preporuča tijekom prvog ili prva dva ciklusa kemoterapije, a potom treba prilagođavati dozu ovisno o toleranciji. Opreznijim doziranjem koje uključuje poznavanje genotipa *DPYD* mogu se izbjeći letalne reakcije na lijek i značajno povećati sigurnost liječenja odnosno kvalitetu života bolesnika na kemoterapiji. U tijeku su prospektivne studije koje dodatno validiraju ovakav pristup.

## Recentno stanje preventivne genotipizacije *DPYD*

Načelno se može konstatirati da rezultati ovog istraživanja kao i studije dostupne u literaturi o povezanosti polimorfizama *DPYD* i toksičnosti FP opravdavaju proaktivan pristup bolesniku i genotipizaciju prije kemoterapije iz perspektive struke i bolesnikove dobrobiti. Međutim, za većinu zdravstvenih sustava to još uvijek predstavlja neprihvatljivi trošak. Stoga se otvara mogućnost testiranja na komercijalnoj osnovi što je dostupno manjini bolesnika koji su spremni *ex privata diligentia* investirati vlastita sredstva za poboljšanje svojeg liječenja. Publicirano je više testova za simultano određivanje nekoliko polimorfizama *DPYD* kao i njihove komercijalno dostupne varijante ili u obliku paketa laboratorijskih usluga ponuđenih izravno korisniku-probandu ili u obliku laboratorijskih kitova lako dostupnih institucijama s adekvatnom opremom i osobljem. Većina ih se temelji na određivanju prisutnosti/odsutnosti *DPYD*\*2A mutacije sa ili bez još nekih polimorfizama po izboru laboratorija. Davatelji takvih usluga uvijek sugeriraju korisniku određeni stupanj sigurnosti u predikciji toksičnosti nakon aplikacije FP. Međutim, obzirom na nisku učestalost etabliranih polimorfizama *DPYD* i znatno češću toksičnost FP, genotipizacija *DPYD* kao metoda probira za osjetljivost na FP suočena je s niskom osjetljivošću i lošom pozitivnom prediktivnom vrijednošću. Drugim riječima, znatno je više bolesnika koji razviju rane i opasne nuspojave na FP, nego što ih ima poznate rizične polimorfizme. Tako primjerice, u studiji Morel A i suradnika (94) autori, validirajući genotipizaciju *DPYD* na svojem uzorku (N=487) za testiranje tri glavna genotipa (\*2A, \*13 i c.2846A>T), detektiraju osjetljivost od 31% za nastanak toksičnosti 3. stupnja i više, iza prvog ili drugog ciklusa kemoterapije. Pozitivna prediktivna vrijednost iznosila je 62%. Specifičnost je visoka i iznosila je 98%, a negativna prediktivna vrijednost 94%. U međuvremenu su publicirane studije koje nalaze i niže vrijednosti validacije testiranja - tako primjerice Lee AM i suradnici (133) nalaze negativnu prediktivnu vrijednost od 68%, a osjetljivost od tek 5,3% za genotipizaciju iste tri mutacije u kontekstu toksičnosti 3. stupnja ili više, nastupile bilo kada tijekom liječenja.

Može se konstatirati da je navedena komercijalizacija testiranja *DPYD* došla prerano, jednako kao što je prerano govoriti da je sa statističke i javnozdravstvene strane opravdano propisati nužno preventivno testiranje, prije aplikacije FP. Iznimku u tom smislu predstavljaju bogatije zemlje. Tako je primjerice Nizozemska uvela obvezu poznavanja genotipa u procesu propisivanja FP. Kliničke studije, kao i početna iskustva s preliminarnim genotipiziranjem su u tijeku te se u narednim godinama mogu očekivati točnije smjernice o kliničkom pristupu



bolesniku - kandidatu za terapiju s FP. Tako primjerice, u studiji Deenen MJ i suradnika (141) procijenjena je analiza koštanja zdravstvene usluge kemoterapije fluoropirimidinima sa odnosno bez prethodnog genotipiziranja i dobivena je podjednaka cijena (5839 vs. 5854 €) uz izbjegnuti rizik jake toksičnosti i eventualne smrtnosti.

Premda su u ovom radu pronađene frekvencije četiriju glavnih inačica *DPYD* bile male (posebno za *DPYD\*13* za koju nije pronađen niti jedan nositelj), za eventualne buduće studije genotipa *DPYD* kod ispitanika s ovog podneblja ne može se preporučiti isključenje niti jedne od testiranih varijanti, budući da je ovdje opisan uzorak od 305 ispitanika razmjerno malen ako se uzme u obzir niska učestalost glavnih polimorfizama *DPYD*. Tek bi potencijalna studija koje bi uključivala uzorak reda veličine  $10^3$  mogla polučiti značajne frekvencije za rijetke inačice i dati specifičan odgovor na pitanje koje inačice treba, a koje ne treba genotipizirati kod bolesnika hrvatskog etničkog podrijetla.

Dodatni razlog za istraživanje utjecaja testiranih genotipova na toksičnost kemoterapije u ovom radu bio je i nedostatak objavljenih rezultata na tu temu kod bolesnika koji potječu iz ovog zemljopisnog podneblja. Ovom studijom stečen je preliminarni uvid u gensku posebnost i raznolikost varijacija lokusa *DPYD* na opisanom uzorku, čime je utrt put daljnjim studijama kao i eventualnom odobrenju preventivnog genotipiziranja bolesnika-kandidata za terapiju s FP od strane nacionalnog pružatelja zdravstvene zaštite.

S kliničkog aspekta mogla bi se načelno, temeljem opisanih rezultata, preporučiti kod bolesnika kod kojih se planira primjena FOLFIRI protokola preventivna genotipizacija *UGT1A1* i *DPYD*. Za bolesnike koji su kandidati za mono-FP kemoterapijske protokole također bi se u tom kontekstu moglo preporučiti testiranje *DPYD* za prisutnost polimorfizama *DPYD\*2A* i *DPYD c.496A>G*, dok se testiranje prisutnosti ostalih triju polimorfizama obuhvaćenih ovim istraživanjem (*DPYD\*13*, *c.2846A>T* i *c.1236G>A*) može argumentirati samo temeljem podataka iz literature, budući da u okviru ove studije nisu dobiveni statistički značajni rezultati.

## 7 Zaključci

1. Dokazan je zbirni utjecaj testiranih polimorfizama *DPYD* na nastanak toksičnosti kemoterapije s fluoropirimidinima.
2. Dokazan je utjecaj polimorfizma *UGT1A1\*28* na toksičnost kemoterapije koja uključuje irinotekan.
3. Dokazana je povezanost polimorfizma *DPYD\*2A* s nastankom toksičnosti, ali analiza utjecaja logističkom regresijom nije bila moguća zbog malog broja detektiranih nositelja.
4. Dokazana je povezanost polimorfizma *DPYD c.496A>G* s razvojem toksičnosti i povećan rizik za nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja kod heterozigota, dočim analiza utjecaja logističkom regresijom kod homozigota nije bila moguća zbog malog broja zahvaćenih ispitanika.
5. Nije dokazana statistička značajnost povezanosti i utjecaja polimorfizama *DPYD c.2846A>T* i *c.1236G>A* na nastanak toksičnosti 3. i 4. stupnja, no obzirom na mali broj detektiranih nositelja kao i razmjernu malu očekivanu učestalost navedenih mutacija, statistička neznačajnost može biti posljedica malog uzorka koji je obuhvaćen ovim istraživanjem.
6. Ne može se donijeti argumentirani zaključak o relevantnosti polimorfizma *DPYD\*13 (c.1679T>G)* obzirom da nije detektiran niti jedan nositelj. Ograničenje relativno malim uzorkom kao i činjenica da se radi o analizi kohorte iz jedne institucije ne dopuštaju zaključak o irelevantnosti tog polimorfizma za uzorkovanu populaciju. Premda inačica nije detektirana, za pravovaljanu procjenu i zaključak o njenoj važnosti bila bi potrebna populacijska studija na znatno većem uzorku.
7. Testiranje pojedinačnih polimorfizama predstavlja manje učinkovitu strategiju probira rizika za nastanak toksičnosti od istovremenog testiranja nekoliko genskih inačica.
8. Ženski spol također ima određeni utjecaj na nastanak toksičnosti te se može smatrati nezavisnim čimbenikom rizika.
9. Dokazana je veća brzina nastanka nuspojava i veći ukupni broj nuspojava po ispitaniku u skupini bolesnika s toksičnošću 3. i 4. stupnja.
10. Bolusna aplikacija fluorouracila najtoksičniji je način primjene fluoropirimidinske kemoterapije kod bolesnika obuhvaćenih ovim istraživanjem.

## 8 Sažetak

Kemoterapija fluoropirimidinima je temelj onkološkog liječenja bolesnika s tumorima probavnog trakta. Dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) je najvažniji enzim metaboličkog puta fluoropirimidina, odgovoran za razgradnju većine unešene tvari (do 90%). Polimorfizmi gena za DPD mogu značajno utjecati na sniženje enzimske aktivnosti i povećanje rizika za nastanak toksičnih nuspojava uz primjenu kemoterapije. U istraživanju je genotipizacijom određena učestalost polimorfizama gena za dihidropirimidin-dehidrogenazu (*DPYD*\*2A, \*13, *c.2846A>T*, *c.1236G>A* i *c.496A>G*) na uzorku (N=305) onkoloških bolesnika liječenih kemoterapijskim protokolima temeljenim na fluoropirimidinima. Također je testirana prisutnost polimorfizma UDP-glikozil transferaze (*UGT1A1*\*28) u podskupini bolesnika koji su uz fluoropirimidine primali i irinotekan, obzirom na poznatu važnost disfunkcije UGT na metabolizam irinotekana. Ispitanici su podijeljeni prema jačini nuspojava u promatranu skupinu (stupanj 3 i 4) i kontrolu (stupanj 0, 1 i 2). Kod bolesnika s mutiranim genom *DPYD* kao i polimorfizmom *UGT1A1*\*28 pokazano je statistički signifikantno povećanje rizika za nastanak toksičnih nuspojava. Ispitanici u promatranoj skupini nuspojave su razvijeli brže (prosječno iza 2. ciklusa, naspram 3. ciklusa u kontrolnoj skupini). Također, ukupni broj nuspojava po ispitaniku je veći u promatranoj skupini (prosječno 3 vs. 1,7).

## 9 Summary

Thesis title: The role of dihydropyrimidine-dehydrogenase and UDP-glucuronyl transferase polymorphisms in fluoropyrimidine and irinotecan toxicity

Ivan Bilic

2016

Chemotherapy with fluoropyrimidines (5-FU, capecitabine) is the foundation of oncological treatment for patients with gastrointestinal tumors (colorectal cancer in particular), as well as other types of solid malignancies. Dihydropyrimidine-dehydrogenase (DPD) is the rate-limiting enzyme of the fluoropyrimidine metabolism, responsible for bulk degradation of injected drug (up to 90%). *DPYD* gene may contain polymorphisms with potentially lethal functional consequences, but risk-level varies considerably according to the type of polymorphism. Patients with enzyme-deficiency may have elevated drug and metabolite levels, and increased risk for toxic adverse events.

In this single-center, case-control designed study fluoropyrimidine and irinotecan-treated patients were sampled (N=305), five *DPYD*-polymorphisms (*DPYD*\*2A, \*13, *c.2846A>T*, *c.1236G>A* and *c.496A>G*) and *UGT1A1*\*28 were analyzed. We stratified subjects according to the toxicity grade (observed group – grade 3 and 4; control group – grade 0, 1 and 2). Frequencies of tested genetic traits were established. Carriers of *DPYD* polymorphism and *UGT1A1*\*28 variant had a statistically significant increase in the risk for toxic side effects. The results point to significant association as well as predictive value of the mutation status with chemotherapy toxicity. Subjects with higher toxicity grades developed adverse effects more rapidly and accumulated greater total number of events *per capita*.

(Zagreb, 2016)

## 10 Popis literature

1. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, et al. Fluorinated Pyrimidines, A New Class of Tumour-Inhibitory Compounds. *Nature*. 1957;179(4561):663-6.
2. Wohlhueter RM, McIvor RS, Plagemann PG. Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol*. 1980;104(3):309-19.
3. Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res*. 1987;47(8):2203-6.
4. Milano G, Chamorey AL. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil with consideration of chronopharmacokinetics. *Chronobiol Int*. 2002;19(1):177-89.
5. Thomas HR, Ezzeldin HH, Guarcello V, Mattison LK, Fridley BL, Diasio RB. Genetic regulation of dihydropyrimidinase and its possible implication in altered uracil catabolism. *Pharmacogenet Genomics*. 2007;17(11):973-87.
6. Muhale FA, Wetmore BA, Thomas RS, McLeod HL. Systems pharmacology assessment of the 5-fluorouracil pathway. *Pharmacogenomics*. 2011;12(3):341-50.
7. Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res*. 2010;38(3):870-83.
8. Matsusaka S, Lenz HJ. Pharmacogenomics of fluorouracil-based chemotherapy toxicity. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2015;11(5):811-21.
9. Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21(4):237-42.
10. Santi DV, McHenry CS, Sommer H. Mechanism of interaction of thymidylate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry*. 1974;13(3):471-81.
11. Rustum YM. Clinical implications of 5-FU modulation. *Oncology (Williston Park)*. 1999;13(7 Suppl 3):22-5.
12. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):330-8.

13. Sloan JA, Goldberg RM, Sargent DJ, Vargas-Chanes D, Nair S, Cha SS, et al. Women experience greater toxicity with fluorouracil-based chemotherapy for colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2002;20(6):1491-8.
14. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, et al. The Role of UGT1A1\*28 Polymorphism in the Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Irinotecan in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. 2006.
15. Chabner BA RD, Paz-Ares L, Garcia-Carbonero R, Calabresi P. Antineoplastic agents. In: Hardman JG LL, Goodman Gilman A (Hon.), editor. *Goodman & Gilman's Pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed: McGraw-Hill.
16. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92(4):414-7.
17. De Mattia E, Toffoli G, Polesel J, D'Andrea M, Corona G, Zagonel V, et al. Pharmacogenetics of ABC and SLC transporters in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line FOLFIRI treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2013;23(10):549-57.
18. Crona DJ, Ramirez J, Qiao W, de Graan AJ, Ratain MJ, van Schaik RH, et al. Clinical validity of new genetic biomarkers of irinotecan neutropenia: an independent replication study. *Pharmacogenomics J*. 2016;16(1):54-9.
19. Kidani Y, Inagaki K, Tsukagoshi S. Examination of antitumor activities of platinum complexes of 1,2-diaminocyclohexane isomers and their related complexes. *Gan*. 1976;67(6):921-2.
20. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004;350(23):2343-51.
21. Cecchin E, D'Andrea M, Lonardi S, Zanusso C, Pella N, Errante D, et al. A prospective validation pharmacogenomic study in the adjuvant setting of colorectal cancer patients treated with the 5-fluorouracil/leucovorin/oxaliplatin (FOLFOX4) regimen. *Pharmacogenomics J*. 2013;13(5):403-9.
22. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll H-J, et al. A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer. *Clinical Colorectal Cancer*. 2015;14(1):1-10.
23. Evans DA, White TA. Human acetylation polymorphism. *J Lab Clin Med*. 1964;63:394-403.

24. Clayman CB, Arnold J, Hockwald RS, Yount EH, Jr., Edgcomb JH, Alving AS. Toxicity of primaquine in Caucasians. *J Am Med Assoc.* 1952;149(17):1563-8.
25. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood.* 1994;84(11):3613-36.
26. Kalow W. Hydrolysis of local anesthetics by human serum cholinesterase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1952;104(2):122-34.
27. Vogel F. *Moderne Probleme der Humangenetik.* Max Planck-Institut für vergleichende Erbbiologie und Erbpathologie. 1959.
28. Kalow W. *Pharmacogenetics, heredity and the response to drugs.* West Washington Square, Philadelphia, Pa., SAD: W. B. Saunders Co.; 1962.
29. Smith RL. The Paton Prize Award. The discovery of the debrisoquine hydroxylation polymorphism: scientific and clinical impact and consequences. *Toxicology.* 2001;168(1):11-9.
30. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979;16(3):183-7.
31. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):234-42.
32. Snozek CLH. *Pharmacogenetics and cancer chemotherapy.* U: Langman LJ, Dasgupta A, ur. *Pharmacogenomics in clinical therapeutics: John Wiley & Sons, Ltd.;* 2012: 39-52.
33. PharmGKB. Genes-drugs [List of available CPIC guidelines to optimize drug therapy according to genotype.]. Dostupno na: [cpicpgx.org/genes-drugs/](http://cpicpgx.org/genes-drugs/).
34. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med.* 2003;348(6):538-49.
35. Madadi P, Koren G. Pharmacogenomics and translational approaches. In: Langman LJ Dasgupta A, ur. *Pharmacogenomics in clinical therapeutics: John Wiley & Sons, Ltd.;* 2012: 9-11.
36. Lu YF, Goldstein DB, Angrist M, Cavalleri G. Personalized medicine and human genetic diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014;4(9):a008581.
37. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med.* 2015;372(9):793-5.
38. Moraes F, Goes A. A decade of human genome project conclusion: Scientific diffusion about our genome knowledge. *Biochem Mol Biol Educ.* 2016;44(3):215-23.

39. Etienne-Grimaldi MC, Boyer JC, Thomas F, Quaranta S, Picard N, Lorient MA, et al. UGT1A1 genotype and irinotecan therapy: general review and implementation in routine practice. *Fundam Clin Pharmacol*. 2015;29(3):219-37.
40. Relling M, Klein T. CPIC: Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium of the Pharmacogenomics Research Network. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2015;89(3):464-7.
41. Simon R, Roychowdhury S. Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):358-69.
42. Segelov E, Chan D, Shapiro J, Price T, Karapetis C, Tebbutt N, et al. The role of biological therapy in metastatic colorectal cancer after first-line treatment: a meta-analysis of randomised trials. *British Journal of Cancer*. 2014;111(6):1122-31.
43. Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol*. 2008;64(8):753-67.
44. Wang L, Weinshilboum R. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*. 2006;25(11):1629-38.
45. Ford LT, Berg JD. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol*. 2010;63(4):288-95.
46. Brauch H, Jordan VC. Targeting of tamoxifen to enhance antitumour action for the treatment and prevention of breast cancer: the 'personalised' approach? *Eur J Cancer*. 2009;45(13):2274-83.
47. Seruga B, Amir E. Cytochrome P450 2D6 and outcomes of adjuvant tamoxifen therapy: results of a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;122(3):609-17.
48. Kiyotani K, Mushiroda T, Hosono N, Tsunoda T, Kubo M, Aki F, et al. Lessons for pharmacogenomics studies: association study between CYP2D6 genotype and tamoxifen response. *Pharmacogenet Genomics*. 2010;20(9):565-8.
49. Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ, Ratain MJ. Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nat Rev Genet*. 2013;14(1):23-34.
50. Ito T. Children's toxicology from bench to bed--Liver injury (1): Drug-induced metabolic disturbance--toxicity of 5-FU for pyrimidine metabolic disorders and pivalic acid for carnitine metabolism. *J Toxicol Sci*. 2009;34 Suppl 2:Sp217-22.
51. Dobritzsch D, Schneider G, Schnackerz KD, Lindqvist Y. Crystal structure of dihydropyrimidine dehydrogenase, a major determinant of the pharmacokinetics of the anti-cancer drug 5-fluorouracil. *EMBO J*. 2001;20(4):650-60.



52. Yoo BK, Gredler R, Vozhilla N, Su ZZ, Chen D, Forcier T, et al. Identification of genes conferring resistance to 5-fluorouracil. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12938-43.
53. Lu ZH, Zhang RW, Diasio RB. Dihydropyrimidine dehydrogenase-activity in human peripheral-blood mononuclear-cells and liver - population characteristics, newly identified deficient patients, and clinical implication in 5-fluorouracil chemotherapy. *Cancer Research*. 1993;53(22):5433-8.
54. Etienne MC, Lagrange JL, Dassonville O, Fleming R, Thyss A, Renee N, et al. Population study of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer patients. *J Clin Oncol*. 1994;12(11):2248-53.
55. Magne N, Etienne-Grimaldi MC, Cals L, Renee N, Formento JL, Francoual M, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and the IVS14+1G > A mutation in patients developing 5FU-related toxicity. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2007;64(2):237-40.
56. Grem JL, Yee LK, Venzon DJ, Takimoto CH, Allegra CJ. Inter- and intraindividual variation in dihydropyrimidine dehydrogenase activity in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 1997;40(2):117-25.
57. Harris BE, Song R, Soong SJ, Diasio RB. Relationship between dihydropyrimidine dehydrogenase activity and plasma 5-fluorouracil levels with evidence for circadian variation of enzyme activity and plasma drug levels in cancer patients receiving 5-fluorouracil by protracted continuous infusion. *Cancer Res*. 1990;50(1):197-201.
58. Mattison LK, Fourie J, Desmond RA, Modak A, Saif MW, Diasio RB. Increased prevalence of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in African-Americans compared with Caucasians. *Clin Cancer Res*. 2006;12(18):5491-5.
59. Bakkeren J, Deabreu RA, Sengers RCA, Gabreels FJM, Maas JM, Renier WO. Elevated urine, blood and cerebrospinal-fluid levels of uracil and thymine in a child with dihydrothymine dehydrogenase-deficiency. *Clinica Chimica Acta*. 1984;140(3):247-56.
60. Tuchman M, Stoeckeler JS, Kiang DT, Odea RF, Ramnaraine ML, Mirkin BL. Familial pyrimidinemia and pyrimidinuria associated with severe fluorouracil toxicity. *New England Journal of Medicine*. 1985;313(4):245-9.
61. Braakhekke JP, Renier WO, Gabreels FJ, De Abreu RA, Bakkeren JA, Sengers RC. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Neurological aspects. *J Neurol Sci*. 1987;78(1):71-7.

62. Diasio RB, Beavers TL, Carpenter JT. Familial deficiency of dihydropyrimidine dehydrogenase. Biochemical basis for familial pyrimidinemia and severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *J Clin Invest.* 1988;81(1):47-51.
63. Johnson MR, Diasio RB. Importance of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients exhibiting toxicity following treatment with 5-fluorouracil. *Adv Enzyme Regul.* 2001;41:151-7.
64. van Kuilenburg AB, Meinsma R, Zonnenberg BA, Zoetekouw L, Baas F, Matsuda K, et al. Dihydropyrimidinase deficiency and severe 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res.* 2003;9(12):4363-7.
65. Milano G, Etienne MC, Pierrefite V, Barberi-Heyob M, Deporte-Fety R, Renée N. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency and fluorouracil-related toxicity. *Br J Cancer.* 1999;79(3-4):627-30.
66. Chansky K, Benedetti J, Macdonald JS. Differences in toxicity between men and women treated with 5-fluorouracil therapy for colorectal carcinoma. *Cancer.* 2005;103(6):1165-71.
67. Schwab M, Zanger UM, Marx C, Schaeffeler E, Klein K, Dippon J, et al. Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: a prospective clinical trial by the German 5-FU Toxicity Study Group. *J Clin Oncol.* 2008;26(13):2131-8.
68. Johnson MR, Yan J, Shao L, Albin N, Diasio RB. Semi-automated radioassay for determination of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. Screening cancer patients for DPD deficiency, a condition associated with 5-fluorouracil toxicity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1997;696(2):183-91.
69. van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res.* 2000;6(12):4705-12.
70. Di Paolo A, Danesi R, Falcone A, Cionini L, Vannozzi F, Masi G, et al. Relationship between 5-fluorouracil disposition, toxicity and dihydropyrimidine dehydrogenase activity in cancer patients. *Ann Oncol.* 2001;12(9):1301-6.
71. Mattison LK, Ezzeldin H, Carpenter M, Modak A, Johnson MR, Diasio RB. Rapid identification of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency by using a novel 2-<sup>13</sup>C-uracil breath test. *Clin Cancer Res.* 2004;10(8):2652-8.

72. Ciccolini J, Mercier C, Blachon MF, Favre R, Durand A, Lacarelle B. A simple and rapid high-performance liquid chromatographic (HPLC) method for 5-fluorouracil (5-FU) assay in plasma and possible detection of patients with impaired dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) activity. *J Clin Pharm Ther.* 2004;29(4):307-15.
73. Remaud G, Boisdron-Celle M, Hameline C, Morel A, Gamelin E. An accurate dihydrouracil/uracil determination using improved high performance liquid chromatography method for preventing fluoropyrimidines-related toxicity in clinical practice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005;823(2):98-107.
74. Kristensen MH, Pedersen P, Mejer J. The value of dihydrouracil/uracil plasma ratios in predicting 5-fluorouracil-related toxicity in colorectal cancer patients. *J Int Med Res.* 2010;38(4):1313-23.
75. Bi D, Anderson LW, Shapiro J, Shapiro A, Grem JL, Takimoto CH. Measurement of plasma uracil using gas chromatography-mass spectrometry in normal individuals and in patients receiving inhibitors of dihydropyrimidine dehydrogenase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;738(2):249-58.
76. van Staveren MC, van Kuilenburg AB, Guchelaar HJ, Meijer J, Punt CJ, de Jong RS, et al. Evaluation of an oral uracil loading test to identify DPD-deficient patients using a limited sampling strategy. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;81(3):553-61.
77. van Kuilenburg AB, Maring JG, Schalhorn A, Terborg C, Schmalenberg H, Behnke D, et al. Pharmacokinetics of 5-fluorouracil in patients heterozygous for the IVS14+1G > A mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2008;27(6):692-8.
78. Saif MW, Choma A, Salamone SJ, Chu E. Pharmacokinetically guided dose adjustment of 5-fluorouracil: a rational approach to improving therapeutic outcomes. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(22):1543-52.
79. NICE guidance. Fluorouracil chemotherapy: The My5-FU assay for guiding dose adjustment. Prosinac 2014. Dostupno na: [www.nice.org.uk/guidance/dg16/chapter/1-Recommendations](http://www.nice.org.uk/guidance/dg16/chapter/1-Recommendations).
80. van Staveren MC, Guchelaar HJ, van Kuilenburg ABP, Gelderblom H, Maring JG. Evaluation of predictive tests for screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Pharmacogenomics J.* 2013;13(5):389-95.
81. NCBI. SNP linked to Gene (geneID:1806, DPYD) Lipanj 2016. Dostupno na: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?locusId=1806](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=1806).

82. Van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beke E, Bobba B, Boffi P, Enns GM, et al. Identification of three novel mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene associated with altered pre-mRNA splicing or protein function. *Biol Chem.* 2005;386(4):319-24.
83. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;89(5):662-73.
84. Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94(6):640-5.
85. Vreken P, Van Kuilenburg AB, Meinsma R, van Gennip AH. Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency: identification and expression of missense mutations C29R, R886H and R235W. *Hum Genet.* 1997;101(3):333-8.
86. McLeod HL, Collie-Duguid ESR, Vreken P, Johnson MR, Wei X, Sapone A, et al. Nomenclature for human DPYD alleles. *Pharmacogenetics.* 1998;8(6):455-9.
87. Ofverholm A, Arkblad E, Skrtic S, Albertsson P, Shubbar E, Enerback C. Two cases of 5-fluorouracil toxicity linked with gene variants in the DPYD gene. *Clin Biochem.* 2010;43(3):331-4.
88. Offer SM, Fossum CC, Wegner NJ, Stuflesser AJ, Butterfield GL, Diasio RB. Comparative functional analysis of DPYD variants of potential clinical relevance to dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *Cancer Res.* 2014;74(9):2545-54.
89. Terrazzino S, Cargnin S, Del Re M, Danesi R, Canonico PL, Genazzani AA. DPYD IVS14+1G>A and 2846A>T genotyping for the prediction of severe fluoropyrimidine-related toxicity: a meta-analysis. *Pharmacogenomics.* 2013;14(11):1255-72.
90. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, et al. Relationship between Single Nucleotide Polymorphisms and Haplotypes in DPYD and Toxicity and Efficacy of Capecitabine in Advanced Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2011;17(10):3455-68.
91. van Kuilenburg AB, Dobritzsch D, Meinsma R, Haasjes J, Waterham HR, Nowaczyk MJ, et al. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem J.* 2002;364(Pt 1):157-63.

92. Collie-Duguid ES, Etienne MC, Milano G, McLeod HL. Known variant DPYD alleles do not explain DPD deficiency in cancer patients. *Pharmacogenetics*. 2000;10(3):217-23.
93. Johnson MR, Wang K, Diasio RB. Profound dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency resulting from a novel compound heterozygote genotype. *Clin Cancer Res*. 2002;8(3):768-74.
94. Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L, Soulie P, Craipeau MC, Traore S, et al. Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol Cancer Ther*. 2006;5(11):2895-904.
95. Rosmarin D, Palles C, Church D, Domingo E, Jones A, Johnstone E, et al. Genetic markers of toxicity from capecitabine and other fluorouracil-based regimens: investigation in the QUASAR2 study, systematic review, and meta-analysis. *J Clin Oncol*. 2014;32(10):1031-9.
96. Seck K, Riemer S, Kates R, Ullrich T, Lutz V, Harbeck N, et al. Analysis of the DPYD Gene Implicated in 5-Fluorouracil Catabolism in a Cohort of Caucasian Individuals. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(16):5886-92.
97. van Kuilenburg AB, Meijer J, Mul AN, Meinsma R, Schmid V, Dobritzsch D, et al. Intragenic deletions and a deep intronic mutation affecting pre-mRNA splicing in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene as novel mechanisms causing 5-fluorouracil toxicity. *Hum Genet*. 2010;128(5):529-38.
98. Froehlich TK, Amstutz U, Aebi S, Joerger M, Largiader CR. Clinical importance of risk variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene for the prediction of early-onset fluoropyrimidine toxicity. *Int J Cancer*. 2015;136(3):730-9.
99. Falvella FS, Cheli S, Martinetti A, Mazzali C, Iacovelli R, Maggi C, et al. DPD and UGT1A1 deficiency in colorectal cancer patients receiving triplet chemotherapy with fluoropyrimidines, oxaliplatin and irinotecan. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(3):581-8.
100. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, et al. Strong Association of a Common Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene Polymorphism with Fluoropyrimidine-Related Toxicity in Cancer Patients. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e4003.
101. Deenen MJ, Schellens JHM, Cats A. SNPs and Haplotypes in DPYD and Outcome of Capecitabine-Response. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(17):5835-6.
102. Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Bilek M, Bouskova K, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and

- patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma*. 2009;56(4):303-16.
103. Ezzeldin H, Johnson MR, Okamoto Y, Diasio R. Denaturing high performance liquid chromatography analysis of the *DPYD* gene in patients with lethal 5-fluorouracil toxicity. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3021-8.
  104. Vreken P, van Kuilenburg AB, Meinsma R, Beemer FA, Duran M, van Gennip AH. Dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency: a novel mutation and expression of missense mutations in *E. coli*. *J Inher Metab Dis*. 1998;21(3):276-9.
  105. Etienne-Grimaldi MC. Exhaustive single nucleotide polymorphism (SNP) analysis of *DPYD* exome in breast cancer patients (pts) receiving capecitabine. Priopćenje na kongresu Američkog društva za kliničku onkologiju, ASCO 2015, sažetak broj 2571.
  106. Boige V, Vincent M, Alexandre P, Tejpar S, Landolfi S, Le Malicot K, et al. *DPYD* Genotyping to Predict Adverse Events Following Treatment With Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy in Patients With Stage III Colon Cancer: A Secondary Analysis of the PETACC-8 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2016;2(5):655-62.
  107. Wells PG, Mackenzie PI, Chowdhury JR, Guillemette C, Gregory PA, Ishii Y, et al. Glucuronidation and the UDP-glucuronosyltransferases in health and disease. *Drug Metab Dispos*. 2004;32(3):281-90.
  108. Stahl N, Jurevics H, Morell P, Suzuki K, Popko B. Isolation, characterization, and expression of cDNA clones that encode rat UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase. *J Neurosci Res*. 1994;38(2):234-42.
  109. Meech R, Mubarakah N, Shivasami A, Rogers A, Nair PC, Hu DG, et al. A Novel Function for UDP Glycosyltransferase 8: Galactosidation of Bile Acids. *Molecular Pharmacology*. 2015;87(3):442-50.
  110. MacKenzie PI, Rogers A, Elliot DJ, Chau N, Hulin J-A, Miners JO, et al. The Novel UDP Glycosyltransferase 3A2: Cloning, Catalytic Properties, and Tissue Distribution. *Molecular Pharmacology*. 2011;79(3):472-8.
  111. Meech R, Miners JO, Lewis BC, Mackenzie PI. The glycosidation of xenobiotics and endogenous compounds: Versatility and redundancy in the UDP glycosyltransferase superfamily. *Pharmacology & Therapeutics*. 2012;134(2):200-18.
  112. Johns Hopkins University. UDP-glycosyltransferase 1 family, Polypeptide A1; UGT1A1. Dostupno na: [omim.org/entry/191740](http://omim.org/entry/191740)

113. Ehmer U, Lankisch TO, Erichsen TJ, Kalthoff S, Freiberg N, Wehmeier M, et al. Rapid Allelic Discrimination by TaqMan PCR for the Detection of the Gilbert's Syndrome Marker UGT1A1 28. *J Mol Diagn.* 2008;10(6):549-52.
114. Servedio V, d'Apolito M, Maiorano N, Minuti B, Torricelli F, Ronchi F, et al. Spectrum of UGT1A1 mutations in Crigler-Najjar (CN) syndrome patients: identification of twelve novel alleles and genotype-phenotype correlation. *Hum Mutat.* 2005;25(3):325.
115. Dias MM, Pignon JP, Karapetis CS, Boige V, Glimelius B, Kweekel DM, et al. The effect of the UGT1A1\*28 allele on survival after irinotecan-based chemotherapy: a collaborative meta-analysis. *Pharmacogenomics J.* 2014;14(5):424-31.
116. Ando Y, Saka H, Ando M, Sawa T, Muro K, Ueoka H, et al. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase gene and irinotecan toxicity: a pharmacogenetic analysis. *Cancer Res.* 2000;60(24):6921-6.
117. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol.* 2004;22(8):1382-8.
118. Barbarino JM, Haidar CE, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for UGT1A1. *Pharmacogenet Genomics.* 2014;24(3):177-83.
119. National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v4.0 Svibanj, 2009 Dostupno na: <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/>.
120. von Ahsen N, Oellerich M, Schutz E. DNA base bulge vs unmatched end formation in probe-based diagnostic insertion/deletion genotyping: genotyping the UGT1A1 (TA)<sub>n</sub> polymorphism by real-time fluorescence PCR. *Clin Chem.* 2000;46(12):1939-45.
121. Deshpande PR, Rajan S, Sudeepthi BL, Abdul Nazir CP. Patient-reported outcomes: A new era in clinical research. *Perspect Clin Res.* 2011;2(4):137-44.
122. Basch E, Snyder C, McNiff K, Brown R, Maddux S, Smith ML, et al. Patient-Reported Outcome Performance Measures in Oncology. *Journal of oncology practice.* 2014;10(3):209-11.
123. Basch E. The Rise of Patient-Reported Outcomes in Oncology. ASCO daily news, ASCO annual meeting collective wisdom [Internet]. Lipanj 2016. Dostupno na: <http://am.asco.org/rise-patient-reported-outcomes-oncology>.
124. Sprangers MA, Sloan JA, Veenhoven R, Cleeland CS, Halyard MY, Abertnethy AP, et al. The establishment of the GENEQOL consortium to investigate the genetic disposition of patient-reported quality-of-life outcomes. *Twin Res Hum Genet.* 2009;12(3):301-11.

125. Jennings BA, Loke YK, Skinner J, Keane M, Chu GS, Turner R, et al. Evaluating Predictive Pharmacogenetic Signatures of Adverse Events in Colorectal Cancer Patients Treated with Fluoropyrimidines. *PLoS One*. 2013;8(10):e78053.
126. Gentile G, Botticelli A, Lionetto L, Mazzuca F, Simmaco M, Marchetti P, et al. Genotype-phenotype correlations in 5-fluorouracil metabolism: a candidate DPYD haplotype to improve toxicity prediction. *Pharmacogenomics J*. 2016;16(4):320-5.
127. Toffoli G, Giodini L, Buonadonna A, Berretta M, De Paoli A, Scalone S, et al. Clinical validity of a DPYD-based pharmacogenetic test to predict severe toxicity to fluoropyrimidines. *Int J Cancer*. 2015;137(12):2971-80.
128. Meulendijks D, Henricks LM, Sonke GS, Deenen MJ, Froehlich TK, Amstutz U, et al. Clinical relevance of DPYD variants c.1679T>G, c.1236G>A/HapB3, and c.1601G>A as predictors of severe fluoropyrimidine-associated toxicity: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2015;16(16):1639-50.
129. Liu X, Cheng D, Kuang Q, Liu G, Xu W. Association of UGT1A1\*28 polymorphisms with irinotecan-induced toxicities in colorectal cancer: a meta-analysis in Caucasians. *Pharmacogenomics J*. 2014;14(2):120-9.
130. Marinkovic N, Pasalic D, Grskovic B, Ferencak G, Honovic L, Rukavina AS. Genotype Frequencies of UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 Promoter Gene Polymorphism in the Population of Healthy Croatian Pre-Scholars. *Coll Antropol*. 2008;32(3):725-9.
131. Orjena Ž. Povezanost polimorfizma TATA sloga promotorske regije UGT1A1 gena i žutice u novorođenčadi na prsima - rana prezentacija Gilbertovog sindroma (disertacija). Zagreb: Sveučilište u zagrebu; 2011.
132. Gamulin M, Jokic M, Grgic M, Kapitanovic S. Pharmacogenetic database of colorectal cancer patients in Croatia - correlation with clinical data (kongresno priopćenje). *Annals of Oncology*. 2008;19:149.
133. Lee CS, Ryan EJ, Doherty GA. Gastro-intestinal toxicity of chemotherapeutics in colorectal cancer: The role of inflammation. *World Journal of Gastroenterology*. 2014;20(14):3751-61.
134. Lunenburg CA, Henricks LM, Guchelaar HJ, Swen JJ, Deenen MJ, Schellens JH, et al. Prospective DPYD genotyping to reduce the risk of fluoropyrimidine-induced severe toxicity: Ready for prime time. *Eur J Cancer*. 2016;54:40-8.
135. Deenen MJ, Meulendijks D, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Boot H, et al. Upfront Genotyping of DPYD\*2A to Individualize Fluoropyrimidine Therapy: A Safety and Cost Analysis. *J Clin Oncol*. 2016;34(3):227-34.



136. Cortejoso L, Garcia-Gonzalez X, Garcia MI, Garcia-Alfonso P, Sanjurjo M, Lopez-Fernandez LA. Cost-effectiveness of screening for DPYD polymorphisms to prevent neutropenia in cancer patients treated with fluoropyrimidines. *Pharmacogenomics*. 2016;17(9):979-84.
137. Valdes K. Overcoming the challenges to incorporate evidence-based medicine into clinical practice. *J Hand Ther*. 2010;23(3):239-40.
138. Dunnenberger HM, Crews KR, Hoffman JM, Haidar CE, Wilkinson MR, Caudle KE, et al. Implementing preemptive clinical pharmacogenetics: reporting on 2 years of experience. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2014;95:S13-S4.
139. Boisdron-Celle M, Biason P, Gamelin E, Morel A. Dihydropyrimidine dehydrogenase and fluoropyrimidines: a review of current dose adaptation practices and the impact on the future of personalized medicine using 5-fluorouracil. *Colorectal Cancer*. 2013;2(6):549-58.
140. Henricks LM, Lunenburg CA, Meulendijks D, Gelderblom H, Cats A, Swen JJ, et al. Translating DPYD genotype into DPD phenotype: using the DPYD gene activity score. *Pharmacogenomics*. 2015;16(11):1277-86.
141. Deenen MJ, Cats A, Sechterberger MK, Severens JL, Smits PHM, Bakker R, et al. Safety, pharmacokinetics (PK), and cost-effectiveness of upfront genotyping of DPYD in fluoropyrimidine therapy (kongresno priopćenje). *Journal of Clinical Oncology (ASCO meeting abstracts)*. 2011;29(15suppl), sažetak broj 3606.

## **11 Biografija**

Dr Ivan Bilić diplomirao je 1996. na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Nakon specijalizacije iz interne medicine i subspecijalističkog usavršavanja iz internističke onkologije zaposlen je kao odjelni liječnik na Zavodu za internističku onkologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Također radi kao asistent na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta u Zagrebu. Posebno područje profesionalnog interesa su tumori dojke, tumori probavnog trakta, patogeneza tumorskog rasta, patofiziološka uloga oksidacijskog stresa te farmakogenetika nuspojava citostatika.