

Utjecaj genskoga polimorfizma enzima UGT1A4 i UGT2B7 te transportnih proteina ABCB1 i ABCG2 na koncentraciju lamotrigina u serumu

Šušak Sporiš, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:501896>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Šušak Sporiš

**Utjecaj genskoga polimorfizma
enzima UGT1A4 i UGT2B7 te
transportnih proteina ABCB1 i ABCG2 na
koncentraciju lamotrigina u serumu**

DISERTACIJA



Zagreb, 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Šušak Sporiš

**Utjecaj genskoga polimorfizma
enzima UGT1A4 i UGT2B7 te
transportnih proteina ABCB1 i ABCG2 na
koncentraciju lamotrigina u serumu**

DISERTACIJA

Zagreb, 2024.

Disertacija je izrađena u Zavodu za neurologiju, Kliničke bolnice Dubrava te u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije, Odjelu za laboratorijsku farmakologiju i toksikologiju te Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografije), Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Nada Božina

Posebnu zahvalu upućujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Božina na pruženoj podršci, strpljenju, nesebičnom dijeljenju znanja, usmjeravanju i vodstvu tijekom cijelog ovog puta.

Hvala svim kolegama iz Zavoda za neurologiju, Kliničke bolnice Dubrava te svim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Hvala mojoj obitelji na ljubavi i nesebičnoj podršci.

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1.	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1.	Epilepsija	1
1.2.	Liječenje epilepsije	2
1.2.1.	Lamotrigin	6
1.2.2.	Valproat	9
1.3.	Farmakogenetika	10
1.3.1.	Farmakogenetika I. i II. faze metabolizma lijekova	12
1.3.2.	Farmakogenetika transportnih proteina	16
1.3.3.	Farmakogenetika lamotrigina	18
1.4.	Svrha rada	21
2.	HIPOTEZA	22
3.	CILJEVI RADA	23
4.	ISPITANICI I METODE	24
4.1.	Opis istraživanja	24
4.2.	Koncept analize podataka	25
4.3.	Ispitanici	29
4.4.	Bioanalitičke metode	29
4.4.1.	Određivanje koncentracije lamotrigina i valproata	30
4.5.	Genotipizacija	31
4.6.	Ishod od interesa	36
4.7.	Postupci za postizanje uvjetovane izmjenjivosti	36
4.8.	Statistička analiza (procjena efekata)	41
4.9.	Broj ispitanika	43
4.10.	Ocjena osjetljivosti na nemjereni <i>confounding</i>	46
5.	REZULTATI	49
5.1.	Temeljna svojstva uključenih ispitanika	49
5.2.	Učestalost pojedinih genotipova polimorfizama od interesa i frekvencija varijantnih alela	50
5.3.	Polimorfizam <i>ABCG2 c.421C>A</i> i bioraspodjeljivost lamotrigina	51

5.3.1.	Ispitanici	51
5.3.2.	Efekt varijantnog alela <i>ABCG2 c.421C>A</i> na bioraspoloživost lamotrigina	53
5.3.3.	Osjetljivost na nemjereni <i>confounding</i>	56
5.3.4.	Polimorfizam <i>ABCG2 c.421C>A</i> modificira učinke valproata na bioraspoloživost lamotrigina	64
5.4.	Polimorfizmi <i>UGT2B7 c.-161C>T</i> i <i>UGT1A4*3 c.142T>G</i> i bioraspoloživost lamotrigina	68
5.4.1.	Ispitanici	68
5.4.2.	Polimorfizmi <i>UGT2B7 c.-161C>T</i> i <i>UGT1A4*3 c.142T>G</i> nemaju učinka na bioraspoloživost lamotrigina	71
5.4.3.	Osjetljivost na nemjereni <i>confounding</i>	74
5.5.	Polimorfizam <i>ABCB1 c.1236C>T</i> i bioraspoloživost lamotrigina	76
5.5.1.	Ispitanici	76
5.5.2.	Polimorfizam <i>ABCB1 c.1236C>T</i> nema učinka na bioraspoloživost lamotrigina	76
5.5.3.	Osjetljivost na nemjereni <i>confounding</i>	80
6.	RASPRAVA	82
6.1.	Utjecaj polimorfizama transportera <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i> na bioraspoloživost lamotrigina	83
6.1.1.	Polimorfizam <i>ABCG2 c.421C>A</i> i bioraspoloživost lamotrigina	84
6.1.2.	Polimorfizam <i>ABCB1 c.1236C>T</i> i bioraspoloživost lamotrigina	88
6.2.	Polimorfizmi metaboličkih enzima <i>UGT1A4</i> i <i>UGT2B7</i> i bioraspoloživost lamotrigina	90
6.3.	Ograničenja i važnost provedenog istraživanja	92
7.	ZAKLJUČCI	96
8.	SAŽETAK	98
9.	SUMMARY	100
10.	POPIS LITERATURE	102
11.	ŽIVOTOPIS	120

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC	superporodica prijenosnika ovisnih o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette</i>)
ABCB1	prijenosnik podporodice B, člana 1 ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>), poznat i kao MDR1 te P-glikoprotein
ABCC2	prijenosnik podporodice C, člana 2 ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>), poznat i kao MDR2
ABCG2	prijenosnik podporodice G, člana 2 ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>), poznat kao BCRP (engl. <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>)
ADME	kratica: apsorpcija, distribucija, metabolizam i izlučivanje (engl. <i>absorption, distribution, metabolism, excretion</i>)
AEL	antiepileptički lijekovi, antiepileptici
BCRP	(engl. <i>Breast Cancer Resistance Protein</i>), prijenosnik podporodice G, člana 2 ovisan o ATP-u (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>)
BLOQ	ispod donje granice kvantifikacije (engl. <i>below the lower limit of quantification</i>)
BTKN	bilateralni toničko-klonički napad
COV	koeficijent varijacije
CPIC	Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenetike (engl. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>)
CYP	superporodica metaboličkih enzima citokroma P450
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
C _{max}	vršna koncentracija, najveća koncentracija lijeka u plazmi/serumu nakon primjene
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array detector</i>)
DAG	usmjereni aciklički grafovi (engl. <i>directed acyclic graphs</i>)
DDI	interakcija lijek-lijek (<i>Drug-Drug Interactions</i>)
DDGI	interakcija lijek-lijek-gen (engl. <i>Drug-Drug-Gene Interactions</i>).
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DRESS	reakcija na lijek s eozinofilijom i sistemskim simptomima (engl. <i>Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms</i>); također poznat kao sindrom preosjetljivosti

EEG	elektroencefalogram
EM	brzi/normalni metabolizator (engl. <i>extensive metabolizer</i>)
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. U.S. Food and Drug Administration)
GMR	omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. <i>geometric mean ratio</i>)
HLA	humani leukocitni antigen
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HR	omjer hazarda (engl. <i>hazard ratio</i>)
ILAE	Internacionalna liga protiv epilepsije (engl. <i>International League Against Epilepsy</i>)
IM	intermedijarni ili srednje brzi metabolizator (engl. <i>intermediate metabolizer</i>)
IRR	omjer stopa događaja ili incidencije (engl. <i>incidence rate ratio</i>)
LAM	lamotrigin
LD	neravnoteža povezanosti gena (engl. <i>linkage disequilibrium</i>)
LLOQ	donja granica kvantifikacije (engl. <i>lower limit of quantification</i>)
MDR1	protein višestruke rezistencije na lijekove 1 (engl. <i>multi-drug resistance protein 1</i>), također poznat kao ABCB1 i P-glikoprotein
MRP2	protein višestruke rezistencije na lijekove 2 (engl. <i>multi-drug resistance protein 2</i>)
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
NAT	N-acetiltransferaza
OR	omjer izgleda (engl. <i>odds ratio</i>)
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-RFLP	analiza polimorfizma dužine restrikcijskih ulomaka (engl. <i>polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism</i>)
PM	spori/slabi metabolizator (engl. <i>poor metabolizer</i>)
polimorfizam	genetička varijacija čija je učestalost u populaciji najmanje 1%
P-gp	P-glikoprotein, prijenosnik također poznat kao ABCB1 i MDR1
RNA	ribonukleinska kiselina
RR	relativni rizik (engl. <i>relative risk</i>)
SCM	strukturalni kauzalni modeli (engl. <i>structural causal models</i>)
SLC	superporodica prijenosnika (engl. <i>Solute Carrier</i>)

SLCO	porodica organskih anionskih prijenosnika, raniji naziv SLC21
SJS	Stevens–Johnsonov sindrom
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SULT	sulfotransferaza
SŽS	središnji živčani sustav
TEN	toksična epidermalna nekroliza
T_{\max}	vrijeme postizanja C_{\max} (vršna koncentracija)
TPMT	tiopurinmetiltransferaza
UDPGK	uridin-difosfat-glukuronska kiselina
UGT	superporodica uridin-difosfat-glukuronoziltransferaza
UM	vrlo brzi metabolizator (engl. <i>ultrarapid metabolizer</i>)
VAL	valproat/valproična kiselina
wt	alel divljeg tipa (engl. <i>wild type</i>)

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. Epilepsija

Epilepsija je jedna od najstarijih, a ujedno i najčešćih neuroloških bolesti. Zbog svoje učestalosti i kliničkih obilježja epilepsija predstavlja veliki medicinski, ali i društveni problem. Definira se kao poremećaj karakteriziran trajnom predispozicijom mozga za generiranje epileptičkih napada (1). Epileptički napadi predstavljaju prolaznu pojavu neuroloških simptoma i/ili znakova zbog prekomjerne ili sinhronne neuronske aktivnosti mozga (2). Dijagnoza epilepsije postavlja se nakon najmanje dva neprovocirana (ili refleksna) epileptička napada u razmaku većem od 24 sata te u slučaju epileptičkih sindroma (1). Nadalje, dijagnoza epilepsije može se postaviti i nakon jednog epileptičkog napada ukoliko je vjerojatnost da se napad ponovi slična kao i nakon dva neprovocirana napada (odnosno veća od 60%), a što se prvenstveno odnosi na bolesnike s prisutnim EEG abnormalnostima ili strukturalnim promjena na mozgu poput preboljelog moždanog udara, tumora na mozgu, poremećaja kortikalnog razvoja ili hipokampalne skleroze (2). Osim epileptičkim napadima, epilepsija može biti praćena i različitim kognitivnim, psihološkim i socijalnim posljedicama.

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije smatra se da u svijetu živi preko 50 milijuna ljudi s epilepsijom što epilepsiju čini najčešćom kroničnom neurološkom bolesti (3). Procjenjuje se da u općoj populaciji aktivnu epilepsiju ima 5 – 10 osoba na 1000 stanovnika (4), dok se prevalencija aktivne epilepsije u Hrvatskoj procjenjuje na 4.8 - 5.5/1000 (5). Najčešće se pojavljuje u dojenačkoj i ranoj dječjoj dobi, nešto manje u pubertetu, potom incidencija opada u odrasloj populaciji, ali ponovno izrazito raste u starijoj životnoj dobi (6). Posljedice epilepsije, posebno ako se radi o nekontroliranoj epilepsiji, mogu biti ozbiljne, od različitih ozljeda, obolijevanja od drugih bolesti i iznenadne smrti pa sve do različitih psihosocijalnih posljedica. Radi što adekvatnije skrbi za bolesnike nužno je pravovremeno prepoznavanje i dijagnosticiranje epilepsije. Za postavljanje pravilne dijagnoze i potom odgovarajuće liječenje izrazito je važno poznavanje semiologije epileptičkih napada kao i klasifikacije epilepsije, odnosno epileptičkog sindroma. Godine 2017. Internacionalna liga protiv epilepsije (ILAE, engl. *International League Against Epilepsy*) objavila je klasifikaciju epileptičkih napada prema kojoj se oni dijele na napade sa žarišnim, generaliziranim i

nepoznatim početkom (2). Na staničnoj razini, osnovu epileptičkog napada čini paroksizmalni depolarizacijski pomak, stanje u kojem repetitivno izbijanje akcijskog potencijala nije praćeno uobičajenim refrakternim razdobljem, radi čega nastaje prolongirana membranska depolarizacija i posljedično pojačano otpuštanje ekscitacijskih neurotransmitora u sinaptičke pukotine (7). Ovakvo stanje može biti uzrokovano nizom unutarnjih i vanjskih čimbenika. Proces kojim određena regija mozga tijekom nekoga vremena postaje sposobna spontano generirati epileptičke napade naziva se epileptogenezom (8). Ishodište epileptičkih napada uglavnom je kortikalne lokalizacije i sadržava velik broj patološki promijenjenih deaferentiranih neurona. Žarišni epileptički napadi karakterizirani su paroksizmalnim izbijanjem u ograničenoj regiji mozga te se manifestiraju žarišnim simptomima, dok generalizirani napadi najvjerojatnije započinju simultano bilateralno u talamusu i drugim supkortikalnim strukturama uključujući diencefalon i retikularnu formaciju moždanog debla (8). Na temelju semiologije prisutnih epileptičkih napada epilepsije dijelimo na žarišne, generalizirane, kombinirane žarišne i generalizirane te nepoznate. Zasebnu skupinu čine epileptički sindromi (2).

1.2. Liječenje epilepsije

Osnovu liječenja epilepsije čini farmakološko liječenje. Epilepsija je jedina kronična neurološka bolest koja se može lijekovima staviti pod kontrolu, odnosno uvesti u remisiju. Na tržištu je dostupan cijeli niz lijekova za liječenje epilepsije koji imaju različite mehanizme djelovanja, učinkovitost i podnošljivost. Antiepileptičke lijekove (AEL) dijelimo u dvije velike skupine, one užeg spektra djelovanja koji su učinkovitiji u liječenju pojedinih vrsta napada te AEL širokog spektra s dokazanom učinkovitošću i kod generaliziranih i kod žarišnih napada (9,10) (tablica 1).

Tablica 1. Antiepileptici šireg i užeg spektra djelovanja. Prilagođeno prema Bašić i sur. (11).

<i>AEL šireg spektra djelovanja</i>	<i>AEL užeg spektra djelovanja</i>
Učinkovitost u liječenju žarišnih i većine generaliziranih napada: Natrijev valproat Levetiracetam Zonisamid Topiramat Fenobarbital Primidon Benzodijazepini Lamotrigin* Rufinamid* Felbamat*	Učinkovitost u liječenju žarišnih napada s ili bez prelaska u BTKN: Karbamazepin Fenitoin Gabapentin Lakozamid Okskarbazepin Eslikarbazepin acetat Pregabalin Tiagabin Vigabatrin Retigabin Perampanel Brivaracetam
	Najbolja učinkovitost u liječenju apsansa: Etosuksimid

AEL – antiepileptici; BTKN – bilateralni toničko-klonički napadi

*prema nekim autorima lamotrigin, felbamat i rufinamid se svrstavaju u antiepileptike užeg spektra djelovanja

Adekvatnim izborom prvog AEL remisija se postiže u oko 50% bolesnika, dok se kod još oko 20% bolesnika remisija postiže zamjenskom monoterapijom ili racionalnom politerapijom (12). Bolesnici koji usprkos uzimanju dva ili više odgovarajuće odabrana AEL primijenjena u adekvatnoj dozi i dalje imaju napade, boluju od farmakorezistentnog oblika epilepsije (13) te su ti bolesnici kandidati za neku od neurokirurških metoda liječenja nakon čega se kod velikog broja bolesnika postiže zadovoljavajuća kontrola bolesti (14).

Kvaliteta života osoba s epilepsijom nije određena samo pojavnošću epileptičkih napada već i nuspojavama AEL stoga je cilj farmakološkog liječenja dobra kontrola epileptičkih napada uz izbjegavanje nuspojava. Procjenjuje se da oko trećina bolesnika s epilepsijom iskusi različite nuspojave AEL-a (15).

Temelj uspješnog liječenja epilepsije je ispravno prepoznavanje vrste napada, odnosno ispravno postavljanje dijagnoze epilepsije ili epileptičkog sindroma. Prilikom odabira AEL važan je individualni pristup, pri čemu je osim dijagnosticiranog oblika bolesti nužno voditi računa i o specifičnim karakteristikama svakog pojedinog bolesnika poput dobi, spola, komorbiditeta i komedikacije. Uz individualni pristup svakom bolesniku iznimno važno je i poznavanje farmakoloških svojstava lijeka stoga adekvatan odabir AEL podrazumijeva kompatibilnost farmakoloških karakteristika AEL-a učinkovitog u liječenju određenog tipa napada s individualnim karakteristikama svakog bolesnika.

Za sigurnu i djelotvornu primjenu farmakoterapije nužno je poznavanje procesa biotransformacije svakog pojedinog lijeka. Prema klasičnoj podjeli metabolizam lijekova dijelimo u reakcije I. faze (oksidacija, redukcija i hidroliza) te reakcije II. faze (acetilacija, glukuronidacija, metilacija, sulfokonjugacija, N-acilacija, reakcije s glutationom). Enzimi I. faze odgovorni su za biotransformaciju više od 75% lijekova, a uglavnom pretvaraju izvorni lijek u polarniji metabolit stvaranjem funkcionalne skupine (-OH, -NH₂, -SH) (16). Ukoliko su metaboliti nastali u I. fazi dovoljno polarni, mogu se brzo izlučiti, ali mnogi produkti I. faze ne izlučuju se brzo te prolaze kroz reakcije u kojima se endogeni supstrat poput glukuronske kiseline, sulfurne kiseline ili aminokiseline povezuje s novougrađenim funkcionalnim skupinama u konjugate velike polarnosti (16). Upravo te reakcije konjugacije glavno su obilježje metabolizma II. faze. Iako se većina lijekova metabolizira opisanim slijedom reakcija, u nekim slučajevima već izvorni lijek može posjedovati funkcionalne skupine koje izravno mogu stvarati konjugate (16). Uz metaboličke enzime važnu ulogu u farmakokinetici lijekova imaju i prijenosnici, odnosno transportni proteini. Oni su važni za transport lijekova kroz različite biološke membrane poput posteljice, gastrointestinalne, bubrežne ili krvno-moždane barijere radi čega imaju važnu ulogu u biodostupnosti lijekova, odnosno apsorpciji, raspodjeli i izlučivanju lijekova (17). Navedeni procesi kojima lijek podliježe u organizmu poznati su u literaturi pod nazivom ADME (apsorpcija, raspodjela, metabolizam i izlučivanje, engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion*).

Optimalne terapijske ili maksimalno podnošljive doze lijekova individualne su vrijednosti te ovise o nizu čimbenika poput dobi, tjelesne težine, spola, genetike, komorbiditeta i komedikacije. Upravo individualni pristup u određivanju doze važan je u farmakoterapiji

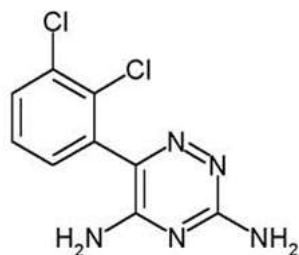
epilepsije. Radi optimizacije antiepileptičke terapije u rutinskoj kliničkoj praksi se često primjenjuje terapijsko praćenje lijeka (TDM, engl. *therapeutic drug monitoring*) u serumu. Referentni raspon predstavlja raspon koncentracija lijeka koji navodi laboratorij i određuje donju granicu ispod koje je terapijski odgovor manje očekivan te gornju granicu iznad koje je vjerojatnost pojave štetnih učinaka veća. Predloženi referentni rasponi koncentracija lijekova često imaju statističko značenje i predstavljaju vjerojatan najučinkovitiji raspon doza za većinu bolesnika, a temelji se na sustavnom istraživanju korelacije između kliničkih podataka i koncentracija lijeka u serumu (18). Zbog individualnih razlika određeni bolesnici mogu imati terapijski učinak, odnosno dobru podnošljivost iako je koncentracija lijeka izvan referentnog raspona. Terapijski raspon se određuje individualno titracijom doze, budući je izravno povezan s dobrim kliničkim odgovorom na primijenjeni lijek. Cilj liječenja epilepsije je postići dobru kontrolu epileptičkih napada uz izbjegavanje štetnih učinaka, a pri čemu TDM ima važnu ulogu budući ne postoji izravna metoda procjene farmakološkog učinka liječenja. TDM je od posebne važnosti kod lijekova koji pokazuju sklonost interindividualnoj i intraindividualnoj farmakokinetičkoj varijabilnosti.

U slučajevima kada se bolesnik istovremeno liječi s više lijekova često postoji rizik od klinički važnih interakcija koje mogu biti glavni razlog farmakoloških varijacija, a upravo mjerenje koncentracije antiepileptika u serumu može nas uputiti na značajne interakcije zbog kojih je potrebna korekcija doze lijekova, iako na temelju prethodnih znanja o mehanizmima interakcije možemo predvidjeti uočeni učinak. Osim što serumske koncentracije AEL imaju važnu ulogu u predviđanju promjena bioraspoloživosti, razvoja nuspojava, ali i dometu interakcija AEL, praćenje koncentracija predstavlja i važan faktor u potvrdi suradljivosti bolesnika. Stoga za adekvatno doziranje AEL, osim kliničkih parametara poput životne dobi, funkcije jetre i bubrega, nužno je razmotriti postoji li mogućnost eventualnih interakcija lijekova. Prema mehanizmu nastanka, interakcije dijelimo na farmakokinetičke i farmakodinamske, pri čemu je farmakodinamska interakcija posljedica promjene učinka lijeka, ali bez promjene njegove koncentracije na mjestu djelovanja. Među farmakodinamske interakcije spada kompetitivni antagonizam na istom receptoru, antagonizam farmakološkog učinka drugog lijeka na različitim receptorima, funkcionalni sinergizam ili mehanizmi koji dovode do istog ili suprotnog učinka (19). Za razliku od farmakodinamskih interakcija, farmakokinetičke interakcije mogu utjecati na razinu koncentracije na mjestu djelovanja lijeka, a mogu biti na razini apsorpcije, raspodjele, metabolizma te izlučivanja lijeka. Uzroci farmakokinetičkih reakcija mogu biti razni, poput formiranja kompleksa, kompeticije za transportere za unos ili indukcija odnosno inhibicija metaboličkih enzima i efluksnih prijenosnika (20). Klinički najznačajnije farmakokinetičke

interakcije među antiepilepticima su one koje su vezane za inhibiciju ili indukciju metaboličkih enzima radi čega je nužno poznavanje farmakoloških svojstava lijeka. Upravo su AEL skupina lijekova koju karakterizira velika podložnost farmakokinetičkim interakcijama, a što je dijelom smanjeno razvojem novijih AEL. Važnost interakcija leži u činjenici da one mogu rezultirati neželjenim kliničkim ishodom poput razvoja nuspojava, pogoršanja osnovne bolesti ili pogoršanja komorbidnih bolesti. Klasično antiepileptike dijelimo na standardne [fenobarbiton, fenitoin, karbamazepin, valproat (VAL) i drugi] i moderne [okskarbazepin, lamotrigin (LAM), topiramat, levetiracetam, pregabalin, zonisamid, lakozamid i drugi]. Karbamazepin, fenitoin, fenobarbiton i primidon induciraju mnoge enzime citkroma P450 (CYP) i uridin-difosfat-glukuronoziltransferaze (UGT) te time mogu značajno smanjiti koncentracije lijekova koji su supstrati tih enzima uključujući lamotrigin, tiagabin, oralne antikoagulanse, oralne kontraceptive te antimikrobne, antineoplastične, imunosupresivne, kardiovaskularne i psihotropne lijekove (21). Suprotno tome, valproična kiselina inhibicijom metabolizma, pretežno putem enzima UGT, može produljiti bioraspoloživost antiepileptika poput lamotrigina i fenobarbitona (21). Zbog razvoja novijih antiepileptika stvoreno je više mogućnosti u liječenju epilepsije budući moderni antiepileptici uzrokuju manje nuspojava kao i manje interakcija s drugim lijekovima na razini enzima CYP i UGT. Usprkos tome, upotrebom modernih antiepileptika broj bolesnika s farmakorezistentnom epilepsijom ostao je nepromijenjen (22).

1.2.1. Lamotrigin

Lamotrigin je moderni antiepileptik koji je prvi put sintetiziran 1970.-ih godina, a 1995. godine je izdano prvo odobrenje za primjenu u Hrvatskoj. Po kemijskom sastavu je 3,5-diamino-6[2,3-diklorofenil]-1,2,4-triazin, s molekularnom težinom 256.09 (slika 1). Strukturom nije sličan niti jednom drugom antiepileptiku.



Slika 1. Kemijska struktura lamotrigina

Široko se upotrebljava u svakodnevnoj kliničkoj praksi. U odraslih i adolescenta u dobi iznad 13 godina odobren je kao monoterapija i politerapija u liječenju žarišnih i generaliziranih epileptičkih napada te u liječenju napada u sklopu sindroma Lennox-Gastaut. Također je odobren i kao dodatna antiepileptička terapija kod žarišnih i generaliziranih napada te kao monoterapija kod tipičnih apsansa u dobi od 2 – 12 godina. Osim u epilepsiji odobren je i za liječenje bipolarnog poremećaja kod odraslih (23). Lamotrigin ima višestruke mehanizme antiepileptičkog djelovanja. Primarni mehanizam djelovanja je blokiranje voltažno ovisnih natrijevih kanala (24). Također blokira i otpuštanje ekscitacijskih neurotransmitera, poglavito glutamata (25), a jedan od mehanizama je i blokiranje voltažno ovisnih kalcijevih kanala (24). Lamotrigin pokazuje linearnu farmakokinetiku. Nakon oralne ingestije brzo se apsorbira ($T_{max} = 1-3$ sata) s biodostupnošću od $\geq 95\%$. Volumna distribucija je 0.9-1.3 L/kg, a stopa vezanja za proteine plazme je 55% (26). Poluvrijeme eliminacije ($t_{1/2}$) je 15-35 sati, no može značajno varirati ovisno o brojnim faktorima, uključujući i komedikaciju (26).

Metabolizira se u jetri glukuronidacijom, bez prethodnog uključanja CYP enzima, odnosno enzima I. faze (26,27). Enzimi koji kataliziraju reakcije glukuronidacije pripadaju superporodici enzima uridin-difosfat-glukuronoziltransferaza (UGT). Glukuronidacija lamotrigina se primarno odvija putem UGT1A4, ali glukuronidaciji također pridonosi UGT2B7 te moguće UGT1A1 i UGT1A3 (24,26). *In vitro* studije pokazale su da je UGT2B7 posebno značajan kod nižih koncentracija lamotrigina (28). Lamotrigin se u najvećoj mjeri metabolizira u 2-N-glukuronid (76% doze) i 5-N-glukuronid (10% doze). Također se metabolizira i u 2-N-metil metabolit (0.14% doze) te u ostale nepoznate, manje metabolite (4% doze) (26). Oko 10% doze lijeka nepromijenjeno se izlučuje urinom (26). Dodatno, lamotrigin inducira vlastitu glukuronidaciju što rezultira blagim povećanjem klirensa, ali proces se dovršava unutar dva tjedna od početka liječenja (29).

Uvođenje lijeka počinje s 12.5 do 25 mg dnevno, a potom se doza postepeno povećava do 200 – 600 mg/dan (ovisno o komedikaciji), podijeljeno dva puta na dan (27). Preporučene

koncentracije lijeka u serumu su 4-55 $\mu\text{mol/L}$ (30). Iako incidencija toksičnosti raste s koncentracijama lamotrigina iznad 60 $\mu\text{mol/L}$ (31), brojne studije su pokazale da se serumske koncentracije lamotrigina mogu podudarati u bolesnika koji su razvili neželjene reakcije te onih koji imaju dobru podnošljivost. Upravo radi toga nužno je individualiziranje terapije uz redovito praćenje serumskih koncentracija. Najčešće neželjene reakcije na lamotigin su vrtoglavica, dvoslike, glavobolja, ataksija, zamućen vid, mučnina, povraćanje, pospanost kao i hipersenzitivni kožni osip (24). Ukoliko se razviju, kožne reakcije se uglavnom javljaju tijekom početka liječenja lamotriginom. Većinom je osip blagog i ograničenog intenziteta, no postoje i slučajevi ozbiljnije kliničke slike kada je potrebna hospitalizacija i prekid primjene lamotrigina. Teški osipi uključuju potencijalno po život opasna stanja kao što su Stevens–Johnsonov sindrom (SJS), toksična epidermalna nekroliza (TEN) i reakcija na lijek s eozinofilijom i sistemskim simptomima (engl. *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms - DRESS*); također poznat kao sindrom preosjetljivosti (32).

Lamotigin je karakteriziran značajnom interindividualnom farmakokinetičkom varijabilnošću, a na što mogu utjecati različiti faktori kao što je dob bolesnika, težina, komedikacija, etnička pripadnost, jetrena te bubrežna funkcija, ali i specifična stanja kao što je trudnoća (31,33-35). Klirens lamotrigina kod djece je i do 2 puta veći nego u odraslih, a među starijom, zdravom populacijom klirens lamotrigina je reduciran oko 30% u usporedbi sa srednjovječnom odraslom populacijom (31). Također, promjena klirensa lamotrigina povezuje se i s ukupnom tjelesnom težinom (33). Osim toga, brojne studije su pokazale promjenu koncentracije lamotrigina tijekom trudnoće. Iako postoje individualne razlike, kod trudnica se klirens lamotrigina značajno povećava kako trudnoća napreduje, s najvišom točkom u trećem tromjesečju (27,31, 36). Povećani krvni protok kroz bubrege te pojačana glomerularna filtracija odgovorni su za pojačano izlučivanje lamotrigina u ranoj trudnoći (37,38), dok je u kasnijoj trudnoći glukuronidacija lamotrigina ubrzana djelovanjem estradiola (37,39). Upravo iz navedenih razloga je potrebna prilagodba doze lijeka tijekom trudnoće. Više studija je pokazalo da oralni kontraceptivi značajno smanjuju koncentraciju lamotrigina u serumu, najvjerojatnije putem indukcije glukuronidacijskih puteva koji su uključeni u metabolizam i etinil estradiolola i lamotrigina (40,41). Kod bolesnika s jetrenom cirozom klirens lamotrigina je smanjen, a poluvrijeme izlučivanja lijeka povećano. Promjene u farmakokinetici lamotrigina koreliraju sa stupnjem oštećenja jetre te je kod bolesnika s izrazito značajnom cirozom medijan $t_{1/2}$ 110 sati. Uznapredovala renalna insuficijencija je povezana sa smanjenim klirensom i povećanim $t_{1/2}$ lamotrigina koji se može kretati i do oko 50 sati (31). Značajan utjecaj na serumske koncentracije lamotrigina može imati istovremena primjena antiepileptika koji su inhibitori ili

induktori jetrenih enzima. Antiepileptici koji su induktori enzima kao što je karbamazepin, fenitoin, primidon i fenobarbiton povećavaju klirens lamotrigina te tako smanjuju koncentraciju lamotrigina u serumu (26,27,31). Suprotno tome, natrijev valproat je potentni inhibitor metabolizma lamotrigina budući djeluje kao inhibitor CYP i UGT enzima, uključujući i inhibiciju UGT1A4 i UGT2B7, radi čega koadministracija ova dva lijeka može dovesti do značajnog povećanja koncentracije lamotrigina. Prosječno se klirens lamotrigina uz koadministraciju s valproatom smanjuje za 60% što dovodi do povećanja koncentracije lamotrigina u serumu, a zabilježeno je povećanje koncentracije lamotrigina i do 200% radi čega se mogu javiti brojne neželjene reakcije poput osipa (uključujući i mogući Stevens-Johnsonov sindrom), glavobolje, ataksije, dvoslika, mučnine, pospanosti i drugih (26,42,43). U više studija je ispitivan mogući utjecaj pušenja, odnosno nikotina, na koncentracije lamotrigina. Nikotin može imati inducirajući učinak na mikrosomalne enzime CYP1A1, CYP1A2, CYP2A1, CYP2A2, CYP2B1, CYP2B2 i CYP2E1 te na UGT1A9 i UGT2B7. Metabolizam lamotrigina manjim dijelom ide putem enzima UGT2B7 te je pretpostavljeno da može biti pod inducirajućim učinkom nikotina što posljedično može rezultirati promjenama u serumskoj koncentraciji lamotrigina. I dok su neke ranije studije pokazale da pušači koji su na monoterapiji lamotriginom imaju niže serumske koncentracije lamotrigina (44,45), u nedavno provedenim studijama taj učinak nije potvrđen (46,47).

1.2.2. Valproat

Za razliku od lamotrigina koji je moderni antiepileptik, valproat je standardni antiepileptik koji je sintetiziran još 1881. godine, no nakon što su mu dokazana antiepileptička svojstva po prvi puta je odobren 1967. godine u Francuskoj kao valproična kiselina, a potom i u više od 100 država (48). Valproična kiselina (2- propilpentanoična kiselina, VAL) je kratka, razgranata masna kiselina (48). Valproat se metabolizira glukuronidacijom u jetri te β -oksidacijom u mitohondrijima, a oba puta se smatraju podjednako važnima obzirom da se njima metabolizira oko 50% odnosno 40% primjenjene doze. Dodatno, oko 10% primjenjene doze se metabolizira oksidacijom s citokromom P450 (CYP) (49). *In vitro* studije su pokazale kako je proces metabolizma glukuronidacije posredovan UGT enzimima: UGT1A3, UGT1A4, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A10 i UGT2B7, dok među važnije CYP enzime koji sudjeluju u metabolizmu valproata spadaju CYP2C9, CYP2A6 i CYP2B6 (50). Valproat ima višestruke mehanizme djelovanja, između ostalih djeluje kao blokator voltažno ovisnih natrijevih kanala, GABA

(gama-aminomaslačna kiselina) agonist te blokator voltažno ovisnih kalcijevih kanala. Nakon oralne primjene u cijelosti se apsorbira i ima 100% bioraspoloživost. Oko 90% valproata se veže na albumine (48). Visok postotak vezanja na proteine plazme je povezan s mogućim interakcijama lijekova. Jedan od primjera je istodobna primjena valproata i acetilsalicilne kiseline koja može istisnuti valproičnu kiselinu s albumina i posljedično povećati koncentraciju valproata u plazmi (51). Osim interakcija koje su povezane s vezanjem valproata za proteine plazme, drugi mehanizam stupanja u interakcije valproata s ostalim lijekovima je putem metabolizma, poput navedene interakcije valproata i lamotrigina pri čemu zbog inhibitornog djelovanja valproata na UGT1A4 i UGT2B7 dolazi do povećanja koncentracije lamotrigina u serumu.

1.3. Farmakogenetika

Gotovo jedna trećina osoba s epilepsijom uz primjenu dostupnih AEL nema dobru kontrolu epileptičkih napada (12,52). Dodatno, oko trećina pacijenata razvije barem jednu neželjenu reakciju na AEL (15). Osim ranije navedenih kliničkih karakteristika, interindividualna varijabilnost u učinkovitosti i neželjenim reakcijama na lijekove povezuje se i genetičkim razlikama budući geni mogu modulirati učinkovitost lijeka utjecajem na farmakokinetičke parametre, odnosno uzrokovati promjenjivu aktivnost sustava odgovornih za metabolizam i transport lijeka (53,54).

Brojne su potencijalne posljedice genetičkih polimorfizama metaboličkih enzima i transportnih proteina na farmakoterapiju: produljenje i pojačavanje farmakološkog učinka, toksičnost lijeka i razvoj nuspojava, izostanak aktivacije predlijeka, izostanak učinkovitosti pri primjeni preporučenih doza te potreba za višim dozama, aktivacija alternativnih i potencijalno štetnih metaboličkih puteva te interakcije lijekova. Pretpostavlja se da je upravo faktor genetičke varijabilnosti odgovoran za 25 -50% ukupne pojavnosti neželjenih reakcija na lijek (16).

Istraživanja genske osnove u odgovoru na farmakoterapiju pod zajedničkim nazivom farmakogenetika/farmakogenomika naglo su se počela razvijati napredovanjem molekularnih dijagnostičkih metoda te razvojem projekta ljudskog genoma radi čega je koncept „personalizirana medicina“ sve prisutniji u medicinskoj praksi. Farmakogenetika proučava interakcije pojedinog lijeka i gena, dok farmakogenomika ispituje utjecaj mnogih gena (ali i čitavog genoma) na učinkovitost i nuspojave određenog lijeka.

Temeljno načelo farmakogenetike je da gensko nasljeđe neke osobe može utjecati na strukturu i koncentraciju proteina te tako na više načina može modificirati djelovanje određenog lijeka (16). Prema sposobnosti i brzini metaboliziranja lijeka razlikuju se četiri specifična fenotipa koji se mogu odrediti fenotipizacijom ili genotipizacijom: spori/slabi metabolizator (engl. *Poor Metabolizer – PM*), srednje brzi metabolizator (engl. *Intermediate Metabolizer – IM*), brzi/normalni metabolizator (engl. *Extensive Metabolizer – EM*) i vrlo brzi metabolizator (engl. *Ultrarapid Metabolizer – UM*) (55). Spori metabolizatori imaju visok rizik razvoja nuspojava uz primjenu prosječnih doza lijeka zbog izostanka funkcionalnih alela i posljedične neaktivnosti enzima. Srednje brzi metabolizatori mogu iskusiti nešto manje nuspojava od sporih metabolizatora jer mogu biti homozigoti za dva alela sa smanjenom aktivnosti ili su heterozigoti tj. nositelji jednog neaktivnog alela (općenito aktivnost enzima smatra se aditivnom, odnosno kodominantnom osobinom). Kod brzog metabolizatora postoje dva potpuno aktivna alela i očekivana je karakteristika najvećeg dijela populacije. Fenotip vrlo brzog metabolizatora ima osobinu ubrzane razgradnje lijekova kao rezultat amplifikacije gena te pri primjeni prosječnih doza lijeka može izostati terapijski učinak (20).

Upravo s novim saznanjima o interindividualnim razlikama na razini sekvence deoksiribonukleinske kiseline (DNA) poboljšano je razumijevanje učinaka određenih varijanti gena na lijekove što je rezultiralo sve većim brojem istraživanja o genetičkoj osnovi različitog odgovora na farmakoterapiju. Rezultati istraživanja su pokazali da su, uz kliničke čimbenike kao što su dob, spol, funkcija jetre i bubrega, komorbiditete, komedikaciju, okolišne čimbenike (poput hrane), i nasljedne farmakogenetičke varijacije važne pri odabiru adekvatnog lijeka te doze za svakog pojedinca. Analizirajući nasljedne farmakogenetičke varijacije moguća je identifikacija bolesnika s povećanim rizikom razvoja neželjenih nuspojava i prije početka terapije. Važnost farmakogenetičkih podataka u informacijama o lijeku istaknuta je i od strane Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency - EMA*) te Agencije za hranu i lijekove Sjedinjenih Američkih Država (engl. *Food and Drug Administration - FDA*). Genetsko testiranje u predviđanju djelotvornosti i toksičnosti antiepileptika je ograničeno. Postoji samo nekoliko primjera kada se takvo testiranje može preporučiti u rutinskoj kliničkoj praksi. Jedan od primjera se odnosi na antiepileptik fenitoin i enzim CYP2C9 putem kojeg se dominantno metabolizira fenitoin. Za njega postoje jasne smjernice u doziranju ovisno o genotipu CYP2C9. Varijante gena s gubitkom funkcije enzima rezultiraju usporenim izlučivanjem lijeka, povišenim koncentracijama te povećanim rizikom razvoja nuspojava središnjeg živčanog sustava, radi čega homozigotni nositelji varijantnog alela CYP2C9*3 trebaju za 50% niže početne doze u odnosu na nositelje aktivnih alela (*1) (56). Nadalje, postoje

preporuke o doziranju fenitoina, brivaracetama i klobazama ovisno o genotipu *CYP2C19* prema kojima osobe koje su spori metabolizatori putem *CYP2C19* trebaju niže početne te niže ciljne doze (57). Također, u području antiepileptika uočena je povezanost karbamazepina, okskarbazepina i fenitoina s polimorfizmima gena humanoga leukocitnog antigena (HLA), što kao posljedicu može imati indukciju Stevens-Johnsonovog sindroma (SJS) i toksične epidermalne nekrolize (TEN) (57).

Dosadašnja farmakogenetička istraživanja za lamotrigin nisu rezultirala dokazima koji bili primjenjivi u svakodnevnoj kliničkoj praksi što je potaknulo ovo istraživanje.

1.3.1. Farmakogenetika I. i II. faze metabolizma lijekova

Farmakogenetika I. faze metabolizma lijekova prvenstveno ispituje varijabilnost unutar gena sustava P450 (CYP) odgovornog za oko 90% svih oksidacijskih reakcija (16). Ukupno je identificirano 57 funkcionalnih enzima citokroma P450 (58), no za metabolizam većine klinički važnih lijekova odgovorni su enzimi *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2D6*, *CYP2E1* i *CYP3A* (16). Ove enzime karakterizira izražen genetički polimorfizam. Njihova smanjena aktivnost dovodi do povećanog rizika za razvoj nuspojava, dok povećana aktivnost može rezultirati smanjenom učinkovitošću lijeka. Također, *CYP* enzime karakterizira i značajna inhibicija te indukcija njihove enzimске aktivnosti lijekovima i drugim ksenobioticima. Među klinički najvažnije enzime citokroma P450 spada potporodica *CYP3A* koja sudjeluje u metabolizmu velikog broja lijekova poput imunosupresiva, antibiotika, antidepresiva i oralnih antikoagulansa, s tim da je *CYP3A4* kvantitativno najvažniji enzim P450 kod odraslih (59). *CYP3A4* pokazuje vrlo visoku varijabilnost u aktivnosti, a dokazano je nekoliko polimorfizama koji utječu na njegovu aktivnost. Varijanta *CYP3A4*1B* povezuje se s povećanom funkcijom, dok se varijanta *CYP3A4*22* povezuje sa smanjenom funkcijom ovog enzima (16). Također, i polimorfizam enzima *CYP2C9* je važan za metabolizam brojnih lijekova poput antiepileptika, antidijabetika, kumarinskih antikoagulansa i nesteroidnih antireumatika (16). Poznato je preko 50 različitih alela *CYP2C9* (60). Varfarin spada među prve lijekove kod kojih su uz preporuke o doziranju uključeni i podaci o polimorfizmu *CYP2C9* te *VKORC1* (vitamin K-epoksid-reduktaza, ciljni enzim) (61). Osobe koji su spori metabolizatori za *CYP2C9* imaju veću sklonost za krvarenje kod primjene varfarina. Dodatno, *CYP2C9* je odgovoran i za oko 90% metabolizma fenitoina, radi čega će osobe koji su nositelji haplotipova *CYP2C9*2* i **3* biti spori metabolizatori i posljedično imati veći rizik za razvoj neželjenih

učinaka (57). Upravo na temelju rezultata istraživanja o genotipovima *CYP2C9* regulatorna tijela su izdala preporuke o doziranju varfarina i fenitoina. Također, i *CYP2C19* sudjeluje u metabolizmu brojnih lijekova poput antiepileptika, antidepresiva, inhibitora protonske pumpe i antiagregacijskih lijekova. Poznato je preko 20 različitih alela (62), od kojih su najvažniji *CYP2C19*2* (c.681G>A) i *CYP2C19*3* (c.636G>A) koji se povezuju sa smanjenom enzimskom aktivnošću, dok se polimorfizam *CYP2C19*17* (c.-806C>T) povezuje s povećanom aktivnosti enzima (63). Upravo polimorfizam *CYP2C19* ima važnu ulogu u odgovoru na terapiju antiagregacijskim lijekom klopidogrelom. Varijanta *CYP2C19* koja ima smanjenu enzimsku aktivnost povezuje se s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih zbivanja zbog smanjene pretvorbe prolijeka u aktivni metabolit, dok kod nositelja varijante s većom enzimskom aktivnošću postoji veći rizik krvarenja zbog ubrzanog stvaranja aktivnog metabolita. Radi važnosti optimizacije terapije klopidogrelom Međunarodni konzorcij kliničke farmakogenetike (CPIC) je izdao preporuke o terapiji klopidogrelom u ovisnosti o nalazu genotipa *CYP2C19* (64). Među antiepilepticima postoje ranije spomenute preporuke o doziranju fenitoina, brivaracetama i klobazama ovisno o genotipu *CYP2C19*, što je klinički izuzetno važno jer će nositelji varijante sa smanjenom enzimskom aktivnošću kod primjene ovih antiepileptika imati veći rizik razvoja neželjenih učinaka (57).

U II. fazi metabolizma lijekova u svakodnevnoj kliničkoj praksi najvažniju ulogu imaju polimorfizmi gena za enzime N-acetiltransferazu (NAT), tiopurinmetiltransferazu (TPMT), glutation-S-transferazu, sulfotransferazu (SULT) i uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu (UGT). Enzimi superporodice UGT spadaju među važnije metaboličke enzime ove faze. Kataliziraju reakcije glukuronidacije koje su važan put biotransformacije brojnih lijekova te egzogenih i endogenih spojeva. Tijekom reakcija glukuronidacije prenosi se glikozilna skupina s uridin-difosfat-glukuronske kiseline (UDPGK) na različite endogene i egzogene supstrate i njihove produkte. Pojedinačni enzimi UGT pokazuju različit afinitet prema supstratima. Na temelju sličnosti slijeda aminokiselina humani enzimi UGT klasificirani su u 4 porodice označene UGT1, UGT2, UGT3 i UGT8 (tablica 2).

Tablica 2. Humana superporodica uridin-difosfat-glukuronoziltransferaza (UGT) (65).

Porodica	Podporodica	Enzimi
UGT1	UGT1A	UGT1A3
		UGT1A4
		UGT1A5
		UGT1A6
		UGT1A7
		UGT1A8
		UGT1A9
		UGT1A10
UGT2	UGT2A	UGT2A1
		UGT2A2
		UGT2A3
	UGT2B	UGT2B4
		UGT2B7
		UGT2B10
		UGT2B11
		UGT2B15
		UGT2B17
		UGT2B28
UGT3	UGT3A	UGT3A1
		UGT3A2
UGT8	UGT8A	UGT8A1

Procesi biotransformacije u II. fazi metabolizma također pokazuju značajnu interindividualnu varijabilnost. Polimorfizmi enzima UGT, kao i polimorfizmi ostalih enzima II. faze metabolizma značajno doprinose varijabilnosti farmakokinetike, a time i učinkovitosti lijekova koji su njihovi supstrati.

Enzim UGT1A4 katalizira metabolizam nekih antiepileptika, poput lamotrigina, ali i metabolizam nekih antipsihotika te primarnih, sekundarnih i teracijarnih amina poput nekih tricikličkih antidepresiva. Do sada je otkriveno više od 100 različitih pojedinačnih polimorfizama (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP), ali njihova frekvencija i klinički značaj su slabo istraženi. Najbolje istraženi polimorfizmi su *c.70C>A* (P24T; *2; rs6755571) i *c.142T>G* (L48V; *3; rs2011425). Kod polimorfizma *UGT1A4 c.70C>A* dolazi do zamjene aminokiseline prolina u treonin na kodonu 24 (P24T) transverzijom citozina u adenin na 70. nukleotidu dok kod polimorfizma *UGT1A4 c.142T>G* dolazi do zamjene aminokiseline leucina u valin na kodonu 48 (L48V) transverzijom treonina u guanin na 142. nukleotidu (66). Funkcionalni genetski polimorfizam na *UGT1A* genskom lokusu po prvi put je istraživan 2004. godine (66). Studija Ehmer i suradnika tada je između ostalog ispitala utjecaj polimorfizma

UGT1A4 70C>A i *UGT1A4 142T>G* na metabolizam dva steroida, dihidrotestosteron (DHT) i transandrosteron (t-AND) te utjecaj na dva amina, benzidin i beta-naftilamin. Pokazano je da je glukuronidacija steroida bila gotovo odsutna kod ljudi s *c.142T>G* varijantom, a kod ljudi s *c.70C>A* varijantom je bila reducirana na više od 50% aktivnosti. Dodatno, utjecaj polimorfizama je pokazan i u glukuronidaciji amina (66). Budući *UGT1A4* sudjeluje u metabolizmu tamoksifena i njegovog aktivnog metabolita 4-OH tamoksifena, više studija je ispitivalo utjecaj polimorfizama *UGT1A4* na njegov metabolizam, od čega je prva bila 2006. godine i pokazala je povećanu aktivnost glukuronidacije u nositelja varijantnog alela *UGT1A4*3*, dok za polimorfizam *UGT1A4*2* nije dokazan utjecaj na aktivnost glukuronidacije (67). Istovjetni rezultati su pokazani i u studiji Benoit-Biancamano i suradnika (68).

Učestalost polimorfizama *UGT1A4* razlikuje se među različitim etničkim skupinama. U bijeloj rasi se frekvencija varijantnog alela *70C>A* kreće od 6-8%, dok je za *142T>G* frekvencija 2.6-9%. Za usporedbu, u japanskoj populaciji frekvencija alela *142T>G* je 12.9-16.5%, dok *70C>A* nije detektirana (69).

Brojne studije su istraživale i utjecaj polimorfizma *UGT2B7* na metabolizam lijekova budući se on smatra važnim enzimom humane superporodice enzima UGT. *UGT2B7* sudjeluje u metabolizmu brojnih lijekova uključujući antiepileptike, nesteroidne protuupalne lijekove, morfin, kodein i druge. Dodatno sudjeluje u metabolizmu brojnih endogenih tvari kao što su žučne i masne kiseline. *UGT2B7* je visoko izražen u ljudskoj jetri, s nižim razinama ekspresije u drugim ekstrahepatičnim organima. Među najviše istraživanim polimorfizmima je *UGT2B7 -802C>T (H268Y; *2)* na eksonu 2 gdje dolazi do zamjene aminokiseline histidin u tirozin na kodonu 268, a razmjerno je čest u različitim etničkim skupinama (71-73). Analizom *UGT2B7* haplotipova otkriveno je i više različitih promotorskih varijanti koje ne mijenjaju aminokiselinski slijed UGT-a, ali mogu utjecati na razinu transkripcije gena koji kodira enzim (*-1306 G>A, -1299 C>T, -1112 C>T, -900 A>G, -327 G>A, -161 C>T*), a među kojima je u istraživanjima najzastupljeniji *UGT2B7 c.-161C>T*, s tim da su *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT2B7 -802C>T* u kompletnoj neravnotežnoj povezanosti (engl. *linkage disequilibrium, LD*) (74,75). Enzim *UGT2B7* je primarno odgovoran za metabolizam morfina koji se relativno često propisuje za liječenje teške akutne i kronične boli. Međutim, bolesnici različito reagiraju na primjenu morfina i ova interindividualna varijabilnost je još uvijek veliki izazov u njegovoj kliničkoj upotrebi. I dok neke studije nisu našle povezanost između polimorfizama *UGT2B7* i koncentracija morfina (76,77), u ostalima je dokazan utjecaj polimorfizama na farmakokinetiku morfina među kojima je studija Sawyer i suradnika koja je dokazala utjecaj polimorfizma *UGT2B7 -161 C>T* na metabolizam morfina (71). Rezultati istraživanja su pokazali povećanje

razine metabolita morfina kod nositelja varijantnog alela (71). U studiji Matic i suradnika pokazana je povezanost varijantnog alela *UGT2B7 -900G>A* s povećanom enzimskom aktivnošću (78), dok je studija Darbari i suradnika pokazala da promotorska varijanta *UGT2B7 -840G>A* pridonosi varijabilnosti u jetrenom klirensu morfina kod bolesnika s anemijom srpastih stanica (79).

1.3.2. Farmakogenetika transportnih proteina

Osim metaboličkih enzima I. i II. faze, veliku ulogu u farmakokinetici lijekova imaju i prijenosnici, odnosno transportni proteini koji se nalaze na epitelnim stanicama raznih tkiva. Upravo transporteri igraju glavnu ulogu u homeostazi regulirajući transcelularno kretanje tvari između pojedinih tjelesnih tekućina (primjerice između krvi i urina, krvi i cerebrospinalne tekućine ili krvi i žuči). Razlikujemo dvije glavne superporodice transportera: ABC (engl. *ATP Binding Cassette*) i SLC (engl. *Solute Carrier*) koje reguliraju kretanje malih molekula ksenobiotika, poput lijekova i toksina, ali i endogenih metabolita unutar te iz različitih tkiva. Na temelju toga razlikujemo transportne proteine koji reguliraju ulazak tvari u stanice, bilo hranjivih tvari bilo lijekova (engl. *uptake* ili *influx transporters*) te izbacivačke transportne proteine (engl. *efflux transporters*). Transport malih molekula supstrata između odjeljaka različitih tjelesnih tekućina zahtijeva aktivnost obje superporodice transportera, i SLC (dominantno odgovorni za ulazak u stanice) i ABC (dominantno izbacivačkih transportera), iako njihova ekspresija varira ovisno o pojedinom tkivu (80).

ABC transporteri su transmembranski proteini koji pretvaraju energiju dobivenu hidrolizom ATP-a u transport supstrata. Superporodica ABC transportera ima 49 članova koji su podijeljeni u 7 porodica od A do G (ABCA do ABCG) prema sličnosti slijeda i organizaciji domena pojedinih članova (16).

Studije su pokazale da upravo genski polimorfizam prijenosnika može utjecati na apsorpciju, raspodjelu i eliminaciju mnogih lijekova, stoga moduliranjem bioraspoloživosti lijekova prijenosnici mogu utjecati na njihovu učinkovitost (81). Većina bolesnika koji imaju farmakorezistentnu epilepsiju su rezistentni na više dostupnih antiepileptika, usprkos činjenici da ti antiepileptici uglavnom imaju drugačije mehanizme djelovanja. Od 2005. godine jedna od vodećih hipoteza o farmakorezistentnoj epilepsiji je da upravo transport antiepileptika preko prijenosnika na krvno-moždanoj barijeri može imati značajnu ulogu u smanjenju koncentracije antiepileptika na ciljnom mjesto djelovanja (82). Najviše su istraživani ABC izbacivački

prijenosnici čija se povećana ekspresija u krvno-moždanoj barijeri povezuje sa smanjenom penetracijom antiepileptika u središnji živčani sustav (SŽS), a time i slabijom učinkovitosti lijeka. Najveći broj istraživanja odnosi se na ABC proteine porodice B, člana 1 (ABCB1) i ABC proteine porodice C, člana 2 (ABCC2), koji su i najčešći, a ranije su bili poznati i kao proteini rezistencije na više lijekova 1 (engl. *Multidrug Resistance Protein 1*, MDR1) te proteini rezistencije na više lijekova 2 (engl. *Multidrug Resistance Protein 2*, MRP2) (83-85). Gen *ABCB1* kodira P-glikoprotein (P-gp) koji je najpoznatiji transporter superporodice ABC (82). P-gp je široko rasprostranjen u normalnom tkivu, uključujući apikalne membrane gastrointestinalnog trakta, bilijarne kanalikularne membrane hepatocita, luminalne membrane proksimalnih tubularnih epitelijalnih stanica bubrega te krvno-moždanu i krvno-likvorsku barijeru. Važan je za transport mnogih lijekova u tijelu (82,86,87). U mozgu, Pgp je izražen u astrocitima, endotelnim stanicama i neuronima (88). Postoje dokazi da se prekomjerna ekspresija P-gp-a u epileptičnom tkivu može povezati s farmakorezistencijom na antiepileptike (89). U genu *MDR1/ABCB1* identificirani su brojni SNP-ovi koji se povezuju s promjenjivom oralnom biodostupnosti i rezistencijom na različite lijekove P-gp supstrate, od čega su najčešći tiha mutacija *ABCB1 c.3435C>T* (rs1045642) koja je povezana s duodenalnim izražajem P-gp-a, *missense* polimorfizam *ABCB1 c.2677G>T/A* (rs2032582) te *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503). Analiza neravnotežne povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) različitih polimorfizama P-gp pokazuje da su ova tri polimorfizma u jakom LD (90). *ABCB1 c.3435C>T* i *c.1236C>T* su sinonimni SNP i nemaju učinak na slijed aminokiselina, dok je SNP *c.2677G>T/A* nesinonimni SNP i rezultira promjenom jedne aminokiseline u proteinu (16,91,92). Dok je uloga polimorfizama *ABCB1* u otpornosti na lijekove dobro poznata u bolestima poput karcinoma, reumatoidnog artritisa i upalne bolesti crijeva (93-95), važnost *ABCB1* u mehanizmu farmakorezistencije kod osoba s epilepsijom prvi puta je pokazana u studiji Siddiqui i suradnika (96). Ovo istraživanje je pokazalo da je genotip *ABCB1 3435CC* češći među bolesnicima s loše kontroliranom epilepsijom nego genotip *TT* (96). Iako su ovi rezultati odmah potvrđeni studijom Zimpricha i suradnika (97), daljnje studije su pokazale dvojbene rezultate (98-105). I studije o ostalim polimorfizmima *ABCB1* su pokazale nekonzistentne rezultate (99,100,104,106-108). Drugi protein uključen u transport antiepileptika je *ABCC2/MRP2* kojeg kodira istoimeni gen. Kao i za *ABCB1*, i studije o povezanosti polimorfizama *ABCC2* i farmakorezistentne epilepsije također su dobile kontradiktorne rezultate (109-112).

Osim gena *ABCB1*, jednim od važnijih gena koji kodira transportne proteine smatra se gen *ABCG2*. *ABCG2* kodira BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*) koji iako je prvotno

otkriven u tumorskom tkivu dojke, dominantno je izražen u jetri, gastrointestinalnom sustavu, mozgu, bubregu, srcu i placenti (113). BCRP je uključen u stanični efluks raznih ksenobiotika i endogenih spojeva. Dokazan je njegov važan utjecaj u rezistenciji na više kemoterapeutskih lijekova što ukazuje na njegovu ulogu u farmakorezistenciji (114,115). *ABCG2* koji se nalazi na kromosomu 4q22.1, sadrži nekoliko funkcionalnih genskih polimorfizama, od čega su najpoznatiji *ABCG2 34G>A* (rs2231137) te polimorfizam s gubitkom funkcije *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142). Studije sugeriraju da SNP *c.421C>A* mijenja prijenosnu funkciju snižavanjem razine ekspresije proteina putem proteasomalne razgradnje potpomognute ubikvitinom (116). Zbog smanjenog transporta putem *ABCG2* kod nositelja varijantnog alela dokazana je povećana sistemska izloženost rosuvastatinu i atrovastatinu te veća vjerojatnost razvoja neželjenih reakcija (117,118).

1.3.3. Farmakogenetika lamotrigina

Budući se lamotrigin metabolizira glukuronidacijom i to primarno putem *UGT1A4*, u manjoj mjeri *UGT2B7*, te moguće *UGT1A1* i *UGT1A3* (24), provedeno je više studija koje su pokušale povezati značajne interindividualne razlike u koncentracijama lamotrigina s genotipom *UGT*-a. Genski polimorfizam *UGT* izoenzima uključenih u metabolizam lamotrigina je vrlo čest genski polimorfizam čiji utjecaj na koncentraciju lamotrigina još uvijek nije u potpunosti razjašnjen (75). *In vitro* studija Zhou J. i suradnika je pokazala da nositelji varijantnog alela (skraćeno „varijantni ispitanici“ – heterozigoti ili varijantni homozigoti) *UGT1A4 142T>G* i *70C>A* imaju smanjenu enzimsku učinkovitost glukuronidacije lamotrigina u odnosu na homozigote divljeg tipa (skraćeno „divlji tip“), što sugerira da bi obje varijante (*c.142T>G* i *c.70C>A*) mogle povećati koncentraciju lamotrigina u serumu *in vivo* (119). Studija Liu L. i suradnika, provedena u dječjoj populaciji, nije pokazala razlike u serumskoj koncentraciji lamotrigina u djece na monoterapiji između različitih genotipova *UGT1A4*, no u djece koja su uzimala politerapiju lamotrigina i valproata koncentracije lamotrigina su bile veće u nositelja varijanti *UGT1A4 142T>G* u usporedbi s nositeljima „divljeg tipa“ (120). Rezultati te studije konzistentni su s rezultatima *in vitro* studije Zhou J. i suradnika, iako je isto dokazano samo u komedikaciji s valproatom. U suprotnosti s tim rezultatima nekoliko studija je pokazalo da varijanta *c.142T>G* dovodi do smanjenja koncentracije lamotrigina u odnosu na „divlji tip“ (45,70,121,122). Studija Wang i suradnika nije pokazala povezanost između varijanti *UGT1A4 142T>G* i varijabilnosti farmakokinetike lamotrigina, no pokazala je statistički značajan utjecaj

polimorfizma promotora *UGT1A4* -219C> T i -163G> A na promijenjenu farmakokinetiku lamotrigina (69). Rezultati studija koje su ispitivale utjecaj polimorfizma *UGT1A4* 70C>A na farmakokinetiku lamotrigina su također nepodudarni. I dok studije na skandinavskoj populaciji pokazuju da homozigotni nositelji alela *UGT1A4* 70C imaju niže koncentracije lamotrigina u odnosu na heterozigotne nositelje ili „divlji tip“ (47,121), u nekim studijama nije pokazana poveznost, uključujući i studiju rađenu na ispitanicima iz Srednje Europe (123). Osim studija koje su ispitivale mogući utjecaj polimorfizama *UGT1A4*, brojne studije su ispitivale i mogući utjecaj polimorfizama *UGT2B7* na farmakokinetiku lamotrigina, a većina *in vivo* podataka o ljudima odnosi se na *UGT2B7* c.-161C>T (rs7668258) i *UGT2B7* c.802C>T (*2) (rs7439366) (24) koji su u potpunoj neravnotežnoj povezanosti (124,125). Nekoliko manjih studija sugeriralo je blago smanjen klirens lamotrigina u heterozigotnih/varijantnih homozigotnih subjekata (123,126,127). U tkivu jetre kod ljudi, *UGT2B7* c.-161C>T je povezan s reduciranom količinom enzima i sveukupno smanjenim kapacitetom glukuronidacije (128). Studija rađena u Srednjoj Europi koja je analizirala utjecaj *UGT2B7* c.-161C>T na farmakokinetiku lamotrigina pokazala je da bolesnici koji su nositelji homozigotne varijante *UGT2B7* -161TT imaju 20.4% niži klirens lamotrigina u usporedbi s bolesnicima koji imaju CC genotip (prilagođeno prema dobi i komedikaciji), što znači da bolesnici s CC genotipom mogu trebati više doze lamotrigina (123). Rezultati su u skladu s rezultatima studije provedene u španjolskoj populaciji te rezultatima studije dobivenima za populaciju Thai (126,127). Za razliku od navedenih studija, studija Liu i suradnika na azijskoj populaciji nije dokazala utjecaj genotipa *UGT2B7* -161TT na koncentraciju lamotrigina (120). Nedavno provedena, veća studija na danskim pacijentima sugerira oko 9% veće koncentracije lamotrigina prilagođene prema dozi kod nositelja varijante *UGT2B7* 802C>T u usporedbi s homozigotima „divljeg tipa“ (47), dok je studija na meksičkim pacijentima ukazala na nepostojanje relevantne povezanosti između oba SNP-a i koncentracija lamotrigina (129).

Navedena nekonzistentnost u rezultatima brojnih istraživanja može biti uzrokovana različitim čimbenicima, poput etničke specifičnosti, dizajnom studija, veličinom uzorka, „remetilačkim“ čimbenicima (engl. „*confounder*“), procijenjenim ishodima. Štoviše, s obzirom na veliki broj SNP-ova u svakom od ova dva gena, pokušaji da se ocijeni relevantnost pojedinog od njih za bioraspoloživost lamotrigina mogu se činiti nesvrshodnim ako se ne uzmu u obzir svi ostali ("kontrola"). Međutim, analizirani polimorfizmi *UGT1A4* c.142T>G i *UGT2B7* c.-161C>T su u potpunoj neravnotežnoj povezanosti (LD) s brojnim drugim SNP-ovima u odgovarajućim genima (68,130-133). Stoga, identifikacijom heterozigotnog ili varijantnog homozigotnog *UGT2B7* c.-161C>T ili *UGT1A4* c.142T>G genotipa, identificiraju se subjekti sa "širim"

genetskim sklopom koji se razlikuje od njihovih kontrola „divljeg tipa“. Navedeni genotipovi mogu i ne moraju biti povezani s bioraspoloživošću lamotrigina, također možda neće biti moguće razriješiti njihove pojedinačne doprinose. Dakle, uspoređivanjem ispitanika koji su heterozigoti ili varijantni homozigoti za *UGT2B7 c.-161C>T* ili *UGT1A4*3 c.142T>G* s njihovim kontrolama „divljeg tipa“, mogu se procijeniti učinci specifičnih polimorfizama, ali i eventualno učinci odgovarajuće "šire genetičke strukture" predstavljene ovim genotipovima. Osim metaboličkih enzima, u bioraspoloživosti lamotrigina važnu ulogu imaju i transporteri. *In vitro* studije sugeriraju da je LAM supstrat za transportere ABCB1 i ABCG2 (134,135), međutim saznanja o utjecaju superporodice ABC transportera na bioraspoloživost lamotrigina su ograničena. Kako je ranije navedeno, polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* je u jakom LD-u s dva kodirajuća SNP-a, *c.2677G>T/A* i *c.3435C>T* (81). Među brojnim polimorfizmima gena *ABCB1*, upravo navedeni SNP-ovi su najčešće analizirani vezano za bioraspoloživost niza lijekova, ali s nekonzistentnim rezultatima (136). Iako su neke studije pokazale povezanost varijantnih alela *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503) s nižim koncentracijama lamotrigina (137,138), studija Milosheška i suradnika isto nije potvrdila, no dokazala je smanjenje klirensa lamotrigina za 22% odnosno 9% u pacijenata s genotipom *ABCB1 2677GG i 2677GT* (123). Nedavno provedena veća studija na skandinavskim ispitanicima nije dokazala povezanost polimorfizma *ABCB1 c.1236C>T* niti *c.3435C>T* s varijabilnošću koncentracija lamotrigina (47).

Saznanja o povezanosti između polimorfizma gena *ABCG2* i bioraspoloživosti lamotrigina su ograničena (138,139). Polimorfizam s gubitkom funkcije, *ABCG2 c.421C>A*, jedan je od poznatijih. Osim za *ABCG2 c.421C>A* (rs 2231142), smanjena funkcija transportera se povezuje s još tri SNP-a *ABCG2* (rs34783571, rs192169062 i rs34264773), dok kod tri SNP-a nije pronađen učinak na funkciju transportera, a za ostale je učinak nepoznat (140). Podaci o utjecaju polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* na farmakokinetičku varijabilnost lamotrigina su oskudni. Dvije studije na kineskim pacijentima pokazale su povezanost polimorfizma *ABCG2* i bioraspoloživosti lamotrigina. U obje studije su nositelji varijantnog alela imali više koncentracije lamotrigina od nositelja „divljeg tipa“ (138,139). U ranijoj eksplorativnoj studiji na uzorku pacijenata s epilepsijom u srednjoj i istočnoj Europi pokazano je da je varijantni alel *ABCG2 c.421C>A* povezan s 25% nižim koncentracijama lamotrigina kod bolesnika na monoterapiji (141). Dodatno, rezultati su pokazali interakciju između ovog SNP-a i valproata. Za razliku od ispitanika na monoterapiji lamotriginom, nositelji varijantnog alela koji su istovremeno liječeni lamotriginom i valproatom imali su više koncentracije lamotrigina u odnosu na kontrole „divljeg tipa“. Koncentracije lamotrigina kod ispitanika na politerapiji s

valproatom komparirane s koncentracijama lamotrigina kod ispitanika na monoterapiji bile su oko 2 puta više ukoliko su ispitanici bili homozigoti „divljeg tipa“, a oko 4,5 puta ako su bili nositelji varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A*.

Regulatorne agencije poput FDA i EMA su prepoznale važnost transportera *ABCG2* kao medijatora u interakcijama lijek-lijek zbog čega su izdale preporuke prema kojima su za istraživanja svih lijekova obavezna ispitivanja o tome da li su lijekovi supstrati ili inhibitori *ABCG2* te utvrđivanje njihova potencijala za stupanje u interakcije na razini *ABCG2* (142,143).

1.4. Svrha rada

S obzirom na značajnu interindividualnu varijabilnost farmakokinetičkih parametara lamotrigina, kao i varijabilnost u učinkovitosti i riziku razvoja štetnih učinaka, u ovom istraživanju ispitivali smo utjecaj genskog polimorfizma enzima *UGT1A4* i *UGT2B7* te transportnih proteina *ABCB1* i *ABCG2* na serumsku koncentraciju lamotrigina.

Upravo zbog nedostatnih podataka, a uz prisutan velik broj bolesnika s neadekvatno kontroliranom epilepsijom, cilj nam je bio procijeniti povezanost pojedinih genotipova *UGT1A4*3 c.142T>G* i *UGT2B7 c.-161C>T* te *ABCB1 c.1236C>T* i *ABCG2 c.421C>A* s koncentracijama lamotrigina kod osoba s epilepsijom srednjoistočnoeuropskog podrijetla.

2. HIPOTEZA

Polimorfizmi metaboličkih enzima UGT1A4 i UGT2B7 te transportnih proteina ABCB1 i ABCG2 mogu značajno utjecati na bioraspoloživost lamotrigina u bolesnika s epilepsijom na monoterapiji lamotriginom ili kombinaciji lamotrigina s valproatom.

3. CILJEVI RADA

Glavni cilj istraživanja je ispitati ulogu polimorfizama metaboličkih enzima *UGT1A4 c.142T>G* (rs 2011425) i *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258) te transportera *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503) i *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) u interindividualnoj varijabilnosti bioraspoloživosti lamotrigina u bolesnika s epilepsijom na monoterapiji lamotriginom ili politerapiji lamotriginom i valproatom.

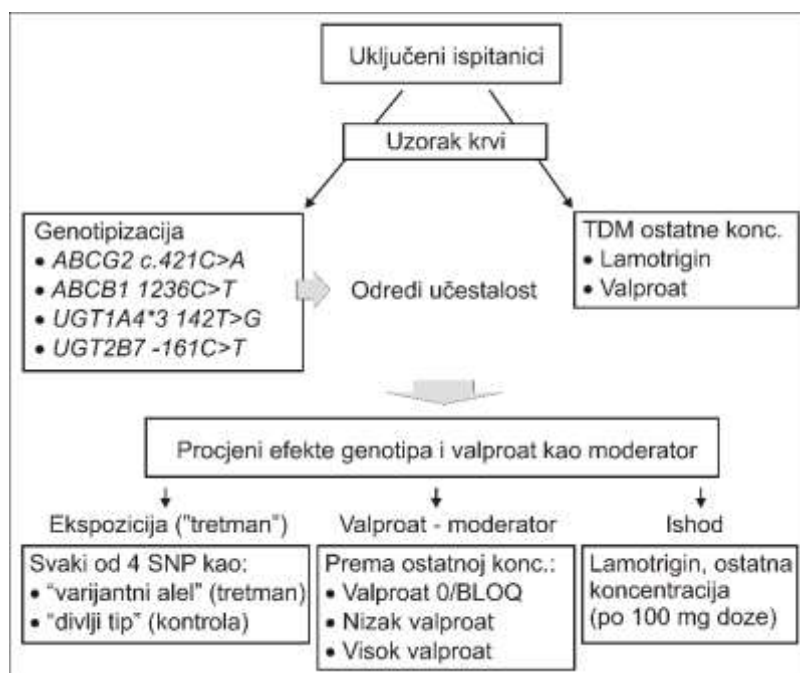
Specifični ciljevi:

1. Odrediti učestalost pojedinih alela i genotipova *UGT1A4 c.142T>G*, *UGT2B7 c.-161C>T*, *ABCB1 c.1236C>T* i *ABCG2 c.421C>A* u hrvatskih bolesnika s epilepsijom.
2. Prikazati odnos primijenjene doze i koncentracija lamotrigina u plazmi neposredno prije sljedeće doze lijeka (ostatne koncentracije, koncentracije na kraju doznog intervala, engl. *trough*) prema genotipu *UGT* i *ABC*.
3. Statističkim metodama testirati povezanost pojedinih alela i genotipova s koncentracijama lamotrigina i valproata u monoterapiji i politerapiji.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Opis istraživanja

Provedeno je presječno istraživanje u kojem su odrasli i adolescentni bolesnici s epilepsijom liječeni monoterapijom lamotriginom (LAM) ili kombiniranom terapijom lamotriginom i valproatom (LAM+VAL) u sklopu rutinskog terapijskog praćenja koncentracija lijekova u krvi (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) u stanju dinamičke ravnoteže, nakon najmanje 3 tjedna terapije, dali uzorak krvi za određivanje jutarnjih koncentracija na kraju doznog intervala (ostatne koncentracije, engl. *morning trough*), te za određivanje genotipa na četiri polimorfna lokusa u genima za: a) transportni protein *Breast Cancer Resistance Protein* (BCRP, ABCG2) (*ABCG2 c.421C>A*, rs2231142); b) transportni protein *Multidrug Resistance Protein 1* (MDR1, ABCB1 ili P-glikoprotein) (*ABCB1 c.1236C>T*, rs1128503); c) enzim uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu tip 1A4 (UGT1A4) (*UGT1A4*3 142T>G*, rs2011425); i d) enzim uridin-difosfat-glukuronoziltransferazu tip 2B7 (UGT2B7) (*UGT2B7 c.-161C>T*, rs7668258). Određena je prevalencija pojedinih genotipova/varijantnih alela među uključenim ispitanicima, a zatim je procijenjen učinak svakog pojedinog polimorfizma na koncentracije lamotrigina na kraju doznog intervala (slika 2). Učinci polimorfizama procijenjeni su u cjelokupnom uzorku, a zatim je procijenjeno modificira li valproat efekte polimorfizama. U tu svrhu (slika 2): 1. Obzirom na genotip polimorfizama od interesa, za svaki pojedini ispitanici su kategorizirani kao (i) „nositelji varijantnog alela“ (skraćeno „varijantni“ ispitanici) (heterozigoti ili varijantni homozigoti) ili kao homozigoti divljeg tipa (skraćeno „divlji tip“) (slika 2). Nositelji varijantnog alela su tretirani kao „ekspozirane jedinke“, tj. one izložene „tretmanu“ (varijantnom alelu), a homozigoti divljeg tipa su tretirani kao „kontrolne jedinke“ (nisu izložene tretmanu); 2. Obzirom na izloženost valproatu, ispitanici su kategorizirani na temelju ostalih koncentracija VAL kao (i) valproat 0 ili ispod donje granice kvantifikacije (engl. *below the lower limit of quantification*, BLOQ); (ii) nizak (ostatni) valproat – vrijednosti $>0/\text{BLOQ}$ ali $<364 \mu\text{mol/L}$, što je približno donja granica preporučenih ostalih koncentracija VAL u TDM-u (30); (iii) visok valproat – vrijednosti $\geq 364 \mu\text{mol/L}$, što odgovara preporučenim (TDM) ostatnim koncentracijama valproata, ili nešto višima od preporučene razine; 3. Ostalne koncentracije lamotrigina (ishod) standardizirane su na 100 mg doze kako bi bile usporedive za osobe tretirane različitim dozama (u različitim fazama titracije doze).



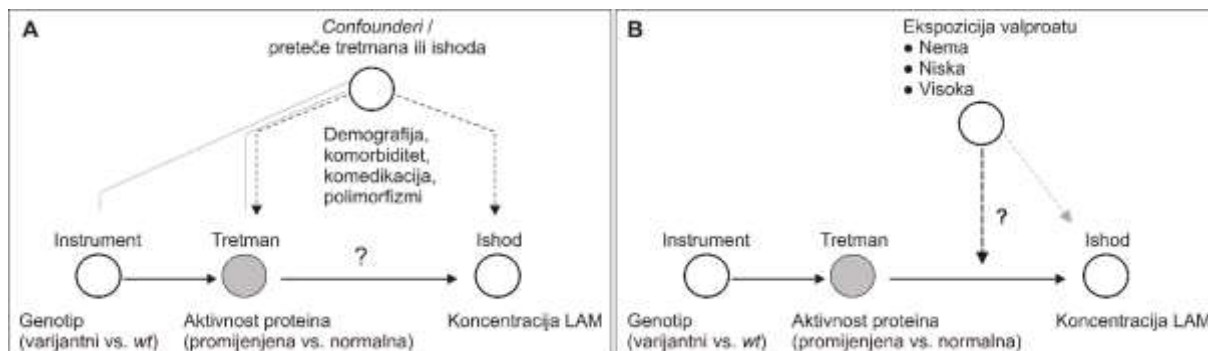
Slika 2. Opća shema istraživanja (vidi 4.1. Opis istraživanja, za detaljno objašnjenje). BLOQ – ispod razine kvantifikacije (engl. *below the limit of quantification*); konc. – koncentracije; SNP – polimorfizam pojedinačnog gena (engl. *single nucleotide polymorphism*); TDM – monitoriranje koncentracije lijeka u terapijske svrhe (engl. *therapeutic drug monitoring*)

4.2. Koncept analize podataka

Hipoteza istraživanja implicira uzročno-posljedični odnos između (svakog od) testiranih polimorfizama (uzrok) i ostalih koncentracija lamotrigina (bioraspoloživost lamotrigina) (ishod). Iako je istraživanje presječno, zadovoljava dva osnovna uvjeta temeljem kojih se doista može procijeniti kauzalni efekt (svakog od) polimorfiz(a)ma: (i) uzrok (polimorfizam) izvjesno prethodi ishodu (koncentraciji lamotrigina najmanje 21 dan od početka tretmana) jer je zadan rođenjem; i (ii) nema „povratnog efekta“ ishoda na uzrok (engl. *no reverse causation*). Izvjesno je da koncentracija lamotrigina ne utječe na genotip. Međutim, uvjet „bez povratnog efekta“ odnosi se na činjenicu da polimorfizmi gena za metabolizirajuće enzime i transportere nemaju drugog načina djelovati na koncentraciju lamotrigina nego mijenjajući aktivnost proteina koje kodiraju. Dakle, kauzalni slijed koji se evaluira jest *genotip* → *aktivnost enzima/transportera* → *koncentracija lamotrigina* - „tretman“ ili „ekspozicija“ koja u konačnici utječe na lamotrigin

jest aktivnost predmetnog enzima/transportera. Poznato je da lamotrigin početno sam inducira vlastitu glukuronidaciju, što rezultira blažim porastom klirensa, no taj proces završava unutar 14-tak dana od početka tretmana (29). Stoga, uvjet „bez povratnog učinka“ je zadovoljen, budući da su koncentracije lamotrigina u istraživanju određene najmanje 3 tjedna od početka terapije. Nadalje, uvjet „bez povratnog učinka“ podrazumijeva da lamotrigin nema efekata niti na druge faktore koji utječu na njegovu koncentraciju, ne samo na aktivnost UGT enzima – ne utječe na aktivnost transportera, i nema učinka na koncentraciju valproata (koja je jak inhibitor UGT enzima). Naime, oko 50% klirensa valproata otpada na glukuronidaciju i on je substrat za najmanje 7 različitih UGT enzima (uključujući UGT1A4 i UGT2B7 (49,144)). Budući da tijekom prva dva-tri tjedna terapije lamotrigin inducira vlastitu glukuronidaciju, moglo bi se pretpostaviti da bi isto tako (inducirajući UGT enzime) mogao utjecati na ekspoziciju valproatu. Jedna ukrižena formalna studija interakcije na 18 zdravih muških dobrovoljaca sugerirala je da bi interakcija valproat-lamotrigin mogla biti dvosmjerna (145) – no zbog dizajna i drugih ograničenja to se nije moglo pouzdano potvrditi. Međutim, daljnje opservacijske studije, te meta-analiza populacijskih farmakokinetičkih studija (146,147) pokazale su da lamotrigin nema efekt na klirens valproata. Uz to, valja naglasiti da (ako i postoji) neki mali učinak lamotrigina na koncentraciju valproata odvija se tijekom prvih tjedan-dva od uvođenja lamotrigina, tijekom kojih se postigne maksimalna indukcija UGT enzima lamotriginom. Dakle, u stanju dinamičke ravnoteže, tj. kada je ta indukcija postignuta, ostvarena je „ravnoteža“ u kojoj više ne postoji (ako je uopće postojao) efekt lamotrigina na valproat. S druge strane, valproat kontinuirano inhibira UGT enzime i trajno održava povišenu (sve dok su oba lijeka u istodobnoj primjeni) ekspoziciju lamotriginu. Prema tome, kada se u nekom trenutku ravnotežnog stanja, nekoliko tjedana od početka (ko)medikacije, istodobno izmjere ostatne koncentracije lamotrigina i valproata, koncentracije lamotrigina mogu se smatrati „posljedičnima“ u odnosu na koncentracije valproata, a ne obrnuto.

U evaluaciji efekata testiranih polimorfizama slijedili smo teoriju kauzalnosti temeljenu na strukturalnim kauzalnim modelima (engl. *structural causal models*, SCM) i usmjerenih acikličkih grafova (engl. *directed acyclic graphs*, DAG) (148). Slika 3 prikazuje pojednostavljeni DAG koji ocrtava „problem“ i termini koji su prikazani su termini teorije kauzalnosti. Prema činjeničnom znanju o problemu, stvarni „uzrok“ ili „tretman“ koji bi mogao utjecati na bioraspodjelu lamotrigina jest aktivnost enzima/transportera, međutim, njih *in vivo* nije moguće izmjeriti. S druge strane, genotipovi se mogu odrediti.



Slika 3. Koncept analize podataka: prikazani su pojednostavljeni usmjereni aciklički grafovi (engl. *directed acyclic graph*; DAG) koji reprezentiraju temeljnu svrhu ovog istraživanja – procijeniti ukupni (totalni) efekt svakog od polimorfizama od interesa na ostatne koncentracije lamotrigina (LAM) (A) i procijeniti efekte tih polimorfizama na raznim razinama izloženosti valproatu (B). **A.** Efekt (kauzalni put) koji se želi procijeniti/kvantificirati (naznačeno upitnikom) istaknut je debljim punim crnim strelicama: „polazište“ je genotip (kategoriziran kao „varijantni“ [nositelji varijantnog alela] ili kao „divlji tip“ [homozigoti divljeg tipa, engl. *wild type*, *wt*]) i on je instrumentalna varijabla (instrument, reprezent „stvarnog tretmana“); instrument definira „tretman“ a to je aktivnost kodiranog enzima/transportera (naznačeno sivim simbolom budući se ne može kvantificirati *in vivo*), kategoriziran kao „promijenjena aktivnost“ (korespondira nositeljstvu varijantnog alela) ili kao „normalna aktivnost“ (korespondira genotipu „divljeg tipa“); kauzalni put završava na ishodu, koncentraciji lamotrigina. Naznačeni su mogući *confounderi* (uzrokuju [naznačeno crtkanim strelicama] i tretman i ishod), preteče tretmana (uzrokuju tretman) i preteče ishoda (uzrokuju ishod) – čimbenici koji svi mogu biti i nekauzalno povezani s instrumentom i/ili tretmanom (naznačeno sivim crtama). **B.** Naznačen je stupanj ekspozicije valproatu („nema“ – odnosi se na ispitanike na monoterapiji lamotriginom, ili su ostatne koncentracije valproata ispod donje granice kvantifikacije; „nizak“ – odnosi se na koncentracije niže od 364 $\mu\text{mol/L}$, što je približno donja granica preporučenih koncentracija valproata; „visok“ – odnosi se na koncentracije $\geq 364 \mu\text{mol/L}$, dakle preporučene [ili nešto više] koncentracije valproata), a želi se procijeniti (naznačeno upitnikom) jesu li efekti polimorfizama homogeni ili ne, na raznim razinama ekspozicije valproatu (valproat kao moderator efekata polimorfizma – naznačeno crtkanom strelicom koja završava na kauzalnom putu). Valproat izvjesno utječe na koncentracije lamotrigina (naznačeno sivom crtkanom strelicom), ali to nije predmet ovog istraživanja.

Kako je spomenuto, oni nemaju drugog „načina“ utjecati na ishod osim učinka koji imaju na aktivnost enzima/transportera. Time se genotipovi „kvalificiraju“ kao instrumentalne varijable ili **instrumenti** – određuju (važni su za) tretman, a na ishod utječu samo utječući na tretman. Treći uvjet valjanosti nekog instrumenta jest da **nema zajedničkih uzroka** s ishodom, što ovdje jest slučaj (genotip zadan rođenjem, tj. koncepcijom). U stvarnosti se, dakle, određuje učinak instrumenta (koji reprezentira tretman) na ishod. Slika 3(A) naznačuje: analizom podataka nastojalo se procijeniti totalni efekt instrumen(a)ta na ishod (naznačen upitnikom); slika 3(B) naznačuje da je, osim toga, namjera bila testirati i mogućnost da efekt instrumen(a)ta nije homogen na svim razinama ekspozicije valproatu – valproat izvjesno utječe na ishod (koncentraciju lamotrigina), ali to nije bio predmet istraživanja/analize podataka, već je namjera bila procijeniti (osim totalnog) i efekt instrumen(a)ta na ishod na različitim razinama izloženosti valproatu [tj. mogućnost da valproat modificira efekta instrumen(a)ta]. Da bi procjena efekta bila realistična, potrebno je „isključiti“ ili „kontrolirati“ tzv. „remetilačke“ čimbenike (slika 3A): **confoundere** - varijable koje uzrokuju i tretman i ishod, npr. lijekovi/bolesti koje utječu na aktivnost enzima/transportera („uzroci“ tretmana, tj. imaju efekt na tretman) i bubrežnu funkciju („uzroci“ ishoda, tj. imaju efekt na bioraspoloživost lamotrigina koji nije posredovan tretmanom), a osim toga, mogu biti nekauzalno „povezane“ s instrumentom [npr. postoji neravnoteža prevalencije ispitanika s takvim stanjima između nositelja vrijantnog alela („tretirani“) i homozigota divljeg tipa („kontrolne“)]; **pretke ishoda** - varijable koje uzrokuju ishod, ali ne i tretman, ali s njime ili s instrumentom mogu biti nekauzalno „povezane“; i **pretke tretmana** – utječu na tretman (aktivnost enzima/transportera), ali ne i na ishod, a mogu biti nekauzalno „povezane“ s instrumentom. „Kontrolirati“ „remetilačke“ čimbenike znači „isključiti ih“, tj. dokinuti njihove efekte. Time se prevenira zabuna u kojoj se neka nekauzalna povezanost („asocijacija“) između „tretmana“ (ili instrumenta) i „ishoda“ intepretira kao uzročno-posljedični odnos. U randomiziranom pokusu, randomizacija inherentno „kontrolira“ sve „remetilačke“ faktore – randomizacija inherentno omogućava **izmjenjivost jedinki** (ispitanika). Kada tretman nije randomiziran potrebno je i) na temelju poznavanja problematike identificirati i kvantificirati sve potencijalne „remetilačke“ faktore i ii) „kontrolirati“ ih alternativnim postupcima (149). To znači nastojati postići izmjenjivost jedinki nalik onoj u randomiziranom pokusu tako da se jedinke izložene tretmanu i kontrole „ujednači“ za vrijednosti „remetilačkih“ čimbenika. Međutim, teorijski, „tretirani“ i „kontrolne“ mogu se ujednačiti samo u odnosu na ona svojstva koja su nam o njima poznata – moguće **confoundere**/preteče tretmana/ishoda koje nismo kvantificirali ili uopće nismo svjesni njihovog postojanja ne mogu se ujednačiti između tretiranih i kontrola. Stoga, nastoji se postići

ujednačenost za poznate/mjerene čimbenike – tzv. **uvjetovana izmjenjivost** (engl. *conditional exchangeability*) – a *a priori* se smatra da uvijek ostaje neka razina „ostatnog“ (nemjerenog) *confoundinga*.

4.3. Ispitanici

Bolesnici s epilepsijom u kojih je postojala indikacija za liječenje lamotriginom (tablete s trenutnim otpuštanjem) ili kombinacijom lamotrigina i valproata (tablete s produljenim otpuštanjem), a bez apsolutnih kontraindikacija za primjenu tih lijekova, podvrgnuti su rutinskom TDM nakon najmanje 21 dan (ko)terapije. Doze lijekova su postupno titrirane, sukladno odgovoru i podnošljivosti (i u skladu s odobrenim sažetcima opisa svojstava lijeka). Uzorci krvi za određivanje jutarnjih ostatnih koncentracija lijek(ov)a uzeti su između 07:00 i 09:00 sati. U studiju su uključeni ispitanici koji su zadovoljili slijedeće kriterije: (i) potpisali su informirani pristanak za genotipizaciju farmakogena i voljni su donirati uzorak krvi u tu svrhu; (ii) dob ≥ 16 godina; (iii) nepušači ili bivši pušači; (iv) ne koriste i tijekom mjesec dana prije davanja uzorka krvi za TDM nisu koristili druge antiepileptike ili druge lijekova za koje je poznato da utječu na farmakokinetiku lamotrigina ili valproata, ili aktivnost UGT enzima, P-glikoproteina i ABCG2 transportera; (v) na temelju rutinske ocjene (anamneza, medicinska dokumentacija) izvjesno je da imaju očuvanu funkciju srca, bubrega i jetre. Bolesnici s nereguliranim dijabetesom, hipo- ili hipertireozom, te oni s poviješću maligne bolesti, oboljeli od bilo koje akutne bolesti, trudnice i bolesnici s HIV infekcijom nisu uključivani u studiju.

4.4. Bioanalitičke metode

Određivanje koncentracija antiepileptika provedeno je na Odjelu za laboratorijsku farmakologiju i toksikologiju te Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Laboratorij definira referentni raspon koncentracija lijeka, a koji je određen donjom granicom ispod koje je terapijski odgovor manje vjerojatan te gornjom granicom iznad koje je veća vjerojatnost toksičnih učinaka. Za lamotrigin definirani referentni raspon je 4-55 $\mu\text{mol/L}$, dok

za valproičnu kiselinu iznosi 350-690 $\mu\text{mol/L}$ (30). Donja granica kvantifikacije (LLOQ) za valproat određena je ispod 20.8 $\mu\text{mol/L}$.

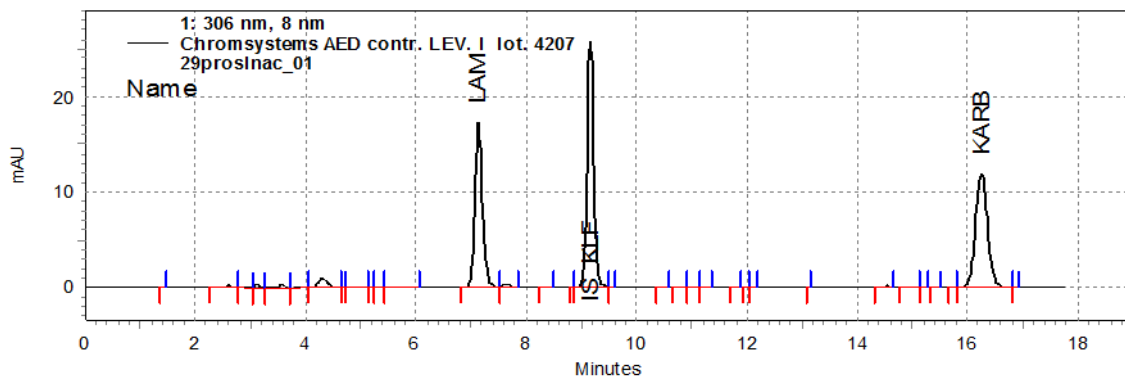
4.4.1. *Određivanje koncentracije lamotrigina i valproata*

Za određivanje koncentracije lamotrigina i valproata uzet je uzorak krvi ujutro, neposredno prije uzimanja jutarnje doze lijeka, a nakon najmanje 21 dana stabilne doze lijeka, odnosno nakon postizanja ravnotežne koncentracije lijeka. Za određivanje koncentracija lijeka u serumu izvađeno je 5 mL krvi u epruvete bez antikoagulansa.

Koncentracija lamotrigina u serumu određena je vlastitom validiranom metodom tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti s *diode array* detektorom (HPLC-DAD), na instrumentu Shimadzu HPLC sistem 20A (Shimadzu, Japan). Koncentracija valproata je mjerena imunokemijskom metodom na analizatoru Dimension EXL 200 (Siemens, Njemačka).

Za HPLC metodu korišteni su kalibrator i kontrolni uzorci tvrtke Recipe (Njemačka), a za imunokemijske analize tvrtke Siemens (Njemačka). Uzorak za HPLC analizu pripremljen je organskom ekstrakcijom s 2,5 ml smjese heksan/etilaceta (1:1). U epruvetu za ekstrakciju uzorka pipetirano je 250 μl plazme ispitanika, 25 μl NaOH (0,5 M) i 25 μl kloramfenikola kao internog standarda. Nakon ekstrakcije pripremljena smjesa centrifugirana je 10 min na 3000 o/min. Gornji organski sloj (2 ml) je odvojen u epruvetu za uparavanje i uparen u struji zraka na 37°C. Upareni ostatak otopljen je u 200 μl mobilne faze. Mobilna faza sastojala se od metanola, acetonitrila i 0,05M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ fosfatnog pufera (pH 6,9) u omjeru 75:90:285, a analiti su razdvojeni uz protok od 0,8 do 1,3 ml/min i termostatiranje kolone MN EC Nucleosil 100-5 C 18 HD 250 x 4.6 mm i predkolone MN CC 8/4 Nucleosil 100-5 C 18 HD na 30°C.

Lamotrigin i interni standard su kvantificirani na 306 nm (slika 4). Za potvrdu prisutnosti analita korišten je UV spektar 190-370 nm. Metoda je validirana za lamotrigin u rasponu od 0,2 do 60 $\mu\text{mol/L}$.



Slika 4. Primjer kromatograma za mjerenje lamotrigina u serumu na valnoj dužini 306 nm

Validacija metode i kriteriji prihvatljivosti učinjeni su prema internom validacijskom protokolu koji slijedi CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) i FDA (Food and Drug Administration) smjernice, a uključuje analizu preciznosti, točnosti, linearnost kalibracijske krivulje i koncentracijski raspon, granicu detekcije, granicu kvantifikacije i stabilnost analita, Svi mjereni analiti uključeni su u vanjsku procjenu kvalitete (RfB i Instand) i akreditirani su prema normi HRN EN ISO 15189:2012 .

4.5. Genotipizacija

Genotipizacija je provođena na Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Za izdvajanje i genotipizaciju DNA izvađeno je 3 mL krvi u epruvetu s antikoagulantom EDTA. Ekstrahiranje DNA učinjeno je iz pune krvi koristeći FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), a prema preporukama proizvođača.

Genotipizacija polimorfizama *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503), *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) i *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258) provedena je koristeći TaqMan[®] metodu lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu za detektiranje polimorfizama jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP). Korišteni su reagensi TaqMan[®] Drug Metabolism Genotyping assays ID C_7586662_10, ID C_15854163_70, ID C_27827970_40, dok je genotipizacija *UGT1A4 c.142T>G* (*UGT1A4*3*, rs2011425) provedena koristeći Custom TaqMan[®] SNP Genotyping assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) metodom PCR u stvarnom vremenu. Detektiranje

polimorfizama izvedeno je prema preporukama proizvođača na uređaju za PCR ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD).

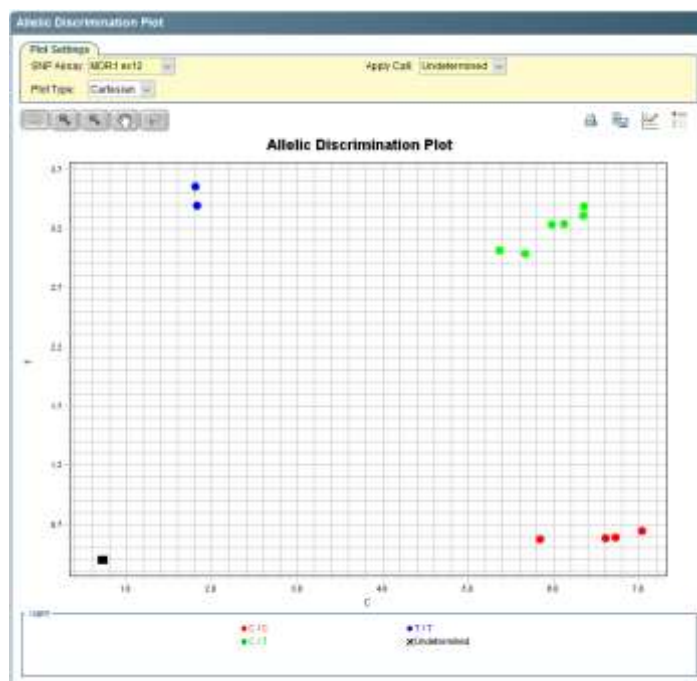
Za analizu pojedinih polimorfizama korišteni su odgovarajući reagenski kitovi (tablica 3).

Tablica 3. Polimorfizmi analizirani Taqman® metodom uz odgovarajuće reagense

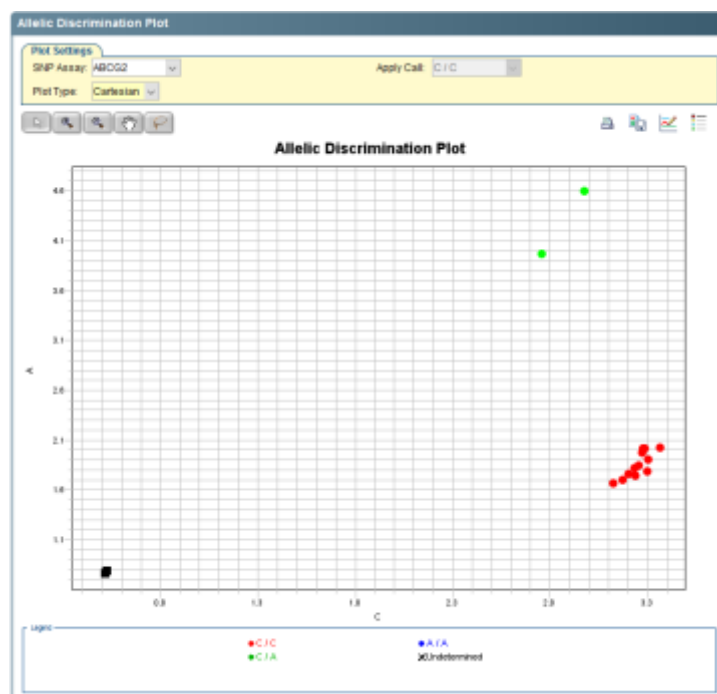
Gen	c. DNA	db SNP (rs#)	TaqMan® SNP Assay ID
<i>ABCB1</i>	c.1236C>T	rs1128503	C_7586662_10
<i>ABCG2</i>	c.421C>A	rs2231142	C_15854163_70
<i>UGT2B7</i>	c.-161C>T	rs7668258	C_27827970_40
<i>UGT1A4*3</i>	c.142T>G	rs2011425	Custom TaqMan® Assay

Korišteni reagensi TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, SAD) sadrže specifične početnice i TaqMan® fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. Za određivanje polimorfizama koriste fluorescentni signal koji nastaje zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze. Fluorescentni signal je detektiran CCD kamerom (engl. *charge – coupled device*), a analiziran je pomoću računalnog programa 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, SAD). Analizom alelne diskriminacije određeno je radi li se o homozigotu za „divlji alel“, heterozigotu ili homozigotu za mutirani alel, a za što je korišten par fluorescentno obilježenih detektora VIC® i FAM® od čega se jedan detektor poklapa s „divljim tipom“ alela, a drugi s varijantnim alelom. Priprema reakcijske smjese i odgovarajući uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System izvedeni su prema uputama proizvođača i jednaki su za sve polimorfizme.

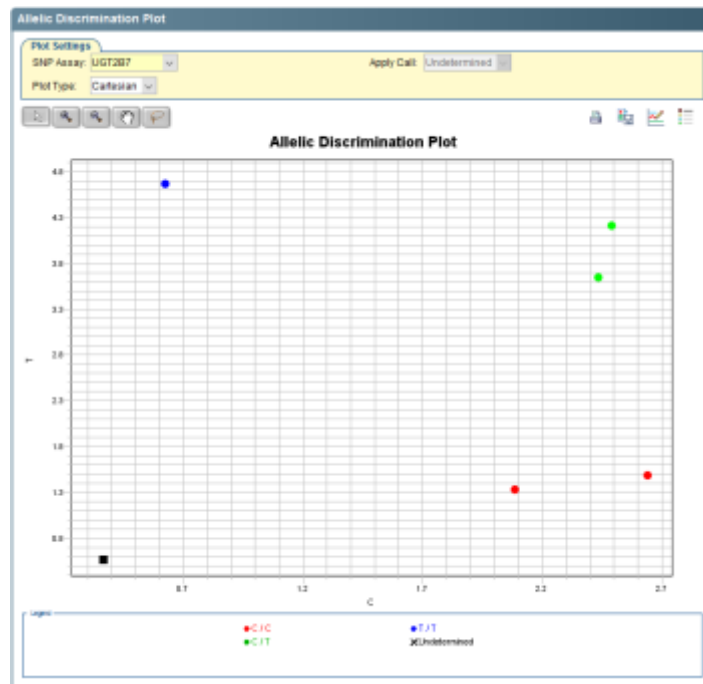
Na slikama 5-8 prikazana je analiza alelne diskriminacije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System za polimorfizme *ABCB1 c.1236C>T*, *ABCG2 c.421C>A*, *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4 c.142T>G*.



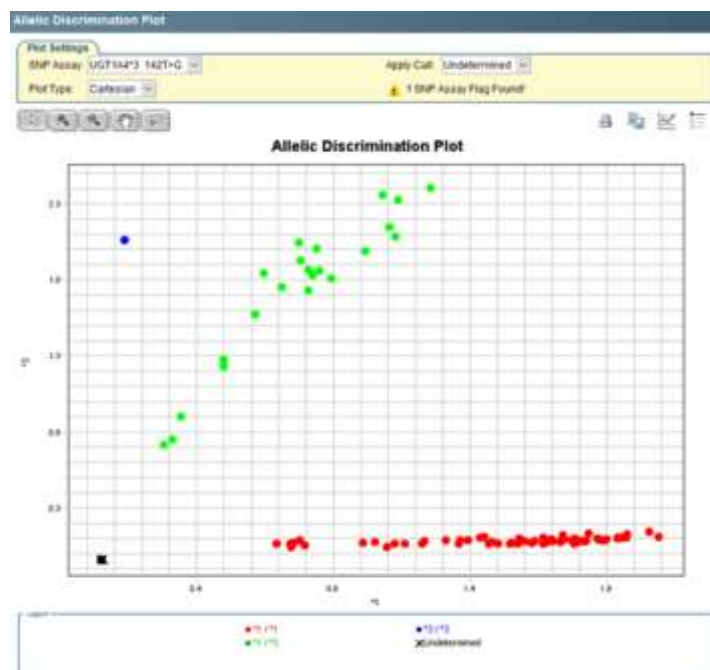
Slika 5. Analiza polimorfizma *ABCB1* c.1236C>T TaqMan® metodom
 Opis: crvene točke - homozigot divlji tip CC; zelene točke - heterozigot CT; plave točke - homozigot varijanta TT.



Slika 6. Analiza polimorfizma *ABCG2* c.421C>A TaqMan® metodom
 Opis: crvene točke - homozigot divlji tip CC; zelene točke - heterozigot CA



Slika 7. Analiza polimorfizma *UGT2B7* c.-161C>T TaqMan® metodom
 Opis: crvene točke - homozigot divlji tip CC; zelene točke - heterozigot CT; plave točke - homozigot varijanta TT.



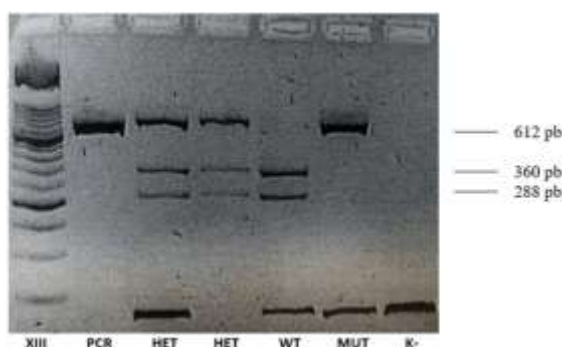
Slika 8. Analiza polimorfizma *UGT1A4* c.142T>G (*3) TaqMan® metodom

Opis: crvene točke - homozigot divlji tip TT; zelene točke - heterozigot TG; plave točke - homozigot varijanta GG

Genotipizacija *UGT1A4 c.142T>G* potvrđena je analizom polimorfizma dužine restrikcijskih ulomaka (engl. *polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*, PCR-RFLP) koja se temelji na očitavanju prisutnosti, odnosno odsutnosti restrikcijskih ulomaka PCR umnožaka za pojedini genotip. Za pripremu reakcijske smjese korištene su preporučene početnice (Invitrogen, SAD) i reagensi (Roche, Njemačka). PCR reakcija provedena je na uređaju GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Nakon PCR reakcije umnožak PCR digestiran je restrikcijskim enzimom na 37 °C 2 sata u termostatu Eppendorf ThermoStat C (Eppendorf, Njemačka). Analiza umnožaka PCR provodila se elektroforezom u 2% agaroznom gelu (Invitrogen, SAD) s netoksičnom bojom (Olerup, Austrija). Razdvajanje je rađeno na uređaju za elektroforezu PowerPac Basic (BIO-RAD Laboratories, SAD) prema preporukama. Vizualizacija gelova izvodila se na uređaju G:BOX (Syngene, Ujedinjeno Kraljevstvo), a za detekciju duljine restrikcijskih ulomaka korišten je molekularni biljeg XIII (Roche, Njemačka). Određivanje pojedinih genotipova i interpretacija nalaza opisani su u tablici 4 te prikazani na slici 9. Analiza je izvedena prema već opisanim postupcima u literaturi (66,150).

Tablica 4. Analiza genotipa *UGT1A4 142T>G* metodom PCR-RFLP

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



Slika 9. Analiza polimorfizama *UGT1A4 c.142T>G* dobivenih metodom PCR-RFLP

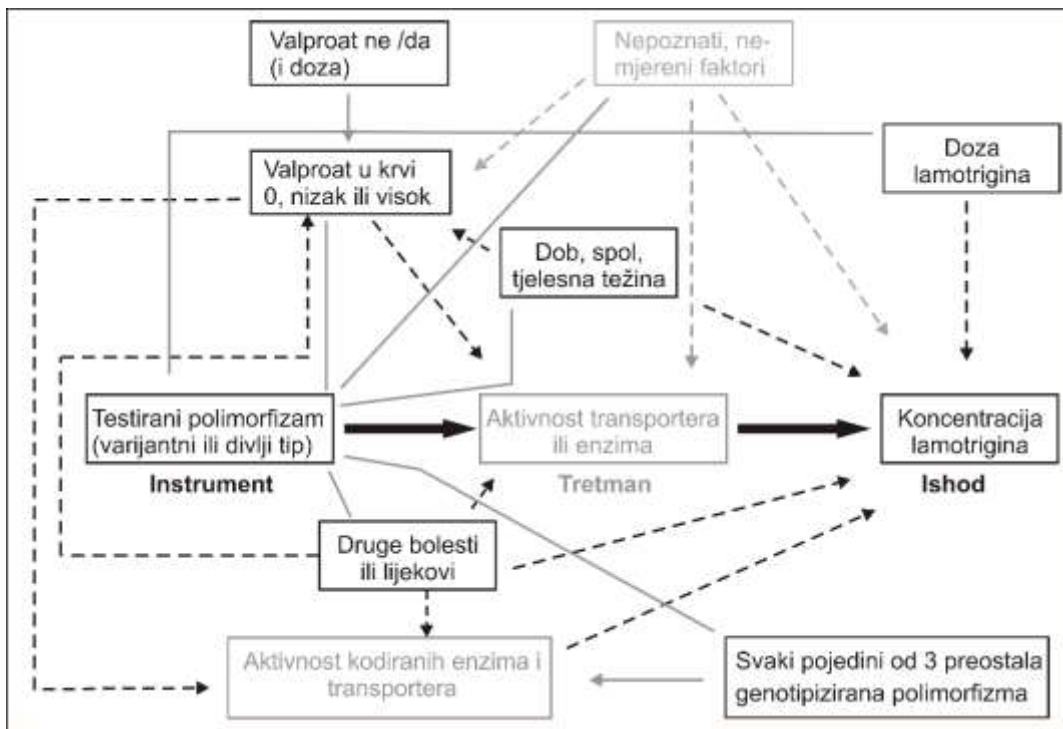
4.6. Ishod od interesa

U svrhu procjene učinaka testiranih genotipova izmjerene koncentracije lamotrigina standardizirane su po primjenjenoj dozi i iskazane u $\mu\text{mol/L}/100 \text{ mg}$. Za procjene učinaka pojedinih polimorfizama, vrijednosti su logaritmirane na bazi e .

4.7. Postupci za postizanje uvjetovane izmjenjivosti

Metodologija temeljena na SCM/DAG teoriji kauzalnosti omogućuje da se činjenično znanje o nekom kauzalnom problemu (koji se želi rasvijetliti), te na njemu temeljene pretpostavke i očekivanja „pretoče“ u matematičke izraze (formaliziraju), što u konačnici omogućuje da se, primjerice, jasno kvantificiraju iznosi nekog totalnog efekta, ili njegov izravni i posredovani dio, procijenjeni efekt korigiran za nemjerene efekte „remetilačkih faktora“ i tome slično. U praktičnom smislu, omogućuje da se grafički, u obliku DAG, prikaže svako kauzalno pitanje na koje se želi odgovoriti. Slika 10 prikazuje nešto kompleksniji, ali još uvijek pojednostavljen DAG koji generalno ilustrira kauzalna pitanja u ovom istraživanju: budući da se odnose na 4 pojedinačna polimorfizma i njihove ukupne (totalne) efekte i zatim na njihove efekte na različitim razinama ekspozicije valproatu – ukupno ih je 8 (po dva za svaki polimorfizam). Opći DAG na slici 10 ne odnosi se ni na jedan polimorfizam/pitanje specifično: samo ugrubo naznačuje koje sve elemente treba uzeti u obzir („kontrolirati“) kako bi se eventualno postigla razumno dobra uvjetovana izmjenjivost jedinki, odnosno, razumno točna procjena kauzalnih efekata od interesa. Kauzalni put od interesa (onaj koji se evaluira) naznačen je debelim crnim strelicama (instrument \rightarrow tretman \rightarrow ishod). Ostale varijable naznačene na slici predstavljaju (najopćenitije i pojednostavljeno) *confoundere*, preteče tretmana ili ishoda i njihove „roditelje“. One varijable koje u ovom istraživanju nisu kvantificirane jer to nije tehnički moguće (npr. aktivnosti pojedinih enzima i transportera), ili ih sadašnje znanje o problemu nije „svjesno“ (pa se stoga niti ne mogu uzeti u obzir), ili pak, postoje i poznate su, ali u ovom istraživanju nisu kvantificirane (npr. različiti drugi polimorfizmi *ABCG2*, *ABCB1*, *UGT2B7* i *UGT1A4* gena) naznačene su sivim kvadratima/slovima. Poznate (prema sadašnjem znanju) i kvantificirane varijable naznačene su crnim kvadratima/slovima. Mjestimično, naznačeni su njihovi „roditelji“ od kojih polaze sive tanje strelice koji naznačuju kauzalni efekt „roditelja“ na

„potomka“; a od *confoundera*/preteča tretmana/ishoda polaze crne crtkane strelice koje naznačuju „remetilačke“ efekte koji ometaju kvantifikaciju kauzalnog efekta od interesa. Sive crte između pojedinih *confoundera*/preteča tretmana/ishoda ili njihovih roditelja i instrumenta naznačuju moguće nekauzalne asocijacije (npr. pukim slučajem prevalencija nekog „interferirajućeg“ polimorfizma veća je na jednoj nego na drugoj razini instrumenta). U okolnostima kada je jedan od polimorfizama od interesa instrument, ostali su „remetilački“, čimbenici, a za svaki polimorfizam DAG izgleda ponešto drugačije (jer je struktura svakog kauzalnog pitanja od interesa nešto drugačija). Treba uočiti da od ishoda ne polazi niti jedna strelica „unatrag“ (prema tretmanu ili *confounderima*) – izostanak takvih strelica informira da je zadovoljen uvjet „bez povratnog učinka“.



Slika 10. Prikaz „generalnog“ usmjerenog acikličkog grafa (DAG) primjenjivog za ovo istraživanje (opis u tekstu). Testirani polimorfizam je instrument i od njega polazi kauzalni put koji se želi kvantificirati – instrument definira tretman (aktivnost transportera/enzima; naznačena sivim jer se ne može mjeriti *in vivo*) koji utječe na ishod. Crno obrubljenim kvadratima/slovima naznačeni su *confounderi*/preteče ishoda/tretmana i (mjestimično) njihovi roditelji. Od „roditelja“ polaze sive strelice koje naznačuju kauzalni odnos na „potomke“. Crkane crne strelice koje polaze od *confoundera*/preteča ishoda/tretmana prema ishodu ili tretmanu naznačuju „remetilačke“ efekte (izravne ili posredne) koje treba „kontrolirati“. Naznačeni su (sivim) i nemjereni *confounderi*/preteče ishoda/tretmana i „remetilački“ efekti.

Sive crte koje povezuju *confoundere*/preteče ishoda/tretmana s instrumentom naznačuju potencijalne nekauzalne asocijacije koje će također ometati kvantifikaciju kauzalnog efekta od interesa.

Računalni paket *daggity* (151) u programskom jeziku R primijenjuje postupke temeljene na SCM/DAG teoriji i omogućuje, sukladno unosu činjeničnih znanja o problemu, (i) konstrukciju odgovarajućeg DAG-a, (ii) identifikaciju „uloga“ pojedinih varijabli u DAG-u i (iii) identifikaciju najmanjeg skupa varijabli koje treba „kontrolirati“ kako bi se postigla uvjetovana izmjenjivost, odnosno mogao nepristrano procijeniti kauzalni efekt tretmana (ili, u ovom slučaju instrumenta) na ishod. S obzirom da istraživanje postavlja veći broj kauzalnih pitanja, DAG-ovi specifični za svako od njih (svaki od 4 polimorfizma od interesa) prikazani su u Rezultatima.

„Kontrola“ „remetilačkih“ efekata (tj. „ujednačavanje“ tretiranih i kontrola za iznose remetičakih varijabli) može se postići različitim postupcima. U ovom istraživanju, jedan dio „kontrole“ ostvaren je temeljem ključnih-isključnih kriterija: (i) ispitanici nisu imali druge antiepileptike (samo LAM ili LAM+VAL) ili druge lijekove koji interferiraju s lamotriginom, ili pak s aktivnošću UGT enzima, ABCG2 transportera ili P-glikoproteina. Dakle, i varijantni i kontrolni ispitanici u tom su smislu bili ujednačeni. Dijelom, to je postignuto i time što nisu uključivani bolesnici s drugim ozbiljnim bolestima (vidi 4.3. Ispitanici), što onda isključuje i komedikaciju; (ii) ispitanici su bili generalno zdravi (osim epilepsije) (vidi 4.3. Ispitanici), stoga su varijantni i kontrolni ispitanici u tom smislu bili ujednačeni. Za ostale potencijalne *confoundere*/preteče ishoda/tretmana koji su kvantificirani, klasični postupak u regresijskim modelima nije bio primjeren. Naime, čak i ako je broj ispitanika velik, teško će se postići „ujednačavanje“ (tretiranih i kontrola) koje nije, u znatnoj mjeri, posljedica interpolacija regresijskog modela – drugim riječima, moguće je generirati procjenu efekta tretmana (instrumenta) na ishod, ali je ona uvelike posljedica projekcije „izvan okvira modela“ (tj. izvan doista kvantificiranih vrijednosti). Kao primjer može poslužiti situacija u kojoj je genotip *ABCG2 c.421C>A* polimorfizma instrument, i dihotomiziran je kao „nositelji varijantnog alela“ i „homozigoti divljeg tipa“, a nastoji se procijeniti efekt varijantnog alela. Prema našem prethodnom iskustvu (141), među osobama liječenim lamotriginom (ili LAM+VAL) prevalencija nositelja varijantnog alela je 15-20%. Što se tiče „remetilačkih“ efekata/varijabli koje su kvantificirane i koje treba „kontrolirati“ („ujednačiti“), tu su spol (2 razine), zatim 2 ili 3 razine svakog od preostala 3 polimorfizma te 3 razine ekspozicije valproatu, što ukupno čini $2 \times 2 \times 2 \times 3 \times 3 = 72$ stratuma. U svakom od tih stratuma, za smislenu procjenu efekta, trebalo

bi biti barem po nekoliko nositelja varijantnog alela i nekoliko homozigota divljeg tipa, a osim toga bi se oni, u svakom stratumu, morali barem donekle preklapati u iznosu dobi i tjelesne mase. Recimo da je razumno željeti da je svakom stratumu 3 nositelja varijantnog alela – to znači da bi trebalo ukupno regrutirati najmanje oko 250 nositelja varijantnog alela i „nadati se“ da će biti pravilno raspoređeni po stratumima. A tih 250 ispitanika bi zapravo predstavljali 15%-tak od cjelokupnog broja, što znači da bi ih ukupno trebalo biti oko 1500 – broj koji se vrlo rijetko sreće u istraživanjima ovog tipa.

U ovom istraživanju za „kontrolu“ („ujednačavanje“ vrijednosti) remetilčkih faktora/efekata, koristili smo dvije druge metode: (i) **egzaktno „uparivanje“** (engl. *exact matching*) u kombinaciji s **optimalnim potpunim „uparivanjem“** (engl. *optimal full matching*) i (ii) **ujednačavanje entropije** (engl. *entropy balancing*). Iz razloga navedenih dalje u tekstu, preferirali smo egzaktne i optimalne *potpuni matching*. No ta metoda ima i ograničenja – može „ujednačavati“ samo instrumente/tretmane s dvije razine. Osim toga, tretirane i kontrolne jedinice koje se ne mogu „upariti“ – izbacuju se iz analize. To katkad može bitno smanjiti broj ispitanika koji se u konačnici analiziraju. Ujednačavanje entropije, s druge strane, može „ujednačavati“ i tretmane koji imaju više od dvije razine ili su kontinuirani i nastoji zadržati sve ispitanike, ali nerijetko ga, zbog konstelacije vrijednosti „remetilčkih“ faktora, nije moguće provesti.

Egzaktno uparivanje u kombinaciji s optimalnim potpunim uparivanjem

Exact matching je preferirani način „kontrolne“ „remetilčkih“ efekata u nerandomiziranim studijama zbog razine ujednačenosti između tretiranih i kontrola koju postiže, međutim, ako je broj takvih faktora koje treba „kontrolirati“ velik, onda, u pravilu, velik broj ispitanika ostane neuparen, odnosno „izbacuje“ se iz analize. Ovaj postupak omogućuje da se jedna tretirana jedinka upari s jednom ili više kontrola, i obrnuto, za niz svojstava, formirajući stratum unutar kojeg se nalaze tretirane i kontrolne jedinice koje su potpuno identične za cijeli set kovarijata. Primjerice, tretirana(e) i odgovarajuća(e) kontrole istog su spola, dobi, razine izloženosti valproatu, imaju isti genotip na svim tipiziranim lokusima itd. Dakle, metodom se postiže ravnoteža kao da se radi o randomizaciji stratificiranoj prema nizu kriterija. **Optimal full matching** također omogućuje uparivanje „jedan – prema – više“ (i obrnuto), ali na temelju multivarijatne udaljenosti između jedinki (obzirom na vrijednosti kovarijata). Kada je Mahalanobis mjera udaljenosti, onda se ovim postupkom može aproksimativno postići ravnoteža kao u stratificiranoj randomizaciji. U postupku se prvo tretirane i kontrolne jedinice

upare egzaktno u odnosu na kategorijske kovarijate (i tako formiraju stratume). Zatim se koristi Mahalanobis udaljenost da dodatno minimizira udaljenost između tretiranih i kontrola unutar stratuma u odnosu na kovarijate koje nisu uključene u egzaktnu proceduru (npr. dob i tjelesna težina, budući su kontinuirane varijable). Za ovaj postupak koristili smo paket *MatchIT* u programskom jeziku R (152-154).

Ujednačavanje entropije

Entropy balancing je vrsta „uparivanja“ (tretiranih i kontrola; pri čemu tretman može imati više od dvije razine ili biti kontinuiran) na temelju (multivarijatne) udaljenosti – algoritam „traži“ i zatim svakoj jedinki dodjeljuje pondera uvjetovane prethodno postavljenim restrikcijama u pogledu momenata distribucije kovarijata (prvi moment – mjera centralne tendencije; drugi moment – mjera disperzije), tako da u konačnici restrikcije budu zadovoljene. Primjerice, ako se skup kovarijata („remetilačkih“ čimbenika) sastoji od nekoliko kontinuiranih i nekoliko kategorijskih varijabli, algoritam traži i (ako rješenje postoji) jedinkama dodjeljuje pondera, što će na koncu rezultirati identičnim ili posve blisko sličnim srednjim vrijednostima, standardnim devijacijama, proporcijama kovarijata u tretiranih i kontrolnih jedinki. Istodobno, ako je adekvatno rješenje moguće, srednja vrijednost pondera na svakoj razini tretmana bit će 1.0, uz umjerenu standardnu devijaciju, a rasponi vrijednosti pondera će se preklapati, i neće biti ekstremnih vrijednosti pondera (kako procjena ne bi prekomjerno ovisila o nekoliko jedinki s velikim ponderima). Da bi to bilo moguće, „sirovi“ podaci za svaku od varijabli moraju se do neke mjere preklapati između razina tretmana. Kad je to preklapanje oskudno, neki će ponderi biti jako veliki. Katkad, preklapanje vrijednosti kovarijata je toliko oskudno da algoritam ne može naći rješenje, tj. ova metoda nije primjenjiva. Za ujednačavanje entropije koristili smo paket *WeightIT* u programskom jeziku R (155,156).

Za razliku od egzaktnog uparivanja, „ujednačenost“ koju postiže ova metoda jest „prosječna ujednačenost“ za vrijednosti kovarijata, međutim, jedna tretirana i jedna kontrolna jedinka mogu se razlikovati u nizu karakteristika, iako pripadaju skupinama za koje su prosječne vrijednosti identične ili blisko slične. S druge strane, nakon egzaktnog uparivanja, svaka tretirana jedinka ima potpuno iste vrijednosti svih kovarijata kao i sve kontrole s kojima je uparena (i obrnuto). Stoga smo preferirali egzaktno uparivanje, a gdje se činilo da ostaje previše neuparenih ispitanika ili smo smatrali da bi bilo informativnije da instrument ima 3 razine (a ne

dvije), koristili smo ujednačavanje entropije. Obrnuto, gdje ujednačavanje entropije nije moglo dati zadovoljavajuće rješenje, koristili smo metode *matchinga*.

Za procjenu ukupnih efekata polimorfizama od interesa, vrijednosti kovarijata u nositelja varijantnog alela i homozigota divljeg tipa „ujednačavani“ su u cjelokupnom uzorku. Za procjenu efekata polimorfizama na raznim razinama ekspozicije valproatu, „ujednačavanje“ je provedeno na svakoj razini ekspozicije. Uspješnost „ujednačavanja“ ocjenjuje se na temelju standardiziranih razlika (d) za pojedine kovarijate između tretiranih i kontrolnih jedinki. Standardno, vrijednosti $d \leq 0.2$ smatraju se beznačajnim razlikama, vrijednosti $d=0.3-0.5$ smatraju se „umjerenim razlikama“, a vrijednosti $d \geq 0.6$ smatraju se velikim razlikama. U postupcima *matchinga*/ponderiranja vrijednosti kovarijata „idealno“ su ujednačene ako je $d < 0.1$ (egzaktno uparivanje i uspješno ujednačavanje entropije daju vrijednosti $d=0.000$), a ako su vrijednosti $d \geq 0.1$ („suboptimalno“ ujednačene vrijednosti) onda su predmetne kovarijate uključene u multivarijatni model za analizu podataka.

4.8. Statistička analiza (procjena efekata)

Za sve genotipizirane polimorfizme procijenjeno je odstupanje od Hardy-Weinberg ekvilibrija, a za polimorfizam *ABCG2* gena i *UGT2B7* gena testirana je neravnoteža povezanosti gena (engl. *linkage disequilibrium*, LD), budući se oba nalaze na dugom kraku 4. kromosoma [računalni program CubeX (157)].

Kada je za „ujednačavanje“ vrijednosti kovarijata korišteno „uparivanje“, efekti testiranih polimorfizama na ishod [$\ln(\text{lamotrigin } \mu\text{mol/l})/100 \text{ mg doze}$] procijenjeni su u „sirovim“ podacima, tj. prije „ujednačavanja“ varijantnih ispitanika i kontrola „divljeg tipa“ za mjerene kovarijate (dakle, u situaciju u kojoj su „ujednačeni“ samo temeljem uključnih kriterija [komorbiditeti, komedikacija]) i nakon „ujednačavanja“, budući da se dva seta podataka neizbježno razlikuju u broju – sličnost nalaza na dva seta podataka podupire dokaz o efektu/izostanku efekta. U obje varijante, koristili smo „klasične“ (frekvencionističke) i Bayes generalizirane linearne modele. U analizu „ujednačenih“ podataka, gdje je to bilo potrebno, uključene su i varijable u kojih „ujednačavanje“ nije rezultiralo idealnom ravnotežom između tretiranih i kontrolnih jedinki. U svakoj od situacija, prvo je procijenjen ukupni efekt varijantnog alela, a zatim efekt na svakoj od razina ekspozicije valproatu (na temelju interakcijskih kontrasta *genotip*valproat*). Modifikacija efekta razinom valproata

kvantificirana je kao razlika efekta varijantnog alela na svakoj od razina ekspozicije valproatu u odnosu na stanje bez ekspozicije valproatu (valproat 0 ili BLOQ), tj. kao omjer omjera geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR):

$$\text{razlika efekta (omjer dva GMR)} = \exp [\ln(\text{GMR1}) - \ln(\text{GMR2})]$$

Podatci nakon „ujednačavanja“ analizirani su u ponderiranim modelima (engl. *weighted regression*), a u frekvencionističkim modelima rabljen je robustni procjenitelj varijance (zbog stratuma formiranih postupkom „ujednačavanja“). U Bayes modelima (4 lanca, 4000 iteracija, 8000 uzoraka posteriorne distribucije), za efekt od primarnog interesa (efekt polimorfizma) i modifikaciju efekta (valproat kao moderator), definirali smo umjereno informirane skeptične normalne *prior* distribucije - centrirane na 0 za $\ln(\text{GMR})$ i za razlike $\ln(\text{GMR})$, sa standardnom devijacijom 0.355. Ti *priori* daju podjednaku (50%) vjerojatnost da je GMR (ili omjer GMR) >1.0 i da je <1.0 , a središnjih 95% te priorne distribucije nalazi se u rasponu između 0.5 i 2.0, pri čemu je 48% vjerojatnosti u rasponu vrijednosti sukladnih konvencionalnim granicama ekvivalencije (0.80 – 1.25). Stoga, ti su *priori* sukladni nul-hipotezi (polimorfizam nema učinka na koncentraciju lamotrigina; valproat nema moderatorski učinak, tj. razlike „tretirani“ – „kontrolni“ podjednake su na svim razinama valproata), no ne isključuju posve mogućnost efekta (u bilo kojem smjeru). Iako efekt valproata nije predmet istraživanja, mora imati definiran *prior* - definiran je umjereno informirani normalni *prior* [srednja vrijednost 0.693, standardna devijacija 0.42 za $\ln(\text{GMR})$]: daje 50% vjerojatnosti da je GMR („nizak valproat“ – „valproat 0“, odnosno za „visok valproat“ – „valproat 0“) >2.0 i 50% da je <2.0 , s 95% vjerojatnosti u rasponu GMR 1.0 do 4.0, a 50% vjerojatnosti za GMR u rasponu 1.57-2.54. Taj *prior* odražava očekivanje o prosječno dvostruko višim koncentracijama lamotrigina u ljudi liječenih kombinacijom LAM+VAL nego u onih na monoterapiji: „predviđa“ da će koncentracije lamotrigina u gotovo svih ispitanika liječenih kombinacijom biti više nego u onih na monoterapiji, blago više u nekih, a ekstremno više (npr. 4 puta više ili i više od toga) u nekih drugih ispitanika. Za efekte (GMR) varijabli koje nisu idealno „ujednačene“ definirani su blago informirani neutralni normalni *priori* (srednja vrijednost 0, standardna devijacija 0.80).

Sve razlike između varijantnih ispitanika i kontrola „divljeg tipa“ iskazane su s 95% granicama pouzdanosti [frekvencionističkim (CI) ili Bayes (CrI)], a isto vrijedi i za omjere GMR-ova. Nije bilo potrebno korigirati granice pouzdanosti/razinu greške tipa 1, jer u istraživanju ne postoji problem multiplikativnosti: naime, za evaluaciju efekta svakog od polimorfizama, a „unutar“ polimorfizma na svakoj razini ekspozicije valproatu, iz cjelokupnog uzorka ispitanika generirane su svaki put nove tj. drugačije pseudopopulacije – „ujednačavanje“ „regrutira“ i

ponderira svaki put iznova, kao da se svaki put radi o zasebnoj studiji, a u svakoj se testira samo jedna nul-hipoteza, pa razina greške tipa 1 odgovora nominalnoj razini 0.05. Isto vrijedi i za procjenu efekta polimorfizma na raznim razinama ekspozicije valproatu – samo je jedan formalni test, F-test, tj. test globalne nul-hipoteze koja glasi „GMR (varijantni – kontrole „divljeg tipa“) ne razlikuje se niti na razini niske niti na razini visoke ekspozicije valproatu u odnosu na ekspoziciju 0“ (tj. već ima „ugrađenu“ korekciju za dvije usporedbe).

Korišten je računalni program SAS 9.4 (SAS Inc., Cary, NC), te računalni paket *rstanarm* (158) u programskom jeziku R za Bayes analizu.

4.9. Broj ispitanika

Kako je prikazano, u ovom istraživanju sadržano je zapravo 8 pojedinačnih „studija“ (ili analiza) – po dvije za svaki polimorfizam od interesa (jedna za procjenu glavnog efekta, druga za procjenu moguće modifikacije efekta polimorfizma valproatom). Nemoguće je odrediti jedan jedinstveni broj ispitanika koji bi udovoljio zahtjevima svake od njih: prevalencija nositelja varijantnih alela („tretirani“) za svaki je polimorfizam drugačija, pa je neki broj ispitanika dostatan za procjenu efekta jednog polimorfizma premalen za procjenu efekta nekog drugog, ili bi se jedan mogao procijeniti na znatno manjem broju ispitanika od efekta nekog drugog polimorfizma. Stoga je ukupan broj ispitanika za uključenje u istraživanje planiran u odnosu na polimorfizam za koji je očekivani udio nositelja varijantnih alela najmanji – broj ispitanika dostatan za razumnu vjerojatnost detekcije nekog biološki vjerojatno relevantnog efekta u tim okolnostima, izvjesno će biti dostatan i za veću vjerojatnost detekcije efekta istog iznosa za polimorfizme za koje je prevalencija nositelja varijantnog alela veća. U tom kontekstu, definirali smo nekoliko „želja“, a na temelju prethodnog iskustva (141) formirali nekoliko očekivanja.

- Smatrali smo da bi efekt (izražen kao GMR) nekog varijantnog alela mogao biti praktično važan ako iznosi $GMR=1.33$ (ili više) ili, recipročno $GMR=0.75$ (ili niže), tj. ako su ostatne razine lamotrigina za barem 33% (ili više) više, ili pak za 25% (ili više) niže od razina u kontrola „divljeg tipa“; a ako su manje od toga, onda nisu praktično važne (GMR je bliže 1.0). Granice 0.75 i 1.33 za 90% granice pouzdanosti oko GMR su konvencionalne granice ekvivalentne bioraspodjelivosti (bioekvivalencije) za lijekove s koeficijentom varijacije oko 30%, a primjenjuju se (u testovima bioekvivalencije) za vršne ekspozicije (C_{max}) – ostatnu koncentraciju (obzirom na njenu prediktivnost u TDM-u) smatrali smo „ekvivalentnom“

mjerom, s time da smo koristili razinu greške (dvostranu) od 0.05 (konzervativniju), a ne 0.1 kao u formalnoj bioekvivalenciji;

- Smatrali smo da je uzorak dovoljno velik ako omogući najmanje 80% vjerojatnosti detekcije takvog efekta (ako postoji!) na dvostranoj razini greške tipa 1 od 0.05.

Očekivanja (141):

- Među oboljelima od epilepsije koji se liječe samo lamotriginom ili LAM+VAL kombinacijom, dominiraju oni na monoterapiji, tj. očekivani udio ispitanika na LAM+VAL kombinaciji je oko 1/3 (33%);
- O tome koja je prevalencija ljudi s nešto preniskim i onih s „ciljanim“ ili nešto višim ostatnim koncentracijama valproata (među oboljelima na LAM+VAL kombinaciji) nismo imali podataka. Pretpostavili smo kako je realno očekivati da nakon najmanje 3 tjedna ko-terapije bude podjednako (50%) onih s „niskim valproatom“ i onih s „visokim valproatom“. To bi značilo da po 15-16% od svih uključenih ispitanika „spada“ u svaku od te dvije skupine (ostali, tj. oko 67% su ispitanici na monoterapiji LAM);
- Očekivana prevalencija nositelja varijantnih alela za četiri polimorfizma od interesa je kako slijedi: a) za *ABCG2 c.421C>A* 15-20%; b) za *ABCB1 c.1236C>T* 60-65%; c) za *UGT1A4*3* 24-25%; d) za *UGT2B7 c.-161C>T* 75-80%. Nadalje, budući da nema nekog biološki opravdanog razloga za suprotno, očekivanje je da su te prevalencije podjednake u ispitanika na monoterapiji i onih na kombiniranoj LAM+VAL terapiji. Shodno, koristeći primjer polimorfizma s najmanjim očekivanim brojem nositelja varijantnog alela (*ABCG2 c.421C>A*), to bi značilo da na nositelje varijantnog alela otpada 15-20% među 33% ispitanika na LAM+VAL, i, nadalje, da je taj udio isti takav i među onima s „niskom“ i onima s „visokom“ ekspozicijom valproatu;
- U prethodnom istraživanju (141), u multivarijantnoj analizi efekta varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* (spram homozigotnog divljeg tipa) u ljudi tretiranih LAM+VAL kombinacijom, detektiran je efekt iskazan kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR)= 1.58 (95%CI 1.06-2.35). Na temelju njega, može se odrediti varijanca razlike logaritmiranih vrijednosti koncentracija lamotrigina između varijantnih ispitanika i kontrola „divljeg tipa“:

$$Var = \{[\ln(\text{donja granica CI}) - \ln(\text{gornja granica CI})]/(2x t, df 73)\}^2$$

A na temelju varijance logaritmiranih vrijednosti, može se procijeniti koeficijent varijacije (COV) za razliku „varijantni“ – „divlji tip“:

$$COV = \sqrt{\exp(Var) - 1} = 0.20$$

- Kad bi broj ispitanika u najmanjoj očekivanoj podskupini (na temelju „kombinacije“ genotipa [varijantni ili „divlji tip“] i ekspozicije valproatu [3 razine]) iznosio 10 (npr. 10 nositelja *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela među onima s „niskim“ koncentracijama valproata), onda bi ukupni broj ispitanika (nositelji varijantnog alela i kontrole „divljeg tipa“) na toj razini ekspoziciji valproatu iznosio ukupno 60 = 10 (ili oko 17%) + 50 (ili oko 83%);

Na temelju iznesenog, zaključili smo:

- Uz pretpostavljeni COV od 0.3 (dakle, za 50% veću od procijenjene), uzorak od 10 „tretiranih“ i 50 „kontrolnih“ ispitanika ima 80% snagu detektirati efekt varijantnog alela od GMR=1.33 (ili recipročno 0.75) na dvostranoj razini alfa =0.05;
- Broj od 60 ispitanika u predmetnoj podskupini s niskom razinom ekspozicije valproatu činio bi 15-16% ukupnog broja ispitanika, odnosno, da bi broj ispitanika u predmetnoj podskupini bio doista oko 60 (s „raspodjelom“ 10 varijantnih i 50 kontrolnih ispitanika), ukupan broj ispitanika trebao bi biti najmanje oko 420.

Budući da su uzorci krvi genotipizirani sukcesivno, kako su ispitanici uključivani, uključivanje je trajalo dok u podskupinama s najmanjim očekivanim brojem ispitanika na temelju kombinacije genotipa i ekspozicije valproatu nije uključeno po najmanje 10 nositelja varijantnih alela. Za taj broj „varijantnih“, očekivali smo da će broj „kontrola“ biti oko 60-tak ili nešto više. Obzirom na planirani postupak „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“, smatrali smo opravdano očekivati da će svih (očekivanih) 10 nositelja varijantnih alela moći biti „upareni“ s najmanje 50-tak kontrola „divljeg tipa“. U slučaju da je COV manji od pretpostavljenog iznosa (0.3) i iznosi, primjerice, 0.25, dostatno bi bilo da se 10 varijantnih može „upariti s“ 20 kontrola „divljeg tipa“ – snaga bi bila 81% za detekciju GMR=1.33 (ili 0.75).

Za sve odnose „varijantni ispitanici“ – „kontrola divljeg tipa“ u drugim polimorfizmima, očekivani udio manje zastupljenih je (prema prethodnom iskustvu) >20%. Stoga, sve te druge usporedbe imale bi znatno veću snagu (>80%) za detekcije efekta od GMR=1.33 (0.75), ako bi se ostvario očekivani broj od najmanje 10 ispitanika u najmanjoj (očekivanoj) podskupini.

4.10. Ocjena osjetljivosti na nemjereni *confounding*

U svim nerandomiziranim usporedbama „tretiranih“ i „kontrola“ *a priori* treba smatrati da postoji neki „iznos“ nemjerenog *confoundinga*. Drugim riječima, procijenjeni efekt može u nekom iznosu (ili cijeli) zapravo biti „privid“, tj. posljedica djelovanja nemjerenih/nepoznatih faktora, a ne tretmana koji se evaluira, pa se, u tim okolnostima, tretmanu pogrešno „dodjeljuje“ efekt koji zapravo ima sasvim druge uzroke. U tim je okolnostima poželjno procijeniti u kojoj mjeri je izmjereni efekt pripisiv tretmanu, odnosno koliko je „podložan“ učincima nemjerenih „remetilačkih“ faktora.

E-vrijednost

E-vrijednost (159) je najmanji efekt koji nemjereni „remetilački“ faktor(i) (jedan ili više njih kumulativno) treba imati na uzrok i na ishod (ili samo na ishod) da bi u potpunosti „objasnio“ opaženi efekt tretmana, u okolnostima kontrole za mjerene kovarijate. Visoka E-vrijednost govori da bi učinak nemjerenih „remetilačkih“ faktora morao biti izrazito visok kako bi u potpunosti „objasnio“ izmjereni efekt odnosno „gurnuo“ opaženi efekt do razine „nema efekta“ (tj. do zaključka kako ono što smo procijenili „pripada“ nemjerenim „remetilačkim“ faktorima, a ne tretmanu koji smo evaluirali). Visoka E-vrijednost upućuje na to da je izmjereni efekt „otporan“ na preostali *confounding*, tj. da ga je nemoguće ili vrlo teško u potpunosti „objasniti“ djelovanjem nekih drugih, nepoznatih faktora a ne samog tretmana. Niska E-vrijednost ukazuje na to da je potreban tek maleni učinak „remetilačkih“ faktora kako bi se u potpunosti „objasnilo“ opaženo - odnosno opaženi je efekt jako podložan učinku nepoznatih, nemjerenih faktora i najvjerojatnije se u potpunosti može „objasniti“ istodobnim prisustvom nekog malog nemjerenog učinka (odnosno opaženo najvjerojatnije nije posljedica tretmana, već drugih, nepoznatih faktora). E-vrijednost se može izračunati [paket *Evalue* u programu R (159)] za različite mjere efekta: za omjer rizika (engl. *relative risk*, RR), omjer izgleda (engl. *odds ratio*, OR), omjer hazarda (engl. *hazard ratio*, HR), omjer stopa događaja ili incidencije (engl. *incidence rate ratio*, IRR), razliku srednjih vrijednosti (engl. *mean difference*) ili regresijski koeficijent (engl. *regression coefficient*) iz „klasične“ linearne regresije ili za standardiziranu razliku srednjih vrijednosti, no uvijek se (putem različitih konverzija) izražava na skali relativnog rizika (RR) (E-vrijednost od 2.0 znači nemjereni efekt u iznosu RR=2.0). U ovom je istraživanju mjere efekta omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR), tj. eksponizirana razlika srednjih vrijednosti logaritama koncentracije lamotrigina, odnosno, omjer dvaju GMR-a (u testu interakcije). No budući da su GMR i RR po svojoj numeričkoj prirodi i značenju

blisko slični, u izračunu E-vrijednosti GMR (ili omjer dvaju GMR-a) se može „tretirati“ kao RR. Obje mjere efekata (i) su eksponenti razlika aritmetičkih sredina logaritama određenih vrijednosti - $\ln(\text{rizika})$ ili $\ln(\text{kontinuirana varijabla s distribucijom „iskrivljenom“ udesno})$; (ii) u oba su slučaja logaritmi normalno distribuirani; (iii) obje se mjere slično interpretiraju: daju informaciju o relativnoj razlici između tretmana i kontrole, odnosno između skupine bolesnika s varijantnim alelom i kontrolne skupine. Ako je za tretman-kontrola relativni rizik $RR > 1.0$, npr. 1.5, to znači relativno 50% veći rizik (nekog događaja) uz tretman; ako je $RR < 1.0$, npr. 0.5, to znači relativno 50% manji rizik. Slično vrijedi i za GMR. Primjerice, ako je za tretman-kontrola omjer GMR > 1.0 , npr. 1.5, to znači relativno 50% višu vrijednost mjerene varijable (farmakokinetički pokazatelji) uz tretman, a ako je $GMR < 1.0$, npr. 0.5, to znači relativno 50% niže vrijednosti mjerene varijable uz tretman. Sličan je odnos između relativnog rizika s tzv. relativnom stopom događaja, odnosno omjerom stopa događaja (IRR) - za IRR E vrijednost se računa na isti način kao i za RR (159). E-vrijednost može se odrediti u odnosu na bilo koju vrijednost. U ovom je istraživanju planirano E-vrijednost odrediti u odnosu: i) u slučaju nekog opaženog GMR koji je < 1.0 – u odnosu na GMR 0.80, tj. odrediti najmanji iznos efekta „nemjerenih faktora“ potreban da „gurne“ neki niski GMR do razine 0.80; ii) u slučaju nekog opaženog GMR koji je > 1.0 – u odnosu na GMR 1.25, tj. odrediti najmanji iznos efekta „nemjerenih faktora“ potreban da gurne neki visoki GMR do razine 1.25. Naime, u farmakokinetici lijekova, uobičajeno je razlike bioraspoloživosti između tretmana koje se kreću u rasponu GMR 0.80-1.25 smatrati „praktično nevažnima“ (tj. dva su tretmana bioekvivalentna).

Korekcija opaženih GMR za nemjereni *confounding*

Bilo koji opaženi efekt može se korigirati za iznos nekog nemjerenog efekta (*confoundinga*) koji u procjeni nije kontroliran (160). Taj se postupak također odnosi na efekte mjerene na skali relativnog rizika, pa smo i tu koristili analogiju između RR i GMR, a rezultira korigiranim opaženim efektom [paket *episensr* u programu R (161)]. Za provođenje postupka potrebne su informacije o (i) veličini efekta nemjerenog (nekontroliranog) čimbenika na ishod i (ii) neravnoteži prevalencije tog čimbenika u tretiranih i kontrola (ako je prevalencija identična, onda nemjereni čimbenik neće remetiti procjenu efekta jer će podjednako „sudjelovati“ u vrijednostima ishoda u tretiranih i kontrolnih jedinki). Primjerice, ako je opaženi efekt $GMR = 1.50$ u okolnostima u kojima nije „kontroliran“ efekt nekog „remetilačkog“ faktora koji iznosi npr. 1.50, moguće je generirati „korigirani“ GMR – korigiran za iznos nemjerenog efekta, uz različite poznate ili pretpostavljene razlike u prevalenciji „remetilačkog“ faktora

između tretiranih i kontrolnih jedinki. Isto vrijedi i ako je opaženi $GMR < 1.0$. Konačno, kad generirana procjena efekta iznosi $GMR=1.0$, to može biti zato što predmetni evaluirani tretman doista nema efekta na ishod, ali može biti i zbog toga što tretman ima efekt, ali istodobno postoji „remetilački“ faktor koji ga „gura“ u suprotnom smjeru, pa se stvara privid kako nema efekta. I $GMR=1.0$ može se korigirati za poznate ili hipotetske efekte nemjerenih „remetilačkih čimbenika“ (*confoundera*).

5. REZULTATI

5.1. Temeljna svojstva uključenih ispitanika

U istraživanje je ukupno uključen 471 ispitanik, od čega 328 (69.6%) ispitanika na monoterapiji lamotriginom, a 143 (30.4%) ispitanika na politerapiji lamotrigina i valproata (tablica 5). Doze lamotrigina bile su u rasponu od 12.5 do 550 mg/dan, slično u ispitanika na monoterapiji i kombiniranoj terapiji, a doze valproata varirale su od 250 mg do 2 grama/dan (tablica 5). Raspon ostalih koncentracija valproata u ispitanika na politerapiji bio je od 0 do 813 $\mu\text{mol/l}$ – naime, u troje ispitanika (na dozi 250 mg), ostalne koncentracije valproata bile su ispod razine kvantifikacije od 20.8 $\mu\text{mol/l}$ (BLOQ), stoga je ukupno 331 (70.2%) ispitanik bio neizložen valproatu ili su ostalne koncentracije BLOQ (tablica 5). Najviša izmjerena ostatna koncentracija (813 $\mu\text{mol/l}$) bila je malo iznad gornje granice preporučenih koncentracija valproata u TDM-u (tablica 5).

Tablica 5. Temeljna svojstva uključenih ispitanika, sveukupno i prema terapiji (monoterapija lamotriginom, LAM, ili kombinacija s valproatom, LAM+VAL). Među ispitanicima na politerapiji, troje je imalo ostatne koncentracije valproata ispod donje granice kvantifikacije (BLOQ) od 20.8 $\mu\text{mol/l}$.

	Svi	LAM	LAM+VAL
N	471	328	143
LAM	328 (69.6)	---	---
LAM+VAL	143 (30.4)	---	---
LAM doza (mg/dan)	175 (12.5-550)	150 (12.5-500)	200 (25-550)
VAL doza (u tretiranih) (g/dan)	---	---	1.0 (0.25-2.0)
VAL koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	---	---	357 (0-813)
VAL 0/BLOQ	331 (70.2)	328 (100)	3 (2.0)
VAL nizak (0/BLOQ <364 $\mu\text{mol/L}$)	70 (14.9)	0	70 (49.0)
VAL visok (≥ 364 $\mu\text{mol/L}$)	70 (14.9)	0	70 (49.0)
LAM koncentracija ($\mu\text{mol/L}$)	12.8 (0.5-102)	9.3 (0.5-60.1)	29.2 (2.3-102)
LAM ($\mu\text{mol/L}$) na 100 mg doze	84.0 (6.5-464)	68.0 (6.5-318)	164 (30.6-464)
Dob (godine)	39 \pm 15 (16-77)	41 \pm 15 (16-74)	35 \pm 13 (16-77)
Udio muških	188 (39.9)	115 (35.1)	73 (51.1)
Tjelesna masa (kg)	75 \pm 17 (27-143)	75 \pm 18 (46-143)	74 \pm 16 (27-117)

Od preostalih 140 ispitanika s mjerljivim ostatnim koncentracijama valproata, 70 (14.9%) je imalo „nizak“ valproat (iznad donje granice kvantifikacije ali $<364 \mu\text{mol/l}$), a 70 je imalo „visok“ valproat ($\geq 364 \mu\text{mol/l}$) odnosno unutar preporučenog raspona ili malo iznad gornje granice (tablica 5). Izmjerene ostatne koncentracije lamotrigina bile su oko 3 puta više u ispitanika na politerapiji nego na monoterapiji (tablica 5), sukladno očekivanjima, a razlika je bila nešto manja što se tiče koncentracija korigiranih za dozu ($\mu\text{mol/l} / 100 \text{ mg doze}$) (tablica 5). Ispitanici na monoterapiji su prosječno bili nešto stariji nego ispitanici na politerapiji (41 vs. 35 godina), s manjim udjelom muškaraca (35.1% vs. 51.1%), a (prosječno) slične tjelesne mase (tablica 5).

5.2. Učestalost pojedinih genotipova polimorfizama od interesa i frekvencija varijantnih alela

Opažene prevalencije nositelja varijantnih alela bile su bliske očekivanjima: (i) što se tiče *ABCG2 c.421C>A*, 378 (80.2%) ispitanika su bili homozigoti divljeg tipa, a 93 (19.8%) su bili nositelji varijantnog alela, od toga svega 5 varijantnih homozigota (tablica 6); (ii) što se tiče *ABCB1 1236>T*, prevladavali su heterozigoti (219, 46.5%), a zatim homozigoti divljeg tipa (33.8%) (tablica 6); (iii) slična prevalencija genotipova opažena je i za *UGT2B7 c.-161C>T* (tablica 6); (iv) u pogledu *UGT1A4*3T>G*, prevladavali su homozigoti divljeg tipa (77.5%), ali je udio nositelja varijantnog alela (s tek sporadičnim varijantnim homozigotima) bio ipak nešto viši nego u slučaju polimorfizma *ABCG2* (22.5%) (tablica 6).

Tablica 6. Opaženi genotipovi i frekvencije varijantnih alela.

	Svi	Lamotrigin	Lamotrigin + valproat
N	471	328	143
<i>ABCG2 c.421 C>A</i> rs 2231142			
CC	378 (80.2%)	256 (78.1%)	122 (85.3%)
CA	88 (18.7%)	67 (20.4%)	21 (14.7%)
AA	5 (1.1%)	5 (1.5%)	0
Frekvencija varijantnog alela	10.4%	11.7%	7.3%
<i>ABCB1 1236 C>T</i> rs1128503			
CC	159 (33.8%)	109 (33.2%)	50 (35.0%)
CT	219 (46.5%)	154 (47.0%)	65 (45.4%)
TT	93 (19.7%)	65 (19.8%)	28 (19.6%)
Frekvencija varijantnog alela	43.0%	43.1%	42.3%
<i>UGT2B7 -161 C>T</i> rs7668258			
CC	119 (25.3%)	72 (22.0%)	47 (32.9%)
CT	237 (50.3%)	169 (51.5%)	68 (47.5%)
TT	115 (24.4%)	87 (26.5%)	28 (19.6%)
Frekvencija varijantnog alela	49.6%	49.4%	43.4%
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i> rs2011425			
TT	365 (77.5%)	253 (77.1%)	112 (78.3%)
TG	102 (21.7%)	72 (22.0%)	30 (21.0%)
GG	4 (0.8%)	3 (0.9%)	1 (0.7%)
Frekvencija varijantnog alela	11.7%	11.9%	11.2%

Prevalencije pojedinih genotipova, kao i frekvencije varijantnih alela bile su slične u ispitanika na monoterapiji i onih na kombiniranoj terapiji (tablica 6). Niti za jedan polimorfizam nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinberg ekvilibrija i nije bilo naznaka LD između *ABCG2 c.421C>A* i *UGT2B7 c.-161C>T* ($D'=0.239$, $r^2=0.0068$).

5.3. Polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* i bioraspoloživost lamotrigina

5.3.1. Ispitanici

U cjelokupnom uzorku, prije „ujednačavanja“ mjerenih kovarijata, nositelji varijantnog alela i kontrole divljeg tipa blago (sve $d < 0.300$) su se razlikovale u nizu svojstava (tablica 7). Nakon „ujednačavanja“ („uparivanje“ – *exact matching* u kombinaciji s *optimal full matching*) svih 93 nositelja varijantnog alela moglo se „upariti“ s ukupno 322 kontrola divljeg tipa i postignuta je idealna ujednačenost za sve mjerene kovarijate (tablica 7).

Tablica 7. Svojstva nositelja varijantnog alela i kontrola divljeg tipa prije i nakon „uparivanja“. Razlike između skupina naznačene su kao standardizirane razlike (d): $d < 0.1$ znači minimalne i beznačajne razlike. Podatci su brojevi (postotci), srednje vrijednosti \pm SD, a za koncentracije lamotrigina geometrijske srednje vrijednosti (koeficijent varijacije, %COV).

	Prije „uparivanja“			Nakon „uparivanja“		
	Varijantni	Divlji tip	D	Varijantni	Divlji tip	D
N	93	378	---	93	322	---
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>						
Udio muških	33 (35.5)	155 (41.0)	-0.114	36.3 (39.0)	125.7 (39.0)	0.000
Dob (godine)	40 \pm 14	39 \pm 15	0.044	40 \pm 14	40 \pm 15	-0.006
Tjelesna težina (kg)	75 \pm 17	75 \pm 17	0.044	75 \pm 16	75 \pm 18	-0.002
Ekspozicija valproatu (VAL)						
VAL 0/BLOQ ¹	72 (77.4)	259 (68.5)	0.201	72.4 (77.8)	250.6 (77.8)	0.000
VAL nizak ($0 < 364 \mu\text{mol/L}$)	11 (11.8)	59 (15.6)	-0.110	9.9 (10.6)	34.1 (10.6)	0.000
VAL visok ($\geq 364 \mu\text{mol/L}$)	10 (10.8)	60 (15.9)	-0.151	10.7 (11.6)	37.2 (11.6)	0.000
<i>ABCB1</i> divlji tip	41 (44.1)	118 (31.2)	0.268	32.5 (34.9)	112.5 (34.9)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	52 (55.9)	260 (68.8)	-0.268	60.5 (65.1)	209.5 (65.1)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	16 (17.2)	103 (27.2)	-0.243	19.7 (21.2)	68.3 (21.2)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	77 (82.8)	275 (72.8)	0.243	73.3 (78.8)	253.7 (78.8)	0.000
<i>UGT1A4</i> *3 divlji tip	65 (69.9)	300 (79.4)	-0.219	74.0 (79.5)	256.0 (79.5)	0.000
<i>UGT1A4</i> *3 varijantni alel	28 (30.1)	78 (20.6)	0.219	19.0 (20.5)	66.0 (20.5)	0.000

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)

Slično, prije „ujednačavanja“, varijantni i kontrolni ispitanici na pojedinim razinama ekspozicije valproatu blago su se razlikovali u vrijednostima mjerenih kovarijata (tablica 8). „Ujednačavanje“ vrijednosti kovarijata provedeno je na svakoj razini ekspozicije valproatu. U ispitanika s valproatom 0/BLOQ, svih 72 nositelja varijantnog alela „upareno“ je s 251/259 kontrola divljeg tipa s idealnom ravnotežom za sve kovarijate (tablica 8); u ispitanika s niskim valproatom, svih 11 varijantnih upareno je s 33/59 kontrola; a u ispitanika s visokim valproatom, svih 10 varijantnih upareno je s 38/60 kontrola – s malom neravnotežom dobi i tjelesne težine (tablica 8).

Tablica 8. Svojstva nositelja varijantnog alela i kontrola divljeg tipa prije i nakon „uparivanja“ – zasebno na svakoj razini ekspozicije valproatu. Razlike između skupina naznačene su kao standardizirane razlike (d): $d < 0.1$ znači minimalne i beznačajne razlike. Podatci su brojevi (postotci) i srednje vrijednosti \pm SD.

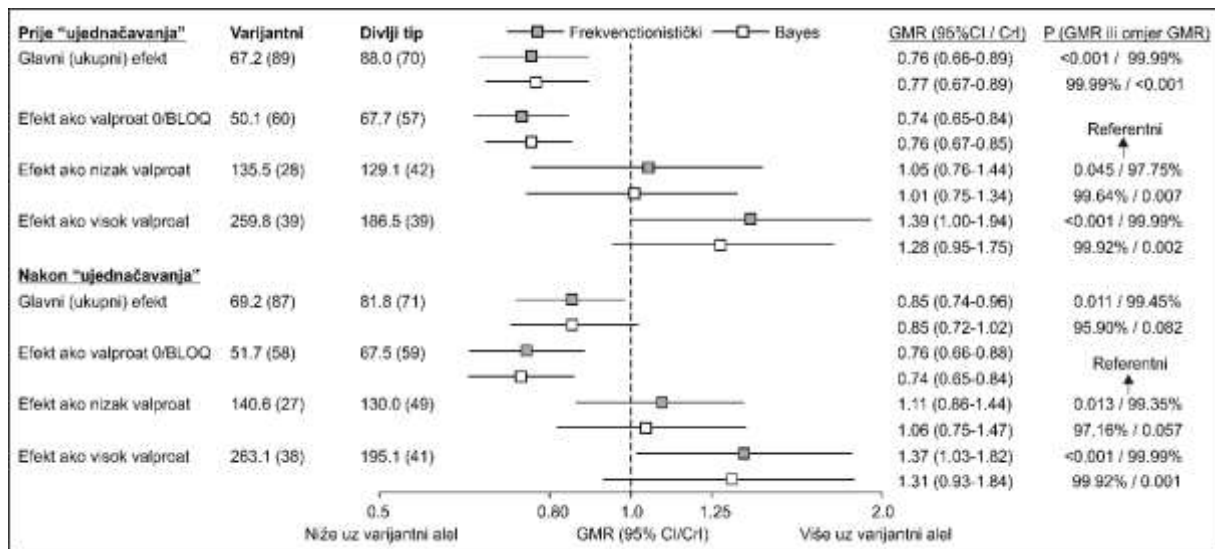
	Prije „uparivanja“		Nakon „uparivanja“		
	Varijantni	Divlji tip	Varijantni	Divlji tip	D
Valproat 0/BLOQ ¹					
N	72	259	72	251	
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>					
Udio muških	23 (31.9)	93 (35.9)	25.6 (35.6)	89.4 (35.6)	0.000
Dob (godine)	41 \pm 14	41 \pm 15	40 \pm 14	41 \pm 15	-0.034
Tjelesna težina (kg)	75 \pm 18	75 \pm 17	75 \pm 16	76 \pm 18	-0.060
<i>ABCB1</i> divlji tip	31 (43.1)	78 (30.1)	24.1 (33.4)	83.9 (33.4)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	41 (56.9)	181 (69.9)	47.9 (66.6)	167.1 (66.6)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	12 (16.7)	63 (24.3)	14.9 (20.7)	52.1 (20.7)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	60 (83.3)	196 (75.7)	57.1 (79.3)	198.9 (79.3)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	48 (66.7)	207 (79.9)	56.8 (78.9)	198.2 (78.9)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	24 (33.3)	52 (20.1)	15.2 (21.1)	52.8 (21.1)	0.000
Valproat nizak ($0 < 364 \mu\text{mol/l}$)					
N	11	59	11	33	
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>					
Udio muških	7 (63.6)	32 (54.2)	7.2 (65.9)	21.7 (65.9)	0.000
Dob (godine)	33 \pm 9	37 \pm 14	34 \pm 9	37 \pm 12	-0.321
Tjelesna težina (kg)	82 \pm 19	75 \pm 15	79 \pm 17	77 \pm 15	0.102
<i>ABCB1</i> divlji tip	6 (54.5)	24 (40.7)	5.8 (52.3)	17.2 (52.3)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	5 (45.5)	35 (59.3)	5.2 (47.7)	15.8 (47.7)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	2 (18.2)	16 (27.1)	1.3 (11.4)	3.8 (11.4)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	9 (81.8)	43 (72.9)	9.8 (88.6)	29.2 (88.6)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	9 (81.8)	46 (78.0)	9.0 (81.8)	27.0 (81.8)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	2 (18.2)	13 (22.0)	2.0 (18.2)	6 (18.2)	0.000
Valproat visok ($\geq 364 \mu\text{mol/l}$)					
N	10	60	10	38	
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>					
Udio muških	3 (30.0)	30 (50.0)	3.8 (37.5)	14.2 (37.5)	0.000
Dob (godine)	36 \pm 18	34 \pm 13	39 \pm 19	35 \pm 14	0.272
Tjelesna težina (kg)	71 \pm 13	73 \pm 18	75 \pm 14	70 \pm 18	0.332
<i>ABCB1</i> divlji tip	4 (40.0)	16 (26.7)	2.9 (29.1)	11.1 (29.1)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	6 (60.0)	44 (73.3)	7.1 (70.8)	26.9 (70.8)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	2 (20.0)	24 (40.0)	3.3 (33.3)	12.7 (33.3)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	8 (80.0)	36 (60.0)	6.7 (66.7)	25.3 (66.7)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	8 (80.0)	47 (78.3)	8.1 (81.2)	30.9 (81.2)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	2 (20.0)	13 (21.7)	1.9 (18.8)	7.1 (18.8)	0.000

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)

5.3.2. Efekt varijantnog alela *ABCG2* c.421C>A na bioraspoloživost lamotrigina

Na temelju podataka prije „ujednačavanja“, u cjelokupnom uzorku ispitanika (glavni ili „ukupni“ efekt varijantnog alela) ekspozicija lamotriginu je bila oko 23-24% niža u nositelja varijantnog alela nego u kontrola divljeg tipa (frekvencionistički GMR=0.76, 0.66-0.89; Bayes

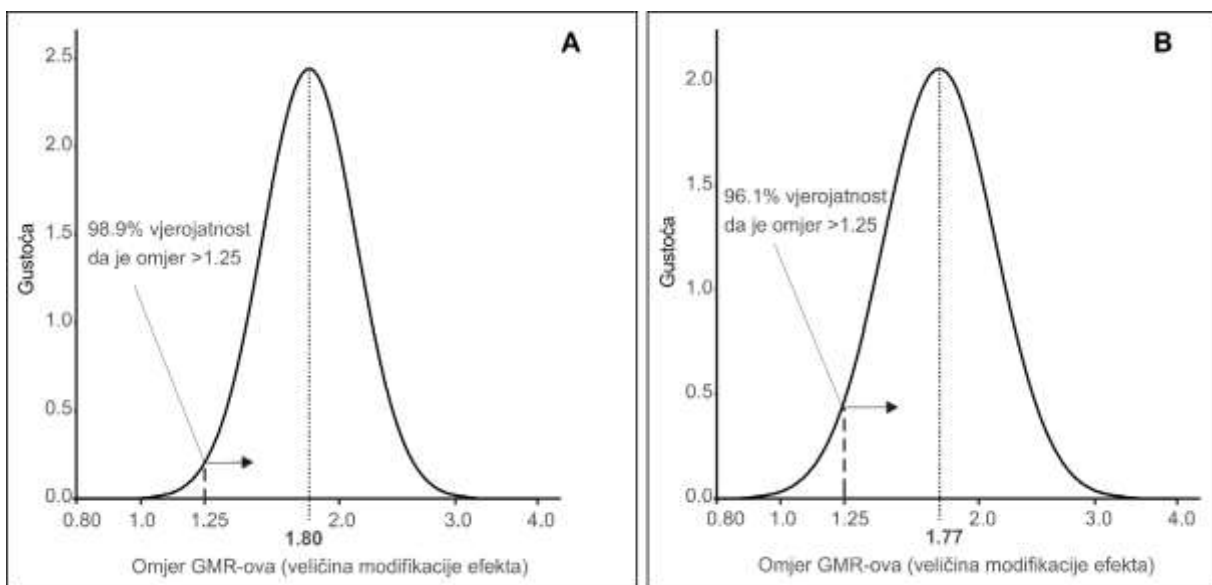
GMR=0.77, 0.67-0.89) (slika 11). „Čisti“ efekt varijantnog alela vidi se u ispitanika s valproatom 0/BLOQ i procijenjen je na oko 24-26% nižu ekspoziciju lamotriginu (slika 11). U istom je iznosu procijenjen i efekt varijantnog alela nakon „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata uz dodatno podešenje za dob i tjelesnu težinu (slika 11).



Slika 11. Efekt varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela na ekspoziciju lamotriginu, prije „ujednačavanja“ i nakon „ujednačavanja“ kovarijata (uz dodatno podešenje za dob i tjelesnu težinu). Prikazane su geometrijske srednje vrijednosti (% koeficijent varijacije) ekspozicije lamotriginu za nositelje varijantnog alela i kontrole divljeg tipa, te efekti varijantnog alela kao omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR). Glavni ili „ukupni“ efekt procijenjen je u modelima samo s genotipom, a efekti na raznim razinama valproata u modelima s interakcijom. Za glavne efekte, prikazane su P-vrijednosti i Bayes vjerojatnosti (P) (redosljedom ovisno o tome je li model frekvencionistički ili Bayes). Za efekte na raznim razinama valproata, efekti (GMR) na razini „valproat 0/BLOQ“ (ispod razine kvantifikacije) su smatrani „referentnim“ a P-vrijednosti/P se odnose na razliku efekata varijantnog alela (GMR-ove) na razini „nizak“ i na razini „visok“ valproat u odnosu na taj referentni efekt.

Sukladno očekivanju, ekspozicija lamotriginu bila je viša što je ekspozicija valproatu bila viša (i u varijantnih i u kontrolnih ispitanika, i prije i nakon „ujednačavanja“ kovarijata) (slika 11). Međutim, efekt varijantnog alela bio je različit (nehomogen) na različitim razinama ekspozicije valproatu: (i) u ispitanika s valproatom 0/BLOQ – oko 25% niža ekspozicija lamotriginu (i prije i nakon „ujednačavanja“) (slika 11); (ii) u ispitanika s niskim valproatom – bez vidljivog efekta varijantnog alela (vrijednosti GMR oko 1.0) (slika 11); (iii) u ispitanika s visokim valproatom

– oko 30% viša ekspozicija i prije (manja razlika između frekvencionističke i Bayes procjene, slika 11) i nakon „ujednačavanja“ kovarijata (GMR=1.37, 1.03-1.82 frekvencionistička procjena, 1.31, 0.93-1.84, Bayes procjena) (slika 11). Kako je prikazano na slici 11, razlike efekata varijantnog alela uz nizak ili visok valproat u odnosu na efekt u ljudi s valproatom 0/BLOQ bile su znatne – za omjere GMR-a (GMR uz nizak valproat vs. GMR uz valproat 0/BLOQ; GMR uz visok valproat vs. GMR uz valproat 0/BLOQ), Bayes vjerojatnosti da su omjeri >1.00 bile su $\geq 96\%$, a korespondirajuće frekvencionističke P-vrijednosti bile su <0.05 (većinom) ili 0.1 - i prije i nakon „ujednačavanja“ kovarijata. Slika 12 prikazuje jasnu razliku između efekata varijantnog alela u ljudi s visokim valproatom i onih s valproatom 0/BLOQ – omjer GMR-ova iznosi 1.80 (frekvencionistička procjena) odnosno 1.77 (Bayes procjena), a vjerojatnost da je omjer >1.25 bila 98.9% za frekvencionističku i 96.1% za Bayes procjenu (slika 12).



Slika 12. Distribucije vjerojatnosti razlike efekata (omjera geometrijskih srednjih vrijednosti, GMR) varijantnog alela u ljudi s visokim valproatom i onih s valproatom 0/BLOQ (ispod razine kvantifikacije). **A.** Frekvencionistička distribucija uzorkovanja. **B.** Bayes posteriorna distribucija. Naznačeni su iznosi frekvencionističke (omjer 1.80) i Bayes (omjer 1.77) procjene razlike efekata varijantnog alela i njihove cjelokupne distribucije. Naznačena je također vjerojatnost da je omjer GMR-a (razlika efekata) >1.25.

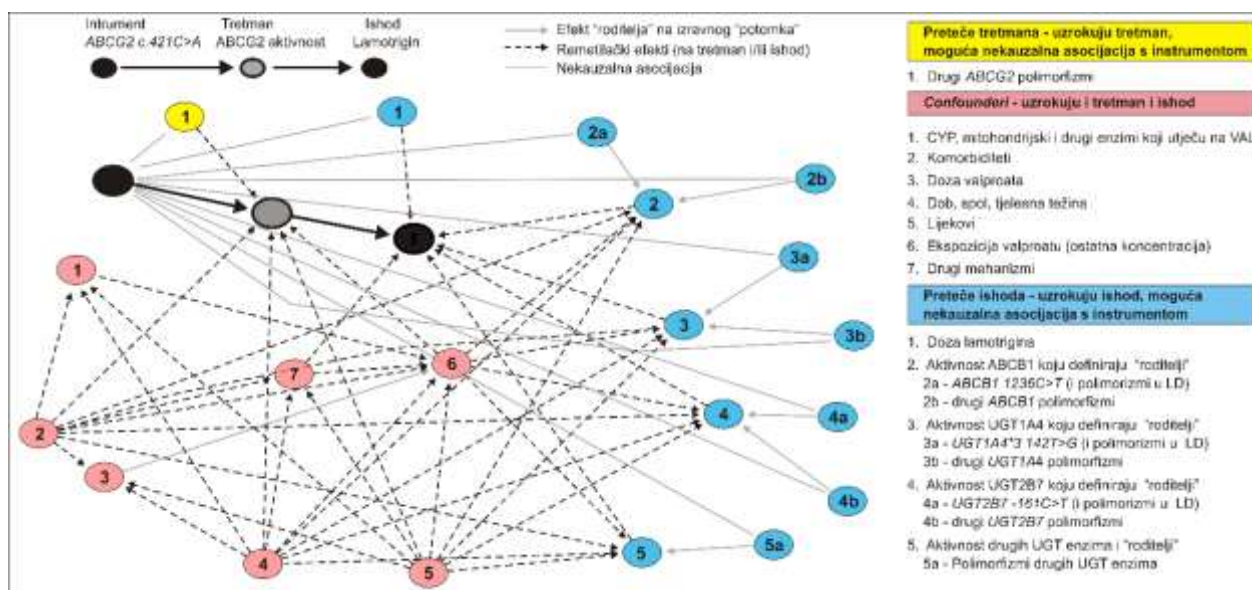
Ukupno – nositelji varijantnog alela imaju oko 25% nižu ekspoziciju lamotriginu u odnosu na kontrole „divljeg tipa“, no stupanj ekspozicije valproatu modificira taj efekt varijantnog alela: uz koncentracije valproata niže od preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu je slična u varijantnih i kontrolnih ispitanika; a u rasponu preporučenih TDM vrijednosti,

ekspozicija lamotriginu je u nositelja varijantnog alela oko 30% viša nego u kontrola „divljeg tipa“.

5.3.3. Osjetljivost na nemjereni confounding

Slika 13 prikazuje, u obliku DAG, „remetilačke faktore“ (*confoundere* i preteče ishoda i tretmana) koji ometaju detekciju/kvantifikaciju efekta *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela na ekspoziciju lamotriginu.

Efekt tj. kauzalni put od interesa naznačen je crnim debljim strelicama: instrument (*ABCG2 c.421C>A* genotip) – „tretman“ (aktivnost *ABCG2*) – ishod (koncentracija lamotrigina. „Remetilački“ faktori kategorizirani su kao: (i) preteče tretmana – čimbenici koji mogu utjecati na aktivnost *ABCG2*, a moguća je nekauzalna asocijacija s instrumentom: to su drugi polimorfizmi *ABCG2* za koje je *in vitro* pokazana veza sa sniženom aktivnošću transportera (140); (ii) *confounderi* (i njihovi „pretci“ ili „roditelji“) – su čimbenici koji uzrokuju (utječu na) i tretman (aktivnost *ABCG2* definiranu instrumentom) i ishod (ali nekim drugim mehanizmom). Među njima su (1) stupanj ekspozicije valproatu – u nekim je tkivima pokazano da valproat mijenja ekspresiju *ABCG2* transportera (162), a s druge strane na koncentracije lamotrigina utječe inhibicijom UGT enzima (posebno bitni UGT1A4 i UGT2B7) (26), ali, potencijalno, i učinkom na ekspresiju *ABCB1* transportera čiji je lamotrigin supstrat (135); (2) čimbenici koji izravno utječu na ekspoziciju valproatu, npr. doza valproata i aktivnost citokrom P-450, nekih UGT enzima (ne UGT1A4 i UGT2B7) i mitohondrijskih enzima za koje je poznato da metaboliziraju valproat (49,50); (3) dob, spol i tjelesna težina su faktori za koje je poznato da utječu na ekspoziciju lamotriginu (iako mehanizmi nisu posve jasni) (31,33), a pretpostavka je da mogu utjecati i na aktivnost *ABCG2* (npr. zbog efekta na razine valproata) – naznačena je mogućnost da ti učinci (utjecaji) mogu biti posredovani efektima na enzime i transportere ili pak nekim „drugim mehanizmima“ (npr. varijacije bubrežne i/ili jetrene funkcije u okviru „normalnih“ funkcija, razine albumina, volumena raspodjele itd.); (4) komorbiditeti i drugi lijekovi (antiepileptici) ili drugi – koji, slično, mogu utjecati i na aktivnost *ABCG2* (izravno ili putem utjecaja na razine valproata) i na lamotrigin, npr. uslijed efekata na UGT enzime, *ABCB1* transporter, ili pak nekim „drugim mehanizmima“; (iii) preteče ishoda – čimbenici za koje se zna ili pretpostavlja da mogu utjecati na ekspoziciju lamotriginu (npr. doza lamotrigina), a mogu biti nekauzalno povezane s instrumentom.



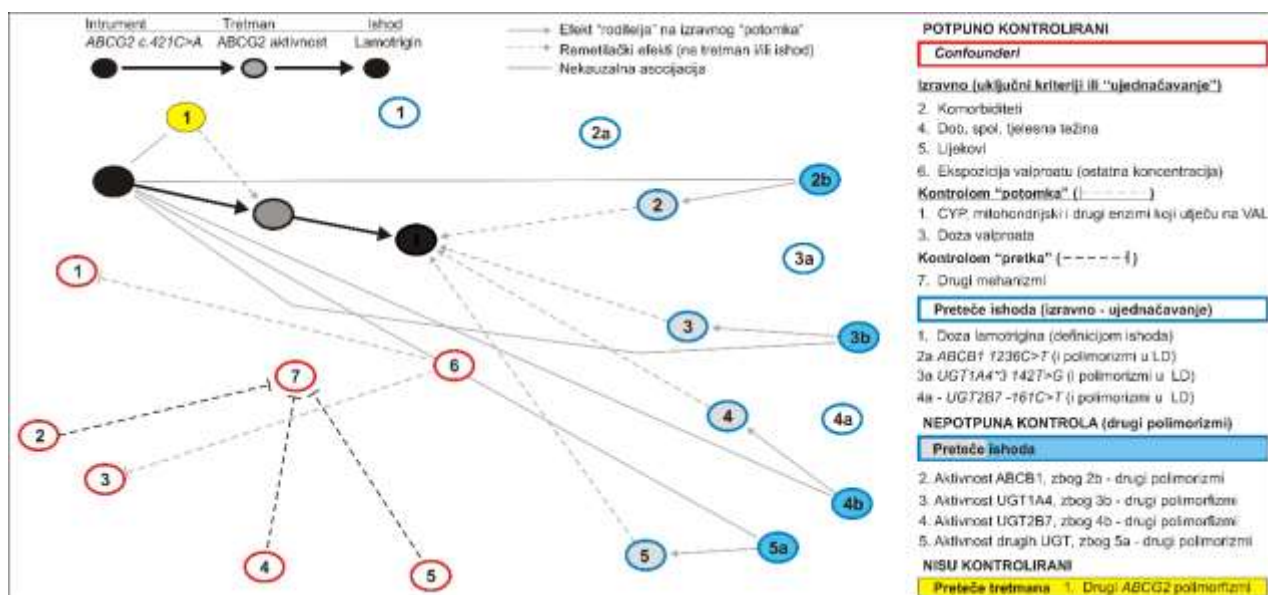
Slika 13. Prikaz „remetilačkih faktora“ koji „ometaju“ detekciju/kvantifikaciju efekta *ABCG2* c.421C>A varijantnog alela na bioraspoloživost lamotrigina – usmjereni aciklički graf (DAG). Efekt (kauzalni put) od interesa naznačen je debelim crnim strelicama i polazi od **instrumenta** – crni simbol (*ABCG2* c.421 genotip, varijantni ili „divlji tip“) koji definira „**tretman**“ (aktivnost *ABCG2*, smanjena ili normalna) koji se ne može mjeriti (naznačen sivim) i završava na **ishodu** – ostatnoj koncentraciji lamotrigina (crni simbol). Žutim je naznačen preteča tretmana – drugi *ABCG2* polimorfizmi koji potencijalno mogu utjecati na aktivnost *ABCG2*, a mogu biti nekauzalno povezani (asocijacija) s instrumentom. Crvenim su naznačeni confounderi – mogu utjecati i na tretman (aktivnost *ABCG2*) i na ishod (tj. koncentracije lamotrigina drugim mehanizmima). Plavim su naznačene preteče ishoda – utječu na ishod, a mogu biti nekauzalno povezane s instrumentom. Sive tanje strelice naznačuju kauzalne efekte „roditelja“ na „potomke“, crne crtkane strelice naznačuju mrežu „remetilačkih efekata“ – izravno na tretman i/ili ishod, ili posredno, različitim mehanizmima. Sive crte naznačuju moguće nekauzalne asocijacije preteča tretmana i preteča ishoda s instrumentom (npr. slučajne razlike prevalencije između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“). Vidi tekst za detalje.

CYP –citokrom P-450 enzimi važni za metabolizam valproata; LD - neravnotežna vezanost

Naznačeni su i čimbenici koji se *in vivo* ne mogu izravno mjeriti poput aktivnosti ABCB1 transportera te UGT1A4 i UGT2B7 enzima. Naznačena je i (više-manje teorijska) mogućnost da bi i aktivnost nekih drugih UGT enzima mogla utjecati na bioraspoloživost lamotrigina. Kao njihovi neposredni pretci ili „roditelji“, navedeni su polimorfizmi za koje je do sada u literaturi bilo naznaka da bi mogli biti relevantni za bioraspoloživost lamotrigina, a oni su genotipizirani u ovom istraživanju (*ABCB1 c.1236C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G* i *UGT2B7 c.-161C>T*) (45,121,126,127,137,138), s tim da je ostavljena i mogućnost da na aktivnost tih proteina utječu drugi polimorfizmi njihovih gena.

Slika 14 prikazuje isti DAG, ali s označenim kontroliranim „remetilačkim faktorima“ kao i onima koji u ovom istraživanju nisu u potpunosti kontrolirani – i mogući su izvori „ostatnog“ ili nemjerenog *confoundinga*. Potpuno kontrolirani faktori su neki *confounderi* i neke preteče ishoda, a to je postignuto ključnim kriterijima (komorbiditeti, komedikacija), „ujednačavanjem“ vrijednosti između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“ (dob, spol, tjelesna težina, stupanj ekspozicije valproatu, genotipovi na polimorfizmima *ABCB1 c.1236C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G* i *UGT2B7 c.-161C>T*) ili definicijom ishoda (koncentracije lamotrigina standardizirane su po 100 mg doze). Treba učiti da se „remetilačke faktore“ može „kontrolirati“ tj. „isključiti“ i posredno, tako da se izravno kontroliraju njihovi pretci: primjerice, za dob, spol, komorbiditete i komedikaciju uzeta je u obzir mogućnost da mogu utjecati na tretman i/ili ishod nekim mehanizmima koji ne uključuju poznate učinke na transportere i enzime („drugi mehanizmi“) – stoga „kontrola“ tih čimbenika „blokira“ „remetilačke putove“ posredovane tim „drugim mehanizmima“. Slično se postiže ako se kontroliraju „potomci“ koji su jedini put kojim neki čimbenik utječe na tretman i/ili ishod: primjerice, kontrola za stupanj ekspozicije valproatu „kontrolira“ također i „učinak“ doze valproata i čimbenika koji sudjeluju u metabolizmu valproata. Neke preteče ishoda nisu u potpunosti kontrolirani – aktivnosti ABCB1, UGT2B7 i UGT1A4: blokirani su utjecaji nekih polimorfizama i drugih faktora koji na te aktivnosti utječu, ali brojni drugi (poznati i nepoznati) polimorfizmi nisu kontrolirani i stoga izvjesno ostaje (makar i teorijska) mogućnost da utječući na aktivnost transportera/enzima ometaju kvantifikaciju efekta od interesa. Slično, nije kontroliran mogući interferirajući efekt drugih polimorfizama *ABCG2*. Nepotpuno kontrolirani i nekontrolirani čimbenici izvor su ostatnog *confoundinga*.

U „idealnim“ okolnostima, za ocjenu osjetljivosti procjene nekog efekta na ostatni *confounding* iznos tog nemjerenog „remetilačkog“ efekta može se barem približno procijeniti na temelju literaturnih podataka. U slučaju efekta varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* na ekspoziciju lamotriginu (slika 11) takvi podatci za sada ne postoje, odnosno, nema naznaka



Slika 14. Situacija u kojoj se kvantificira efekt *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela na ekspoziciju lamotriginu – DAG nakon „kontrola“ „remetilačkih faktora“. Potpuno kontrolirani čimbenici naznačeni su bijelim simbolima od kojih (više) ne polaze nikakvi „remetilački“ efekti (crtkane strelice) jer su blokirani. To je postignuto uključnim kriterijima, „ujednačavanjem“ vrijednosti kovarijata, definicijom ishoda, kontrolom „potomaka“ ili „predaka“. Nepotpuno kontrolirani čimbenici naznačeni su sivim simbolima – to se odnosi na aktivnosti ABCB1, UGT1A4, UGT2B7 i „ostalih“ UGT enzima. Naime, neki polimorfizmi njihovih gena nisu kontrolirani (plavi simboli) pa još uvijek mogu utjecati na aktivnost transportera/enzima (pune sive strelice), a mogu biti nekauzalno povezani s instrumentom (sive crte). Posljedično, od nepotpuno kontroliranih čimbenika mogući su „remetilački“ efekti na ishod (crtkane sive strelice). Nije kontrolirana moguća interferencija preteča tretmana – drugih *ABCG2* polimorfizama (koji mogu biti nekauzalno povezani s instrumentom).

da bi faktori prikazani na slici 14 kao oni koji „nisu kontrolirani“ imali neki mjerljiv efekt na bioraspodjelu lamotrigina:

1. Drugi polimorfizmi *ABCG2*. Prema aktualnom znanju, polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) daleko je najčešći poznati polimorfizam *ABCG2* gena [na globalnoj razini, frekvencija varijantnog alela procijenjena je na oko 10% (140), baš kao i u ovom istraživanju]. Smanjena (*in vitro*) funkcija transportera povezuje se s tri daljnja polimorfizma (rs34783571, rs192169062 i rs34264773), za tri polimorfizma pokazano je da nemaju utjecaja na aktivnost transportera, a za nekolicinu nije poznato utječu li na aktivnost transportera (140). Kumulativno, frekvencija varijantnih alela povezanih sa smanjenom aktivnošću transportera je

0.68%, a uzimajući u obzir i one za koje nije poznato utječu li na funkciju transportera, kumulativna frekvencija iznosi oko 1% (140). Shodno tome, među ispitanicima u ovom istraživanju realno je očekivati da su svega nekolicina njih bili nositelji tih „ostalih“ varijantnih alela/polimorfizama. Vjerojatnost da bi ta činjenica mogla utjecati na procjene u ovom istraživanju izvjesno je zanemariva.

2. Drugi polimorfizmi (osim genotipiziranih) *UGT1A4*, *UGT2B7* i „drugih“ UGT enzima.

Neka su istraživanja naznačila mogućnost da, uz *UGT1A4* i *UGT2B7* enzime, klirensu lamotrigina u maloj mjeri doprinose enzimi *UGT1A3* i *UGT1A2* no njihova uloga nije jasno dokazana, a ako i postoji, doprinos je vrlo malen (24). *UGT1A4* je vrlo polimorfan gen. Polimorfizam genotipiziran u ovom istraživanju, *UGT1A4*3 c.142T>G* (rs2011425), u potpunom je LD s nekoliko promotorskih polimorfizama, primjerice *-214C>T* i *-163G>A* (rs3732219 i rs3732218) s kojima tvori *UGT1A4*3a* haplotip, ali i s *-419* i *-463*, te s nekoliko daljnjih polimorfizama (tvore haplotipove *5 i *7a) (68,130-132). Osim toga, u bijelaca, rs2011425 je u potpunom LD s *UGT1A4*2 c.70C>A* (rs6755571, Pro24Tre) (66,133) koji je povezan sa smanjenom aktivnošću enzima *in vitro* (68,119), no izvještaji o njegovoj povezanosti s ostatnim koncentracijama lamotrigina u ljudi nisu jednoznačni (npr. u skandinavskih ispitanika) (47,121). Dakle, kontrolirajući za genotip *UGT1A4*3 c.142T>G*, kontrolira se i mogući utjecaj niza polimorfizama s kojima je u potpunom LD. Jasno je, također, da ostaje niz drugih polimorfizama u genu *UGT1A4* koji nisu „kontrolirani“. U ovom času, međutim, nepoznato je odražavaju li se oni na aktivnost *UGT1A4* / ekspoziciju lamotriginu.

I gen *UGT2B7* je vrlo polimorfan. Polimorfizam genotipiziran u ovom istraživanju – *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258) je u potpunom LD s polimorfizmom *802C>T* (rs743966) (24), te s nizom promotorskih polimorfizama s kojima tvori dva glavna haplotipa (124) i drugim polimorfizmima s kojima tvori haplotipove *UGT2B7*1a*, **1j*, **1k*, **2b*, **2c*, **2d*, **2f* (130). Dakle, i kontrola za genotip *UGT2B7 c.-161C>T* ujedno „kontrolira“ niz drugih polimorfizama s kojima je potpunom LD no, ostaje i niz drugih polimorfizama u genu *UGT2B7* koji nisu kontrolirani. Njihov mogući učinak na aktivnost *UGT2B7* enzima nije poznat.

3. Drugi polimorfizmi (osim genotipiziranih) *ABCB1*.

Polimorfizam genotipiziran u ovom istraživanju, *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503), u jakom je LD (81) s dva druga učestala kodirajuća polimorfizma, *c.2677G>T/A* (rs2032582) i *c.3435C>T* (rs1045642), a to vrijedi i za hrvatsku populaciju (163). Dakle, kontrolirajući za rs1128503, kontroliraju se (uvelike) i daljnja dva polimorfizma. U bijelaca, to su tri daleko najčešća polimorfizma, i ekstenzivno su evaluirana u vezi bioraspoloživosti niza lijekova, ali s vrlo varijabilnim rezultatima (136). U

odnosu na lamotrigin, nekoliko studija haplotipova ili pojedinačnih polimorfizama naznačilo je njihov mogući utjecaj na bioraspoloživost (24), ali nedavna velika studija u skandinavskih bolesnika nije našla „signal“ koji bi povezivao *c.1236C>T* ili *c.3435C>T* s bioraspoloživosti lamotrigina (47). Kumulativna prevalencija šest ostalih kodirajućih *ABCB1* polimorfizama je oko 10% (136), pa je izrazito malo vjerojatno da bi mogli biti „odgovorni“ za opažene efekte.

4. Ostali mogući nemjereni faktori. Istraživanja do sada nisu ukazala na važnost polimorfizama/aktivnosti drugih ABC transportera ili transportera iz *SLCO* superporodice na sistemsku bioraspoloživost lamotrigina.

U tim okolnostima (i) određene su E-vrijednosti kao indikator hipotetskog kumulativnog ostatnog efekta svih mogućih nemjerenih „remetilačkih“ faktora potrebene da dijelom ili u cijelosti „objasne“ opaženi efekt *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela, te razliku efekata uz visoku ekspoziciju valproatu i kada je valproat 0/BLOQ (E-vrijednosti za omjer GMR-a); (ii) efekt *ABCG2 c.421C>A* varijantnog alela i omjer GMR korigirani su za hipotetske iznose pretpostavljenih ostatnih „remetilačkih“ efekata.

E-vrijednosti. a) Da bi u potpunosti „objasnili“ opaženu razliku između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“ od $GMR=0.76$ odnosno $GMR=0.74$ (slika 11) (valproat 0/BLOQ), tj. efekt pripisan varijantnom alelu „gurnuli“ na vrijednost „nema efekta“ ($GMR=1.00$), nemjereni „remetilački“ faktori morali bi djelovati na način da rezultatno imaju kumulativni efekt snažnog sniženja koncentracije lamotrigina i to za polovicu, tj. $GMR=0.51$ odnosno $GMR=0.49$. Da bi djelomično „objasnili“ opaženu razliku, na način, primjerice, da „gurnu“ opažene GMR-ove na vrijednosti 0.85 (mali efekt varijantnog alela, unutar raspona ekvivalentne bioraspoloživosti), kumulativni učinak nemjerenih „remetilačkih“ faktora morao bi biti $GMR=0.65$ odnosno 0.68. b) Da bi u potpunosti „objasnili“ opaženu razliku, razlika između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“ pri visokoj razini valproata i uz valproat 0/BLOQ od 1.80 za omjer GMR odnosno 1.77 (slika 12) (tj. omjer GMR-ova „gurnuli“ na vrijednosti 1.00), kumulativni rezultatni efekt nemjerenih „remetilačkih“ faktora morao bi biti takav da na razini valproat 0/BLOQ „guraju“ GMR prema nižim vrijednostima od opaženih i/ili da na visokoj razini valproata „guraju“ GMR prema višim vrijednostima od opaženih na način da uslijed njihovog djelovanja omjer GMR-ova bude 3.00 (za frekvencionističku procjenu), odnosno 2.94 (za Bayes procjenu). Da bi djelomično objasnio opažene omjere GMR-ova, tj. „gurnuo“ im vrijednost na 1.25, kumulativni rezultatni efekt nemjerenih „remetilačkih“

faktora morao bi biti takav da uslijed njihovog djelovanja omjer GMR-ova iznosi 2.24, odnosno 2.18.

Ne postoji neki definirani iznos E-vrijednosti koji određuje „granicu“ osjetljivosti na nemjereni *confounding*. Međutim, u ovom kontekstu opravdano je reći da su opažene razlike između nositelja varijantnog alela i kontrola „divljeg tipa“ prilično neosjetljive na ostatne „remetilačke“ efekte, tj. isti bi morali biti doista izraženi, da bi se opaženo moglo u cijelini ili većim dijelom pripisati njihovom djelovanju, a ne činjenici imanja varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela.

Opaženi efekti korigirani za hipotetske nemjerene „remetilačke“ efekte. Budući da su prevalencija neke kombinacije „remetilačkih“ efekata i njenog mogućeg efekta na ishod nepoznate, definirati smo hipotetske situacije. Primjerice, ako je očekivana prevalencija „ostalih“ polimorfizama *ABCG2* koji mijenjaju aktivnost transportera kumulativno 1%, a prevalencija „ostalih“ polimorfizama *ABCB1* kumulativno 10% onda je, uz opravdanu pretpostavku da su te vjerojatnosti nezavisne, vjerojatnost istodobnog prisustva bilo kojeg polimorfizama iz tih dviju skupina $0.01 \times 0.1 = 0.001$ ili 0.1%. Prevalencija svih „ostalih“ polimorfizama *UGT2B7* i *UGT1A4* nije poznata. Pretpostavimo da je ukupna prevalencija kombinacije polimorfizama dvaju gena koji „guraju“ koncentracije lamotrigina u istom smjeru 30%, i nezavisna je od prevalencija „ostalih“ polimorfizama *ABCG2* i *ABCB1*, koji, hipotetski također „guraju“ koncentracije lamotrigina u istom smjeru, i to u istom onom u kojem ga „guraju“ ostali polimorfizmi *UGT2B7* i *UGT1A4*. Vjerojatnost istodobnog prisustva tih polimorfizama (s učinkom na lamotrigin koji je „u istom smjeru“) iznosi $0.01 \times 0.1 \times 0.30 = 0.0003$ ili 0.03%. No, pretpostavimo da je ta vjerojatnost puno veća (333 puta veća) i da iznosi 10%, u ukupnom broju ispitanika nakon „ujednačavanja“, na razini valproata 0/BLOQ to bi bilo 32 ispitanika. Pretpostavimo, nadalje, da se radi o rezultatnom „remetilačkom“ učinku koji „gura“ koncentracije lamotrigina na niže vrijednosti i to sa znatnim kumulativnim učinkom od $GMR=0.70$ (30% redukcija). Pretpostavimo, nadalje, da između nositelja varijantnog alela ($n=72$) i kontrola „divljeg tipa“ ($n=251$) pukim slučajem postoji znatna neravnoteža u prevalenciji tog „remetilačkog“ seta, i to tako da je razlika 5:1, odnosno 25% među nositeljima varijantnog alela ($n=18$ od 72) i 5% ($n=14$ od 251) među kontrolama „divljeg tipa“. To je hipotetska situacija koja sugerira da opaženi $GMR=0.75$ (kao „sredina“ između frekvencionističke i Bayes procjene od 0.76 i 0.74) nije posljedica imanja varijantnog alela, već efekta neravnotežno raspoređenog seta „remetilačkih varijabli“ koji snizuju koncentraciju lamotrigina. Opaženi $GMR=0.75$ korigiran za taj snažni nemjereni i hipotetski „remetilački“ efekt iznosi 0.798 – tj. još uvijek je ispod vrijednosti 0.80 (donje granice raspona „ekvivalentne

bioraspoloživosti“). Alternativno, moglo bi se pretpostaviti da „remetilački“ set ne snizuje, već povisuje koncentraciju lamotrigina, te da, pukim slučajem, postoji neravnoteža u prevalenciji na način da je puno češći među kontroloma „divljeg tipa“, tj. da opaženi $GMR=0.75$ nije posljedica efekta varijantnog alela koji snizuje koncentraciju lamotrigina, već da je posljedica veće prevalencije „remetilačkih“ faktora koji je povisuju među kontroloma „divljeg tipa“. Primjerice, da je ukupna prevalencija od 10% ($n=32$), „raspoređena“ tako da je taj set varijabli prisutan u 2/72 (2.7%) nositelja varijantnog alela i u 30/251 (12.0%) kontrola „divljeg tipa“ (omjer 1:4). Uz pretpostavku da taj „remetilački“ set ima jak efekt na lamotrigin iskazan kao $GMR=1.43$ (povisuje koncentraciju za 43%, što je recipročno od $GMR=0.70$), korigirani opaženi efekt $GMR=0.75$ iznosio bi 0.78, tj. još uvijek bi bio ispod granice „ekvivalentne bioraspoloživosti“. Konačno, mogla bi se pretpostaviti i hipotetska situacija u kojoj u ispitanika s valproatom 0/BLOQ postoji takva neravnoteža „remetilačkih“ faktora da stvara privid efekta varijantnog alela koji snizuje koncentraciju lamotrigina, a u ispitanika s visokim valproatom takva neravnoteža „remetilačkih“ faktora koja stvara privid efekta varijantnog alela koji povisuje koncentraciju lamotrigina. Takva situacija implicira da omjer GMR -ova 1.80 nije posljedica razlika efekata varijantnog alela na dvije razine ekspozicije valproatu, već da je posljedica razlika efekata „remetilačkih“ faktora na dvije razine ekspozicije lamotriginu. Međutim, čak i kad bi ta hipotetska razlika efekata „remetilačkih“ faktora bila doista velika, kao omjer GMR -ova od 2.00, opaženi omjer GMR -ova još uvijek bi iznosio 1.35.

Sveukupno, obzirom na trenutno (ne)znanje o problemu, procjene koje su ovdje okarakterizirane kao efekti varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela izvjesno mogu biti opterećene nekim za sada nepoznatim nemjerenim „remetilačkim“ efektima. Međutim, vjerojatnost takvih efekata je mala, a čak i da su vrlo izraženi, ne bi u potpunosti ili u većini „objasnili“ opaženo. Stoga je opravdano zaključiti da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* ima određeni učinak na bioraspoloživost lamotrigina, na način da činjenica varijantnog alela rezultira nižim ostatnim koncentracijama lamotrigina. Nadalje, izvjesnom se čini i modifikacija tog efekta kada postoji ekspozicija valproatu, na način da se efekt varijantnog alela „izgubi“ (nizak valproat), odnosno da uz visoke razine valproata varijantni alel rezultira većom ekspozicijom lamotriginu.

5.3.4 Polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* modificira učinke valproata na bioraspoloživost lamotrigina

Učinak valproata na sistemsku bioraspoloživost lamotrigina dobro je poznat i u ovom ga istraživanju nije bila namjera (iznova) procjenjivati. No, u kontekstu procjene efekta *ABCG2 c.421C>A* polimorfizma, slika 11 ilustrira kako je izvjesno da istodobno postoje dva efekta – efekt varijantnog alela i efekt valproata. Kada na neki ishod istodobno djeluju dva uzroka, onda je modifikacija mjere efekta (u ovom slučaju GMR) u pravilu „dvosmjerna“. Stoga je, iako to nije izvorno bio cilj, procijenjen efekt valproata na dvije razine *ABCG2 c.421C>A* polimorfizma, tj. u kontrola „divljeg tipa“ i nositelja varijantnog alela.

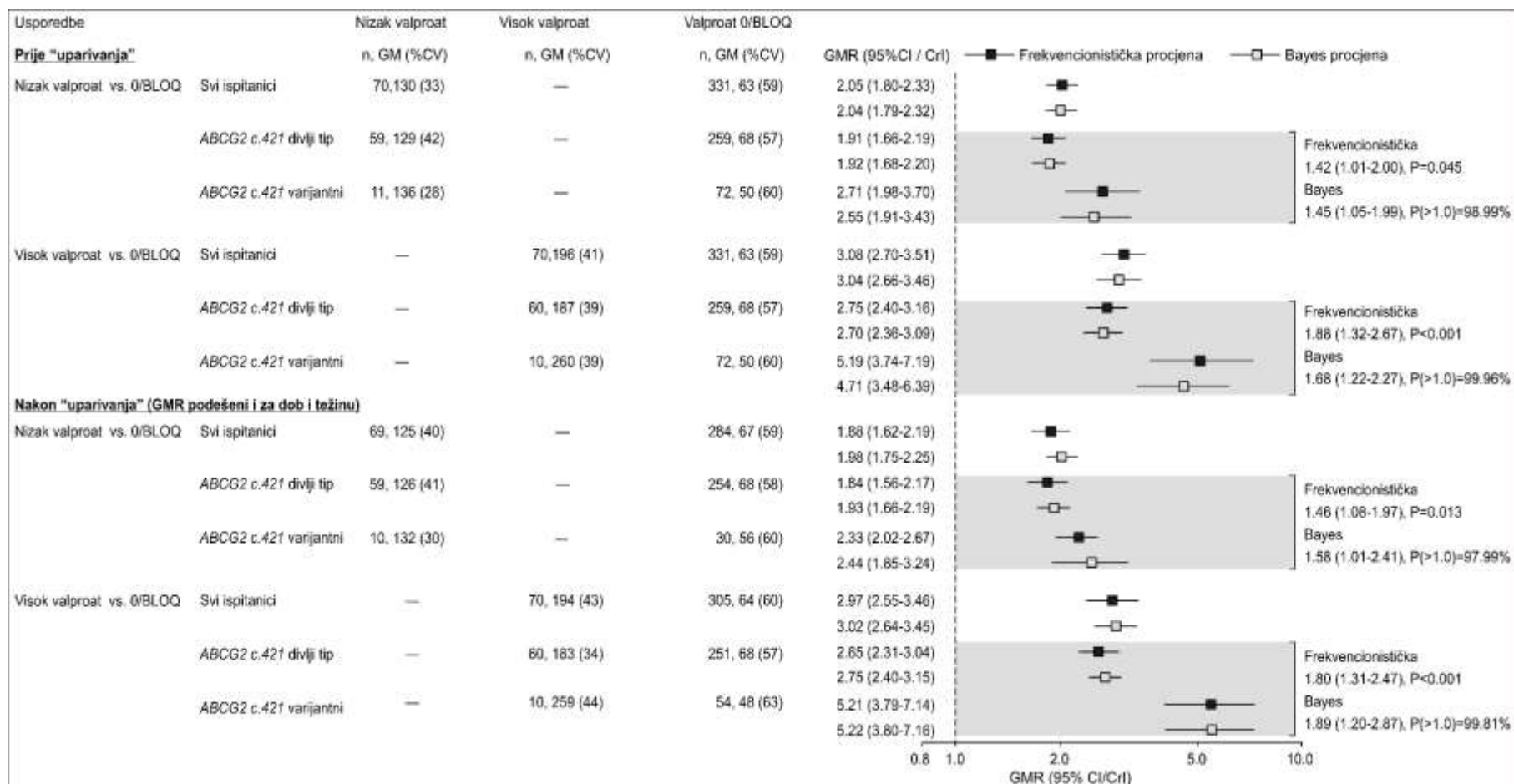
Sveukupno, 70 ispitanika s visokim valproatom i 70 ispitanika s niskim valproatom razlikovali su se numerički od 331 ispitanika s valproatom 0/BLOQ (kontrola) u dobi, spolu, tjelesnoj težini i prevalenciji pojedinih polimorfizama (tablica 9). Isto vrijedi za 60 ispitanika s visokim, 59 s niskim i 259 s valproatom 0/BLOQ koji su bili homozigoti divljeg tipa *ABCG2 c.421C>A*, odnosno za 10 ispitanika s visokim, 11 s niskim i 72 s valproatom 0/BLOQ koji su bili nositelji varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela (tablica 9). U konačnici, u cjelokupnom uzorku, svih 70 ispitanika s visokim valproatom „upareno“ je s 305 (od 331) kontrola (valproat 0/BLOQ), a 69 ispitanika s niskim valproatom „upareno“ je s 284 kontrole, uz manju neravnotežu u dobi i tjelesnoj težini (kontrole su nešto starije i imaju nešto veću tjelesnu težinu) (tablica 9). Među homozigotima divljeg tipa, svih 60 s visokim valproatom „upareno“ je s 251 kontrolom, a 59 onih s niskim valproatom upareno je 254 kontrole (tablica 9), ponovno s manjom neravnotežom u dobi i tjelesnoj težini (tablica 9). Konačno, među nositeljima varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A*, svih 10 s visokim valproatom „upareno“ je s 54 kontrole, a 10 onih s niskim valproatom upareno je s 30 kontrola uz manju neravnotežu dobi i tjelesne težine (tablica 9).

Kako je prikazano na slici 15, i prije i nakon „uparivanja“ (uz dodatno podešenje za dob i tjelesnu težinu), opaženi su blisko slični obrasci: (i) u cjelokupnom uzorku, uz nizak valproat ekspozicija lamotriginu bila je oko dvostruko viša nego bez valproata (valproat 0/BLOQ), a uz visok valproat bila je oko tri puta viša nego bez valproata, odnosno, efekt „visokog valproata“ je bio izraženiji od efekta „niskog valproata“ (očekivano); (ii) efekt „niskog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela nego u homozigota divljeg tipa – omjer GMR oko 1.50 (manje razlike između frekvencionističkih i Bayes procjena (slika 15); (iii) i efekt „visokog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog alela nego u homozigota divljeg tipa – omjer GMR oko 1.80 (slika 15).

Tablica 9. Svojstva ispitanika prema razini ekspozicije valproatu (VAL) (0/BLOQ¹ [kontrolna razina], nizak ili visok) prije i nakon „uparivanja“ za sve ispitanike, te za nositelje varijantnog alela i kontrole divljeg tipa *ABCG2 c.421C>A*. Podatci su brojevi (postotci) i srednje vrijednosti±SD.

<i>Svi ispitanici</i>	Prije „uparivanja“			Nakon „uparivanja“: Visok VAL vs. 0/BLOQ i Nizak VAL vs. 0/BLOQ					
	Visok VAL	Nizak VAL	0/BLOQ	Visok VAL	0/BLOQ	D	Nizak VAL	0/BLOQ	d
N	70	70	331	70	305	---	69	284	---
Udio muških	33 (47.1)	39 (55.7)	116 (35.1)	25.6 (36.5)	111.4 (36.5)	0.000	29.1 (42.2)	119.9 (42.2)	0.000
Dob (godine)	34±13	36±13	41±15	37±13	41±15	-0.299	37±13	41±15	-0.238
Tjelesna težina (kg)	72±17	76±16	75±17	71±15	75±17	-0.254	74±15	77±18	-0.163
<i>ABCG2</i> divlji tip	60 (85.7)	59 (84.3)	259 (78.2)	58.1 (82.9)	252.9 (82.9)	0.000	61.2 (88.7)	251.8 (88.7)	0.000
<i>ABCG2</i> varijantni alel	10 (14.3)	11 (15.7)	67 (20.2)	11.9 (17.1)	52.1 (17.1)	0.000	7.8 (11.3)	32.2 (11.3)	0.000
<i>ABCB1</i> divlji tip	20 (28.6)	30 (42.9)	109 (32.9)	20.5 (29.3)	89.5 (29.3)	0.000	24.2 (35.1)	99.8 (35.1)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	40 (71.4)	40 (57.1)	222 (67.1)	49.5 (70.7)	215.5 (70.7)	0.000	44.8 (64.9)	184.2 (64.9)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	26 (37.1)	18 (25.7)	75 (22.7)	16.6 (23.7)	72.4 (23.7)	0.000	24.2 (21.5)	61.1 (21.5)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	44 (62.9)	52 (74.3)	256 (77.3)	53.4 (76.3)	232.6 (76.3)	0.000	44.8 (78.5)	222.9 (78.5)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	55 (789.6)	55 (78.6)	255 (77.0)	56.4 (80.5)	245.6 (80.5)	0.000	14.9 (81.9)	232.5 (81.9)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	15 (21.4)	15 (21.4)	76 (23.0)	13.6 (19.5)	59.4 (19.5)	0.000	54.1 (18.1)	51.5 (18.1)	0.000
<i>ABCG2 c.421C>A</i> divlji tip									
N	60	59	259	60	251	---	59	254	---
Udio muških	30 (50.0)	32 (54.2)	93 (35.9)	23.2 (38.6)	96.8 (38.6)	0.000	23.6 (39.9)	101.3 (39.9)	0.000
Dob (godine)	34±13	37±14	41±15	36±12	41±15	-0.306	38±13	41±15	-0.223
Tjelesna težina (kg)	73±18	75±15	75±17	72±16	75±17	-0.202	73±15	76±18	-0.151
<i>ABCB1</i> divlji tip	16 (26.7)	24 (40.7)	78 (30.1)	16.6 (27.7)	69.4 (27.7)	0.000	18.3 (31.0)	78.7 (31.0)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	44 (73.3)	35 (59.3)	181 (69.9)	43.4 (72.3)	181.6 (72.3)	0.000	40.7 (69.0)	175.3 (69.0)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	24 (40.0)	16 (27.1)	63 (24.3)	15.6 (26.1)	65.4 (26.1)	0.000	13.9 (23.6)	60.1 (23.6)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	36 (60.0)	43 (72.9)	196 (75.7)	44.4 (73.9)	185.6 (73.9)	0.000	45.1 (76.4)	193.9 (76.4)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	47 (78.3)	46 (78.0)	207 (79.9)	49.0 (81.7)	205.0 (81.7)	0.000	47.7 (80.8)	205.3 (80.8)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	13 (21.7)	13 (22.0)	52 (20.1)	11.0 (18.3)	46.0 (18.3)	0.000	11.3 (19.2)	48.7 (19.2)	0.000
<i>ABCG2 c.421C>A</i> varijantni									
N	10	11	72	10	54	---	10	30	---
Udio muških	3 (30.0)	7 (63.6)	23 (31.9)	2.7 (26.6)	14.3 (26.6)	0.000	6 (60.0)	18 (60.0)	0.000
Dob (godine)	36±18	33±9	41±14	38±18	42±15	-0.264	35±11	41±15	-0.409
Tjelesna težina (kg)	71±13	82±19	75±18	68±12	75±17	-0.489	79±19	84±18	-0.268
<i>ABCB1</i> divlji tip	4 (40.0)	6 (54.5)	31 (43.1)	3.8 (37.5)	20.3 (37.5)	0.000	6.7 (67.5)	20.2 (67.5)	0.000
<i>ABCB1</i> varijantni alel	6 (60.0)	5 (45.5)	41 (56.9)	6.2 (62.5)	33.7 (62.5)	0.000	3.3 (32.5)	9.8 (32.5)	0.000
<i>UGT2B7</i> divlji tip	2 (20.0)	2 (18.2)	12 (16.7)	1.3 (12.5)	6.8 (12.5)	0.000	0.5 (5.0)	1.5 (5.0)	0.000
<i>UGT2B7</i> varijantni alel	8 (80.0)	9 (81.8)	60 (83.3)	8.7 (87.5)	47.2 (87.5)	0.000	9.5 (95.0)	28.5 (95.0)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> divlji tip	8 (80.0)	9 (81.8)	48 (66.7)	7.5 (75.0)	40.5 (75.0)	0.000	9 (90.0)	27 (90.0)	0.000
<i>UGT1A4*3</i> varijantni alel	2 (20.0)	2 (18.2)	24 (33.3)	2.5 (25.0)	13.5 (25.0)	0.000	1 (10.0)	3 (10.0)	0.000

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)



Slika 15. Polimorfizam *ABCG2* c.421C>A modificira efekt valproata na ekspoziciju lamotriginu. Prikazani su (prije i nakon „uparivanja“) (i) broj ispitanika (n), geometrijske srednje vrijednosti ishoda (GM) s koeficijentom varijabilnosti (%CV) i (ii) efekti [omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR)] niske i visoke ekspozicije valproatu (kao usporedba s kontrolnom ekspozicijom 0/ispod granice kvantifikacije [BLOQ]) za sve ispitanike i posebno za homozigote divljeg tipa i nositelje varijantnog alela. Naznačene su razlike efekata valproata (kao omjeri GMR) u nositelja varijantnog alela i homozigota divljeg tipa, s frekvencionističkim P-vrijednostima i Bayes vjerojatnostima (P).

Svi isti potencijalni (hipotetski) „remetilački“ efekti koji su razmatrani vezano za procjene efekta varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela aktualni su i u slučaju procjene efekata ostatnih koncentracija valproata – međutim, ovdje je u fokusu modifikacija efekta valproata *ABCG2* polimorfizmom, tj. razlike efekata valproata u nositelja varijantnog alela i homozigota divljeg tipa. Stoga su u tablici 10 prikazane E-vrijednosti, odnosno veličine „remetilačkih“ efekata iskazane kao omjer GMR koje bi bile potrebne da opažene razlike efekata valproata (tj. omjere GMR-ova) „gurnu“ na razinu 1.25 (gornja granica ekvivalentne bioraspodjelivosti). Za razliku efekta (omjer GMR) niskog valproata u nositelja varijantnog alela naspram efekta u homozigota divljeg tipa, „remetilački“ faktori bi morali generirati omjer GMR od 1.61 odnosno 1.84 kako bi opažene omjere (frekvencionističke i Bayes) „gurnuli“ na razinu 1.25. Za razliku efekta visokog valproata u nositelja varijantnog alela naspram efekta u homozigota divljeg tipa „remetilački“ efekti bi morali biti i još veći, tj. 2.24, odnosno 2.39 (tablica 10).

Stoga, malo je vjerojatno da bi se opažena modifikacija efekta valproata pripisana polimorfizmu *ABCG2 c.421C>A* mogla u cijelosti ili većim dijelom objasniti učincima nekih nemjerenih „remetilačkih“ faktora.

Tablica 10. Osjetljivost na ostatni (nemjereni) *confounding* modificirajućeg učinka polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* na efekte valproata. Prikazane su opažene razlike efekata valproata (kao omjeri omjera geometrijskih srednjih vrijednosti [GMR]) u nositelja varijantnog alela i homozigota divljeg tipa, te iznos omjera GMR koje bi morali generirati nemjereni „remetilački“ faktori kako bi opažene omjere „gurnuli“ na razinu 1.25.

	Opazeni omjer GMR	Potreban „remetilački“ efekt
Efekt niskog valproata (vs. 0/BLOQ ¹)		
Frekvencionistička procjena razlike efekta	1.46	1.61
Bayes procjena razlike efekta	1.58	1.84
Efekt visokog valproata (vs. 0/BLOQ ¹)		
Frekvencionistička procjena razlike efekta	1.80	2.24
Bayes procjena razlike efekta	1.89	2.39

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)

5.4. Polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* i bioraspoloživost lamotrigina

Evaluacija ova dva polimorfizma u odnosu na bioraspoloživost lamotrigina prikazana je u jednom poglavlju jer je ustroj DAG-ova isti samo polimorfizmi izmjenjuju „uloge“: ako se *UGT2B7 c.-161C>T* „tretira“ kao uzrok, onda je *UGT1A4*3 c.142T>G* potencijalni „remetilački“ faktor i obrnuto.

5.4.1. Ispitanici

UGT2B7 c.-161C>T. Ukupno je uključeno 119 homozigota divljeg tipa, 237 heterozigota i 115 varijantnih homozigota (tablica 11). Ispitanici u te tri skupine međusobno su se tek blago razlikovali u vrijednostima mjerenih kovarijata (prije ujednačavanja) - najveća standardizirana razlika odnosila se na dob, a bila je u rangu „gotovo nevažnih“ iznosa, $d=0.210$ (tablica 11). Obzirom da je „ekspozicija“ (instrument, odnosno „tretman“) imao 3 razine [homozigoti divljeg tipa (kontrola), heterozigoti (tretirani) i varijantni homozigoti (tretirani)], te obzirom na znatno preklapanje vrijednosti svih kovarijata u tri skupine i razmjerno visok broj ispitanika s pojedinim genotipom, za „ujednačavanje“ vrijednosti kovarijata korišteno je uravnoteživanje entropije – tim je postupkom ostvarena idealna podudarnost (sve vrijednosti $d=0.000$) triju skupina i za analizu su „zadržani“ svi uključeni ispitanici (tablica 11).

Iz istih razloga, te zbog činjenice da je samo 9/115 varijantnih homozigota imalo „visoke“ ostatne koncentracije valproata, ispitanici nisu kategorizirani na tri razine valproata, već na dvije (valproat 0/BLOQ ili >0/BLOQ) kako bi se tri skupine „tretmana“ ujednačile na razini bez izloženosti valproatu i uz izloženost (mjerljivim koncentracijama) valproatu u svrhu evaluacije moguće modifikacije efekta polimorfizma valproatom. Pri tome, za skupinu ispitanika s valproatom >0/BLOQ, među kovarijate za „ujednačavanje“ uvrštene su i izmjerne koncentracije valproata (tj. njihovi logaritmi) (tablica 12). I ovdje su prije „ujednačavanje“ postojale male razlike između ispitanika pojedinih genotipova (sve $d < 0.300$), s izuzetkom ostatne koncentracije valproata ($d=0.665$). Međutim, postupak uravnotežavanja entropije omogućio je idealnu „ujednačenost“ za iznose svih kovarijata (sve maksimalne d vrijednosti $=0.000$) (tablica 12).

Tablica 11. Svojstva ispitanika (mjerene kovarijate) prema genotipu – homozigoti divljeg tipa (kontrola), heterozigoti ili varijantni homozigoti (tretirani) - za polimorfizam *UGT2B7 c.-161C>T* prije i nakon „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata (uravnoteživanje entropije). Podatci su brojevi (postotci) ili srednja vrijednost±standardna devijacija. Prikazane su standardizirane razlike između genotipova (d). Maks d – najveća standardizirana razlika između neka dva genotipa.

	Prije „ujednačavanja“				Nakon „ujednačavanja“			
	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d
N	119	237	115	---	119	237	115	---
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>								
Žene	74 (62.2)	139 (58.6)	70 (60.9)	0.034	71.5 (60.1)	142.4 (60.1)	69.1 (60.1)	0.000
Muškarci	45 (37.8)	98 (41.4)	45 (39.1)	0.034	47.5 (39.9)	94.6 (39.9)	45.9 (39.9)	0.000
Dob (godine)	40±15	38±15	40±13	0.210	39±15	39±15	39±13	0.000
Tjelesna težina (kg)	74±16	76±17	75±18	0.122	75±17	75±17	75±18	0.000
<i>Ekspozicija valproatu (VAL)</i>								
VAL 0/BLOQ ¹	75 (63.0)	169 (71.3)	87 (75.7)	0.126	83.6 (70.2)	166.5 (70.2)	80.8 (70.2)	0.000
VAL nizak (0<364 µmol/L)	18 (15.1)	33 (13.9)	19 (16.5)	0.026	17.7 (14.9)	35.2 (14.9)	17.1 (14.9)	0.000
VAL visok (≥364 µmol/L)	26 (21.9)	35 (14.8)	9 (7.8)	0.140	17.7 (14.9)	35.2 (14.9)	17.1 (14.9)	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	90 (75.6)	194 (81.8)	81 (70.4)	0.114	92.2 (77.5)	183.7 (77.5)	89.1 (77.5)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	29 (24.4)	43 (18.2)	34 (29.6)	0.114	26.8 (22.5)	53.3 (22.5)	25.9 (22.5)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	103 (86.6)	186 (78.5)	89 (77.4)	0.092	95.5 (80.3)	190.2 (80.3)	92.3 (80.3)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	16 (13.4)	51 (21.5)	26 (22.6)	0.092	23.5 (19.7)	46.8 (19.7)	22.7 (19.7)	0.000
<i>ABCB1 1236 C>T</i>								
CC (divlji tip)	32 (26.9)	81 (34.2)	46 (40.0)	0.131	40.2 (33.8)	80.0 (33.8)	38.8 (33.8)	0.000
CT	66 (55.5)	103 (43.5)	50 (43.5)	0.120	55.3 (46.5)	110.2 (46.5)	53.5 (46.5)	0.000
TT	21 (17.6)	53 (22.4)	19 (16.5)	0.058	23.5 (19.7)	46.8 (19.7)	22.7 (19.7)	0.000

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)

Tablica 12. Svojstva ispitanika prema genotipu za polimorfizam *UGT2B7 c.-161C>T* prije i nakon „ujednačavanja“ kovarijata na dvije razine izloženosti valproatu (0/ispod razine kvantifikacije, BLOQ) ili >0/BLOQ. Podatci su brojevi (postotci) ili srednja vrijednost±standardna devijacija. Prikazane su standardizirane razlike između genotipova (d). Maks d –najveća standardizirana razlika između neka dva genotipa

	Prije „ujednačavanja“				Nakon „ujednačavanja“			
	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d
Valproat 0/BLOQ								
N	75	169	87	---	75	169	87	---
Muškarci	26 (34.7)	61 (36.1)	29 (33.3)	0.028	26.3 (35.0)	59.2 (35.0)	30.5 (35.0)	0.000
Dob (godine)	43±16	40±15	41±13	0.187	41±15	41±15	41±13	0.000
Tjelesna težina (kg)	74±17	77±17	74±18	0.178	75±17	75±17	75±19	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	56 (74.7)	136 (80.5)	63 (72.4)	0.081	57.8 (77.0)	130.2 (77.0)	67.0 (77.0)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	19 (25.3)	33 (19.5)	24 (27.6)	0.081	12.2 (23.0)	38.8 (23.0)	20.0 (23.0)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	63 (84.0)	130 (76.9)	66 (75.9)	0.081	58.7 (78.2)	132.2 (78.2)	68.1 (78.2)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	12 (16.0)	39 (23.1)	21 (24.1)	0.081	16.3 (21.7)	36.7 (21.8)	18.9 (21.8)	0.000
<i>ABCB1 1236 C>T</i>								
CC (divlji tip)	22 (29.3)	52 (30.8)	35 (40.2)	0.109	24.7 (32.9)	55.6 (32.9)	28.6 (32.9)	0.000
CT ili TT (varijantni alel)	53 (70.7)	117 (69.2)	52 (59.8)	0.109	50.3 (67.1)	113.3 (67.1)	58.4 (67.1)	0.000
Valproat >0/BLOQ								
N	44	68	28	---	44	68	28	---
Muškarci	19 (43.2)	37 (54.4)	16 (57.1)	0.140	22.6 (51.4)	35.0 (51.4)	14.4 (51.4)	0.000
Dob (godine)	36±13	35±15	35±10	0.094	35±13	35±15	35±11	0.000
Tjelesna težina (kg)	73±16	73±17	78±17	0.287	74±14	74±18	74±16	0.000
Valproat (ln) (μmol/L)	5.92±0.39	5.85±0.44	5.61±0.56	0.665	5.83±0.42	5.83±0.48	5.83±0.55	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	34 (77.3)	58 (85.3)	18 (64.3)	0.210	34.6 (78.6)	53.4 (78.6)	22.0 (78.6)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	10 (22.7)	10 (14.7)	10 (35.7)	0.210	9.4 (21.4)	14.6 (21.4)	6.0 (21.4)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	40 (90.9)	56 (82.3)	23 (82.1)	0.088	37.4 (85.00)	57.8 (85.0)	23.8 (85.0)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	4 (9.1)	12 (17.7)	5 (17.9)	0.088	6.6 (15.0)	10.2 (15.0)	4.2 (15.0)	0.000
<i>ABCB1 1236 C>T</i>								
CC (divlji tip)	10 (22.7)	29 (42.7)	11 (39.3)	0.199	15.7 (35.7)	24.3 (35.7)	10.0 (35.7)	0.000
CT ili TT (varijantni alel)	34 (77.3)	39 (57.3)	28 (60.7)	0.199	28.3 (64.3)	43.7 (64.3)	18.0 (64.3)	0.000

UGT1A4*3 c.142T>G. Ukupno je uključeno 365 homozigota divljeg tipa (kontrola) te 102 heterozigota i 4 varijantna homozigota – tj. ukupno 106 nositelja varijantnog alela (tretirani) (tablica 13). Prije „ujednačavanja“ vrijednosti mjerenih kovarijata, razlike između skupina bile su male – najveća standardizirana razlika odnosila se na tjelesnu težinu, a bila je u rangu „malih-umjerenih“ razlika, $d=0.273$ (tablica 13). Uravnoteživanjem entropije, postignuta je idealna ujednačenost između nositelja varijantnog alela i kontrola divljeg tipa (tablica 13). Od ukupno 331 ispitanika s valproatom 0/BLOQ, 76 su bili nositelji varijantnog alela, a 255 kontrola divljeg tipa (tablica 13), dok je među 140 ispitanika s valproatom >0/BLOQ bilo 30 nositelja varijantnog alela i 110 kontrola divljeg tipa (tablica 13): manje razlike mjerenih kovarijata idealno su „ujednačene“ na obje razine ekspozicije valproatu (tablica 13).

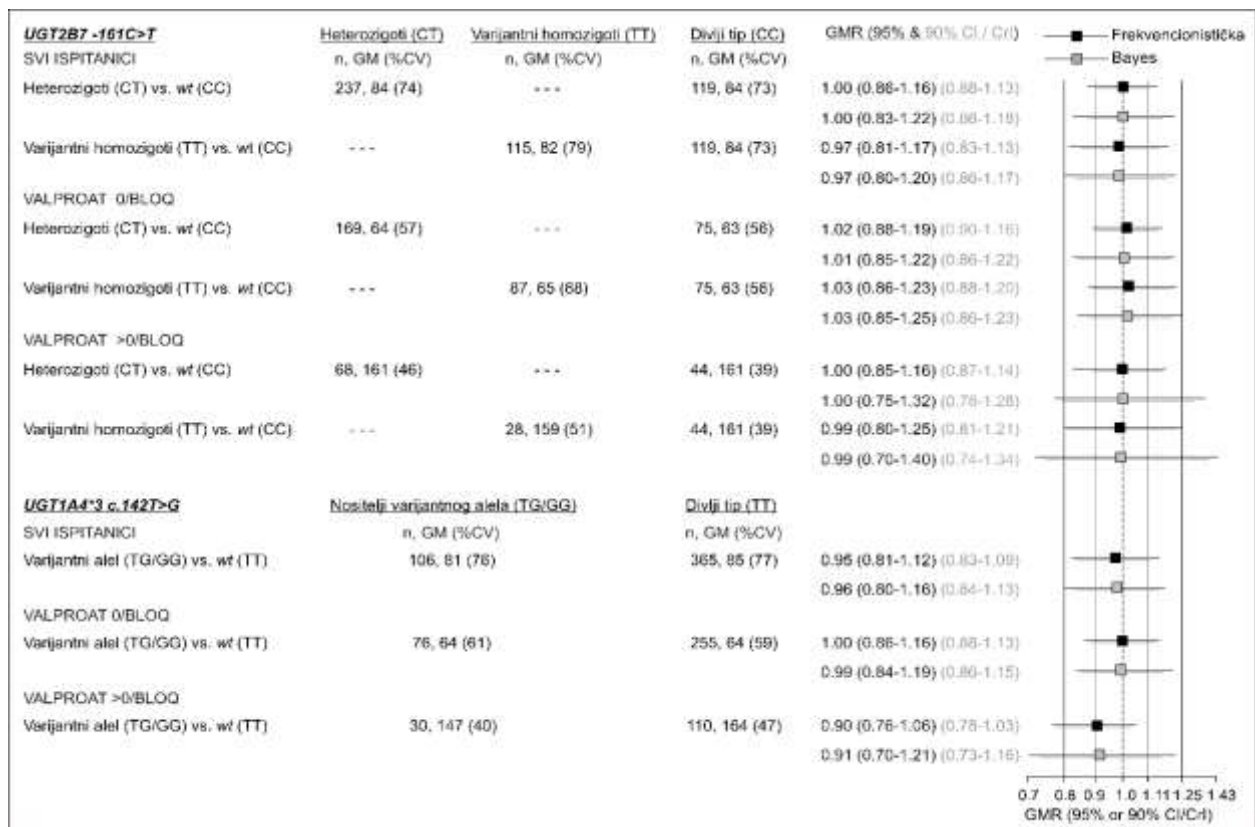
5.4.2. Polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* nemaju učinka na bioraspoloživost lamotrigina

Kako je detaljnije prikazano u odsječku 5.3.3., oba su ova polimorfizma u potpunom LD s nizom drugih polimorfizama i čine veći broj haplotipova: a) genotipovi na ovim lokusima zapravo „predstavljaju“ kompleksniji genski ustroj koji se razlikuje između homozigota divljeg tipa, heterozigota i varijantnih homozigota; b) bez genotipizicija čitavog niza polimorfizama u *UGT2B7* i *UGT1A4* genima praktično je nemoguće „izolirati“ potencijalne efekta upravo ovih polimorfizama – ali za to bi trebalo više tisuća ili desetina tisuća ispitanika. Posljedično, u ovom su istraživanju zapravo procijenjeni učinci tih „kompleksnijih genskih ustroja“ koje reprezentiraju genotipovi na ova dva lokusa.

Kako je prikazano na slici 16, sveukupno i na različitim razinama ekspozicije valproatu, bioraspoloživost lamotrigina bila je blisko slična u heterozigota/varijantnih homozigota ili pak homozigota divljeg tipa za svaki od ova dva polimorfizma: a) svi omjeri bili su u rasponu GMR 0.90-1.11 (raspon u koji tipično „padaju“ točke procjene [*point estimates*] kada se radi o ekvivalentnoj bioraspoloživosti); b) 95% granice pouzdanosti, a posebno 90% granice pouzdanosti (koje se tipično evaluiraju u konceptu bioraspoloživosti) bile su u pravilu unutar raspona 0.80-1.25 (što su konvencionalne granice ekvivalentne bioraspoloživosti). „Protezale“ su se izvan tih okvira samo za neke Bayes procjene (koje su konzervativnije od frekvencionističkih) i kada se radilo o manjim podskupinama ispitanika (ukazujući na određenu nepreciznost uslijed znatne varijabilnosti). Ukupno, nema naznaka da genski ustroji koje evaluirani polimorfizmi „reprezentiraju“ imaju neki relevantan učinak na bioraspoloživost lamotrigina.

Tablica 13. Svojstva ispitanika prema genotipu za polimorfizam *UGT1A4**3 c.142T>G prije i nakon „ujednačavanja“ kovarijata – ukupno, te na dvije razine izloženosti valproatu (0/ispod razine kvantifikacije, BLOQ) ili >0/BLOQ. Podatci su brojevi (postotci) ili srednja vrijednost±standardna devijacija. Prikazane su standardizirane razlike između genotipova (d).

	Prije „ujednačavanja“			Nakon „ujednačavanja“		
	TG/GG	Kontrole TT	D	TG/GG	Kontrole TT	D
Svi						
N	106	365	---	106	365	---
<i>Kovarijate</i>						
<i>Žene</i>						
Muškarci	35 (33.0)	153 (41.9)	0.089	42.3 (39.9)	145.7 (39.9)	0.000
Dob (godine)	39±14	39±15	-0.049	39±15	39±15	0.000
Tjelesna težina (kg)	71±16	76±17	0.273	75±18	75±17	0.000
<i>Ekspozicija valproatu (VAL)</i>						
VAL 0/BLOQ ¹	76 (71.7)	255 (69.8)	-0.018	74.4 (70.2)	256.4 (70.2)	0.000
VAL nizak (0<364 µmol/L)	15 (14.1)	55 (15.1)	0.009	15.8 (14.9)	54.3 (14.9)	0.000
VAL visok (≥364 µmol/L)	15 (14.1)	55 (15.1)	0.009	15.8 (14.9)	54.3 (14.9)	0.000
<i>UGT2B7 -161 C>T</i>						
CC (divlji tip)	29 (27.4)	90 (24.7)	-0.027	26.8 (25.3)	92.2 (25.3)	0.000
CT	43 (40.6)	194 (53.1)	0.126	53.3 (50.3)	183.7 (50.3)	0.000
TT	34 (32.1)	81 (22.2)	-0.099	25.9 (24.4)	89.1 (24.4)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>						
CC (divlji tip)	78 (73.6)	300 (82.2)	0.086	85.1 (80.3)	292.9 (80.3)	0.000
CA ili AA	28 (26.4)	65 (18.8)	-0.086	20.9 (19.7)	72.1 (19.7)	0.000
<i>ABCB1 1236 C>T</i>						
CC (divlji tip)	30 (28.3)	129 (35.3)	0.070	35.8 (33.8)	123.2 (33.8)	0.000
CT	60 (56.6)	159 (43.6)	-0.130	49.3 (46.5)	169.7 (46.5)	0.000
TT	16 (15.1)	77 (21.1)	0.060	20.9 (19.7)	72.1 (19.7)	0.000
Valproat 0/BLOQ						
N	76	255	---	76	255	---
Muškarci	20 (26.3)	96 (37.7)	-0.245	26.6 (35.0)	89.4 (35.0)	0.000
Dob (godine)	40±14	41±15	-0.031	41±15	41±15	0.000
Tjelesna težina (kg)	71±16	76±18	-0.307	75±19	75±18	0.000
<i>UG2B7 -161 CC (divlji tip)</i>						
<i>UG2B7 -161 CT/TT</i>	57 (75.0)	199 (78.0)	-0.072	58.8 (77.3)	197.2 (77.3)	0.000
<i>ABCG2 c.421 CC (divlji tip)</i>						
<i>ABCG2 c.421 CA/AA</i>	24 (41.6)	48 (18.8)	0.297	16.5 (21.7)	55.5 (21.7)	0.000
<i>ABCB1 1236 CC (divlji tip)</i>						
<i>ABCB1 1236 CT/TT</i>	52 (68.2)	170 (66.7)	0.037	51.0 (67.1)	171.0 (67.1)	0.000
Valproat >0/BLOQ						
N	30	110	---	30	110	---
Muškarci	15 (50)	57 (51.8)	-0.036	15.4 (51.4)	56.6 (51.4)	0.000
Dob (godine)	34±13	36±13	-0.128	35±14	35±13	0.000
Tjelesna težina (kg)	72±17	75±16	-0.181	74±16	74±16	0.000
Valproat (ln) (µmol/L)	5.81±0.53	5.83±0.45	-0.035	5.83±0.51	5.83±0.44	0.000
<i>UG2B7 -161 CC (divlji tip)</i>	10 (33.3)	34 (30.9)	0.051	9.4 (31.4)	24.6 (31.4)	0.000
<i>UG2B7 -161 CT/TT</i>	20 (66.7)	76 (69.1)	-0.051	20.6 (68.6)	75.4 (68.6)	0.000
<i>ABCG2 c.421 CC (divlji tip)</i>	26 (86.7)	93 (84.5)	0.060	25.5 (85.0)	93.5 (85.0)	0.000
<i>ABCG2 c.421 CA/AA</i>	4 (13.3)	17 (15.5)	-0.060	4.5 (15.0)	16.5 (15.0)	0.000
<i>ABCB1 1236 CC (divlji tip)</i>	6 (20.0)	44 (40.0)	-0.447	10.7 (35.7)	39.3 (35.7)	0.000
<i>ABCB1 1236 CT/TT</i>	24 (80.0)	66 (60.0)	0.447	19.3 (64.3)	70.7 (64.3)	0.000



Slika 16. Polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* i bioraspoloživost lamotrigina. Prikazane su vrijednosti nakon „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata (uravnoteženjem entropije – svi ispitanici su uključeni u analizu): i) broj ispitanika po podskupinama prema genotipu (n), geometrijske srednje vrijednosti koncentracija lamotrigina/100 mg doze (GM) i geometrijski koeficijent varijacije (%CV); ii) razlike između heterozigota/varijantnih homozigota („tretirani“) i homozigota divlje tipa (wt, kontrole) kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR) s granicama pouzdanosti procjene (CI, CrI). Uz 95% granice, naznačene su i (sivim) 90% granice pouzdanosti oko procjena budući da se 90% granice standardno evaluiraju u konceptu ekvivalentne bioraspoloživosti. Sive okomite crte naznačuju vrijednosti GMR 0.90 i 1.11 – u taj raspon tipično „padaju“ vrijednosti GMR za ekspozicije s ekvivalentnom bioraspoloživostu. Crne okomite crte naznačuju vrijednosti GMR 0.80 i 1.25 – konvencionalne granice ekvivalentne bioraspoloživosti (za 90% granice pouzdanosti oko procjene).

5.4.3. Osjetljivost na nemjereni confounding

DAG-ovi na slici 13 i na slici 14 (vezano za polimorfizam *ABCG2 c.421C>A*) prikazuju sve mjerene (i kontrolirane) i nemjerene potencijalne „remetilačke“ faktore u ovom istraživanju. U odnosu na polimorfizme *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* jedino što bi u tim DAG-ovima bilo drugačije nego na slici 13 i slici 14 jest „uloga“ pojedinih naznačenih čimbenika: *UGT2B7* odnosno *UGT1A4* polimorfizmi bili bi instrumenti (s tri odnosno dvije razine) a aktivnost *UGT2B7* odnosno *UGT1A4* enzima bio bi „stvarni tretman“. Svi ostali naznačeni elementi bili bi „remetilački“ faktori (*confounder*i ili preteče tretmana ili ishoda). Stoga, izvori nemjerenog (ostatnog) *confounding*a („remetilačkih“ efekata) isti su u evaluaciji polimorfizama *UGT2B7 / UGT1A4* kao i u evaluaciji polimorfizma *ABCG2*. Kako nema naznaka da bi ti polimorfizmi bili povezani s ostatnim koncentracijama lamotrigina/100 mg doze (slika 16), E-vrijednosti kao indikatori osjetljivosti na nemjerene „remetilačke“ efekt nemaju smisla.

Za ocjenu osjetljivosti procjena na slici 16 na ostatne „remetilačke“ efekte, prepostavili smo hipotetsku situaciju u kojoj su glavni izvor takvih efekata polimorfizmi *UGT2B7* i *UGT1A4* koji u ovom istraživanju *nisu* određeni, dakle „ostale genske konstelacije“, mimo evaluiranih polimorfizama (i polimorfizama s kojima su u potpunom LD). Prepostavili smo da bi takvi „remetilački“ efekti (kumulativno) mogli „gurati“ opažene GMR-ove ili prema vrijednostima >1.0 ili prema vrijednosti <1.0 , pri čemu bi mogli imati umjeren učinak (kao GMR 1.25 ili, recipročno, GMR 0.80) ili jak učinak (kao GMR 1.43 ili, recipročno, 0.70): GMR-ovi 1.25/0.80 su zapravo standardna gornja i donja granica ekvivalentne ekspozicije, a GMR-ovi 1.43/0.70 su „proširene“ granice koje se primjenjuju za lijekove visoke varijabilnosti, npr. one koje imaju interindividualni %CV od 50%. Takav %CV odgovara inherentnoj varijabilnosti klirensa lamotrigina, nakon podešenja za dob, tjelesnu težinu, istodobnu primjenu induktora UGT enzima i valproata (164). Prema sadašnjim spoznajama, praktično svi polimorfizmi *UGT1A4* s prevalencijom od oko 10-15% („česti“) u potpunom su LD s polimorfizmom *c.142T>G*, a kumulativna prevalencija ostalih polimorfizama može se približno procijeniti na 5-10% (130,131). Slično, svi (poznati) najčešći haplotipovi *UGT2B7* uključuju *c.-161C>T* (125,130), a ukupna prevalencija ostalih haplotipova koji ne uključuju taj polimorfizam je oko 15% (125). Mi smo, konzervativno, prepostavili da je prevalencija takvih „genskih“ ustroja za svaki od dva gena oko 25%, što bi značilo da je vjerojatnost njihove istodobne prisutnosti 6.25% - međutim, držali smo se konzervativne pretpostavke kako je prevalencija dvaju koincidentnih „remetilačkih“ setova 25%, te smo prepostavili da je ta ukupna prevalencija rezultat slučajne znatne neravnoteže između heterozigota / varijantnih homozigota („tretirani“) i kontrola divljeg

tipa u odnosu 2:1 ili 4:1. Stoga smo opažene procjene efekata evaluiranih polimorfizama korigirali za kumulativni „remetilački“ efekt od 1.25 ili 0.80, odnosno 1.43 ili 0.70, uz pretpostavljenu ukupnu prevalenciju od 25%, ali s neravnotežom 2:1 ili 4:1.

Varijantni aleli *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* rezultiraju izmijenjenom aktivnošću enzima *in vitro*. U ljudi, neke studije (ali ne sve!) naznačile su da bi heterozigoti/homozigiti *UGT2B7 c.-161C>T* mogli imati nešto više koncentracije lamotrigina od kontrola divljeg tipa, a u slučaju *UGT1A4*3 c.142T>G* bi mogli imati nešto niže koncentracije (24,47,121,129,165).

Za *UGT2B7 c.-161C>T* pretpostavili smo: genotipovi CT ili TT povisuju ostatne koncentracije lamotrigina (u odnosu na CC), a izostanak efekta na slici 16 posljedica je činjenice da su ih ostatni „remetilački“ faktori, znatno prevalentniji među CT ili TT ispitanicima nego među CC ispitanicima, „pogurali“ prema nižim vrijednostima, pa su GMR-ovi oko 1.00 posljedica tih „remetilačkih“ efekata, a ne izostanka efekta polimorfizma (odnosno, efekti polimorfizama postoje, ali su ih neutralizirali „remetilački“ efekti).

Za *UGT1A4*3 c.142* pretpostavili smo: genotipovi TG ili GG snizuju koncentracije lamotrigina (u odnosu na TT), a izostanak efekta na slici 16 posljedica je činjenice su ih ostatni „remetilački“ faktori, znatno prevalentniji među TG/GG ispitanicima nego među TT ispitanicima, „pogurali“ prema višim vrijednostima, pa su GMR-ovi oko 1.00 posljedica tih „remetilačkih“ efekata, a ne izostanka efekta polimorfizma (odnosno, efekti polimorfizama postoje, ali su ih neutralizirali „remetilački“ efekti).

Kako je prikazano u tablici 14, za *UGT2B7 -161* svi korigirani efekti TC i TT genotipova (GMR-ovi vs. CC) - i uz najveći disbalans prevalencije „remetilačkih“ faktora i uz njihov jak efekt – još uvijek su unutar raspona 0.90-1.11 u kojeg tipično „padaju“ GMR-ovi tretmana koji daju ekvivalentnu bioraspoloživost.

Za *UGT1A4*3 c.142* korigirani efekti TG/GG genotipova (tj. nositeljstva varijantnog alela (GMR-ovi vs. TT) još uvijek padaju unutar raspona 0.90-1.11. Iznimka je jedino situacija s izrazitim disbalansom „remetilačkih“ faktora od 4:1, tj. 60% vs. 15% uz jak efekt od GMR=1.43 – korigirani GMR iznosi 0.85, no još uvijek je unutar konvencionalnog raspona „ekvivalentne bioraspoloživosti“.

Ukupno, u hipotetskim situacijama s izrazitim ostatnim „remetilačkim“ efektima, korigirani GMR-ovi tek malo odstupaju od procjena na slici 16 što potvrđuje da nema naznaka da su ovi polimorfizmi povezani s bioraspoloživošću lamotrigina u nekom praktično važnom smislu.

Tablica 14. Osjetljivost na nemjereni *confounding* – procjene efekata polimorfizma *UGT2B7 c.-161C>T* i polimorfizma *UGT1A4*3 c.142T>G* (omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti, GMR) uz valproat 0/BLOQ prikazane na slici 16 korigirane su za hipotetske umjerene ili jake efekte ostalih „remetilačkih“ faktora uz pretpostavku izrazitog disbalansa njihove prevalencije između heterozigota/varijantnih homozigota („tretirani“) i kontrola divljeg tipa.

	GMR	Neravnoteža	Remetilački efekt	Korigirani GMR
<i>UGT2B7 -161</i>				
CT (n=169) vs. CC (n=75)	1.02	2:1, 30% : 15%	GMR 0.80 (umjeren)	1.05
		2:1, 30% : 15%	GMR 0.70 (jak)	1.07
		4:1, 32% : 8%	GMR 0.80 (umjeren)	1.07
		4:1, 32% : 8%	GMR 0.70 (jak)	1.09
TT (n=87) vs. CC (n=75)	1.03	2:1, 30% : 15%	GMR 0.80 (umjeren)	1.06
		2:1, 30% : 15%	GMR 0.70 (jak)	1.08
		4:1, 32% : 8%	GMR 0.80 (umjeren)	1.08
		4:1, 32% : 8%	GMR 0.70 (jak)	1.10
<i>UGT1A4*3 c.142</i>				
TG/GG (n=76) vs. CC (n=255)	1.00	2:1, 40% : 20%	GMR 1.25 (umjeren)	0.96
		2:1, 40% : 20%	GMR 1.43 (jak)	0.93
		4:1, 60% : 15%	GMR 1.25 (umjeren)	0.90
		4:1, 60% : 15%	GMR 1.43 (jak)	0.85

5.5. Polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* i bioraspoloživost lamotrigina

5.5.1. Ispitanici

Uključeno je ukupno 159 homozigota divljeg tipa (kontrola), 219 heterozigota („tretirani“) i 93 varijantnih homozigota („tretirani“) koji su se blago razlikovali u mjerenim kovarijatama (tablica 15). „Ujednačavanjem“ kovarijata (uravnoteženjem entropije) postignuta je idealna „ujednačnost“ između te tri skupine (tablica 15): sveukupno, za ispitanike s valproatom 0/BLOQ (109 homozigota divljeg tipa, 156 heterozigota i 66 varijantnih homozigota) i za ispitanike s valproatom >0/BLOQ (dodatno „ujednačavanje“ za koncentraciju valproata (50 homozigota divljeg tipa, 63 heterozigota i 27 varijantnih homozigota) (tablica 16).

5.5.2. Polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* nema učinka na bioraspoloživost lamotrigina

Ovaj polimorfizam je jedan od tri česta polimorfizma *ABCB1* s kojima je u jakom LD (vidi odsječak 5.3.3). U bijelaca, ta su tri polimorfizma – *ABCB1 c.1236C>T*, *c.2677G>T/A* i *c.3435C>T* - daleko najčešća *ABCB1* polimorfizma: u naših ispitanika, frekvencija

Tablica 15. Svojstva ispitanika (mjerene kovarijate) prema genotipu – homozigoti divljeg tipa (kontrola), heterozigoti ili varijantni homozigoti (tretirani) - za polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* prije i nakon „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata (uravnoteživanje entropije). Podatci su brojevi (postotci) ili srednja vrijednost±standardna devijacija. Prikazane su standardizirane razlike između genotipova (d). Maks d – najveća standardizirana razlika između neka dva genotipa.

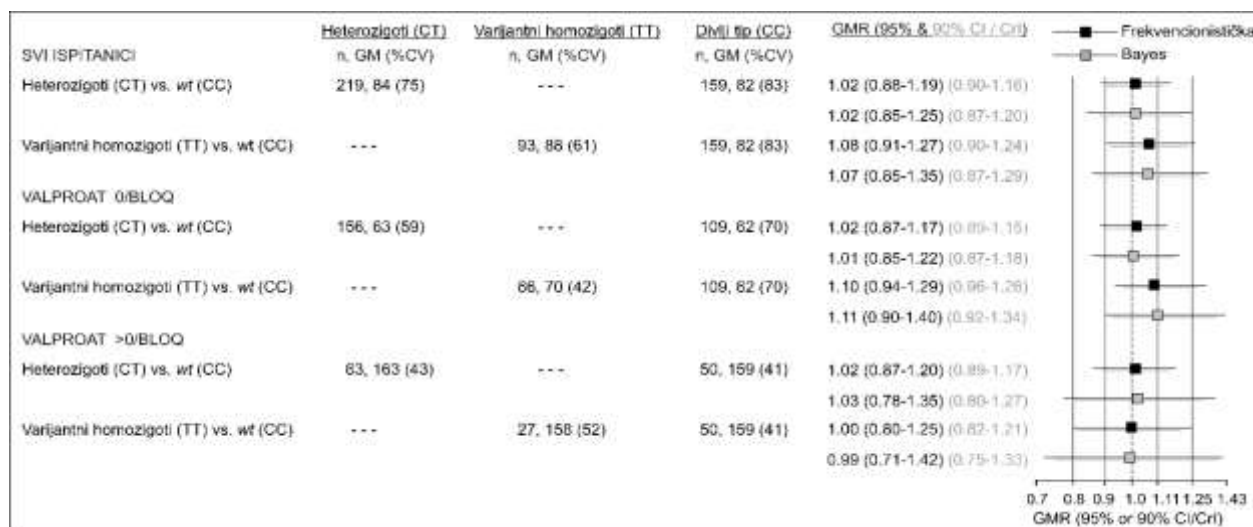
	Prije „ujednačavanja“				Nakon „ujednačavanja“			
	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d
N	159	219	93	---	159	219	93	---
<i>Kovarijate za ujednačavanje</i>								
Žene	97 (61.0)	136 (62.1)	50 (53.8)	0.170	96.5 (60.1)	131.6 (60.1)	55.9 (60.1)	0.000
Muškarci	62 (39.0)	83 (37.9)	43 (46.2)	0.170	63.5 (39.9)	87.4 (39.9)	37.1 (39.9)	0.000
Dob (godine)	37±14	40±15	41±15	0.236	39±15	39±15	39±14	0.000
Tjelesna težina (kg)	74±17	75±17	77±18	0.154	75±17	75±17	75±18	0.000
<i>Ekspozicija valproatu (VAL)</i>								
VAL 0/BLOQ ¹	109 (68.5)	156 (71.2)	66 (71.0)	0.059	111.7 (70.2)	153.9 (70.2)	65.4 (70.2)	0.000
VAL nizak (0<364 µmol/L)	30 (18.9)	25 (11.4)	15 (16.1)	0.207	23.6 (14.9)	32.5 (14.9)	13.8 (14.9)	0.000
VAL visok (≥364 µmol/L)	20 (12.6)	38 (17.4)	12 (12.9)	0.137	23.6 (14.9)	32.5 (14.9)	13.8 (14.9)	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	129 (81.1)	159 (72.6)	77 (82.8)	0.251	123.2 (77.5)	169.7 (77.5)	72.1 (77.5)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	30 (18.9)	60 (27.4)	16 (17.2)	0.251	35.8 (22.5)	49.3 (22.5)	20.9 (22.5)	0.000
<i>UGT2B7 -161C>T</i>								
CC (divlji tip)	32 (20.1)	66 (30.1)	21 (22.6)	0.235	40.2 (25.3)	55.3 (25.3)	23.5 (25.3)	0.000
CT	81 (50.9)	103 (47.0)	53 (57.0)	0.199	80.0 (50.3)	110.2 (50.3)	46.8 (50.3)	0.000
TT	46 (29.0)	50 (22.8)	19 (20.4)	0.199	38.8 (24.4)	53.5 (24.4)	22.7 (24.4)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	118 (74.2)	179 (81.7)	81 (87.1)	0.332	127.6 (80.3)	175.8 (80.3)	74.6 (80.3)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	41 (25.8)	40 (18.3)	12 (12.9)	0.332	31.4 (19.7)	43.2 (19.7)	18.4 (19.7)	0.000

¹Na monoterapiji ili koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (BLOQ)

Tablica 16. Svojstva ispitanika prema genotipu *ABCB1 c.1236C>T* prije i nakon „ujednačavanja“ vrijednosti kovarijata na svakoj od dvije razine ekspozicije valproatu (0/ispod razine kvantifikacije, BLOQ, i >0/BLOQ) (vidi opis tablice 15 za značenje prikazanih brojčanih vrijednosti).

Valproat 0/BLOQ	Prije „ujednačavanja“				Nakon „ujednačavanja“			
	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d	Kontrola CC	Tretirani CT	Tretirani TT	Maks d
N	109	156	66	---	109	156	66	---
Muškarci	38 (34.9)	51 (32.7)	27 (40.9)	0.171	38.2 (35.1)	54.7 (35.1)	23.1 (35.1)	
Dob (godine)	39±13	42±15	42±16	0.191	41±14	41±15	41±15	0.000
Tjelesna težina (kg)	75±18	75±17	77±18	0.137	75±18	75±17	75±18	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	85 (78.0)	115 (73.7)	55 (83.3)	0.235	84.0 (77.0)	120.2 (77.0)	50.8 (77.0)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	24 (22.0)	41 (26.3)	11 (16.7)	0.235	25.0 (23.0)	35.8 (23.0)	15.2 (23.0)	0.000
<i>UGT2B7 -161C>T</i>								
CC (divlji tip)	22 (20.2)	39 (25.0)	14 (21.2)	0.116	24.7 (22.7)	35.3 (22.7)	15.0 (22.7)	0.000
CT	52 (47.7)	77 (49.4)	40 (60.6)	0.260	55.6 (51.0)	79.7 (51.0)	33.7 (51.0)	0.000
TT	35 (32.1)	40 (25.6)	12 (18.2)	0.323	28,7 (26.3)	41.0 (26.3)	17.3 (26.3)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	78 (71.6)	124 (79.5)	57 (86.4)	0.368	85.3 (78.2)	122.1 (78.2)	51.6 (78.2)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	31 (28.4)	32 (20.5)	9 (13.6)	0.368	23.7 (21.8)	33.9 (21.8)	14.4 (21.8)	0.000
Valproat >0/BLOQ								
N	50	63	27	---	50	63	27	---
Muškarci	24 (48.0)	32 (50.8)	16 (59.3)	0.227	25.7 (51.4)	32.4 (51.4)	13.9 (51.4)	0.000
Dob (godine)	33±13	36±13	38±14	0.332	35±15	35±13	35±13	0.000
Tjelesna težina (kg)	73±14	75±17	76±19	0.188	74±13	74±17	74±19	0.000
Valproat (ln) (μmol/L)	5.70±0.51	5.96±0.41	5.76±0.40	0.594	5.83±0.47	5.83±0.45	5.83±0.39	0.000
<i>UGT1A4*3 142 T>G</i>								
TT (divlji tip)	44 (88.0)	44 (69.8)	22 (81.5)	0.460	39.3 (78.6)	49.5 (78.6)	21.2 (78.6)	0.000
TG ili GG (varijantni alel)	6 (12.0)	19 (30.2)	5 (18.5)	0.460	10.7 (21.4)	13.5 (21.4)	5.8 (21.4)	0.000
<i>UGT2B7 -161C>T</i>								
CC (divlji tip)	10 (20.0)	27 (42.8)	7 (25.9)	0.512	15.7 (31.4)	19.8 (31.4)	8.5 (31.4)	0.000
CT	29 (58.0)	26 (41.3)	13 (48.2)	0.338	24.3 (48.6)	30.6 (48.6)	13.1 (48.6)	0.000
TT	11 (22.0)	10 (15.9)	7 (25.9)	0.247	10.0 (20.0)	12.6 (20.0)	5.4 (20.0)	0.000
<i>ABCG2 c.421 C>A</i>								
CC (divlji tip)	40 (80.0)	55 (87.3)	24 (88.9)	0.253	42.5 (85.0)	53.6 (85.0)	23.0 (85.0)	0.000
CA ili AA (varijantni alel)	10 (20.0)	8 (12.7)	3 (11.1)	0.253	7.5 (15.0)	9.4 (15.0)	4.0 (15.0)	0.000

varijantnog alela je bila oko 41%, a kumulativna frekvencija svih ostalih varijantnih alela u kodirajućim polimorfizmima *ABCB1* je do oko 10%. Obzirom na jaki LD s druga dva polimorfizma, bez genotipizacije sva tri, nemoguće je zaključivati o specifičnom „efektu *ABCB1 c.1236C>T*“. Međutim, homozigoti divljeg tipa, heterozigoti i varijantni homozigoti za ovaj polimorfizam predstavljaju različite „šire genske ustroje“ – a o njihovoj se razlici na temelju sadašnjih rezultata može zaključivati. Svi GMR-ovi za usporedbe heterozigota (CT) ili varijantnih homozigota (TT) („tretirani) s kontrolama divljeg tipa (CC) su bili blisko oko 1.00, a izvjesno u rasponu od 0.90 do 1.11 – sveukupno, te posebno u ispitanika s valproatom 0/BLOQ i ispitanika s valproatom >0/BLOQ (slika 17). Za većinu, i 95%, a posebno 90%, granice pouzdanosti bile su unutar raspona 0.80-1.25 – tek su neke procjene (češće Bayes procjene, jer su konzervativnije) imale granice pouzdanosti koje su se protezale van tih granica (slika 17). Ukupno, uz spomenuto ograničenje zbog pomanjkanja informacija o preostala dva česta *ABCB1* polimorfizma, opravdano je zaključiti kako polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* (odnosno, „širi genski ustroj“ kojeg predstavlja) nema relevantnog učinka na biorasploživost lamotrigina.



Slika 17. Polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* i biorasploživost lamotrigina. Prikazane su vrijednosti nakon „ujednačavanja“ kovarijata – svi ispitanici su uključeni u analizu: i) broj ispitanika prema genotipu (n), geometrijske srednje vrijednosti koncentracija lamotrigina/100 mg doze (GM) i geometrijski koeficijent varijacije (%CV); ii) razlike između heterozigota/varijantnih homozigota i homozigota divlje tipa (*wt*) (omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti, GMR) s granicama pouzdanosti procjene (95% i 90%). Sive okomite crte naznačuju vrijednosti GMR 0.90 i 1.11, a crne okomite crte naznačuju vrijednosti GMR 0.80 i 1.25 (konvencionalne granice ekvivalentne biorasploživosti).

5.5.3. Osjetljivost na nemjereni confounding

DAG-ovi na slici 13 i na slici 14 (vezano za polimorfizam *ABCG2 c.421C>A*) prikazuju sve mjerene (i kontrolirane) i nemjerene potencijalne „remetilačke“ faktore u ovom istraživanju: u odnosu na polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T*, izmjene tih DAG-ova sastojale bi se samo u tome da je *ABCB1 c.1236C>T* instrument, aktivnost *ABCB1* „tretman“, a polimorfizmi *ABCB2 c.421C>A* i *UGT2B7 c.-161C>T* i *UGT1A4*3 c.142T>G* „remetilački“ faktori. Obzirom da dosadašnja saznanja uglavnom ne nalaze „signal“ da bi *ABCB1* polimorfizmi (ili haplotipovi) imali neki relevantan učinak na bioraspoloživost lamotrigina (24, 136) (vidi i odsječak 5.3.3.), te obzirom na važnost UGT enzima za klirens lamotrigina, kao najrealniji mogući izvor nemjerenih „remetilačkih“ efekata i ovdje smo pretpostavili efekte polimorfizama *UGT2B7* i *UGT1A4* koje nismo genotipizirali. Kao i za evaluirane *UGT2B7* i *UGT1A4* polimorfizme, pretpostavili smo hipotetsku situaciju u kojoj bi nemjereni *UGT2B7* i *UGT1A4* polimorfizmi mogli „gurati“ opažene GMR-ove ili prema vrijednostima >1.0 ili prema vrijednosti <1.0 , pri čemu bi mogli imati umjeren učinak (kao GMR 1.25 ili 0.80) ili jak učinak (kao GMR 1.43 ili 0.70). Pretpostavili smo, nadalje, da bi ukupna prevalencija takvih „remetilačkih“ setova mogla biti (vrlo visokih) 25%, te da je rezultat slučajne neravnoteže između heterozigota / varijantnih homozigota („tretirani“) i kontrola „divljeg tipa“ u odnosu 2:1 ili 4:1.

Kako je naznačeno u tablici 17 – i uz (posve nevjerojatnu) visoku neravnotežu prevalencije jakih „remetilačkih“ faktora koji ili povisuju koncentraciju lamotrigina (taj „scenarij“ pretpostavlja da je „stvarni“ efekt *ABCB1* polimorfizma sniženje koncentracije lamotrigina, a procjene na slici 18 posljedica su „protusmjernog“ učinka „remetilačkih“ faktora) ili je pak snižavaju (taj „scenarij“ pretpostavlja da je „stvarni“ efekt *ABCB1* polimorfizma povišenje koncentracije lamotrigina, a procjene na slici 18 posljedica su „protusmjernog“ učinka „remetilačkih“ faktora) i tako poništavaju „stvarne“ efekte *ABCB1* polimorfizma, korigirani GMR-ovi sa slike 18 još uvijek su u rasponu 0.80-1.25. To podupire zaključak kako je izrazito malo vjerojatno da polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* (odnosno, „širi genski ustroj“ koji genotip na ovom lokusu reprezentira) ima neki relevantan učinak na bioraspoloživost lamotrigina.

Tablica 17. Osjetljivost na nemjereni *confounding* – procjene efekata polimorfizma *ABCB1C>T* (omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti, GMR) uz valproat 0/BLOQ prikazane na slici 18 korigirane su za hipotetske umjerene ili jake efekte ostalih „remetilačkih“ faktora uz pretpostavku izrazitog disbalansa njihove prevalencije između heterozigota/varijantnih homozigota („tretirani“) i kontrola „divljeg tipa“.

	GMR	Neravnoteža	Remetilački efekt	Korigirani GMR
CT (n=159) vs. CC (n=109)	1.02	2:1, 32% : 16%	GMR 1.25 (umjeren)	0.98
		2:1, 32% : 16%	GMR 1.43 (jak)	0.96
		4:1, 36% : 9%	GMR 1.25 (umjeren)	0.96
		4:1, 36% : 9%	GMR 1.43 (jak)	0.92
		2:1, 32% : 16%	GMR 0.80 (umjeren)	1.05
		2:1, 32% : 16%	GMR 0.70 (jak)	1.07
		4:1, 36% : 9%	GMR 0.80 (umjeren)	1.08
		4:1, 36% : 9%	GMR 0.70 (jak)	1.11
TT (n=66) vs. CC (n=109)	1.10	2:1, 36% : 18%	GMR 1.25 (umjeren)	1.06
		2:1, 36% : 18%	GMR 1.43 (jak)	1.03
		4:1, 48% : 12%	GMR 1.25 (umjeren)	1.01
		4:1, 48% : 12%	GMR 1.43 (jak)	0.96
		2:1, 36% : 18%	GMR 0.80 (umjeren)	1.14
		2:1, 36% : 18%	GMR 0.70 (jak)	1.16
		4:1, 48% : 12%	GMR 0.80 (umjeren)	1.19
		4:1, 48% : 12%	GMR 0.70 (jak)	1,24

6. RASPRAVA

Varijabilnost kliničkog odgovora na primijenjeni lijek među pojedincima predstavlja važan problem u svakodnevnoj kliničkoj praksi, a što je posebno izraženo kod lijekova s uskim terapijskim rasponom poput antiepileptika. Gotovo trećina bolesnika s epilepsijom nema zadovoljavajuću kontrolu napada usprkos odgovarajuće ordiniranom antiepileptiku (12), dok trećina ima pojavu neželjenih reakcija na primijenjeni lijek (15). Istraživanja su pokazala da na bioraspoloživost lijeka, uz kliničke čimbenike poput dobi, spola i komedikacije, mogu utjecati i genetičke razlike utjecajem na farmakokinetičke parametre. Rezultati brojnih studija govore u prilog individualiziranog pristupa kod odabira lijeka i doze, a upravo farmakogenetika predstavlja važan faktor u „personaliziranoj medicini“. Genetsko testiranje u predviđanju djelotvornosti i toksičnosti antiepileptika je ograničeno i postoji samo nekoliko primjera kada se takvo testiranje može preporučiti u svakodnevnoj kliničkoj praksi, poput preporuka za doziranje fenitoina ovisno o genotipu *CYP2C9* i *CYP2C19* (57).

Farmakokinetika lamotrigina je karakterizirana značajnom interindividualnom varijabilnošću što za posljedicu može imati utjecaj na učinkovitost lijeka te moguću pojavu neželjenih reakcija. Upravo radi toga određivanje koncentracija lijeka u serumu, odnosno terapijsko praćenje lijeka ima važnu ulogu u liječenju bolesnika na terapiji lamotriginom. Nekoliko lijekova može snažno inducirati glukuronidaciju lamotrigina te time ubrzati njegov metabolizam, za razliku od inhibitora glukuronidacije čije je djelovanje suprotno. Među najznačajnije inhibitore metabolizma lamotrigina svakako spada valproat. Budući da klinički faktori ne mogu u potpunosti objasniti varijabilnost farmakokinetike lamotrigina brojna istraživanja su pokušala naći poveznicu s genetičkim razlikama enzima uključenih u metabolizam i transport lijeka, ali dosadašnja saznanja su nekonzistentna uz nedovoljno jasnu kliničku ulogu dobivenih rezultata. U našem istraživanju ispitali smo ulogu genskog polimorfizama metaboličkih enzima *UGT1A4 c.142T>G* i *UGT2B7 c.-161C>T* te transportera *ABCB1 c.1236C>T* i *ABCG2 c.421C>A* na bioraspoloživost lamotrigina kod bolesnika s epilepsijom koji su na monoterapiji lamotriginom ili na politerapiji lamotriginom i valproatom. Sama hipoteza istraživanja implicira uzročno-posljedični odnos između svakog od testiranih polimorfizama i ostatnih (engl. *trough*) koncentracija lamotrigina (bioraspoloživost lamotrigina).

Rezultati nisu pokazali značajan utjecaj ispitivanih polimorfizama metaboličkih enzima *UGT1A4* i *UGT2B7*, kao niti transportera *ABCB1* na koncentracije lamotrigina, no snažno sugeriraju da genotip *ABCG2 c.421C>A* moderira učinak valproata na ekspoziciju lamotrigina.

Učinak valproata na ekspoziciju lamotriginu veći je u nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* u odnosu na nositelje „divljeg tipa“.

6.1. Utjecaj polimorfizma transportera ABCB1 i ABCG2 na bioraspoloživost lamotrigina

Transportni proteini važni su za prijenos lijekova kroz različite biološke membrane. Stoga, genske varijante ovih proteina mogu modulirati apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lijekova. Istraživanja su pokazala da je lamotigin supstrat za transportne proteine, P-glikoprotein (MDR1/ ABCB1) i BCRP/ABCG2 (134,135), no dokazi o mogućem utjecaju polimorfizama ovih gena na bioraspoloživost lamotrigina su oskudni. Oba transportera, ABCB1 i ABCG2, spadaju u skupinu izbacivačkih transportera ovisnih o ATP-u. I dok je ABCB1 predmet brojnih istraživanja već duže vrijeme, u posljednje vrijeme je sve više istraživanja usmjereno na transporter ABCG2. Od njegovog otkrića 1998. godine identificirani su brojni supstrati za ABCG2 poput kemoterapeutika, cimetidina, sulfasalazina, rosuvastatina i drugih (166). Supstrati za ABCG2 nisu samo lijekovi već i fiziološke tvari kao što su estron-3-sulfat, 17 β -estradiol 17-(β -d-glukuronid) i mokraćna kiselina (166). U normalnom ljudskom tkivu, ABCG2 visoko je izražen na apikalnim membranama placentnih sinciciotrofoblasta, intestinalnom epitelu, kanalikularnoj membrani hepatocita, endotelnim stanicama krvnih žila mozga i apikalnoj membrani proksimalnih tubularnih stanica bubrega, na taj način pridonoseći apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijekova i endogenih spojeva. U jetri i bubrezima, ABCG2 sudjeluje u bilijarnoj i bubrežnoj eliminaciji lijekova i ksenobiotika, dok na razini krvno-moždane barijere značajno ograničava ulazak lijekova ili ksenobiotika u mozak, što je u skladu s visokim razinama ekspresije ABCG2 na luminalnoj strani moždanih endotelnih stanica (166). ABCG2 se pokazao kao važan medijator u interakcijama lijek-lijek. Poznate su stotine inhibitora ABCG2, a upravo inhibicija ovog transportera se pokazala važnim mehanizmom interakcija lijekova. Iako molekularni mehanizmi inhibicije ABCG2 nisu u potpunosti objašnjeni, smatra se da se radi o raznolikim mehanizmima. I dok neki inhibitori ABCG2 djeluju inhibirajući aktivnost ATP-aze, ostali inhibitori koji su ujedno i supstrati za ABCG2, mogu djelovati kao kompetitivni inhibitori. Brojni inhibitori P-glikoproteina ujedno su i inhibitori ABCG2 poput elakridara (GF120918), inhibitora HIV proteaze ili inhibitora tirozin kinaze (imatinib, nilotinib i apatinib). Uloga ABCG2 u dispoziciji lijekova kod ljudi pokazana je u više kliničkih studija. Interakcija lijek-lijek na razini transportera ABCG2 pokazana je u jednoj ranijoj studiji kod istodobne primjene oralnog elakridara i topotekana što je rezultiralo

značajnim povećanjem oralne bioraspoloživosti topotekana s 40 na 97% što sugerira da je inhibicija ABCG2 u tankom crijevu dovela do povećanja apsorpcije topotekana (166,167). Osim toga, interakcija lijek-lijek na razini ovog transportera opisana je između metotreksata i benzimidazola što je rezultiralo odgođenom renalnom eliminacijom metotreksata te između ciklosporina i rosuvastatina što je dovelo do povećanja apsorpcije rosuvastatina (167). S obzirom na brojne dokaze, regulatorna tijela poput FDA i EMA prepoznala su ABCG2 kao jedan od ključnih prijenosnika lijekova uključenih u klinički relevantnu raspodjelu lijekova, radi čega su izdane smjernice prema kojima novi lijekovi trebaju biti ispitani kao potencijalni supstrati ili inhibitori proteina ABCG2 (142,143). Ove smjernice bi posebno mogle biti važne u slučajevima kada ispitivani lijek ima značajnu topivost uz oslabljenu permeabilnost zbog aktivnosti izbacivanja putem ABCG2 transportera. Klinički dokaz utjecaja samog ABCG2 na interakcije lijek-lijek ograničen je zbog mogućeg preklapanja s drugim metaboličkim putevima budući razni transporteri i enzimi sudjeluju u metabolizmu mnogih lijekova koji su identificirani kao supstrati ili inhibitori ABCG2.

6.1.1. Polimorfizam ABCG2 c.421C>A i bioraspoloživost lamotrigina

Brojne studije su istraživale korelacije između pojedinačnih nukleotidnih polimorfizma (SNP) ABCG2 i farmakokinetike lijekova supstrata za ABCG2. Najopsežnije istraživani lijekovi su statini i kemoterapeutici, dok je među SNP najopsežnije analiziran ABCG2 c.421C>A (p. Q141K, rs2231142). Polimorfizam ABCG2 c.421C>A rezultira smanjenom transportnom aktivnošću. *In vitro* studije pokazale su da polimorfizam ABCG2 c.421C>A zadržava ekspresiju mRNA, ali ekspresija proteina te njihova funkcija smanjeni su za 50-70% zbog pojačane degradacije u proteasomu, što za posljedicu ima smanjenu izbacivačku aktivnost u komparaciji s genotipom divljeg tipa (116,168,169). Sveukupno, smatra se da utjecaj ABCG2 c.421C>A na farmakokinetiku lijeka ovisi o samom ispitivanom lijeku, genotipu, ali i putu primjene lijeka. Pokazan je učinak polimorfizma ABCG2 c.421C>A na farmakokinetiku statina (rosuvastatin, fluvastatin, simvastatin i atorvastatin) pri čemu su homozigoti 421AA imali značajno veću izloženost lijeku, dok isti učinak nije pokazan za genotip 421CA (117). Također, u nositelja ovog polimorfizma uočena je povećana incidencija nuspojava fluvastatina (170), atorvastatina (118) i gefitiniba (171). Više studija je pokazalo kontradiktorne rezultate za iste lijekove, a tipičan primjer je sulfasalazin (172,173). Pregledom literature dostupne su dvije studije koje su ispitivale utjecaj polimorfizma ABCG2 c.421C>A na izloženost lamotriginu u monoterapiji. U

obje je pokazana povezanost ovog polimorfizma s koncentracijama lamotrigina. U prvoj studiji provedenoj na 140 ispitanika pokazano je da je varijantni alel povezan s višim koncentracijama lamotrigina (138), dok je druga studija na 112 ispitanika pokazala da su homozigoti za varijantni alel (*421AA*) imali više normalizirane koncentracije lamotrigina u odnosu na heterozigote ili homozigote divljeg tipa (139). Obje navedene studije bile su provedene u kineskoj populaciji, a dosadašnjim istraživanjima pokazano je da se učestalost pojedinih alela *ABCG2 c.421C>A* značajno razlikuje među populacijama i rasama, što može rezultirati različitim farmakokinetским svojstvima te različitim dometom interakcija lijekova na razini transportera *ABCG2*. Alel *ABCG2 421A* vrlo je čest u japanskoj i kineskoj populaciji, s prijavljenom učestalošću alela između 26 i 35% (138,169,174). Nasuprot tome, kod Afrikanaca i Afroamerikanaca prijavljena je niska učestalost (< 1%) varijantnog alela (174), dok učestalost varijantnog alela kod bijelaca iznosi 10% -14% (174,175). Rezultati naše studije pokazali su učestalost ovog alela od 10.4%, što je u skladu s rezultatima ostalih studija za bjelačku populaciju. U našem istraživanju procjenjen je efekt varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* na bioraspoloživost lamotrigina. Za razliku od dvije gore navedene studije naši rezultati pokazali su efekt u kojem nositelji varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* imaju oko 25% nižu ekspoziciju lamotriginu u odnosu na nositelje „divljeg tipa“ u slučaju monoterapije lamotriginom ili kombinirane terapije LAM + VAL ukoliko je koncentracija valproata ispod razine kvantifikacije (engl. *below the lower limit of quantification*, BLOQ)]. Nadalje, rezultati našeg istraživanja pokazali su da je ekspozicija lamotriginu bila viša što je ekspozicija valproatu bila viša, odnosno da stupanj ekspozicije valproatu modificira efekt varijantnog alela. Rezultati su pokazali da uz koncentracije valproata niže od preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu je slična u varijantnih i kontrolnih ispitanika „divljeg tipa“, dok u rasponu preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu u nositelja varijantnog alela je oko 30% viša nego u kontrolnih ispitanika „divljeg tipa“. Imajući u vidu da je koncentracija lamotrigina u odsutstvu valproata bila oko 25% niža kod nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A*, a u slučaju politerapije lamotrigina i valproata uz preporučenu koncentraciju valproata oko 30% viša, potreban je povećan oprez obzirom na kliničke posljedice u slučaju korekcije antiepileptičke terapije.

Učinak valproata na sistemsku bioraspoloživost lamotrigina dobro je poznat, no u kontekstu procjene efekta polimorfizma *ABCG2 c.421C>A*, izvjesno je da istodobno postoje dva efekta – efekt varijantnog alela i efekt valproata. Stoga je u istraživanju uz efekt varijantnog alela (*ABCG2 c.421C>A*) u različitim razinama ekspozicije valproatu, procjenjen i efekt valproata, i to na dvije razine *ABCG2 c.421C>A* polimorfizma: u nositelja varijantnog alela i u kontrola

„divljeg tipa“. U cjelokupnom uzorku, uz nizak valproat ekspozicija lamotriginu bila je oko dva puta viša nego bez valproata (valproat 0/BLOQ), a uz visok valproat bila je oko tri puta viša nego bez valproata, odnosno, efekt „visokog valproata“ je bio očekivano izraženiji od efekta „niskog valproata“. Nadalje, efekt „niskog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog *ABCG2 c.421C>A* alela nego u homozigota divljeg tipa (omjer GMR oko 1.50) i efekt „visokog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog alela nego u homozigota divljeg tipa (omjer GMR oko 1.80).

Rezultati našeg istraživanja u skladu su s rezultatima ranije, eksplorativne studije, koja je pokazala značajnu ulogu polimorfizma *ABCG2 c.421 C>A* u moduliranju interakcije lamotrigina i valproata (141). U navedenoj studiji, kod nositelja varijantnog alela *ABCG2 421A*, zapažena je izraženija interakcija lamotrigina i valproata, na način da je za oko 2 puta veći inhibitorni utjecaj valproata u usporedbi s inhibicijskim potencijalom valproata u nositelja divljeg tipa (141).

Da bi procjena našeg istraživanja bila realistična bilo je potrebno kontrolirati „remetilačke“ čimbenike (poglavlje 4.2.) budući se time prevenira zabuna u kojoj se neka nekauzalna povezanost između genotipa, odnosno aktivnosti proteina i koncentracije lamotrigina, interpretira kao uzročno-posljedični odnos. Imajući na umu čimbenike koje smo uzeli u obzir, poput uključnih/isključnih kriterija, kao najvažniji mogući „remetilački“ čimbenici ostaju polimorfizmi transportera i metaboličkih enzima koji nisu bili predmet istraživanja, i to prvenstveno polimorfizmi gena *ABCG2*, *ABCB1* te *UGT1A4* i *UGT2B7*. Međutim, čini se vrlo malo vjerojatnim da bi oni mogli u potpunosti ili u većem dijelu objasniti uočene razlike u učincima valproata na bioraspodjelu lamotrigina uvjetovane genotipom *ABCG2 c.421C>A*. U tu svrhu, oni bi morali djelovati sinkrono, njihova prevalencija u podskupovima valproat-genotip *ABCG2 c.421C>A* trebala bi biti izrazito neuravnotežena, a njihov kumulativni učinak trebao bi biti značajan, a što je obzirom na trenutno znanje o ovoj temi vrlo malo vjerojatno. Prema aktualnom znanju, *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) najčešće je istraživani polimorfizam gena *ABCG2*. Smanjena (*in vitro*) funkcija transportera povezuje se i s tri druga polimorfizma (rs34783571, rs192169062 i rs34264773), za tri polimorfizma pokazano je da nemaju utjecaja na aktivnost transportera, dok za nekoliko drugih nije poznato utječu li na aktivnost ovog transportera (140). Kumulativno, frekvencija varijantnih alela povezanih sa smanjenom aktivnošću transportera je do 1%, uzimajući u obzir i one za koje nije poznato utječu li na funkciju transportera (140). Shodno tome, među ispitanicima u ovom istraživanju realno je očekivati da su svega nekolicina njih bili nositelji tih „ostalih“ varijantnih alela/polimorfizama. Vjerojatnost da bi ta činjenica mogla utjecati na procjene u ovom istraživanju izvjesno je

zanemariva. Situacija je znatno složenija vezano za dva glavna metabolička enzima lamotrigina, UGT1A4 i UGT2B7. *UGT1A4* je vrlo polimorfan gen, a polimorfizam analiziran u ovom istraživanju, *UGT1A4*3 c.142T>G* (rs2011425), u potpunom je LD s više drugih polimorfizama, uključujući i *UGT1A4*2 c.70C>A* (rs6755571, Pro24Tre) (66,133) koji je povezan sa smanjenom aktivnošću enzima *in vitro* (68,119), premda rezultati o njegovoj povezanosti s koncentracijama lamotrigina u ljudi nisu jednoznačni. Nadalje, *UGT1A4*3 c.142T>G* je u potpunom LD s nekoliko promotorskih polimorfizama, primjerice *-214C>T* i *-163G>A* s kojima tvori *UGT1A4*3a* haplotip, te s nekoliko daljnjih polimorfizama tvoreći ostale haplotipove (*5 and *7a) (68,130-132). Dakle, kontrolirajući za genotip *UGT1A4*3 c.142T>G*, kontrolira se i mogući utjecaj niza polimorfizama s kojima je u potpunom LD. Ipak, moguće je da ostaju drugi polimorfizmi u genu *UGT1A4* koji nisu „kontrolirani“. I gen *UGT2B7* je vrlo polimorfan. Polimorfizam genotipiziran u ovom istraživanju *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258) je u potpunom LD s polimorfizmom *802C>T* (rs743966) (24), te s nizom promotorskih polimorfizama s kojima tvori dva glavna haplotipa (124) i drugim polimorfizmima s kojima tvori haplotipove *UGT2B7*1a, *1j, *1k, *2b, *2c, *2d, *2f* (130). Dakle, i kontrola za genotip *UGT2B7 c.-161C>T* ujedno „kontrolira“ niz drugih polimorfizama s kojima je u potpunom LD, no kao i za *UGT1A4*, ostaje niz drugih polimorfizama u genu *UGT2B7* koji nisu kontrolirani, a njihov mogući učinak na aktivnost enzima *UGT2B7* nije poznat. Neka su istraživanja naznačila mogućnost da, uz *UGT1A4* i *UGT2B7* enzime, klirensu lamotrigina u maloj mjeri doprinose enzimi *UGT1A3* i *UGT1A2*, no njihova uloga nije jasno dokazana, a ako i postoji, doprinos je vrlo malen (24).

Među brojnim polimorfizmima gena *ABCB1*, tri su uobičajena kodirajuća SNP-a, *c.1236C>T* (rs1128503), *c.2677G>T/A* (rs2032582), *c.3435C>T* (rs1045642), a koji su u jakoj LD (81), a recentno je isto dokazano i u hrvatskoj populaciji (163). Dakle, kontrolirajući za *c.1236C>T* uvelike se kontroliraju i druga dva polimorfizma. Kumulativna prevalencija šest ostalih kodirajućih *ABCB1* polimorfizama je oko 10% (136), pa je izrazito malo vjerojatna njihova uloga u opaženim efektima.

Istraživanja do sada nisu ukazala na važnost polimorfizama/aktivnosti transportera iz *SLCO* superporodice, kao niti drugih ABC transportera, na sistemsku bioraspodjelu lamotrigina (24). Recentno objavljeni pregledni rad evaluirao je rezultate brojnih studija o utjecaju polimorfizama drugih ABC transportera (*ABCB1*, *ABCG2*, *ABCC1*, *ABCC2* i *ABCC3*) na farmakokinetiku kao i odgovor na lijekove, sugerirajući da je utjecaj ovih SNP-ova minimalan (ako uopće i postoji) (176). Navedeno je primjenjivo i za lamotigin.

Sveukupno, obzirom na trenutna saznanja o problemu, procjene koje su ovdje okarakterizirane kao efekti varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* izvjesno mogu biti opterećene nekim za sada nepoznatim nemjerenim „remetilačkim“ efektima. Međutim, vjerojatnost takvih efekata je mala, a čak i da su vrlo izraženi, ne bi u potpunosti ili u većini objasnili opaženo. Stoga je opravdano zaključiti da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* ima određeni učinak na biorasplošivost lamotrigina, na način da prisutnost varijantnog alela rezultira nižim ostatnim koncentracijama lamotrigina. Nadalje, izvjesnom se čini i modifikacija tog efekta kada postoji ekspozicija valproatu, na način da se efekt varijantnog alela „izgubi“ (nizak valproat), odnosno da uz visoke razine valproata varijantni alel rezultira većom ekspozicijom lamotriginu. Praktično, to znači da bi preporučeno smanjenje doze lamotrigina ako se primjenjuje istodobno s valproatom (vođeno očekivanim dvostrukim povećanjem izloženosti lamotriginu) moglo biti preskromno u ovoj podskupini pacijenata koji nose varijantni alel *ABCG2 c.421C>A*, a što može rezultirati većom vjerojatnošću razvoja toksičnih učinaka.

Zaključno, ovo istraživanje snažno sugerira da je učinak valproata na izloženost lamotriginu moderiran polimorfizmom *ABCG2 c.421C>A*: povećanje razine lamotrigina izazvano valproatom izraženije je u nositelja varijantnog alela, nego u nositelja „divljeg tipa“ alela, u mjeri koja je vjerojatno klinički relevantna.

6.1.2. Polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* i biorasplošivost lamotrigina

Tri najčešća i najviše ispitivana polimorfizma *ABCB1* u bijelaca su *ABCB1 c.1236C>T*, *c.2677G>T/A* i *c.3435C>T*. Nalaze se u jakom LD (odsječak 5.3.3.) i ekstenzivno su evaluirana u vezi biorasplošivosti niza lijekova, ali s vrlo varijabilnim rezultatima (136). U pogledu lamotrigina, nekoliko studija sugeriralo je uključenost pojedinačnih SNP-ova ili haplotipa, ali recentna veća studija na skandinavskim pacijentima nije pronašla povezanost *c.1236C>T* ili *c.3435C>T* s koncentracijama lamotrigina prilagođenima prema dozi (47). S tim u skladu su i rezultati naše studije koja također nije pokazala jasnu povezanost između polimorfizma *ABCB1 c.1236C>T* i koncentracije lamotrigina kao niti utjecaj ovog polimorfizma na domet interakcije između lamotrigina i valproata. U studiji koja je provedena u populaciji sličnoj našoj kohorti, a koja je uključila 100 ispitanika od kojih je 54 bilo na monoterapiji lamotriginom također nije dokazan statistički značajan utjecaj polimorfizma *ABCB1 c.1236C>T* na farmakokinetiku lamotrigina, ali je ustanovljen smanjen klirens lamotrigina za 22% u nositelja genotipa *2677GG* te za 9% u nositelja genotipa *2677GT* (123). U suprotnosti s navedenom studijom, studija

provedena u populaciji kineskih ispitanika liječenih monoterapijom lamotrigina dokazala je utjecaj polimorfizma *ABCB1 c.1236C>T* na koncentraciju lamotrigina (138). Također, studija koja je ispitala ulogu polimorfizama *ABCB1 C1236T*, *G2677T* i *C3435T*, a provedena je u Srednjoj-Južnoj Europi, pokazala je povezanost između varijantnog alela *ABCB1 c.1236C>T* i nižih koncentracija lamotrigina, dok nije pokazana statistički značajna povezanost polimorfizama *ABCB1 C3435T* i *G2677T/A* s koncentracijama lamotrigina. Nositelji genotipa *1236CC* imali su statistički značajan porast koncentracija lamotrigina u odnosu na genotip *1236CT* i *TT*. Također, analizom povezanosti haplotipova *ABCB1* s koncentracijom lamotrigina dobivena je statistički značajna povezanost ($P=0,018$), no važno je za naglasiti da od 222 uključena ispitanika, njih 75% je bilo na politerapiji lamotrigina i drugih antiepileptika uključujući AET s induktivnim odnosno inhibitivnim potencijalom. Opservirani učinak je zamječen samo u skupini ispitanika liječenih antiepileptičkom politerapijom, dok učinak nije zamječen u podskupini na monoterapiji lamotriginom (137). Učestalost varijantnih alela *ABCB1* varira među različitim populacijama i rasama, radi čega se za procjenu učinka ovog polimorfizma na raspoloživost lamotrigina trebaju provesti istraživanja na većem uzorku u različitim etničkim skupinama. U naših ispitanika, frekvencija varijantnog alela *ABCB1 c.1236C>T* je bila oko 41%, a kumulativna frekvencija svih ostalih varijantnih alela u kodirajućim polimorfizmima *ABCB1* je do oko 10%. Obzirom na jaki LD s druga dva polimorfizma, bez genotipizacije sva tri polimorfizma, nije moguće zaključivati o specifičnom „efektu *ABCB1 c.1236C>T*“. Međutim, homozigoti divljeg tipa, heterozigoti i varijantni homozigoti za ovaj polimorfizam predstavljaju različite „šire genske ustroje“, a o njihovoj se razlici na temelju sadašnjih rezultata može zaključivati. Ukupno, uz spomenuto ograničenje zbog pomanjkanja informacija o preostala dva česta *ABCB1* polimorfizma, opravdano je zaključiti kako polimorfizam *ABCB1 c.1236C>T* (odnosno, „širi genski ustroj“ kojeg predstavljala) nema relevantnog učinka na bioraspoloživost lamotrigina. U skladu s tim je i ranije navedeni pregledni rad (176) o povezanosti između SNP-ova raznih ABC transportera (*ABCB1*, *ABCG2*, *ABCC1*, *ABCC2* i *ABCC3*) i farmakokinetike raznih lijekova, no rezultati su uglavnom pokazali ili slabu povezanost ili povezanost nije utvrđena, a što upućuje na to da je utjecaj tih SNP-ova na farmakokinetiku lijekova općenito slab ukoliko i postoji.

6.2. Polimorfizmi metaboličkih enzima UGT1A4 i UGT2B7 i bioraspoloživost lamotrigina

Brojne studije istraživale su moguću povezanost između farmakokinetike lamotrigina i polimorfizma gena *UGT*, ali dobiveni rezultati nisu konzistentni. Na temelju rezultata *in vitro* studija te kliničkih podataka, utjecaj polimorfizma *UGT1A4*3 c.142T>G* (rs2011425) na farmakokinetiku lamotrigina pokazao se najuvjerljivijim, iako rezultati svih istraživanja nisu istoznačni. Kako je i ranije navedeno, *UGT1A4*3 142T>G* je u potpunoj LD s dva SNP-a promotora, *-219C>T* i *-163G>A* (rs3732219 i rs3732218), kako bi se formirao haplotip *UGT1A4*3a*. Za *-219C>T* i *-163G>A* također postoje dokazi o mogućem utjecaju na farmakokinetiku lamotrigina (24,29). *UGT1A4*3 c.142T>G* je u potpunoj LD i s *-419* i *-463*, te s nekoliko drugih SNP-ova (tvoreći haplotipove *5 i *7a) (68,130-132). Dodatno, *UGT1A4 c.142T>G* je kod bijelaca u potpunoj LD s *UGT1A4 70C>A* (66,133). *In vitro* studije pokazale su smanjenu enzimsku aktivnost za *UGT1A4*2 70C>A* i *UGT1A4*3 c.142T>G* (119). Za razliku od toga neke kliničke studije upućuju na povezanost *UGT1A4 c.142T>G* s povećanom enzimskom aktivnošću. Više studija je pokazalo da nosioci varijantnog alela *UGT1A4 c.142T>G* imaju niže koncentracije lamotrigina u odnosu na nosioce „divljeg tipa“ (45,70), uključujući i jednu studiju provedenu na skandinavskoj populaciji (121), za razliku od toga, jedna kasnija studija također provedena na skandinavskoj populaciji nije našla povezanost između polimorfizma *UGT1A4 c.142T>G* i bioraspoloživosti lamotrigina (47). S tim u skladu su i rezultati naše studije u kojoj nismo pronašli povezanost između polimorfizma *UGT1A4 c.142T>G* i serumskih koncentracija lamotrigina niti je dokazan utjecaj ovog polimorfizma na domete interakcija između lamotrigina i valprota. Razlike u rezultatima mogu se objasniti s nekoliko čimbenika, jedan od njih je da nisu jednako uzimani u obzir vanjski čimbenici poput istovremene terapije drugim antiepilepticima, uključujući lijekove koji mogu inhibirati ili inducirati metabolizam lamotrigina. Nadalje, učestalost pojavnosti pojedinih polimorfizama također je jedan od faktora varijabilnosti koji može ukazati na farmakokinetičku varijabilnost lamotrigina na populacijskoj razini. Učestalost varijante *UGT1A4 c.142T>G* u azijskim populacijama slična je onoj zabilježenoj u bijelaca (70,131,132). U našoj studiji učestalost varijantnog alela *UGT1A4 142T>G* iznosi 11.7%, dok u turskoj populaciji (45) iznosi oko 25%. Učestalost *UGT1A4 70C>A* u turskoj populaciji je oko 2%, za razliku od azijskih populacija u kojima je polimorfizam *UGT1A4 70C>A* vrlo rijedak ili se ne pojavljuje. Budući je u ranijoj studiji Klarice i sur. pokazano da je učestalost varijantnog alela *UGT1A4 c.70C>A* u našoj populaciji 1 %, analiza ovog polimorfizma nije bila predmet istraživanja u našoj studiji (141). Štoviše, studije opetovano pokazuju da su *UGT1A4 c.142T>G* i *UGT1A4 c.70C>A* u

jakoj LD u europskim populacijama, stoga, činjenica da pacijenti nisu genotipizirani za *UGT1A4 c.70C>A* nije značajno utjecala na rezultate našeg istraživanja.

Uz enzim UGT1A4, dokazan je utjecaj i drugih enzima na metabolizam lamotrigina. *In vitro* studija je pokazala kako valproična kiselina inhibira mikrosomalnu glukuronidaciju lamotrigina putem enzima UGT2B7, a ne putem UGT1A4 koji je dominantan u metabolizmu lamotrigina (28). Polimorfizam promotorske regije *UGT2B7 c.-161C>T* ne dovodi do mijenjanja aminokiselinskog slijeda enzima UGT2B7, ali može dovesti do promjene razine transkripcije enzima (177). Među poznatim polimorfizama gena *UGT2B7*, jedino polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258) i *UGT2B7 c.802C>T* (rs7439366) imaju najmanje po dva dosljedna rezultata o utjecaju na farmakokinetiku lamotrigina (47,126,127,178). Studija skupine autora pod vodstvom Blance Schanez i suradnika prva je studija koja je pokazala utjecaj polimorfizma *UGT2B7 c.-161 C>T* na klirens lamotrigina. Rezultati su u multivarijantnoj analizi pokazali da politerapija s drugim antiepilepticima objašnjava 70% varijabilnosti koncentracija lamotrigina, dob pacijenta doprinosi s 24%, dok je doprinos polimorfizma *UGT2B7 c.-161 C>T* procijenjen na 12% (126). U skladu s tim su i rezultati studije provedene u tajlandskoj populaciji koja je pokazala smanjenje klirensa lamotrigina za 18% u ispitanika koji su nositelji varijantnog alela *UGT2B7 c.-161T* (*CT* ili *TT*) u odnosu na homozigote „divljeg tipa” (127), dok je studija provedena u slovenskoj populaciji pokazala smanjenje klirensa lamotrigina (20,4%) u homozigota za varijantni alel, *UGT2B7 c.-161TT*, u usporedbi s nositeljima alela *c.-161C* (123). Studija provedena u kineskoj populaciji nije pokazala povezanost polimorfizma *UGT2B7 c.-161C>T* i bioraspoloživosti lamotrigina (120) što je u skladu s rezultatima naše studije u kojoj nismo dokazali utjecaj ovog polimorfizma na raspoloživost lamotrigina kao niti na domet interakcije lamotrigina i valproata.

UGT2B7 c.-161C>T i *UGT2B7 c. 802C>T* su u potpunom LD-u, stoga kontroliranje za jedan kontrolira i drugi polimorfizam. *UGT2B7 -161C>T* je u potpunom LD-u i s nekoliko drugih polimorfizama i sudjeluje u brojnim haplotipovima, uključujući haplotip *UGT2B7*1k* (*-1306G/-1299C/-1112C/ -900A/-327G/-161C /372G*) (130), a koji uključuje SNP *UGT2B7 372A>G* (rs28365062) za kojeg je u jednoj studiji pokazano da utječe na klirens lamotrigina (24).

Budući su oba istraživana polimorfizma *UGT-a* u potpunom LD s nizom drugih polimorfizama i čine veći broj haplotipova genotipovi na ovim lokusima zapravo „predstavljaju“ kompleksniji genski ustroj koji se razlikuje između homozigota divljeg tipa, heterozigota i varijantnih homozigota. Nadalje, bez genotipizacije čitavog niza polimorfizama gena *UGT2B7* i *UGT1A4* nemoguće je izolirati potencijalne efekte upravo ovih polimorfizama. Posljedično, u ovom su

istraživanju zapravo procijenjeni učinci tih „kompleksnijih genskih ustroja“ koje predstavljaju genotipovi na ova dva lokusa.

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da je sveukupno i na različitim razinama ekspozicije valproatu, bioraspoloživost lamotrigina bila blisko slična u heterozigota/varijantnih homozigota ili pak homozigota divljeg tipa za svaki od ova dva polimorfizma. Ukupno, nema naznaka da genski ustroji koje evaluirani polimorfizmi „reprezentiraju“ imaju neki relevantan učinak na bioraspoloživost lamotrigina.

6.3. Ograničenja i važnost provedenog istraživanja

Provedeno istraživanje ima nekoliko ograničenja. Prvo ograničenje ove studije je da ne pruža odgovore o mehanizmu opaženih učinaka. Za razliku od lamotrigina, valproat nije supstrat za ABCG2. Ipak, lamotrigin, valproat i ABCG2 imaju određene "dodirne" točke. Razmatrajući biološku distribuciju transportera ABCG2 (140), lokacija na kojoj bi njegova smanjena efluksna aktivnost [kao posljedica mutacije *ABCG2 c.421C>A* (116)] mogla biti relevantna za sistemsku bioraspoloživost oralnog lamotrigina primarno je gastrointestinalni sustav. Određeni doprinos opaženim učincima mogao bi biti i posljedica uključenosti transportera ABCG2 u izlučivanje lijekova mokraćom (179). Međutim, budući da valproat (za razliku od lamotrigina) nije ABCG2 supstrat (135) mehanizmi koji leže u pozadini uočene razlike učinaka valproata na ostatne koncentracije lamotrigina između nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* i nositelja „divljeg tipa“ nisu jasno uvjerljivi. Ipak, barem jedno potencijalno (hipotetsko) objašnjenje čini se mogućim. Smanjena aktivnost ABCG2, kao posljedica polimorfizma *ABCG2 c.421C>A*, uzrokovana je smanjenim brojem prijenosnika budući se varijanta proteina opsežnije razgrađuje (140). Zanimljivo je da je to eksplicitno dokazano u ljudskoj placenti (140). S druge strane, perfuzija tkiva ljudske posteljice valproatom [koncentracije u rasponu od 290 do 1150 $\mu\text{mol/L}$ (odgovaraju "niskom" do "ciljanom/visokom" valprota kako je definirano u ovoj analizi)] smanjuje ekspresiju ABCG2 (reducirani transkripti) za 2-3 puta (162). Slično, ekspresija ABCG2 u placenti smanjena je u miševa izloženih valproatu tijekom trudnoće (180). Pod pretpostavkom da se fenomen može primijeniti za druga tkiva koja fiziološki ekspimiraju ABCG2, čini se da povećanje izloženosti lamotriginu izazvano valproatom možda nije samo posljedica inhibirane glukuronidacije lamotrigina, već i smanjene efluksne aktivnosti transportera ABCG2 u gastrointestinalnom traktu. U tom kontekstu, veća razlika u ostatnim koncentracijama lamotrigina između pacijenata koji su bili izloženi (liječeni) i neizloženi

(kontrola) valproatu ako su nositelji varijante *ABCG2 c.421C>A* u odnosu na one koji su homozigoti divljeg tipa (moderiranje učinka valproata ovim polimorfizmom) može se objasniti multiplikativnim (a ne samo aditivnim) učincima valproata (smanjena transkripcija/ekspresija transportera) i SNP *ABCG2 c.421C>A* (povećana degradacija transportera), budući oboje "rade u istom smjeru" (smanjena efluksna aktivnost *ABCG2*), ali različitim mehanizmima.

Ovu mogućnost podupire činjenica da se moderirajući učinak polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* činio izraženijim kada je izloženost valproatu bila veća.

Nadalje, ograničenje ove studije je da nisu analizirani mogući polimorfizmi za koje je u dostupnoj literaturi pokazan utjecaj na farmakokinetiku lamotrigina, poput *UGT2B7 372A>G* (123) i *UGT2B7 802C>T* (47) te polimorfizmi transportera poput *OCT1 rs628031* (139) i *2677G>T/A* (123). Međutim, obzirom da je dio njih u LD s polimorfizmima koji su bili predmet analize u našoj studiji (kako je prethodno i navedeno), za očekivati je da smo kontrolom jednog polimorfizma, kontrolirali i one s kojima su u LD.

Iduće ograničenje ove studije je da se temelji na mjerenju koncentracija lamotrigina na kraju doznog intervala, u okviru rutinskog terapijskog praćenja lijeka, a ne na detaljnoj farmakokinetičkoj analizi, no mišljenja smo da to ne isključuje njenu kliničku važnost obzirom da je ovakav pristup preporučen u međunarodnim smjernicam za terapijsko praćenje antiepileptika u serumu.

Jedno od ograničenja studije je i što nije uzeta u obzir prehrana ispitanika, budući je dokazan inhibitorni učinak određene hrane na *ABCG2*, poput soje. Soja je bogat izvor izoflavona koji inhibicijom transportera *ABCG2* i *ABCB1* te inhibicijom/indukcijom enzima citokroma P450 mogu stupati u farmakokinetičke interakcije s brojnim lijekovima (181).

U našu studiju uključeni su samo nepušači budući nikotin može imati inducirajući učinak na mikrosomalne enzime *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A1*, *CYP2A2*, *CYP2B1*, *CYP2B2* i *CYP2E1* te na *UGT1A9* i *UGT2B7*. Metabolizam lamotrigina manjim dijelom ide putem enzima *UGT2B7* te može biti pod inducirajućim učinkom nikotina što posljedično može rezultirati promjenama u serumskoj koncentraciji lamotrigina. I dok su neke ranije studije pokazale smanjenje serumske koncentracije lamotrigina kod ispitanika pušača liječenih samo lamotriginom (44,45) u nedavno provedenim studijama taj učinak nije potvrđen (46,47).

S druge strane, stajališta smo da je u istraživanje uključen relevantan broj ispitanika, s adekvatno određenim uključnim i isključnim kriterijima, uz odgovarajuće vrijeme uzrokovanja te analizu koncentracija lijekova prilagođenih prema dozi. Nadalje, da bi procjena efekata bila realistična, bilo je potrebno kontrolirati „remetilačke“ čimbenike i na taj način prevenirati pogrešku u kojoj bi se neka nekauzalna asocijacija interpretirala kao uzročno-posljedični odnos.

Dijelom je to zadovoljeno adekvatnim uključnim/isključnim kriterijima. Nastojala se postići izmjenjivost jedinki nalik onoj u randomiziranom pokusu tako da se jedinke izložene tretmanu i kontrole „ujednači“ za vrijednosti „remetilačkih“ čimbenika. Međutim, teorijski dvije skupine ispitanika („tretirani“ i „kontrolne“) mogu se ujednačiti samo u odnosu na ona svojstva koja su nam o njima poznata. Stoga, nastojala se postići ujednačenost za poznate/mjerne čimbenike - tzv. uvjetovana izmjenjivost, a smatra se da uvijek ostaje i neka razina „ostatnog“ (nemjerenog) *confoundinga*. Bilo koji opaženi efekt može se korigirati za iznos nekog nemjerenog efekta (*confoundinga*) koji u procjeni nije kontroliran (160). Taj se postupak također odnosi na efekte mjerene na skali relativnog rizika, stoga je korištena analogija između RR i GMR koja rezultira korigiranim opaženim efektom.

Napretkom spoznaja o brojnim bolestima te produljenjem očekivane životne dobi, danas se u liječenju mnogih stanja često istovremeno primjenjuje više lijekova, što značajno povećava mogućnost interakcija lijekova (engl. *Drug-Drug Interactions*, DDI). Budući da do interakcije lijek-lijek može doći na razini gena/enzima sve češće se u literaturi koristi i izraz interakcija lijek-lijek-gen (engl. *Drug-Drug-Gene Interactions*, DDGI). Farmakogenetičko ispitivanje može unaprijediti sigurnost i učinkovitost primjenjene terapije, otkrivajući genetičke varijante za koje je poznato da mogu utjecati na farmakokinetiku, odnosno smanjenu djelovornost ili toksičnost primjenjenog lijeka. Osim istodobne primjene lijekova koji mogu utjecati na farmakokinetičke parametre djelujući na funkciju metaboličkih enzima i transportera, važno je također uvijek imati na umu i druge čimbenike koji mogu utjecati na farmakokinetičku varijabilnost primjenjene terapije, poput dobi ili hrane.

I dok su istraživanja posljednjih godina usmjerena na aktivnosti koje doprinose donošenju kliničkih odluka temeljenih na farmakogenetičkim spoznajama ili interakcijama lijek-lijek, malo je istraživanja koja su obuhvatila ova dva pristupa analizirajući učinke interakcija gen-lijek-lijek. Rezultati ovog istraživanja koji upućuju na važnost polimorfizma *ABCG2* u moduliranju dometa interakcije lamotrigina i valproata ukazuju na nužnost daljnjih istraživanja. Brojni lijekovi su inhibitori transportera *ABCG2* te na taj način, u slučaju konkomitantne primjene, mogu modulirati farmakokinetiku transportiranog supstrata, rezultirajući interakcijama primjenjenih lijekova, što posljedično može dovesti do neželjenih toksičnih učinaka zbog povećane izloženosti. Imajući u vidu da gotovo trećina bolesnika s epilepsijom nema zadovoljavajući kontrolu napada, te da oko trećine bolesnika razvije nuspojave na antiepileptike, učinak interakcije lijek-lijek-gen opažen u našem istraživanju dodatno dobiva na

važnosti te smatramo da su potrebna daljnja istraživanja, uključujući i istraživanja u drugim populacijama.

Ovo istraživanje koje se temelji na ispitivanju interakcija lijek-lijek-gen važno je u integraciji farmakogenomike u kliničku praksu, s konačnim ciljem unaprijeđenja individualizacije i optimizacije terapije za svakog pojedinca.

Zbog interindividualne varijabilnost u učinkovitosti i neželjenim reakcijama na primjenu antiepileptika ispitivan je i mogući genetički utjecaj na farmakodinamiku koja je zadana ciljnim molekulama djelovanja antiepileptika. Mnogi antiepileptici pokazuju farmakološke učinke putem inhibicije funkcije voltažnih natrijskih kanala, uključujući i lamotrigin. Stoga su se brojna istraživanja fokusirala na gene u podlozi. Ali unatoč tome, studije koje su istraživale polimorfizme gena koji kodiraju ciljna mjesta djelovanja antiepileptika nisu rezultirali otkrićem biomarkera kojima bi se mogao predvidjeti odgovor na terapiju (182-186).

Uz istraživanje genetičkih čimbenika u odgovoru na farmakoterapiju, tijekom proteklih 20-ak godina ubrzano se razvija i područje epigenetike. I dok se smatra da genetička raznolikost doprinosi varijabilnom odgovoru na farmakoterapiju 25-50%, saznanja o utjecaju epigenetike na moduliranje farmakoterapije su još uvijek skromna. S poboljšanim razumijevanjem epileptogeneze, epigenetskih determinanti i farmakogenomike očekivan je napredak u primjeni farmakološke, ali i nefarmakološke terapije u području epileptologije.

7. ZAKLJUČCI

Provedeno istraživanje u bolesnika s epilepsijom liječenih monoterapijom lamotriginom ili kombiniranom terapijom lamotriginom i valproatom jednim dijelom potvrdilo je postavljenu hipotezu te je rezultiralo znanstvenim spoznajama o interakciji lijek-lijek-gen (engl. *Drug-Drug-Gene Interactions*, DDGI).

1. Kod osoba s epilepsijom srednjoistočnoeuropskog podrijetla frekvencija varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* iznosila je 10.4%, *ABCB1 c.1236C>T* 43.0%, *UGT2B7 -161 C>T* 49.6%, a *UGT1A4*3 142 T>G* 11.7%. Prevalencije pojedinih genotipova, kao i frekvencije varijantnih alela bile su slične u ispitanika na monoterapiji i onih na kombiniranoj terapiji lamotrigina i valproata.
2. Dokazan je efekt polimorfizma *ABCG2 c.421C>A* na bioraspoloživost lamotrigina. Nositelji varijantnog alela imali su oko 25% nižu ekspoziciju lamotriginu u odnosu na kontrole „divljeg tipa“ u slučaju monoterapije lamotriginom (valproat 0) ili na kombiniranoj terapiji lamotrigina i valproata (LAM + VAL) ukoliko su koncentracije valproata bile ispod razine kvantifikacije (engl. *below the lower limit of quantification*, BLOQ), no stupanj ekspozicije valproatu modificira taj efekt varijantnog alela. Uz koncentracije valproata niže od preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu bila je slična u varijantnih i kontrolnih ispitanika; a u rasponu preporučenih vrijednosti terapijskog praćenja lijeka, ekspozicija lamotriginu je u nositelja varijantnog alela bila oko 30% viša nego u kontrola „divljeg tipa“.
3. Dokazano je da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* modificira učinke valproata na bioraspoloživost lamotrigina. U cjelokupnom uzorku, uz koncentracije valproata niže od preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu bila je oko dvostruko viša nego bez valproata (valproat 0/BLOQ), a uz koncentracije valproata unutar preporučenih TDM vrijednosti, ekspozicija lamotriginu bila je oko tri puta viša nego bez valproata, odnosno, efekt „visokog valproata“ bio je izraženiji od efekta „niskog valproata“. Efekt „niskog

valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* nego u homozigota divljeg tipa (omjer GMR oko 1.50). Također, i efekt „visokog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog alela nego u homozigota divljeg tipa (omjer GMR oko 1.80).

4. Polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G* i *ABCB1 c.1236C>T* nemaju relevantnog učinka na bioraspodjelu lamotrigina u osoba s epilepsijom.

8. SAŽETAK

Uvod: Lamotrigin karakterizira značajna interindividualna varijabilnost farmakokinetičkih parametara te je posljedično tome prisutna varijabilnost u učinkovitosti i razvoju štetnih učinaka. Do sada nije razjašnjena uloga polimorfizama metaboličkih enzima UGT1A4 i UGT2B7 te transportnih proteina ABCB1 i ABCG2 na bioraspodjelu lamotrigina.

Svrha: Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti razlikuju li se nositelji varijantnog alela *UGT2B7 c.-161C>T* (rs7668258), *UGT1A4*3 c.142T>G* (rs2011425), *ABCB1 c.1236C>T* (rs1128503) i *ABCG2 c.421C>A* (rs2231142) od odgovarajućih kontrola divljeg tipa (engl. *wild type*, wt) s obzirom na izloženost lamotriginu.

Metode: U istraživanje su uključeni adolescenti i odrasle osobe s epilepsijom koji su uzimali monoterapiju lamotrigina ili politerapiju lamotrigina i valproata te su bili podvrgnuti rutinskom terapijskom praćenju lijeka. Ispitanici su inače bili zdravi i nisu uzimali druge lijekove koji bi mogli stupiti u interakciju s lamotriginom i valproatom. Uključeni ispitanici genotipizirani su za *UGT2B7 c.-161C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G*, *ABCB1 c.1236C>T* i *ABCG2 c.421C>A*. Heterozigotni i varijantni homozigotni ispitanici uspoređivani su sa svojim kontrolama divljeg tipa za ostalne koncentracije lamotrigina (standardizirane po dozi) s prilagodbom prema dobi, spolu, tjelesnoj težini, ostalim ispitivanim polimorfizmima i razinama izloženosti valproatu. Za „ujednačavanje“ vrijednosti kovarijata korišteno je uravnoteživanje entropije.

Rezultati: Uključena je ukupno 471 osoba s epilepsijom, od čega je njih 328 (69.6%) bilo na monoterapiji, a 143 su bili na politerapiji lamotrigina i valproata. Rezultati su pokazali da su nositelji varijantnog alela *ABCG2 c.421C>A* imali koncentracije lamotrigina niže za 25% u odnosu na kontrole divljeg tipa u slučaju da su ispitanici bili na monoterapiji lamotriginom (valproat 0) ili na kombiniranoj terapiji lamotrigina i valproata (LAM + VAL) ukoliko su koncentracije valproata bile ispod razine kvantifikacije (engl. *below the lower limit of quantification*, BLOQ). Nije dokazana razlika u koncentracijama lamotrigina između nositelja varijantnog alela i nositelja divljeg tipa kod ispitanika na kombiniranoj terapiji LAM + VAL ukoliko je koncentracija valproata bila <364 µmol/L [„nizak valproat“ (vrijednosti GMR oko 1.0)], dok su nositelji varijantnog alela imali 30% više koncentracije lamotrigina ukoliko je valproat bio >364 µmol/L [„visok valproat“ - unutar terapijskog raspona ili više (GMR =1.37,

1.03-1.82 frekvencionistička procjena, 1.31, 0.93-1.84, Bayes procjena)]. Nadalje, procijenjen je efekt valproata na dvije razine *ABCG2 c.421C>A* polimorfizma, tj. u kontrola „divljeg tipa“ i nositelja varijantnog alela. Efekt „visokog valproata“ bio je izraženiji u nositelja varijantnog alela nego u homozigota divljeg tipa (omjer GMR 1.80), kao i efekt „niskog valproata“ (omjer GMR 1.50).

Ostatne koncentracije lamotrigina (standardizirane prema dozi) bile su podjednake u nositelja varijantnih alela i kontrola divljeg tipa za *UGT2B7 c.-161C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G* i *ABCB1 c.1236C>T*.

Zaključak: Rezultati istraživanja sugeriraju da polimorfizam *ABCG2 c.421C>A* moderira učinak valproata na izloženost lamotriginu, dok polimorfizmi *UGT2B7 c.-161C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G* i *ABCB1 c.1236C>T* nemaju relevantnog učinka na bioraspoloživost lamotrigina u osoba s epilepsijom.

Ključne riječi: lamotrigin, valproat, genski polimorfizam, *UGT2B7 c.-161C>T*, *UGT1A4*3 c.142T>G*, *ABCB1 c.1236C>T*, *ABCG2 c.421C>A*.

9. SUMMARY

Doctoral thesis

Influence of genetic polymorphisms of UGT1A4 and UGT2B7 enzymes and ABCB1 and ABCG2 transport proteins on lamotrigine serum concentrations

Ivana Šušak Sporiš, 2024.

Introduction: Lamotrigine is characterized by significant interindividual variability in pharmacokinetic parameters and, consequently, there is variability in efficacy and the risk for adverse reactions. The role of polymorphisms of UGT1A4 and UGT2B7 metabolic enzymes as well as ABCB1 and ABCG2 transport proteins on the lamotrigine bioavailability has not yet been clarified.

Purpose: To estimate whether epilepsy patients with variant *UGT2B7* *c.-161C>T* (rs7668258), *UGT1A4**3 *c.142T>G* (rs2011425), *ABCB1* *c.1236C>T* (rs1128503) and *ABCG2* *c.421C>A* (rs2231142) alleles differ from their wild-type (wt) peers in exposure to lamotrigine.

Methods: Consecutive adults on lamotrigine monotherapy or lamotrigine and valproate co-treatment undergoing routine therapeutic drug monitoring, otherwise generally healthy and free of interacting drugs, were genotyped for *UGT2B7* *-161C>*, *UGT1A4**3 *c.142T>G*, *ABCB1* *c.1236C>T* (rs1128503) and *ABCG2* *c.421C>A*. Heterozygous and variant homozygous subjects were compared to their wt controls for dose-adjusted lamotrigine troughs with adjustment for age, sex, body weight, other evaluated polymorphisms, and level of exposure to valproate using covariate entropy balancing.

Results: Of the 471 included patients, 328 (69.6%) were on monotherapy and 143 were co-treated with valproate. The results showed that *c.421C>A* variant allele carriers had by 25% lower lamotrigine concentrations compared to wild-type controls if the subjects were on lamotrigine monotherapy or lamotrigine and valproate (LAM + VAL) polytherapy if valproate troughs were below the lower limit of quantification (BLOQ). Variant *c.421C>A*

allele had no obvious effect on lamotrigine troughs if valproate concentrations were <364 $\mu\text{mol/L}$ [low valproate (GMR 1.0)], and increased lamotrigine troughs by 30% if valproate > 364 $\mu\text{mol/L}$ [target/high valproate (GMR =1.37, 1.03-1.82 frequentist; 1.31, 0.93-1.84, Bayesian)]. Furthermore, we evaluated the effect of valproate on two levels of the *ABCG2* *c.421C>A* polymorphism ("wild type" controls and variant allele carriers). The "high valproate" effect was more pronounced in the variant allele carriers than in the wild-type homozygotes (GMR ratio 1.80), as was the "low valproate" effect (GMR ratio 1.50). Dose-adjusted lamotrigine troughs in *UGT2B7* *c.-161C>T*, *UGT1A4*3* *c.142T>G* and *ABCB1* *c.1236C>T* variant allele carriers were closely similar to those in their wt controls. **Conclusion:** Data suggests that *ABCG2* *c.421C>A* polymorphism moderates the effect of valproate on exposure to lamotrigine, while dose-adjusted lamotrigine troughs in epilepsy patients with variant *UGT2B7* *c.-161C>T*, *UGT1A4*3* *c.142T>G* or *ABCB1* *c.1236C>T* alleles are equivalent to those in their respective wt peers.

Key words: lamotrigine, valproate, genetic polymorphism, *UGT2B7* *c.-161C>T*, *UGT1A4*3* *c.142T>G*, *ABCB1* *c.1236C>T*, *ABCG2* *c.421C>A*.

10. POPIS LITERATURE

1. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, i sur. ILAE official report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014;55(4):475–82.
2. Falco-Walter JJ, Scheffer IE, Fisher RS. The new definition and classification of seizures and epilepsy. *Epilepsy Res*. 2018;139:73-9.
3. World Health Organisation. Epilepsy - fact sheets. [Internet]. 09.02.2023. [pristupljeno 20.04.2023.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>
4. Davis J, Roberts R, Davidson DL, Norman A, Ogston S, Grimshaw JM, i sur. Implementation strategies for a Scottish national epilepsy guideline in primary care: results of the Tayside Implementation of Guidelines in Epilepsy Randomized (TIGER) trial. *Epilepsia*. 2004;45(1):28-34.
5. Bielen I, Cvitanovic-Sojat L, Bergman-Markovic B, Kosicek M, Planjar-Prvan M, Vuksic L, i sur. Prevalence of epilepsy in Croatia: a population-based survey. *Acta Neurol Scand*. 2007;116(6):361-7.
6. Thijs RD, Surges R, O'Brien TJ, Sander JW. Epilepsy in adults. *Lancet*. 2019;393(10172):689-701.
7. Bašić S, Petelin Gadže Ž. Epilepsije. U: Brinar V, urednik. *Neurologija za medicinare*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
8. Petelin Gadže Ž, Nanković S, Šulentić V, Poljaković Z, Čajić I, Bujan Kovač A. Uvod. U: *Epilepsija, dijagnostički i terapijski priručnik*. Urednici: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
9. Goldenberg MM. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment. *P T*. 2010;35(7):392-415.
10. Abou-Khalil BW. Update on Antiepileptic Drugs. *Continuum (Minneapolis)*. 2019; 25:508–36.
11. Bašić S, Petelin Gadže Ž, Prpić I, Poljaković Z, Malenica M, Gjergja Juraški R, i sur. Smjernice za farmakološko liječenje epilepsije. *Liječ Vjesn*. 2021;143:429–50.

12. Kwan P, Brodie MJ. Effectiveness of first antiepileptic drug. *Epilepsia*. 2001; 42(10):1255-60.
13. Brodie MJ. Pharmacological Treatment of drug-resistant epilepsy in adults: a practical guide. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2016;16(9):82.
14. Rugg-Gunn F, Miserocchi A, McEvoy A. Epilepsy surgery. *Pract Neurol*. 2020;20(1):4-14.
15. Canevini MP, De Sarro G, Galimberti CA, Gatti G, Licchetta L, Malerba A, i sur.; SOPHIE Study Group. Relationship between adverse effects of antiepileptic drugs, number of coprescribed drugs, and drug load in a large cohort of consecutive patients with drug-refractory epilepsy. *Epilepsia*. 2010;51(5):797-804.
16. Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Božina N, ur. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Zagreb: Medicinska Naklada; 2019.
17. Božina N. Farmakogenomika antiepileptika. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, ur. Epilepsija, dijagnostički i terapijski priručnik. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
18. Patsalos PN, Berry DJ, Bourgeois BF, Cloyd JC, Glauser TA, Johannessen SI, i sur. Antiepileptic drugs – best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: A position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on therapeutic strategies, *Epilepsia*. 2008;49:1239-76.
19. Huić M, Francetić I. Interakcije. U: Francetić I, Vitezić D, ur. Klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
20. Božina N, Pejnović L. Osnove farmakogenetika. U: Božina N, Macolić Šarinić V, ur. Farmakogenomika i farmakovigilancija, sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije, upute i smjernice. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
21. Johannessen SI, Landmark CJ. Antiepileptic drug interactions - principles and clinical implications. *Curr Neuropharmacol*. 2010;8(3):254-67.
22. Schmidt D, Schachter SC. Drug treatment of epilepsy in adults. *BMJ*. 2014;348:g254.
23. Medicines.org.uk Lamictal. Summary of product characteristics. [Internet] 13.07.2023. [pristupljeno 19.07.2023.]. Dostupno na: <http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/4228>

24. Mitra-Ghosh T, Callisto SP, Lamba JK, Rimmel RP, Birnbaum AK, Barbarino JM, i sur. PharmGKB summary: lamotrigine pathway, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics*. 2020;30(4):81-90.
25. Leach MJ, Marden CM, Miller AA. Pharmacological studies on lamotrigine, a novel potential antiepileptic drug: II. Neuro-chemical studies on the mechanism of action. *Epilepsia*. 1986;27:490–7.
26. Patsalos PN. Lamotrigine. U: *Antiepileptic drug interactions*. 3. izd. Springer; 2016. str. 55-59.
27. Shorvon S. Lamotrigine. U: *Handbook of epilepsy treatment*. 3. izd. Wiley – Blackwell; 2010. str. 192-199.
28. Rowland A, Elliot DJ, Williams JA, Mackenzie PI, Dickinson RG, Miners JO. In vitro characterization of lamotrigine N2-glucuronidation and the lamotrigine-valproic acid interaction. *Drug Metab Dispos*. 2006;34(6):1055-62.
29. Hussein Z, Posner J. Population pharmacokinetics of lamotrigine monotherapy in patients with epilepsy: retrospective analysis of routine monitoring data. *Br J Clin Pharmacol*. 1997;43(5):457-65.
30. Lovrić M. Terapijsko praćenje antiepileptika. U: Petelin Gadže Ž, Poljaković Z, Nanković S, Šulentić V, ur. *Epilepsija, dijagnostički i terapijski priručnik*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
31. Johannessen SI, Tomson T. Pharmacokinetic variability of newer antiepileptic drugs: when is monitoring needed? *Clin Pharmacokinet*. 2006;45:1061-75.
32. Goa KL, Ross SR, Chrisp P. Lamotrigine. A review of its pharmacological properties and clinical efficacy in epilepsy. *Drugs*. 1993;46:152-76.
33. Milovanovic JR, Jankovic SM. Population pharmacokinetics of lamotrigine in patients with epilepsy. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2009;47:752–60.
34. Punyawudho B, Ramsay RE, Macias FM, Rowan AJ, Collins JF, Brundage RC, i sur. Population pharmacokinetics of lamotrigine in elderly patients. *J Clin Pharmacol*. 2008;48(4):455-63.
35. Rivas N, Buelga DS, Elger CE, Santos-Borbujo J, Otero MJ, Domínguez-Gil A, i sur. Population pharmacokinetics of lamotrigine with data from therapeutic drug monitoring in German and Spanish patients with epilepsy. *Ther Drug Monit*. 2008;30(4):483-9.

36. Pennell PB, Newport DJ, Stowe ZN, Helmers SL, Montgomery JQ, Henry TR. The impact of pregnancy and childbirth on the metabolism of lamotrigine. *Neurology*. 2004;62(2):292-5.
37. Reimers A, Helde G, Bråthen G, Brodtkorb E. Lamotrigine and its N2-glucuronide during pregnancy: the significance of renal clearance and estradiol. *Epilepsy Res*. 2011;94(3):198-205.
38. Ohman I, Beck O, Vitols S, Tomson T. Plasma concentrations of lamotrigine and its 2-N-glucuronide metabolite during pregnancy in women with epilepsy. *Epilepsia*. 2008;49(6):1075-80.
39. Chen H, Yang K, Choi S, Fischer JH, Jeong H. Up-regulation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 by 17beta-estradiol: a potential mechanism of increased lamotrigine elimination in pregnancy. *Drug Metab Dispos*. 2009;37(9):1841-7.
40. Sabers A, Ohman I, Christensen J, Tomson T. Oral contraceptives reduce lamotrigine plasma levels. *Neurology*. 2003;61(4):570-1.
41. Christensen J, Petrenaite V, Atterman J, Sidenius P, Ohman I, Tomson T, i sur. Oral contraceptives induce lamotrigine metabolism: evidence from a double-blind, placebo-controlled trial. *Epilepsia*. 2007;48(3):484-9.
42. May TW, Rambeck B, Jürgens U. Influence of oxcarbazepine and methsuximide on lamotrigine concentrations in epileptic patients with and without valproic acid comedication: results of a retrospective study. *Ther Drug Monit*. 1999;21(2):175-81.
43. Yuen AW, Land G, Weatherley BC, Peck AW. Sodium valproate acutely inhibits lamotrigine metabolism. *Br J Clin Pharmacol*. 1992;33(5):511-3.
44. Reinsberger C, Dorn T, Krämer G. Smoking reduces serum levels of lamotrigine. *Seizure*. 2008;17(7):651-3.
45. Gulcebi MI, Ozkaynakçı A, Goren MZ, Aker RG, Ozkara C, Onat FY. The relationship between UGT1A4 polymorphism and serum concentration of lamotrigine in patients with epilepsy. *Epilepsy Res*. 2011;95(1-2):1-8.
46. Welty TE, Gidal BE, Duan J, Privitera MD, Berg MJ, Krebill R, i sur. Coffee and cigarette smoking interactions with lamotrigine. *Epilepsy Behav*. 2021;116:107741.

47. Petrenaite V, Öhman I, Jantzen FPT, Ekström L. Effect of UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15, UGT2B17 and ABC1B polymorphisms on lamotrigine metabolism in Danish patients. *Epilepsy Res.* 2022;182:106897.
48. Perucca E. Pharmacological and therapeutic properties of valproate: a summary after 35 years of clinical experience. *CNS Drugs.* 2002;16:695-714.
49. Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, Leeder JS, Song W, Birnbaum AK. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2013;23:236-41.
50. Kiang TK, HO PC, Anari MR, Tong V, Abbott FS, Chang TK. Contribution of CYP 2C9, CYP2A6 and CYP2B6 to valproic acid metabolism in hepatic microsomes from individuals with the individuals with the CYP2C9*1/*1 genotype. *Toxicol Sci.* 2006;94:261-71.
51. Sandson NB, Marcucci C, Bourke DL, Smith-Lamacchia R. An interaction between aspirin and valproate: the relevance of plasma protein displacement drug-drug interactions. *Am J Psychiatry.* 2006; 163:1891-6.
52. Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. *N Engl J Med.* 2000; 342(5):314-9.
53. Loscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 2009;50(1):1-23.
54. Walker LE, Mirza N, Yip VLM, Marson AG, Pirmohamed M. Personalized medicine approaches in epilepsy. *J Intern Med.* 2015;277(2):218-34.
55. Božina N, Bradamante V, Lovrić M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2009;60:217-42.
56. Caudle KE, Rettie AE, Whirl-Carrillo M, Smith LH, Mintzer S, Lee MT, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guidelines for CYP2C9 and HLA-B genotypes and phenytoin dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(5):542-8.
57. US Food and Drug Administration. Precision Medicine. Table of Pharmacogenetic Associations. [Internet]. 26.10.2022. [pristupljeno 18.06.2023.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/medical-devices/precision-medicine/table-pharmacogenetic-associations>

58. Rendić S, Medić-Šarić M. Reakcije I. faze, oksidoredukcijske reakcije i reakcije hidrolize. U: Medić-Šarić M, ur. Metabolizam lijekova i odabranih ksenobiotika. Zagreb: Medicinska naklada, 2013, str. 15-170.
59. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;96(3):340-8.
60. CYP2C9 allele nomenclature. [Internet, pristupljeno 27.04.2023.]. Dostupno na: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2c9.htm>
61. Johnson JA, Caudle KE, Gong L, Whirl-Carrillo M, Stein CM, Scott SA, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Pharmacogenetics-Guided Warfarin Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2017;102(3):397-404.
62. CYP2C19 allele nomenclature. [Internet, pristupljeno 27.04.2023.]. Dostupno na: <https://www.pharmvar.org/htdocs/archive/cyp2c19.htm>
63. Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, Hulot JS, Thron CF, Altman RB, i sur. PharmaGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenom.* 2012;22:159-65.
64. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C19 Genotype and Clopidogrel Therapy: 2013 Update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:317-23.
65. Meech R, Hu DG, McKinnon RA, Mubarakah SN, Haines AZ, Nair PC, i sur. The UDP-Glycosyltransferase (UGT) Superfamily: New Members, New Functions, and Novel Paradigms. *Physiol Rev.* 2019;99(2):1153-222.
66. Ehmer U, Vogel A, Schütte JK, Krone B, Manns MP, Strassburg CP. Variation of hepatic glucuronidation: novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT 1A4. *Hepatology.* 2004;39(4):970—7.
67. Sun D, Chen G, Dellinger RW, Duncan K, Fang JL, Lazarus P. Characterization of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen glucuronidation by human UGT1A4 variants. *Breast Cancer Res.* 2006;8(4):R50.
68. Benoit-Biancamano MO, Adam JP, Bernard O, Court MH, Leblanc MH, Caron P, i sur. A pharmacogenetics study of the human glucuronosyltransferase UGT1A4. *Pharmacogenet Genomics.* 2009;19:945-54.

69. Wang Q, Liang M, Dong Y, Yun W, Qiu F, Zhao L, i sur. Effects of UGT1A4 genetic polymorphisms on serum lamotrigine concentrations in Chinese children with epilepsy. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2015;30:209–13.
70. Chang Y, Yang L, Zhang M, Liu SY. Correlation of the UGT1A4 gene polymorphism with serum concentration and therapeutic efficacy of lamotrigine in Han Chinese of Northern China. *Eur J Clin Pharmacol.* 2014;70:941-6.
71. Sawyer MB, Innocenti F, Das S, Cheng C, Ramirez J, Pantle-Fisher FH, i sur. A pharmacogenetics study of uridine diphosphateglucuronosyltransferase 2B7 in patients receiving morphine. *Clin Pharmacol Ther.* 2003;73:566–74.
72. Hu DG, Meech R, Lu L, McKinnon RA, Mackenzie PI. Polymorphisms and haplotypes of the UDPglucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:854–62.
73. Daly AK. Pharmacogenetics of drug metabolizing enzymes in the United Kingdom population: review of current knowledge and comparison with selected European populations. *Drug Metab Pers Ther.* 2015;30:165–74.
74. Bhasker CR, McKinnon W, Stone A, Lo AC, Kubota T, Ishizaki T, i sur. Genetic polymorphism of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) at amino acid 268: ethnic diversity of alleles and potential clinical significance. *Pharmacogenetics.* 2000;10:679–85.
75. Kim SC, Kim MG. Meta-analysis of the Influence of UGT Genetic Polymorphisms on Lamotrigine Concentration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2019;124(2):163-9.
76. Holthe M, Rakvåg TN, Klepstad P, Idle JR, Kaasa S, Krokan HE, i sur. Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (UGT2B7) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients. *Pharmacogenomics J.* 2003; 3:17-26.
77. Nielsen LM, Sverrisdóttir E, Stage TB, Feddersen S, Brøsen K, Christrup LL, i sur. Lack of genetic association between OCT1, ABCB1, and UGT2B7 variants and morphine pharmacokinetics. *Eur J Pharm Sci.* 2017;99:337-42.
78. Matic M, Norman E, Rane A, Beck O, Andersson M, Elens L, i sur. Effect of UGT2B7 -900G>A (-842G>A; rs7438135) on morphine glucuronidation in preterm newborns: results from a pilot cohort. *Pharmacogenomics.* 2014;15(12):1589-97.

79. Darbari DS, van Schaik RH, Capparelli EV, Rana S, McCarter R, van den Anker J. UGT2B7 promoter variant -840G>A contributes to the variability in hepatic clearance of morphine in patients with sickle cell disease. *Am J Hematol*. 2008 Mar;83(3):200-2.
80. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(1):29-44.
81. Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10:1337–54.
82. Kwan P, Brodie MJ. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy. *Epilepsia*. 2005;46(2):224–35.
83. Silverman JA, Raunio H, Gant TW, Thorgeirsson SS. Cloning and characterization of a member of the rat multidrug resistance (mdr) gene family. *Gene*. 1991;106(2):229-36.
84. Ueda K, Shimabuku AM, Konishi H, Fujii Y, Takebe S, Nishi K, et al. Functional expression of human P-glycoprotein in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett*. 1993;330(3):279-82.
85. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(16):1295-302.
86. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008;38:802–32.
87. Cascorbi I. Role of pharmacogenetics of ATP-binding cassette transporters in the pharmacokinetics of drugs. *Pharmacol Ther*. 2006;112:457–73.
88. Dallas S, Miller DS, Bendayan R. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol Rev*. 2006;58(2):140-61.
89. Potschka H, Brodie MJ. Pharmacoresistance. *Handb Clin Neurol*. 2012;108:741-57.
90. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JH. Part 2: pharmacogenetics variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist*. 2011;16:820-34.
91. Komar AA. Silent SNPs: impact on gene function and phenotype. *Pharmacogenomics*. 2007;8(8):1075–80.

92. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmöller J, Johné A, i sur. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3473-8.
93. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:48-58.
94. Llorente L, Richaud-Patin Y, Díaz-Borjón A, Alvarado de la Barrera C, Jakez-Ocampo J, de la Fuente H, i sur. Multidrug resistance-1 (MDR-1) in rheumatic autoimmune disorders. Part I: Increased P-glycoprotein activity in lymphocytes from rheumatoid arthritis patients might influence disease outcome. *Joint Bone Spine*. 2000;67(1):30-9.
95. Farrell RJ, Murphy A, Long A, Donnelly S, Cherikuri A, O'Toole D, i sur. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology*. 2000;118(2):279-88.
96. Siddiqui A, Kerb R, Weale ME, Brinkmann U, Smith A, Goldstein DB, i sur. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med*. 2003;348(15):1442-8.
97. Zimprich F, Sunder-Plassmann R, Stogmann E, Gleiss A, Dal-Bianco A, Zimprich A, i sur. Association of an ABCB1 gene haplotype with pharmaco-resistance in temporal lobe epilepsy. *Neurology*. 2004;63(6):1087-9.
98. Soranzo N, Cavalleri GL, Weale ME, Wood NW, Depondt C, Marguerie R, i sur. Identifying candidate causal variants responsible for altered activity of the ABCB1 multidrug resistance gene. *Genome Res*. 2004;14(7):1333-44.
99. Hung CC, Jen Tai J, Kao PJ, Lin MS, Liou HH. Association of polymorphisms in NR1I2 and ABCB1 genes with epilepsy treatment responses. *Pharmacogenomics*. 2007;8(9):1151-8.
100. Seo T, Ishitsu T, Ueda N, Nakada N, Yurube K, Ueda K, i sur. ABCB1 polymorphisms influence the response to antiepileptic drugs in Japanese epilepsy patients. *Pharmacogenomics*. 2006;7(4):551-61.
101. Tan NC, Heron SE, Scheffer IE, Pelekanos JT, McMahon JM, Vears DF, i sur. Failure to confirm association of a polymorphism in ABCB1 with multidrug-resistant epilepsy. *Neurology*. 2004;63(6):1090-2.
102. Sills GJ, Mohanraj R, Butler E, McCrindle S, Collier L, Wilson EA, i sur. Lack of association between the C3435T polymorphism in the human multidrug

- resistance (MDR1) gene and response to antiepileptic drug treatment. *Epilepsia*. 2005;46(5):643-7.
103. Kim YO, Kim MK, Woo YJ, Lee MC, Kim JH, Park KW, i sur. Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance 1 gene in Korean epileptics. *Seizure*. 2006;15(1):67-72.
 104. Haerian BS, Lim KS, Tan CT, Raymond AA, Mohamed Z. Association of ABCB1 gene polymorphisms and their haplotypes with response to antiepileptic drugs: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2011;12(5):713-25.
 105. Bournissen FG, Moretti ME, Juurlink DN, Koren G, Walker M, Finkelstein Y. Polymorphism of the MDR1/ABCB1 C3435T drug-transporter and resistance to anticonvulsant drugs: a meta-analysis. *Epilepsia*. 2009;50(4):898-903.
 106. Meng H, Guo G, Ren J, Zhou H, Ge Y, Guo Y. Effects of ABCB1 polymorphisms on plasma carbamazepine concentrations and pharmaco-resistance in Chinese patients with epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2011;21(1):27-30.
 107. Dong L, Luo R, Tong Y, Cai X, Mao M, Yu D. Lack of association between ABCB1 gene polymorphisms and pharmaco-resistant epilepsy: an analysis in a western Chinese pediatric population. *Brain Res*. 2011;1391:114-24.
 108. Tang K, Ngoi SM, Gwee PC, Chua JM, Lee EJ, Chong SS, i sur. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetics*. 2002;12(6):437-50.
 109. Seo T, Ishitsu T, Oniki K, Abe T, Shuto T, Nakagawa K. ABCC2 haplotype is not associated with drug-resistant epilepsy. *J Pharm Pharmacol*. 2008;60(5):631-5.
 110. Sporis D, Bozina N, Basić S, Lovrić M, Babić T, Susak I, Marković I. Lack of association between polymorphism in ABCC2 gene and response to antiepileptic drug treatment in Croatian patients with epilepsy. *Coll Antropol*. 2013 Mar;37(1):41-5.
 111. Grover S, Kukreti R. A systematic review and meta-analysis of the role of ABCC2 variants on drug response in patients with epilepsy. *Epilepsia*. 2013;54(5):936-45.
 112. Qian L, Fang S, Yan YL, Zeng SS, Xu ZJ, Gong ZC. The ABCC2 c.-24C>T polymorphism increases the risk of resistance to antiepileptic drugs: A meta-analysis. *J Clin Neurosci*. 2017;37:6-14.

113. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ, Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001;61(8):3458-64.
114. Zhang W, Sun S, Zhang W, Shi Z. Polymorphisms of ABCG2 and its impact on clinical relevance. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;503(2):408-13.
115. Zhang W, Yang Y, Dong Z, Shi Z, Zhang JT. Single-nucleotide polymorphisms in a short basic motif in the ABC transporter ABCG2 disable its trafficking out of endoplasmic reticulum and reduce cell resistance to anticancer drugs. *J Biol Chem.* 2019;294(52):20222-32.
116. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, et al. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm Res.* 2009;26(2):469-79.
117. Keskitalo JE, Zolk O, Fromm MF, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. ABCG2 polymorphism markedly affects the pharmacokinetics of atorvastatin and rosuvastatin. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(2):197-203.
118. Mirošević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Muačević Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics.* 2015;16(8):803-15.
119. Zhou J, Argikar UA, Rimmel RP. Functional analysis of UGT1A4 (p24T) i UGT1A4(L48V) variant enzymes. *Pharmacogenomics.* 2011;12:1671-9.
120. Liu L, Zhao L, Wang Q, Qiu F, Wu X, Ma Y. Influence of valproic acid concentration and polymorphism of UGT1A4*3, UGT2B7 -161C>T and UGT2B7*2 on serum concentration of lamotrigine in Chinese epileptic children. *Eur J Clin Pharmacol.* 2015;71:1341-7.
121. Reimers A, Sjursten W, Helde G, Brodtkorb E. Frequencies of UGT1A4*2 (P24T) and *3 (L48V) and their effects on serum concentrations of lamotrigine. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2016;41(2):149-55.
122. Du Z, Jiao Y, Shi L. Association of UGT2B7 and UGT1A4 Polymorphisms with Serum Concentration of Antiepileptic Drugs in Children. *Med Sci Monit.* 2016;22:4107-13.
123. Milosheska D, Lorber B, Vovk T, Kastelic M, Dolžan V, Grabnar I. Pharmacokinetics of lamotrigine and its metabolite N-2-glucuronide: Influence of

- polymorphism of UDPglucuronosyltransferases and drug transporters. *Br J Clin Pharmacol.* 2016;82:399-411.
124. Hu DG, Meech R, Lu L, McKinnon RA, Mackenzie PI. Polymorphisms and haplotypes of the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 gene promoter. *Drug Metab Dispos.* 2014;42:854-62.
 125. Saito K, Moriya H, Sawaguchi T, Hayakawa T, Nakahara S, Goto A, i sur. Haplotype analysis of UDP-glucuronocyltransferase 2B7 gene (UGT2B7) polymorphisms in healthy Japanese subjects. *Clin Biochem.* 2006;39(3):303-8.
 126. Blanca Sanchez M, Herranz JL, Leno C, Arteaga R, Oterino A, Valdizan EM, i sur. UGT2B7 -161C>T polymorphism is associated with lamotrigine concentration-to-dose ratio in a multivariate study. *Ther Drug Monit.* 2010;32:177–84.
 127. Singkham N, Towanabut S, Lertkachatarn S, Punyawudho B. Influence of the UGT2B7 -161C>T polymorphism on the population pharmacokinetics of lamotrigine in Thai patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2013;69:1285-91.
 128. Xu C, Gao J, Zhang HF, Gao N, Guo YY, Fang Y, i sur. Content and activities of UGT2B7 in human liver in vitro and predicted in vivo: a bottom-up approach. *Drug Metab Dispos.* 2018;46:1351-9.
 129. Ortega-Vazquez A, Fricke-Galindo I, Dorado P, Jung-Cook H, Martinez-Juarez IE, Monroy-Jaramillo N, i sur. Influence of genetic variants and antiepileptic drug co-treatment on lamotrigine concentration in Mexican-Mestizo patients with epilepsy. *Pharmacogenet J.* 2020;20:845-56.
 130. UGT alleles Nomenclature. [Internet, pristupljeno 25.05.2023.]. Dostupno na <https://www.pharmacogenomics.pha.ulaval.ca/ugt-alleles-nomenclature/>
 131. Saeki M, Saito Y, Jinno H, Sai K, Hachisuka A, Kaniwa N, i sur. Genetic variations and haplotypes of UGT1A4 in a Japanese population. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2005;20(2):144-51.
 132. Mori A, Maruo Y, Iwai M, Sato H, Takeuchi Y (2005) UDP-glucuronosyltransferase 1A4 polymorphisms in a Japanese population and kinetics of clozapine glucuronidation. *Drug Metab Pharmacokinet.* 33:672-5.
 133. Lopez M, Dorado P, Ortega A, Penas-Lledo E, Monroy N, Silva-Zolezzi I, i sur. Interethnic differences in UGT1A4 genetic polymorphisms between Mexican Mestizo and Spanish populations. *Mol Biol Rep.* 2013;40:3187-92.

134. Luna-Tortós C, Fedrowitz M, Löscher W. Several major antiepileptic drugs are substrates for human P-glycoprotein. *Neuropharmacology*. 2008;55(8):1364-75.
135. Römermann K, Helmer R, Löscher W. The antiepileptic drug lamotrigine is a substrate of mouse and human breast cancer resistance protein (ABCG2). *Neuropharmacology*. 2015;93:7-14.
136. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz L, Klein TE, i sur. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics*. 2011;21:152-61.
137. Lovrić M, Božina N, Hajnšek S, Kuzman MR, Sporiš D, Lalić Z, i sur. Association between lamotrigine concentrations and ABCB1 polymorphisms in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit*. 2012;34(5):518-25.
138. Zhou Y, Wang X, Li H, Zhang J, Chen Z, Xie W, i sur. Polymorphisms of ABCG2, ABCB1 and HNF4 α are associated with Lamotrigine trough concentrations in epilepsy patients. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2015;30(4):282-7.
139. Shen CH, Zhang YX, Lu RY, Jin B, Wang S, Liu ZR, i sur. Specific OCT1 and ABCG2 polymorphisms are associated with Lamotrigine concentrations in Chinese patients with epilepsy. *Epilepsy Res*. 2016;127:186-90.
140. Fohner AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for ABCG2. *Pharmacogenet Genomics*. 2017;27:420-7.
141. Klarica Domjanović I, Lovrić M, Trkulja V, Petelin-Gadže Ž, Ganoci L, Čajić I, i sur. Interaction between ABCG2 421C>A polymorphism and valproate in their effects on steady-state disposition of lamotrigine in adults with epilepsy. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(9):2106-19.
142. US Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies—Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. [Internet]. 2020. [pristupljeno 15.01.2023.]. Dostupno na <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-interactions-relevant-regulatory-guidance-and-policy-documents>.
143. European Medicines Agency EMA/CHMP/37646/2009, Use of pharmacogenetic methodologies in the pharmacokinetic evaluation of medicinal products. [Internet]. 2012. [pristupljeno 15.01.2023.]. Dostupno na

- <https://www.ema.europa.eu/en/use-pharmacogenetic-methodologies-pharmacokinetic-evaluation-medicinal-products-scientific-guideline>
144. Chatzistebanidis D, Georgiou I, Kyritsis AP, Markoula S. Functional impact and prevalence of polymorphisms involved in the hepatic glucuroniation of valproic acid. *Pharmacogenomics*. 2012;13:1055-71.
 145. Anderson GD, Cau MK, Gidal BE, Harris SJ, Levi RH, Lai AA, i sur. Bidirectional interaction of valproate and lamotrigine in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 1996;60:145-56.
 146. Mataringa MI, May TW, Rambeck B. Does lamotrigine influence valproate concentrations. *Ther Drug Monit*. 2002;24:632-6.
 147. Methaneethorn J. A systematic review of population pharmacokinetics of valproic acid. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84:816-34.
 148. Pearl J. *Causality: models, reasoning and inference*. 2. izd. Cambridge: University Press; 2009.
 149. Lash TL, VanderWeele TJ, Haneuse S, Rothman KJ. *Confounding and confounders*. U: *Modern epidemiology*, 4. izd. Wolters Kluwer 2021.
 150. Haslemo T, Loryan I, Ueda N, Mannheimer B, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, i sur. UGT1A4*3 encodes significantly increased glucuronidation of olanzapine in patients on maintenance treatment and in recombinant systems. *Clin Pharmacol Ther*. 2012;92:221-7.
 151. Textor J, van der Zander B, Gilthorpe MS, Liskiewicz M, Elliot GTH. Robust causal inference using directed acyclic graphs: the R package “dagitty”. *Int J Epidemiol*. 2016;45:1887-94.
 152. Hansen BB, Olsen Klopfer S. Optimal full matching and related designs via network flows. *J Computational Global Stat*. 2006;15:609-27.
 153. Ho DE, Imai K, King G, Stuart EA. MatchIT: nonparametric preprocessing for parametric causal inference. *J Stat Software*. 2011;42:1-28.
 154. King G, Nielsen R. Why propensity scores should not be used for matching. *Polit Anal*. 2019;27:435-54.
 155. Hainmueller J. Entropy balancing for causal effects: a multivariate reweighting method to produce balanced samples in observational studies. *Political Analysis*. 2012;20:25-46.

156. Greifer N. WeightIt: Weighting for Covariate Balance in Observational Studies. [Internet]. 2022. Dostupno na: <https://ngreifer.github.io/WeightIt/>, <https://github.com/ngreifer/WeightIt>
157. Gaunt TR, Rodríguez S, Day IN. Cubic exact solutions for the estimation of pairwise haplotype frequencies: implications for linkage disequilibrium analyses and a web tool “CubeX”. *BMC Bioinformatics*. 2007;8(1):428.
158. Goodrich B, Gabry J, Ali I, Brilleman S. rstanarm: Bayesian applied regression modeling via Stan. R package version 2.21.3, 2022. Dostupno na: <https://mc-stan.org/rstanarm/>
159. VanderWeele TJ, Ding P. Sensitivity analysis in observational research: introducing the E-value. *Ann Intern Med*. 2017;167: 268-74.
160. Schneeweiss S. Sensitivity analysis and external adjustment for unmeasured confounders in epidemiologic database studies of therapeutics. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2006;15:291-303.
161. Heine D. The episensr package: basic sensitivity analysis of epidemiological results. 2021. doi:10.5281/zenodo.4554553, R package version 1.1.0, <https://dhaine.github.io/episensr/>
162. Rubinchik-Stern M, Shmuel M, Bar J, Kovo M, Eyal S. Adverse placental effects of valproic acid: studies in perfused human placentas. *Epilepsia*. 2018;59:993-1003.
163. Borić-Bilušić A, Božina N, Lalić Z, Lovrić M, Nađ-Škegro S, Penezić L, Barišić K, Trkulja V. Loss of function ABCG2 c.421 (rs2231142) polymorphism increases steady-state exposure to mycophenolic acid in stable renal transplant recipients: exploratory matched cohort study. *Adv Ther*. 2023;40(2):601-18.
164. FDA. Lamictal. Clinical Pharmacology review. [Internet]. 2007. [Pristupljeno 21.01.2023.]. Dostupno na: https://www.fda.gov/files/drugs/published/020241s032_020764s025 Lamotrigine Clinpharm BPCA (fda.gov)
165. Suzuki T, Mihara K, Nagai G, Kagawa S, Nakamura A, Nemoto K, Kondo T. Relationship between UGT1A4 and UGT2B7 polymorphisms and steady-state plasma concentrations of lamotrigine in patients with treatment-resistant depressive disorder receiving lamotrigine as augmentation therapy. *Ther Drug Monit*. 2019;41:86-90.

166. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport-an update. *AAPS J.* 2015;17(1):65-82.
167. Lee CA, O'Connor MA, Ritchie TK, Galetin A, Cook JA, Ragueneau-Majlessi I, i sur. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metab Dispos.* 2015;43:490-509.
168. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, i sur. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res.* 2004;21(10):1895-903.
169. Imai Y, Nakane M, Kage K, Tsukahara S, Ishikawa E, Tsuruo T, i sur. C421A polymorphism in the human breast cancer resistance protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol Cancer Ther.* 2002;1:611–6.
170. Mirošević Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolic Šarinic V. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics.* 2013;14(12):1419-31.
171. Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, i sur. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(23):1739-42.
172. Urquhart BL, Ware JA, Tirona RG, Ho RH, Leake BF, Schwarz UI, i sur. Breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug disposition: intestinal expression, polymorphisms and sulfasalazine as an in vivo probe. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18:439–48.
173. Adkison KK, Vaidya SS, Lee DY, Koo SH, Li L, Mehta AA, i sur. Oral sulfasalazine as a clinical BCRP probe substrate: pharmacokinetic effects of genetic variation (C421A) and pantoprazole coadministration. *J Pharm Sci.* 2010;99:1046–62.
174. Zamber CP, Lamba JK, Yasuda K, Farnum J, Thummel K, Schuetz JD, i sur. Natural allelic variants of breast cancer resistance protein (BCRP) and their relationship to BCRP expression in human intestine. *Pharmacogenetics.* 2003;13(1):19-28.
175. Bäckström G, Taipalensuu J, Melhus H, Brändström H, Svensson AC, Artursson P, i sur. Genetic variation in the ATP-binding cassette transporter gene ABCG2 (BCRP) in a Swedish population. *Eur J Pharm Sci.* 2003;18(5):359-64.

176. Bruckmueller H, Cascorbi I. ABCB1, ABCG2, ABCC1, ABCC2, and ABCC3 drug transporter polymorphisms and their impact on drug bioavailability: what is our current understanding? *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2021;17(4):369-96.
177. Thibaudeau J, Le pine J, Tojcic J. Characterization of common UGT1A8, UGT1A9 and UGT2B7 variants with different capacities to inactive mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone. *Cancer Res.* 2006;66:125-33.
178. Petrenaite V, Ohman I, Ekstrom L, Saebye D, Hansen TF, Tomson T, i sur. UGT polymorphisms and lamotrigine clearance during pregnancy. *Epilepsy Res.* 2018;140:199-208.
179. Huls M, Brown CDA, Windass AS, Sayer R, van den Heuvel JJMW, Heemskerk S, i sur. The breast cancer resistance protein transporter ABCG2 is expressed in the human kidney proximal tubule apical membrane. *Kidney Int.* 2008;73(2):220-5.
180. Jinno N, Furugen A, Kurosawa Y, Kanno Y, Narumi K, Kobayashi M, i sur. Effects of single and repetitive valproic acid administration on the gene expression of placental transporters in pregnant rats: an analysis by gestational period. *Reprod Toxicol.* 2020;96:47-56.
181. Soyata A, Hasanah AN, Rusdiana T. Isoflavones in Soybean as a Daily Nutrient: The Mechanisms of Action and How They Alter the Pharmacokinetics of Drugs. *Turk J Pharm Sci.* 2021;18(6):799-810.
182. Markovic I, Pejanovic-Skobic N, Bozina N, Susak Sporis I, Sporis D, Basic S. The lack of influence of IVS5-91 G>A polymorphism of the SCN1A gene on efficacy of lamotrigine in patients with focal epilepsy. *Neurol Res.* 2019;41(10):930-5.
183. Kwan P, Poon WS, Ng HK, Kang DE, Wong V, i sur. Multidrug resistance in epilepsy and polymorphisms in the voltage-gated sodium channel genes SCN1A, SCN2A, and SCN3A: correlation among phenotype, genotype, and mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(11):989-98.
184. Zimprich F, Stogmann E, Bonelli S, Baumgartner C, Mueller JC, Meitinger T, i sur. A functional polymorphism in the SCN1A gene is not associated with carbamazepine dosages in Austrian patients with epilepsy. *Epilepsia.* 2008;49(6):1108-9.

185. Manna I, Gambardella A, Bianchi A, Striano P, Tozzi R, Aguglia U, et al. A functional polymorphism in the SCN1A gene does not influence antiepileptic drug responsiveness in Italian patients with focal epilepsy. *Epilepsia*. 2011;52(5):e40-4.
186. Haerian BS, Baum L, Kwan P, Tan HJ, Raymond AA, Mohamed Z. SCN1A, SCN2A and SCN3A gene polymorphisms and responsiveness to antiepileptic drugs: a multicenter cohort study and meta-analysis. *Pharmacogenomics*. 2013;14(10):1153-66.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Šušak Sporiš (r. Šušak) rođena je 14. lipnja 1981. godine u Zadru gdje je završila osnovnu i srednju školu (Opća gimnazija „Franje Petrića“). Školovanje nastavlja na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirala 2007. godine. 2008. godine polaže stručni ispit pred ispitnom komisijom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske. Od 2009. godine radi na Zavodu za neurologiju Kliničke bolnice Dubrava kao specijalizant. 2014. godine polaže specijalistički ispit iz neurologije te je do danas zaposlenik Zavoda za neurologiju kao specijalist neurolog. Obzirom na višegodišnji klinički i znanstven rad iz područja epileptologije 2020. godine polaže subspecijalistički ispit i stječe status užeg specijaliste iz područja epileptologije. Stručno znanje redovito usavršava edukacijom, uključujući i edukacije organizirane od strane Međunarodne lige protiv epilepsije (ILAE). Višegodišnji je član Hrvatske lige protiv epilepsije, a od 2016. obnaša dužnost tajnice društva.

2013. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Objavila je više znanstvenih i stručnih radova. Koautor je poglavlja u priručniku za trajno usavršavanje Sveučilišta u Zagrebu „Priručnik iz farmakoterapije neuroloških bolesti“. Aktivno je sudjelovala s usmenim i posterskim izlaganjima na brojnim stručnim skupovima.