



Središnja medicinska knjižnica

**Božina , Nada (2005) *Uloga farmakogenetičkih varijacija u terapiji depresije [ The role of pharmacogenetic variations in the therapy of depression ].* Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/249>

University of Zagreb Medical School Repository

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

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Nada Božina**

**Uloga farmakogenetičkih varijacija u terapiji depresije**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2005.**

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku i u Klinici za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ana Stavljenić Rukavina

Zahvaljujem voditelju rada prof. dr. sc. Ani Stavljenić Rukavina na podršci i savjetima tijekom izrade rada.

Također zahvaljujem doc.dr.sc. Almi Mihaljević Peleš na pomoći pri provedbi kliničkog dijela istraživanja.

Zahvaljujem svim kolegama iz Zavoda za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku koji su mi pomogli na bilo koji način u izradi ovog rada. Ipak, posebna zahvala Zrinki Mirković i Predragu Donat-Švaljek.

## SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1	Citokrom P450	2
1.1.1.	Citokrom P450 2D6 (CYP2D6)	5
1.1.2	Citokrom P450 2C9 (CYP2C9)	7
1.1.3	Citokrom P450 2C19(CYP2C19)	8
1.1.4.	Citokrom P450 3A4 (CYP3A4)	8
1.2.	Transportni proteini	11
1.2.1.	P-glikoprotein	11
1.2.2.	Serotoninski transportni sustav	14
1.3.	Farmakogenetika u depresiji	17
1.3.1.	Depresija	17
1.3.1.1.	Veliki depresivni poremećaj	18
1.3.1.2.	Ocjenske ljestvice za depresiju	19
1.3.1.2.	Ljestvice za bilježenje i rangiranje neželjenih učinaka	20
1.3.2.	Farmakoterapija depresije	20
1.3.2.1.	Tri-tetraciklični antidepresivi	22
1.3.2.2.	Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina	22
1.3.3.	Metaboličke interakcije psihotropnih lijekova	23
1.3.3.1.	Politerapija velikog depresivnog poremećaja	25
1.3.4.	Antiepileptici i psihotropni lijekovi	27
2.	HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA	28
2.1.	Ciljevi istraživanja	28
3.	MATERIJAL I METODE	29
3.1.	Ispitanici	29
3.1.1.	Zdravi ispitanici	29
3.1.2.	Bolesnici	29
3.2.	Materijal	31
3.3.	Analiza DNA	31
3.3.1.	Izolacija DNA metodom isoljavanja	31
3.3.2.	Određivanje koncentracije DNA	33
3.3.3.	Ispitivanje kvalitete izolirane DNA	33
3.4.	Metode genotipizacije	34
3.4.1.	Polimerazna lančana reakcija (PCR-RFLP)	35
3.4.1.1.	Genotipizacija CYP2C9	40
3.4.1.2.	Genotipizacija CYP2C19	41
3.4.1.2.	Genotipizacija CYP2D6	42
3.4.1.4.	Genotipizacija CYP3A4	44
3.4.1.5.	Genotipizacija MDR1	44
3.4.1.6.	Genotipizacija SERT	46
3.5.	Metode fenotipizacije	49
3.5.1.	Fenotipizacija CYP2D6	49
3.5.2.	Određivanje koncentracija paroksetina, maprotilina i diazepamama	52
3.6.	Statistička analiza	55
4.	REZULTATI	56
4.1.	Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1, SERT gena u zdravoj populaciji i bolesnika s VDP	56

4.2.	Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT gena u bolesnika s VDP prema odgovoru na terapiju	61
4.3.	Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT gena u bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove	67
4.4.	Utjecaj polimorfizama gena CYP2D6 i MDR1 na metabolički odnos(MR) dekstrometorfana/dekstrorfana te na koncentracije paroksetina i maprotilina	72
5.	RASPRAVA	79
5.1.	Interetnička varijabilnost enzima I faze metabolizma	79
5.1.1.	Učestalost genotipova metaboličkih enzima citokroma P450-CYP u hrvatskoj populaciji	79
5.2.	Korelacija genotipova metaboličkih enzima s fenotipskim osobinama bolesnika s VDP	81
5.2.1.	Učestalost genotipova metaboličkih enzima citokroma P450-CYP u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem	81
5.2.2.	Korelacija genotipova metaboličkih enzima s učinkovitosti terapije u bolesnika s VDP	
5.2.3.	Korelacija genotipova metaboličkih enzima s nastankom nuspojava na terapiju antidepresivima u bolesnika s VDP	83 84
5.3.	Korelacija polimorfizama P-glikoproteina, gena MDR1, s fenotipskim osobinama bolesnika s VDP	85
5.3.1.	MDR1 i odgovor na terapiju antidepresivima	87
5.4.	Korelacija polimorfizama serotoninskog transportera s fenotipskim osobinama bolesnika s VDP	89
5.5.	Korelacija polimorfizama CYP2D6 i MDR1 s metaboličkim omjerom dekstrometorfana prema metabolitu i koncentracijama paroksetina i maprotilina	92
6.	ZAKLJUČCI	95
7.	POPIS LITERATURE	98
8.	Sažetak	114
9.	Summary	115
10.	Životopis	116

## Popis oznaka i kratica

CYP	superporodica metaboličkih enzima citokroma P-450
CYP2C9	P-450 metabolički enzim
CYP2C19	P-450 metabolički enzim
CYP2D6	P-450 metabolički enzim
CYP3A4	P-450 metabolički enzim
EM	engl. <i>extensive metabolizer</i> , brzi metabolizator
GC-MS	engl. <i>gas chromatography mass spectrometry</i> , plinska kromatografija –masena spektrometrija
HAMD	engl. <i>Hamilton Depression Rating Scale</i> , Hamiltonova ljestvica za depresiju
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i> , tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IM	engl. <i>intermediate metabolizer</i> , intermedijarni metabolizator
MDR1	od engl. <i>multi drug resistance</i> , gen multirezistencije na lijekove
MR	engl. <i>Metabolic Ratio</i> , metabolički odnos
mut	mutirani alel
pb	par baza
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> , polimerazna lančana reakcija
PM	engl. <i>poor metabolizer</i> , spori metabolizator
Pgp	P- glikoprotein
RFLP	engl. <i>restriction fragment length polymorphism</i> , polimorfizam duljine restrikcijskih ulomaka
SSRI	engl. <i>selective serotonin reuptake inhibitor</i> , selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina
SERT ili HTT	serotoninski transporter
SŽS	središnji živčani sustav
UEM	engl. <i>ultraextensive metabolizer</i> , vrlo brzi metabolizator
UKU	ocjenska ljestvica za neželjene učinke psihotropnih lijekova
VDP	veliki depresivni poremećaj
wt	engl. <i>wild type</i> , divlji tip alela

# 1. UVOD

Interindividualna varijabilnost bolesnika u odgovoru na farmakoterapiju jedan je od glavnih problema kako u kliničkoj praksi tako i u razvijanju novih lijekova. Ta pojava može prouzročiti terapijski neuspjeh ili ozbiljne neželjene nuspojave u pojedinaca ili određene skupine bolesnika. Psihijatrijski poremećaji predstavljaju značajan udio u pobolu i smrtnosti. Predviđanja Svjetske zdravstvene organizacije rangiraju depresiju na drugo mjesto, odmah iza ishemijskih bolesti srca do 2020. godine (Murray i Lopez, 1996.). U farmakoterapiji depresije, usprkos čitavom nizu dostupnih lijekova, 30-50% svih bolesnika nema zadovoljavajući odgovor na početno liječenje (Fava i sur, 2003.). Osim toga, ozbiljne nuspojave lijekova su rangirane u SAD-a na četvrtom mjestu uzroka smrtnosti (Lazarou i sur, 1999.).

Potencijalni rizici za farmakoterapijsku varijabilnost uključuju međusobne interakcije lijekova, dob bolesnika, oštećenu funkciju jetre, bubrega ili druge bolesti, navike poput pušenja ili pijenja alkohola. Od posebnog značenja i u najnovije vrijeme predmet istraživanja znanstvenih disciplina farmakogenetike-farmakogenomike su nasljedne predispozicije koje moduliraju farmakološki odgovor (Evans i sur, Weber i sur, 1999.). Projekt humanog genoma te sustavna identifikacija i funkcionalna analiza humanih gena značajno doprinosi istraživanju i racionalnijoj uporabi lijekova (Weinshilboum i sur, 2003.). Ustanovljeno je da varijabilnosti farmakoterapijskog odgovora mogu biti rezultat različitih genskih polimorfizama koji mogu utjecati na farmakokinetičke parametre: apsorpciju, dispoziciju, metabolizam i izlučivanje lijekova te farmakodinamiku koja je određena ciljnim mjestom lijeka (engl. *drug target*), tj. receptorima. (Evans i sur, 2003.) Otkriveni su i identificirani mnogi polimorfni oblici gena metaboličkih enzima, transportnih proteina, receptora i drugih mogućih modulatora. Međutim, još uvijek nema jedinstvenog znanstvenog stava o genskim biljezima koji bi nedvojbeno mogli predvidjeti fenotip odgovora na psihofarmakoterapiju i na taj način omogućili prijevod genomike u racionalnu terapiju (McLeod i sur, 2001, Valdes i sur, Ito i sur, 2004.). Stoga se i dalje provode različite farmakokinetičke i farmakodinamske studije i razrađuju metode za ekstrapolaciju pouzdanih podataka i korelaciju genetičkih parametara s učinkovitošću terapije i toksičnim nuspojavama. (Steimer i sur, Schmitz i sur, 2001, Ito i sur, 2004.).

Farmakokinetička varijabilnost je prepoznata kao glavni izvor varijabilnosti terapijskog odgovora. Koncentracija lijeka na efektornom mjestu određuje učinkovitost i nepoželjne

nuspojave tog lijeka. Primijenjena doza je samo neizravno povezana s tom koncentracijom i ukupnim terapijskim odgovorom. Nije moguće odrediti koncentraciju lijeka na mjestu djelovanja, ali su koncentracije u plazmi u stanju ravnoteže s perifernim odjeljcima. Koncentracija lijeka u plazmi ovisi o oslobađanju, apsorpciji, distribuciji, metabolizmu i izlučivanju. Terapijsko praćenje koncentracija lijeka (engl. *therapeutic drug monitoring-TDM*) u plazmi pomaže u eliminaciji varijabilne farmakokinetike kao uzroka neučinkovitosti i nepoželjnih reakcija u antidepresivnoj terapiji (Reis i sur, 2005.). Općenito, terapijsko praćenje je posebno korisno kada lijek pokazuje jedno ili više sljedećih svojstava: usku terapijsku širinu, varijabilnu farmakokinetiku, nejasne simptome toksičnosti, odložen klinički učinak, točno definiran odnos koncentracije s učinkom terapije (Bengtsson i sur, 2004.).

Genetički utemeljene razlike u aktivnosti metaboličkih enzima lijekova prepoznate su kao glavni izvor farmakokinetičkih varijabilnosti između bolesnika. Krajnji cilj farmakogenomike je u pronalasku genskih biljega za farmakogenetički profil-fenotip odgovora na farmakoterapiju (engl. *drug responders - nonresponders*) tj. u primjeni genetičkih informacija za stvaranje algoritama za odabir najprikladnijeg lijeka za svakoga pojedinog bolesnika ili skupine bolesnika (Steimer i sur, 2004, Weide i sur, 2005.).

Među važne genetičke čimbenike koji mogu modulirati učinkovitost terapije antidepresivima svakako pripadaju polimorfni metabolički enzimi - citokromi P450, i transportni sustavi: P-glikoprotein te serotoninški transporter (Meyer i sur, 2000, Rauch i sur, 2002, Eichelbaum i sur, 2004, Seretti i sur, 2004.).

## **1.1. Citokromi P450**

Među enzimima I faze biotransformacije, sustav citokroma P450 prednjači po katalitičkoj svestranosti. Ova superporodica enzima predstavlja najvažniji enzimski sustav uključen u biotransformaciju mnogih endogenih i egzogenih spojeva uključujući lijekove (Rendić 1997, Rendić i sur, 2002.) . Među fiziološke supstrate ovih enzima pripadaju steroidi, masne kiseline, prostaglandini, leukotrieni i biogeni amini, dok ksenobiotici uključuju lijekove, biljne toksine i toksične spojeve iz okoliša. Citokromi pretežno kataliziraju oksidacijske reakcije, djelujući kao monooksigenaze, oksidaze i peroksidaze, ali mogu sudjelovati i u redukcijским reakcijama. U reakcijama I. faze metabolizma nastaju funkcionalne skupine koje služe kao konjugacijska mjesta u reakcijama II. faze. Mnogi ksenobiotici se detoksificiraju ili aktiviraju u reaktivne intermedijare (Autrup i sur, 2002.). Najveće koncentracije enzima P450 uključenih u biotransformaciju nalaze se u membranama endoplazmatskog retikuluma



uglavnom u jetri, premda se enzimi citokromi P450 mogu naći u gotovo svim tkivima i organima (crijeva, pluća, bubrezi, mozak, limfociti, placenta). Stoga P450 enzimi imaju važnu ulogu u regulaciji intenziteta i trajanja aktivnosti lijeka, u detoksifikaciji ksenobiotika i aktivaciji ksenobiotika u toksične i mutagene i kancerogene metabolite (Yoshihiko i sur, Rendić i sur, 2002, Nebert i sur, 1999.).

Jetreni P450 enzimi, uključeni u biotransformaciju, svrstani su u tri glavne P450 genske obitelji: CYP1, CYP2 i CYP3. Jetra sadrže i CYP4 gensku obitelj, u čije supstrate ubrajamo neke masne kiseline i eikosanoide i manji broj ksenobiotika (Taninger i sur, 1999.).

Količina i aktivnost P450 enzima varira među pojedinim osobama zbog genetičkih i vanjskih čimbenika. Smanjena aktivnost enzima može biti rezultat kao prvo genskih mutacija koje blokiraju sintezu enzima ili rezultiraju sintezom katalitički inaktivnih enzima zatim izlaganja vanjskim čimbenicima (poput infektivnih bolesti ili ksenobiotika) koji suprimiraju ekspresiju P450, ili izlaganja ksenobioticima koji inhibiraju ili inaktiviraju već postojeće P450 enzime (Meyer i sur, 1997.). Inhibicijom citokroma P450 jedan lijek može poremetiti biotransformaciju drugog lijeka a to može voditi k povećanom farmakološkom ili toksičnom učinku drugog lijeka (Alderman i sur, 1997.). U tom smislu, inhibicija citokroma P450 oponaša genetički uzrokovanu insuficijentnu ekspresiju citokroma P450. Povećana enzimaska aktivnost može biti rezultat genskih duplikacija koje rezultiraju prekomjernom ekspresijom P450 enzima, izlaganja vanjskim čimbenicima, poput ksenobiotika, koji induciraju sintezu citokroma P450, ili stimulacije postojećih enzima ksenobioticima (Rendić, 1995.). Indukcijom citokroma P450 jedan lijek može stimulirati metabolizam drugog lijeka i tako smanjiti ili povećati terapijski učinak (Touw i sur, 1997.). Alelne varijante koje su rezultat mutacija u izvornom, divljem genu su drugi izvor individualnih varijabilnosti u aktivnosti P450 enzima. Supstitucije aminokiselina mogu povećati ili češće smanjiti enzimsku aktivnost. Vanjski faktori koji mogu utjecati na količinu enzima citokroma P450 uključuju lijekove (npr. barbiturati, rifampin, izoniazid) hranu (npr. povrće iz porodice crucifera: kelj, repa, kupus; grejp, gospina trava; na roštilju dobro pečeno meso) društvene navike (pijenje alkohola, pušenje), i bolesti (dijabetes, upala, hiper/ hipotiroidizam).

Polimorfizam gena CYP određuje tri kategorije fenotipova s obzirom na intenzitet metabolizma (Linder i sur, 1997.). Fenotip dobro izraženog metabolizma (engl. *extensive metabolizer, EM*) očekivana je normalna osobina najvećeg dijela populacije. Fenotip slabog (sporog) metabolizma (engl. *poor metabolizer, PM*), koji ima osobinu nagomilavanja specifičnih lijekova-supstrata u organizmu zbog smanjene ili dokinute aktivnosti enzima, autosomno je recesivno svojstvo. Fenotip izrazito pojačanog metabolizma (engl.

*ultraextensive metabolizer, UEM*), rezultat je amplifikacije odgovornog gena, s osobinom ubrzane razgradnje lijekova-supstrata, a izražen je kao autosomno dominantno svojstvo. Uz ove osnovne fenotipove čest je prijelazni oblik s jednim funkcionalnim i drugim mutiranim alelom (engl. *intermediate metabolizer IM*).

Metabolički fenotip može se odrediti fenotipizacijom ili genotipizacijom. Fenotipizacija se izvodi s pomoću probnog lijeka čiji metabolizam isključivo ovisi o funkciji ispitivanog enzima (Bertilson 1992.). Fenotip se procjenjuje prema vrijednosti metaboličkog omjera (engl. *Metabolic ratio MR*) koncentracija izvornog lijeka / metabolita određenih metodama tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC), plinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom GC-MS ili tekućinskom kromatografijom i masenom spektrometrijom (LC-MS) ( Alvan i sur,1990, Botsch i sur,1994, Ieri i sur, 1997.). Prednost fenotipizacije je u mogućnosti praćenja interakcija lijekova koje bolesnik mora istovremeno uzimati, a nedostatak u dobivanju nepouzdatih rezultata zbog utjecaja bolesti, osobito jetre i bubrega te mogućih interakcija s drugim spojevima (Brosen i sur, 1988.). Tablica 1. prikazuje neke probne lijekove koji se koriste za fenotipizaciju najvažnijih enzima citokroma P-450 (CYP).

**Tablica 1. Test lijekovi za CYP fenotipizaciju**

Enzim	Test-lijek za fenotipizaciju
CYP2D6	dekstrometorfan, spartein, metoprolol, debrisočin,
CYP2C9	fenitoin, varfarin
CYP2C19	mefenitoin, omeprazol, progvanil
CYP3A4	midazolam, eritromicin, omeprazol
CYP1A2	kafein

Genotipizacija podrazumijeva identifikaciju mutacija gena CYP metodama molekularne dijagnostike koje se temelje na polimeraznoj lančanoj reakciji, (*engl. PCR -polymerase chain reaction*) te prepoznavanju homozigotnih ili heterozigotnih nosioca mutiranih alela koji rezultiraju određenim fenotipom (Ingelman-Sundberg i sur, 2001, 2002.). Te mutacije uključuju genske promjene koje dovode do prekomjerne ekspresije (duplikacija gena), odsutnosti aktivnog proteinskog produkta (nul-aleli), ili stvaranja proteina sa smanjenom katalitičkom sposobnošću (inaktivirajući aleli) (Daly i sur, 1996.). Prednosti genotipizacije su male količine krvi ili tkiva potrebne za analizu, na rezultat ne utječe zdravstveni status bolesnika ili drugi lijekovi, a rezultati su dostupni u kratkom vremenu. Analizu treba napraviti samo jednom jer genotip ostaje nepromijenjen tijekom cijelog života. Definiran je velik broj različitih mutacija gena CYP, ali se molekularna analiza zbog ekonomičnosti provodi za one koje su u određenoj populaciji najučestalije (de Moraes i sur, 1994, Svir i sur, 1999, Takahashi i sur, 2003.).

Sekvenciranjem humanoga genoma otkriveno je 90 različitih gena citokroma P450 od kojih je 55 funkcionalno (Nelson 2005). Među njima su od najveće kliničke važnosti te do sada najbolje proučeni CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 (Touw i sur, 1997, Autrup i sur, 2000, Božina i sur, 2005.).

### **1.1.1. Citokrom P450 2D6 (CYP2D6)**

Molekularna su istraživanja u farmakogenetici počela s citokromom P-450 - CYP2D6. Otkrivene su različite varijante alela, najčešće točkaste mutacije, ali su opisane i delecije, duplikacije te multiplikacije gena (Agundez i sur, 1995, Sachse i sur, 1997.). Fenotip ekstenzivnog metabolizma, s homozigotnim divljim tipom alela, zastupljen je u 60-75% populacije i ima normalnu aktivnost enzima, dok heterozigotni prijelazni fenotip nalazimo u 25-40% populacije, s smanjenom aktivnošću enzima. Fenotip slabog metabolizma, koji dovodi do nagomilavanja specifičnih lijekova-supstrata u organizmu koji mogu proizvesti toksične učinke, ima učestalost do 7% u bijeloj populaciji (From i sur, 1997, Bertilson i sur, 2002.). Fenotip izrazito pojačanog metabolizma u 1-10% bijele populacije, rezultat je amplifikacije odgovornog gena, s osobinom ubrzane razgradnje lijekova-supstrata, a nasljeđuje se kao autosomno dominantno svojstvo (Dahl i sur, 1995.).

CYP2D6, debrisočin-4-hidroksilaza, uključen je u metabolizam velikog broja (oko 25 %) vrlo često propisivanih lijekova kao što su antiaritmici, blokatori  $\beta$ -adrenergičkih receptora, antidepresivi, neuroleptici (tablica 2). Ovaj enzim također sudjeluje u metabolizmu endogenih supstrata važnih za funkciju središnjeg živčanog sustava (SŽS) kao što su amini i steroidi. Još je 1987 g. jedna švedska studija na zdravim dragovoljcima pokazala značajnu razliku u osobnosti (personality) između brzih i sporih metabolizatora supstrata CYP2D6 ( Bertilson i sur,1989.). Spori metabolizatori su bili više podložni anksioznosti i teže su se socijalizirali u usporedbi s brzim metabolizatorima. Danas postoje značajni dokazi da je CYP2D6 prisutan i aktivan u središnjem živčanom sustavu, premda mu je aktivnost niža od one u jetri (Funae i sur, 2003, Hedlung i sur, 2001.). Druga istraživanja su pokazala da je regeneracija serotonina iz 5-metoksitriptamina te konverzija p- i m- tiramina u dopamin posredovana s CYP2D6, što znači da je ovaj polimorfni enzim izravno uključen u serotoninsku i dopaminsku homeostazu ( Yu i sur, 2003, Niwa i sur, 2004.).

Fenotipizacija se za CYP2D6 najčešće provodi sa deksmetorfanom (Baumann i sur, 1988.). Dokumentirana je značajna varijabilnost aktivnosti ovog enzima u pojedinim etničkim zajednicama. Zastupljenost fenotipa sporog metabolizma u bijeloj populaciji iznosi 2-10% (Griese i sur, 1998, Tamminga i sur, 2001, Niewinski i sur, 2002, Božina i sur, 2003.), u azijskoj populaciji 1% (Lamba i sur, 1998.), a u crnoj populaciji 0-2% (Ingelman-Sundberg i sur, 1999.) .

Istraživanja su za fenotip vrlo brzog metabolizma ustanovila različite vrijednosti u pojedinim populacijama: švedskoj 1% (Bertilson i sur, 1992.), njemačkoj 2% (Griese i sur, 1998.), hrvatskoj 4 % (Božina i sur, 2003.), španjolskoj 6-10% ( Bernal i sur,1999.), turskoj 8% , arapskoj 20% (Meyer i sur, 2000.) , etiopskoj 29% (Sachse i sur, 1997.) i azijskoj 2% (Ingelman-Sundberg i sur, 1999.).

Općenito, pri standardnoj dozi lijeka, slabi metabolizatori mogu razviti neželjene nuspojave, dok će kod vrlo brzih metabolizatora zbog suboptimalnih terapijskih koncentracija izostati očekivana učinkovitost lijeka.

CYP2D6 genski lokus obuhvaća tri visoko homologna gena CYP2D8P, CYP2D7P i CYP2D6 locirana na 22q13.1. Gen CYP2D6 se sastoji od devet egzona i osam introna. CYP2D7P i CYP2D8P su pseudogeni. Do danas je otkriveno više od sedamdeset različitih alelnih varijanti ([www.imm.ki.se/CYPalleles/](http://www.imm.ki.se/CYPalleles/)). U kliničkoj praksi analiza CYP2D6\*3,\*4,\*5,\*6 mutiranih alela i genskih multiplikacija osigurava s 99%-tnom sigurnošću otkrivanje

sporih i brzih metabolizatora. U tablici 6. su navedeni najčešći aleli CYP2D6, nukleotidne promjene, i posljedična enzimaska aktivnost.

**Tablica 2. Važniji supstrati CYP2D6 enzima**

Grupa lijekova	
<i>Analgetici</i>	kodein, deksmetorfan, fentanil, hidrokodon, meperidon, metadon, morfin, oksikodon, tramadol
<i>Antiaritmici</i>	amiodaron, ajmalin, flekainid, lidokain, meksiletin, propafenon
<i>Betablokatori</i>	alprenolol, bisoprolol, bufuralol, karvedilol, labetalol, metoprolol, pindolol, propranolol, timolol
<i>Psihofarmaci</i>	amfetamin, amitriptilin, fluoksetin, fluvoksamin, haloperidol, imipramin, klomipramin, klorpromazin, klozapin, maprotilin, paroksetin, risperidon, tioridazin, trazodon, venlafaksin, zyklopiksol
<i>Ostali</i>	gvanoksan, kaptopril, tamoksifen, trimetoprim

### 1.1.2. Citokrom P450 2C9 (CYP2C9)

Polimorfizam je u obitelji CYP2C značajan za farmakoterapiju zbog nekih vrlo važnih lijekova - supstrata ovog enzima kao što su antikonvulzivi, antidijabetici, antikoagulanti, antidepresivi (Goldstein i sur, 2001.). Polimorfizam CYP2C9 može utjecati na toksičnost lijekova s uskom terapijskom širinom kao što su fenitoin ili varfarin (Taube i sur, 2000, Van der Weide i sur, 2001.). Prema dosadašnjim istraživanjima učestalost fenotipa slabih metabolizatora u bijeloj populaciji varira od 2-6% (Takahashi i sur, 2003.). CYP2C9 gen je lociran na kromosomu 10q24. Do sada je uz divlji tip, "wt", identificirano 12 različitih mutiranih alela CYP2C9. Prema istraživanjima, aleli CYP2C9\*2 i CYP2C9\*3 prisutni su u 85 % slabih metabolizatora (Garcia-Martin i sur, 2001.).

**Tablica 3. Važniji supstrati CYP2C9 enzima**

Grupa lijekova	
<i>Angiotenzin II receptor blokatori</i>	losartan, irbesartan, valsartan
<i>Antidijabetici</i>	tolbutamid, glipizid
<i>Antikoagulanti</i>	varfarin
<i>Antikonvulzivi</i>	fenitoin
<i>Antimikrobni</i>	metronidazol, sulfametoksazol
<i>Nesteroidni antireumatici</i>	diklofenak, ibuprofen, indometacin, naproksen
<i>Psihofarmaci</i>	amitriptilin, fluoksetin

### 1.1.3. Citokrom P450 2C19 (CYP2C19)

Gen CYP2C19 je lociran na kromosomu 10q24 i sastoji se od devet egzona. Do sada je dokumentirano 15 različitih alela CYP2C19 gena i ustanovljena značajna međuetnička varijabilnost u učestalosti pojedinih fenotipova: incidencija slabih metabolizatora je 1-5% u bijeloj populaciji, 13-23% u orijentalnoj populaciji, 6% među Etiopljanima, a čak 70% među stanovništvom Vanuatu (otoci Tana i Malakula) (Goldstein i sur, 1997, Dojo i sur, 2001, Desta i sur, 2002.). Dosadašnja istraživanja navode zastupljenost alela CYP2C19\*2 i "C19\*3 u 95% osoba sporih metabolizatora.

**Tablica 4. Važniji supstrati CYP2C19 enzima**

---

Grupa lijekova

---

<i>Antikonvulzivi</i>	barbiturati, fenitoin, valproati
<i>Blokatori protonske pumpe</i>	omeprazol, lansoprazol, pantoprazol
<i>Psihofarmaci</i>	diazepam, imipramin, klomipramin, sertralin, citalopram
<i>Ostali</i>	progvanil, propranolol, ritonavir, tolbutamid

### 1.1.4. Citokrom P450 3A4 (CYP3A4)

Humani enzim CYP3A4 kodira nifedipin oksidazu koja je uključena u metabolizam endogenih spojeva i ksenobiotika. Interindividualna varijabilnost u ekspresiji enzima CYP3A4 vrlo je velika (20-40 puta), što dovodi i do interindividualnih razlika u dispoziciji lijekova supstrata CYP3A4 (Lin i sur, 2002, Hesselink i sur, 2003.). CYP3A4 gen je lociran na kromosomu 7q21 i sastoji se od trinaest egzona. Unutar gena CYP3A4 opisano je dvadesetak mutiranih alela koji se u populaciji bijelaca pojavljuju s učestalošću do 7%, međutim tek je za manji broj potvrđeno da modificiraju funkciju enzima. Najznačajnija i najčešće do sada opisivana genska varijanta odgovorna za bimodalnu fenotipsku varijaciju metabolizma nifedipina nalazi se u nekodirajućoj promotorskoj regiji, a označava se kao CYP3A4\*1B i povezana je sa pojačanom aktivnošću CYP3A4 enzima (Eiselt i sur, 2001.).

**Tablica 5. Važniji supstrati CYP3A4 enzima**

---

**Grupa lijekova**

---

<i>Analgetici</i>	acetaminofen, alfentanil, kodein, dekstrometorfan)
<i>Antiaritmici</i>	disopiramid, lidokain, kinidin
<i>Antimikrobni</i>	doksiciklin, eritromicin, klaritromicin, klindamicin ketokonazol, mikonazol, troleandomicin, HIV-proteaza inhibitori
<i>Antihistaminici</i>	astemizol, loratadin, terfenadin
<i>Antikonvulzivi</i>	karbamazepin, etosuksimid
<i>Antilipemici</i>	atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, simvastatin
<i>Antitumorski</i>	busulfan, ciklofosfamid, doksorubicin, paklitaksel, tamoksifen, vinblastin, vinkristin
<i>Blokatori kalcijevih kanala</i>	amlodipin, felodipin, nifedipin, nimodipin, verapamil
<i>Steroidi</i>	estradiol, kortizol, progesteron, prednizon, testosteron,
<i>Imunosupresivi</i>	ciklosporin, sirolimus, takrolimus
<i>Kardiotonički glikozidi</i>	digitoksin
<i>Narkotici</i>	metadon, kanabinoidi, kokain, fentanil
<i>Psihofarmaci</i>	amfetamin, fluoksetin, haloperidol, klomipramin, klonazepam, klorpromazin, midazolam, risperidon, triazolam
<i>Ostali</i>	cimetidin, deksametazon, enalapril, lidokain, paracetamol, salmeterol

**Tablica 6. Najčešći aleli CYP2C9, CYP2C19 CYP2D6 i CYP3A4 gena prema dosadašnjim istraživanjima**

Alel	Nukleotidna promjena	Enzimska aktivnost
CYP2C9*1 (wt)	nema	normalna
CYP2C9* 2	C 430 T	smanjena
CYP2C9* 3	A1075 C	smanjena
CYP2C19*1 (wt)	nema	normalna
CYP2C19* 2	G 681 A	nema
CYP2C19* 3	G 636 A	nema
CYP2D6*1 (wt)	nema	normalna
CYP2D6*2 (1xN)	N aktivnih gena	povećana
CYP2D6* 3	A 2549 delecija	nema
CYP2D6* 4	G 18464 A	nema
CYP2D6* 5	CYP2D6 delecija	nema
CYP2D6* 6	T 1707 delecija	nema
CYP3A4 wt	nema	normalna
CYP3A4*1B	A 290 G	povećana

wt – *wild type*-“divlji”(izvorni ) oblik



## 1.2. Transportni proteini

### 1.2.1. P-glikoprotein

Transportni proteini imaju važnu ulogu u regulaciji apsorpcije, raspodjele i izlučivanja mnogih lijekova. Najbolje do sada proučen prijenosnik je P-glikoprotein (Pgp) kodiran genom ABCB1 ili MDR1 (engl. *multidrug resistance*) (Borst i sur, 2000.). Pgp je integralni membranski protein s funkcijom prijenosa tvari iz stanice i s membrane prema van. Njegova fiziološka funkcija je zaštita stanice od toksičnih tvari. Mnogi su lijekovi Pgp supstrati (Tablica 7), stoga aktivnost Pgp utječe na njihove farmakokinetičke parametre, međusobne interakcije i terapijsku učinkovitost. Ta je činjenica prvotno uočena u malignim stanicama gdje visoka ekspresija i aktivnost MDR1 čini maligne stanice otpornima na terapiju mnogim lijekovima. Pgp je također prisutan u različitim drugim nemalignim stanicama i organima poput crijeva, placentе, bubrega, jetre, gušterače, testisa, krvno-moždane brane, limfocita, te makrofaga, sa ulogom moduliranja bioraspodjelivosti lijeka. Ekspresija P-glikoproteina u ovim tkivima rezultira smanjenom apsorpcijom lijeka iz gastrointestinalnog sustava, pojačanom eliminacijom lijeka u žuč i mokraću i usporenim ulaskom nekih lijekova u središnji živčani sustav (Van Asperen i sur, 1998, 1999.). Klinički značaj uloge P-glikoproteina ovisi o lokalizaciji u tkivu, terapijskom indeksu lijeka-supstrata i intra-individualnoj varijabilnosti. S obzirom na varijabilnost, istraživanja polimorfizama gena MDR1 su pokazala značajnu korelaciju nekih genotipova i haplotipova s promjenama u dispozijskoj kinetici i interakcijama klinički važnih lijekova poput digoksina, feksofenadina, talinolola, takrolimusa, HIV proteaza inhibitora (Kim i sur, 1998, 2001, Johnе i sur, 2002.). Osim toga polimorfizam može imati važnu ulogu u bolesnika koji nemaju klinički zadovoljavajući odgovor na farmakoterapiju. Neke novije studije izvješćuju o ulozi P-glikoproteina kao mogućeg bitnog čimbenika u razvoju refraktornih epilepsija (Siddiqui i sur, 2003.). Prevelika ekspresija P-glikoproteina ili gena MDR1 uočena je u endotelnim stanicama izoliranim iz tkiva temporalnog režnja bolesnika s epilepsijom, malformacijskih i neoplastičnih lezija uključujući fokalne kortikalne displazije i gangliogliome (Dombrowski i sur, 2001.). Nekoliko studija opisuje značajno povišenu ekspresiju transportnih proteina (Pgp i MRP1) u svim analiziranim uzorcima tkiva iz epileptogenih zona. U nekih bolesnika s farmakorezistentnom epilepsijom nađen je znatan porast mutacija C3435T u genu MDR1.

U životinjskim je modelima pokazano da i sami epi- napadi mogu inducirati gen MDR1, što rezultira povećanim koncentracijama Pgp.

P-glikoprotein je također važan prognostički čimbenik u malignim bolestima poput tumora gastrointestinalnog sustava ili uroepitelnih tumora (Siegmund i sur, 2002.). Sve veći broj predkliničkih i kliničkih studija pokazuje da bi polimorfizam gena MDR1 mogao biti važan biljeg u procjeni ishoda farmakoterapije za brojne bolesti (Ieiri i sur, 2004.).

S obzirom na antidepresive značajna su istraživanja *in vivo* na mozgu *mdr1ab(-/-) knockout* miševa (Uhr i sur, 2000, 2002.). Njihovi rezultati pokazuju da su koncentracije paroksetina i venlafaksina bile povećane (1,7 do 3 puta) i nakon jednokratne doze i nakon 11-dnevne terapije. Novija istraživanja *in vitro* dokazuju da se farmakokinetičke interakcije lijekova često dešavaju na nivou P-glikoproteina (Weiss i sur, 2003.). Provedena su istraživanja u staničnim kulturama (L-MDR1 stanice - model za humani Pgp; pBCEC stanice- model za krvno-moždanu branu). Ispitivane su moguće interakcije novijih antidepresiva (citalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin, reboksetin, sertralin i venlafaksin) i njihovih glavnih metabolita s P-glikoproteinom. Svi ispitivani lijekovi su pokazali inhibitornu aktivnost prema Pgp. Sertralin i paroksetin su bili najpotentniji u usporedbi s vrijednostima poznatog Pgp inhibitora kinidina.

Gen MDR1 je lociran na kromosomu 7q21.1 Do sada je opisano više mutacija u genu, istražena njihova povezanost s ekspresijom Pgp i utjecaj na farmakokinetičke parametre klinički važnih lijekova (Hoffmeyer i sur, 2000.). Kao i za druge farmakogenetičke čimbenike, uočena je znatna međuetnička razlika u učestalosti pojedinih polimorfizama (Cascorbi i sur, 2001.). U populaciji bijelaca najznačajniji je polimorfizam C3435T na egzonu 26 povezan s polimorfizmom G2677T/A na egzonu 21. Ovaj haplotip rezultira znatno izmijenjenom funkcijom Pgp-a.

Potencijalne mogućnosti farmakogenetičke analize P-glikoproteina mogu biti značajne u karakterizaciji patoloških mehanizama i pronalaženju učinkovitijih terapijskih pristupa jer mutacije u genu MDR-1 mogu promijeniti spektar supstrata za Pgp, interakcije lijekova, učinkovitost transporta i osjetljivost Pgp na inhibiciju sa specifičnim inhibitorima (Glauser i sur, 2002, Weis i sur, 2003.).

**Tablica 7. Poznati supstrati P-glikoproteina**

---

Grupa lijekova	
<i>Antibiotici</i>	eritromicin, HIV proteaza inhibitori, flukonazol, klaritromicin, ketokonazol, mikonazol, rifampin,
<i>Antitumorski lijekovi:</i>	ciklofosamid, cisplatin, daunorubicin, doksorubicin, etopozid, paklitaksel, vinblastin,
<i>Antiepileptici</i>	fenitoin, fenobarbiton, karbamazepin, lamotrigin, felbamat
<i>Antilipemici</i>	atorvastatin, fluvastatin, gemfibrozil, lovastatin, simvastatin
<i>Imunosupresivi</i>	ciklosporin, sirolimus, takrolimus,
<i>Blokatori kalcijevih kanala:</i>	amlodipin, felodipin, nifedipin, nimodipin, verapamil
<i>Psihotropni</i>	alprazolam, diazepam, fluoksetin, paroksetin, venlafaksin
<i>Ostali</i>	deksametazon, digoksin, feksofenadin, prednisolon, propafenon, probenecid, varfarin

### 1.2.2. Serotoninski transportni sustav

Evolucijski visoko konzerviran serotoninski transporter (SERT ili HTT) regulira čitav serotonergični sustav i njegove receptore preko modulacije izvanstanične koncentracije serotonina. SERT je u mozgu i drugim perifernim tkivima odgovoran za aktivni transport serotonina u neurone, enterokromafine stanice, krvne pločice i druge stanice. U mozgu SERT se nalazi u perisinaptičkim membranama nervnih završetaka i u dendritičkim ograncima u uskoj blizini stanica koje sadrže serotonin a smještene su u srednjem mozgu i raphe jezgama moždanog debla. Nakon neuralne stimulacije SERT posreduje u brzom uklanjanju i recikliranju oslobođenog serotonina, stoga ima kritičnu ulogu u homeostatskoj regulaciji visine, trajanja, i prostorne raspodjele signala koji stižu do serotoninskih receptora. SERT također ima određenu sposobnost transporta drugih endogenih amina poput dopamina, a također je prijenosnik spojeva poput fenfluramina, nonfenfluramina, supstituiranih amfetamina (MDMA-“ekstazi”, i parakloroamfetamina), metkatinona i serotoninskog neurotoksina amino-MPTP (1-metil-4-(2'-aminofenil)-1,2,3,6-tetrahidropiridin), koji preko serotoninskog transportera ulazi u neurone i inducira perzistentnu (mjesecima dugu) redukciju serotonina popraćenu neurodegenerativnim promjenama. Razlike u ekspresiji i funkciji serotoninskog transportera koje su produkt varijabilnosti gena SERT, povezane su s mnogim poremećajima u ljudskom organizmu (Kirchheiner i sur, 2004.). Molekularne DNA analize u bolesnika s autizmom, ADHD, bipolarnim poremećajima, te Tourette-ovim sindromom otkrile su signale u kromosomskoj regiji 17q gdje je SERT lociran. Paralelna su istraživanja SERT *knockout* miševa otkrila različite fenotipove koji pretpostavljaju SERT kao mogućeg genskog kandidata i za druge poremećaje poput sindroma iritabilnog crijeva i debljine (Chen i sur, 2001.). Smatra se da smanjena serotonergična neurotransmisija ima važnu ulogu u etiologiji depresije, stoga SERT predstavlja glavno ciljno mjesto za različite antidepresive poput tri-tetracikličkih, i inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI). Gen SERT je pozicioniran na SLC6A4 genskom lokusu na kromosomu 17q11.1-17q12 i obuhvaća ~31 kpb, a sastoji se od 14 egzona (Murphy i sur, 2004.). Opisana su dva česta polimorfizma gena SERT. Prvi, varijabilni broj ponavljajućih ulomaka (*VNTR- engl. variable number of tandem repeats*) u drugom intronu (Stin2) sastoji se od četiri varijante s 9 (STin2.9), 10 (STin2.10), 11 (STin2.11) ili 12 (STin2.12) kopija 17-pb ponavljajućeg elementa. Najčešći aleli ovog polimorfizma su STin2.10 i Stin2.12. Stin12 se označava kao “1” (long) alel, a svi ostali kao

“s” (short) aleli. Ovaj je polimorfizam smješten izvan kodirajuće regije (egzona) gena SERT, ali se pretpostavlja da utječe na regulacijski element genskog prijepisa. Drugi polimorfizam, insercija/ delecija, nalazi se u promotorskoj regiji SERT (SERTPR ili 5-HTTLPR) i opisane su četiri varijante s 14, 16, 18 ili 20 ponavljajućih ulomaka od 20–23 pb. Najčešće su zastupljeni aleli s 14 ili 16 ponavljajućih ulomaka. Polimorfizam s 14 ulomaka označava se kao “S”, a svi drugi kao “L” aleli. “L” alelu se pripisuje povećana transkripcija i viša biološka aktivnost proteina SERT. Ispitivanja utjecaja polimorfizama gena SERT na učinkovitost terapije antidepresivima su provedena u ograničenom, manjem broju (Rauch i sur, 2002, Kirchheiner i sur, 2004.). Nekoliko je studija izvijestilo o boljem učinku SSRI u osoba nosioca dva “l” alela za STin2 (Smits i sur, 2004.). Druge studije imaju proturječne rezultate (Ito i sur, 2002.). Ovaj nesklad može biti rezultat etničke raznolikosti: učestalost “s” alela je gotovo dva puta veća u orijentalnoj u odnosu na bijelu populaciji (79 prema 42%), a obje su studije koje navode povezanost “s” alela s boljim farmakološkim odgovorom provedene u orijentalnoj populaciji. Polimorfizam SERTPR je povezan sa bržim kliničkim odgovorom na terapiju sertralinom (Durham i sur, 2004.). Studije povezanosti polimorfizama SERT s neželjenim reakcijama na SSRI ukazuju na značajnu korelaciju s rizikom pojave manije (Rousseva i sur, 2003.) . Mundo navodi 5,3 puta veću učestalost hipomanije kao nuspojave u bolesnika nosioca S/S genotipa na terapiji sa SSRI (Mundo i sur, 2001.). U bolesnika nosioca S/S - SERTPR genotipa, fluoksetinom inducirana insomnija bila je 3,5 puta češća a agitacija 9,5 puta učestalija u odnosu na S/L i L/L genotip (Perlis i sur, 2003.). Neka istraživanja ukazuju da će terapija u bijeloj populaciji biti manje uspješna u bolesnika s genotipom SERTPR S/S, dok podatci za azijsku populaciji navode Stin2–10/12 genotip kao mogući biljeg slabijeg odgovora na terapiju sa SSRI ( Kim i sur, 2000.).

**Tablica 8. Psihotropni lijekovi i antiepileptici kao supstrati, inhibitori, ili induktori CYP enzima**

	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6		CYP3A4		CYP1A2
Supstrati	fenitoin fenobarbiton	Triciklični antidepresivi (demetilacija) citalopram  fenitoin diazepam	Tri-ciklični Antidepresivi (hidroksilacija) fluoksetin paroksetin	tioridazin perfenazin haloperidol klozapin olanzapin  venlafaksin mianserin  risperidon sertindol	Triciklični antidepresivi (demetilacija) sertralin nefazodon  reboksetin diazepam alprazolam midazolam triazolam	haloperidol klozapin risperidon kvetiapin ziprasidon  karbamazepin felbamate tiagabine zonisamid	Triciklični antidepresivi (demetilacija) fluvoksamin  klozapin olanzapin
Inhibitori	Fluoksetin Valproati	felbamat	tioridazin fluoksetin paroksetin		fluoksetin fluvoksamin nefazodon		fluvoksamin
Induktori					karbamazepin fenitoin fenobarbiton primidon okskarbazepin topiramat felbamat		karbamazepin fenitoin fenobarbiton primidon
Test-lijek za fenotipizaciju	Fenitoin varfarin	Mefenitoin	Dekstrometorfan Debrisokin Spartein		midazolam eritromicin omeprazol		kafein

## 1.3 Farmakogenetika u depresiji

### 1.3.1. Depresija

- Potencijalna ozbiljnost stanja u kojem se bolesnici nalaze zahtijeva hitnu učinkovitu terapiju;
- Čak do 40% svih depresivnih bolesnika ne odgovara učinkovito na početnu farmakoterapiju; uz to treba proći i do 6 tjedana prije nego se dokaže učinkovitost terapije;
- “Non-responderi” čine glavninu u mnogim psihijatrijskim klinikama; stoga bi bilo vrlo poželjno i važno takve bolesnike identificirati prije početne terapije i izbjeći predugi period liječenja na osnovu pokušaja i neuspjeha;
- Ekonomska i klinička opravdanost ovakvog analitičkog pristupa, prije ili na početku antidepressivne terapije, predmet je ispitivanja;
- Farmakogenetske su studije postale dio kliničkih evaluacijskih procesa za nove lijekove .

Depresija se ubraja u najranije opisane bolesti u povijesti medicine, a danas je to jedan od najčešćih psihičkih poremećaja. Tijekom druge polovine 20. stoljeća izrazito se povećala učestalost depresije, tako da po nekim mišljenjima ulazimo u doba melankolije. Veliki je problem što u općoj populaciji ima dosta zabluda, mitova i neznanja o depresiji i mnogi uopće ne znaju da je depresija bolest i ne traže stručnu pomoć.

Epidemiološka istraživanja pokazuju kako svaka 5. žena i svaki 10. muškarac tijekom života može doživjeti barem jednu ozbiljnu depresivnu epizodu (Checkley i sur, 1998.). Učestalost depresivnih poremećaja u općoj populaciji je između 3,6 i 6,8%, a po nekima je učestalost i znatno veća, čak i više od 20% (Healy i sur, 1997. ). Sukladno tome možemo pretpostaviti da u Hrvatskoj ima više od 100.000 osoba koje pate od raznih formi depresivnog poremećaja. Depresija je poremećaj koji se javlja epizodično, a u više od 80% osoba s prvom depresivnom epizodom pojaviti će se nova depresivna epizoda. Neliječena depresivna epizoda u načelu traje od 6 mjeseci do 2 godine, a ponekad čak i uz pokušaj liječenja može trajati doživotno. Takvih slučajeva ima 15-20%. Neliječena depresivna epizoda praćena je znatno većim rizikom od javljanja nove depresivne epizode i kronifikacije postojeće.

### 1.3.1.1. Veliki depresivni poremećaj

Kriteriji za veliki depresivni poremećaj (prema DSM-IV, engl. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fourth edition - DSM IV, American Psychiatric Association, Washington DC, 1994.*)

A. Pet (ili više) od slijedećih simptoma prisutni su tijekom dvotjednog razdoblja i predstavljaju promjenu od ranijeg djelovanja; barem jedan od simptoma je ili (1) depresivno raspoloženje ili (2) gubitak zanimanja ili uživanja.

1. depresivno raspoloženje veći dio dana, gotovo svaki dan, što se navodi kao subjektivna pritužba (npr. osjeća se tužno ili prazno) ili to stanje vide druge osobe. Napomena: U djece i adolescenata može biti prisutno razdražljivo raspoloženje.
2. Značajno smanjeno zanimanje ili uživanje u svim, ili gotovo svim aktivnostima veći dio dana, gotovo svaki dan (što se navodi kao subjektivna pritužba ili to stanje vide druge osobe).
3. Značajan gubitak tjelesne težine bez dijete ili pak dobivanje na težini (npr. promjena više od 5% tjelesne težine u mjesec dana), ili smanjenje ili povećanje apetita gotovo svakog dana. Napomena: U djece, gubitkom se smatra nemogućnost dostizanja očekivane težine.
4. Nesanica ili hipersomnija gotovo svakog dana.
5. Psihomotorna agitacija ili retardacija gotovo svakog dana (što vide druge osobe, a ne samo kao subjektivni osjećaj nemira ili usporenosti).
6. Umor ili gubitak energije gotovo svakog dana.
7. Osjećaj bezvrijednosti ili velike i neodgovarajuće krivnje (može biti i sumanuta) gotovo svakog dana. depresivno raspoloženje veći dio dana, gotovo svaki dan, što se navodi kao subjektivna pritužba (npr. osjeća se tužno ili prazno) ili to stanje vide druge osobe. Napomena: U djece i adolescenata može biti prisutno razdražljivo raspoloženje.
8. Smanjena sposobnost mišljenja ili koncentriranja, ili neodlučnost, gotovo svaki dan (bilo kao subjektivni osjećaj ili vidljivo od strane drugih)



9. Ponavljajuća razmišljanja o smrti ( ne samo strah od smrti), ponavljajuće samoubilačke ideje bez specifičnog plana, ili pokušaji samoubojstva ili specifični plan za izvršenje samoubojstva.

B. Simptomi ne zadovoljavaju kriterije za miješanu (manični elementi) epizodu.

C. Simptomi uzrokuju klinički značajne smetnje ili oštećenja u socijalnom, radnom ili drugom važnom području djelovanja.

D. Simptomi ne nastaju kao neposredni fiziološki učinak (psihoaktivne) tvari (npr. zlouporaba droga ili lijekova) ili općeg zdravstvenog stanja (npr. hipotiroidizam).

E. Simptomi se ne mogu pripisati žalovanju, tj. ne nastaju nakon gubitka voljene osobe, simptomi traju duže od 2 mjeseca i obilježeni su značajnim djelatnim oštećenjem, bolesnom zaokupljenošću s bezvrijednošću, samoubilačkim idejama, psihotičnim simptomima ili psihomotornom usporenošću.

Ako neka osoba ima najmanje 5 od nabrojanih simptoma u trajanju od najmanje 2 tjedna, govorimo o tzv. velikoj ili major depresivnoj epizodi.

Kada su prisutna samo 4 ili manje simptoma, govorimo o tzv. maloj ili minor depresiji.

### 1.3.1.2 Ocjenske ljestvice za depresiju

Izraženost depresivnih simptoma procjenjuje se primjenom standardiziranih ocjenskih ljestvica. Najpoznatija je Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju (Hamilton, 1960.).

#### Hamiltonova ocjenska ljestvica za depresiju

1. Depresivno raspoloženje	0	1	2	3	4
2. Osjećaj krivnje	0	1	2	3	4
3. Samoubilački porivi	0	1	2	3	4
4. Smetnje usnivanja	0	1	2		
5. Smetnje prosnivanja	0	1	2		
6. Jutarnje smetnje spavanja	0	1	2		
7. Rad i djelatnost	0	1	2	3	4
8. Psihomotorna inhibicija	0	1	2	3	4
9. Agitacija	0	1	2	3	4
10. Anksioznost (psihička)	0	1	2	3	4
11. Anksioznost (tjelesna)	0	1	2	3	4

12. Gastrointestinalni simptomi	0	1	2	3	4
13. Opći tjelesni simptomi	0	1	2	3	4
14. Genitalni simptomi	0	1	2	3	4
15. Hipohondrijski simptomi	0	1	2	3	4
16. Gubitak tjelesne tekućine	0	1	2	3	4
17. Uvid u bolest	0	1	2	3	4

CGI (*Clinical Global Impression*) psihijatrijska ljestvica se često primjenjuje za globalnu procjenu bolesnikova stanja i zahtijeva kliničko iskustvo. Sedam kategorija težine bolesti su u rasponu “nije bolestan” do “ekstremno teška bolest” (Guy, 1976.).

### **1.3.1.3. Ljestvice za bilježenje i rangiranje neželjenih učinaka psihotropnih lijekova - UKU -**

UKU standardizirana ljestvica za rangiranje nuspojava psihotropnih lijekova sastoji se od nekoliko kategorija simptoma, (Lingjaerde i sur , 1998.) :

Psihičke nuspojave: poteškoće koncentracije, sedacija / nesanica, poteškoće u pamćenju, napetost, unutarnji nemir, produženo spavanje, skraćeno spavanje, emocionalna bezvoljnost  
Neurološke nuspojave: distonija, rigidnost, hipokinezija / akinezija, tremor, akatizija, epileptički napadi, parestezije

Autonomne nuspojave: pojačana salivacija, smanjena salivacija, mučnina / povraćanje, proljev, zatvor, poteškoće mokrenja, poliurija / polidipsija, ortostatska vrtoglavica, palpitacije/ tahikardija, pojačano znojenje

Ostale nuspojave: različite vrste osipa ,svrbež, osjetljivost na sunce, pojačana pigmentacija, povećanje tjelesne težine, gubitak tjelesne težine, menoragia, amenorea, galaktorea, seksualne smetnje, glavobolja

### **1.3.2. Farmakoterapija depresije**

Djelovanje lijekova koji se rabe u depresiji nastupa s odgodom zbog “down regulacije receptora” od dva, tri, četiri, a katkad čak i šest tjedana (Thase i sur, 2003, Hotopf i sur, 2005.). Lijek treba davati najmanje četiri do šest tjedana i to u punoj terapijskoj dozi. Ako nakon tog perioda nema zadovoljavajućeg poboljšanja, treba promijeniti lijek, tako da se

uvede lijek druge farmakološke skupine, odnosno drugog mehanizma djelovanja (Zimmerman i sur, 2005.).

Danas je dostupan velik broj lijekova za liječenje depresije, a mogu se svrstati prema mehanizmu djelovanja. Prikazano u Tablici 9 ( Prema American Psychiatric Association).

**Tablica 9. Lijekovi za liječenje depresije**

FARMAKOLOŠKI MEHANIZAM DJELOVANJA	PREDSTAVNICI
1. IMAO (inhibitori monoamino oksidaze)	Neselektivni i ireverzibilni: iproniazid Selektivni i reverzibilni: moklobemid
2. Neselektivni inhibitori ponovne pohrane monoamina)	Triciklički antidepresivi (TCA): imipramin, dezipramin, klomipramin i sl.
3. SSRI (SIPPS) (selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina)	Fluvoksamin, fluoksetin, paroksetin, sertralin, citalopram
4. RIMA/SSRI (reverzibilni i selektivni inhibitori MAO-A i ponovne pohrane serotonina)	Brofaromin
5. NRI (selektivni inhibitori ponovne pohrane noradrenalina)	Maprotilin (tretraciklički AD)-, viloksazin, reboksetin, tomoksetin
6. NDRI (adrenergički modulatori – inhibitori ponovne pohrane noradrenalina i dopamina)	Bupropion
7. SNRI (dualni inhibitori – inhibitori ponovne pohrane serotonina i noradrenalina)	Klovoksamin, venlafaksin, duloksetin
8. Antagonisti 5-HT <sub>2</sub> /alfa 2NA receptora	Mianserin
9. SARI (dualni serotoninski antidepresivi – antagonisti 5-HT <sub>2</sub> receptora i inhibitori ponovne pohrane serotonina)	Trazodon, nefazodon
10. Pojačivači ponovne pohrane serotonina	Tianeptin
11. Agonisti 5-HT <sub>1a</sub> receptora	Buspiron
12. NaSSA ( noradrenergički i speifični serotoninergički antidepresivi)	Mirtazapin
13. Pojačivači adrenergičkih funkcija preko sustava drugog glasnika	Rolipram

### **1.3.2.1. Tri-tetraciklični antidepresivi (TCA)**

Triciklični antidepresivi revolucionirali su farmakoterapiju depresije i poznati su gotovo svi detalji njihove farmakokinetike (Guy 1976, Wilson i sur, 2005.). Usprkos uvođenju selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina i drugih novih lijekova, TCA su ostali važna terapijska komponenta. Današnje terapijske smjernice preporučuju njihovu uporabu posebno za rezistentne oblike depresije. Tercijarni amini (poput amitriptilina, imipramina) metaboliziraju se putem demetilacije u jetrenom sustavu citokroma P450 u farmakološki aktivne sekundarne amine (nortriptilin, desipramin). Ovi se zatim hidroksiliraju s pomoću CYP2D6 u farmakološki inaktivne metabolite. TCA imaju usku terapijsku širinu. Značajna je toksičnost povezana s povišenim koncentracijama. Terapijski je raspon za TCA i njihove aktivne metabolite dobro definiran. Dokazana je korelacija između koncentracije lijeka i kliničkog učinka. Zbog toga je osnovano očekivati značajan utjecaj genetski zasnovanih promjena u metaboličkom kapacitetu na klinički uspjeh farmakoterapije s TCA (Chen i sur, 1996.). Postoje izvještaji o smrtnom ishodu liječenja s TCA u bolesnika s fenotipom slabih metabolizatora (Swanson i sur, 1997.). U studijama korelacije genotipa CYP2D6 s koncentracijama tricikličkih antidepresiva u kliničkoj populaciji uočeno je da su fenotipski ekstremi, odnosno vrlo brzi metabolizatori i spori metabolizatori u povećanom omjeru zastupljeni među hospitaliziranim depresivnim bolesnicima zbog suboptimalne koncentracije lijeka pri standardnim dozama ili toksičnih nuspojava (de Leon i sur, 1998.). Druga istraživanja navode povećanu učestalost nuspojava u slabih metabolizatora tretiranih lijekovima-supstratima CYP2D6 (Steimer i sur, 1999.). Spori su metabolizatori podložniji nastanku ekstrapiramidnih reakcija (Tamaninga i sur, 2003).

### **1.3.2.2. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina**

SSRI (kratica od engl.: *selective serotonin reuptake inhibitors*)

Danas mnogi liječnici smatraju SSRI prvim izborom farmakoterapije u liječenju depresije. Po učinkovitosti se uspoređuju sa TCA ali po toleranciji i sigurnosti su ispred TCA (Jakovljević 1998, Burke i sur, 1999.). S obzirom na potencijal stupanja u interakcije s drugim lijekovima, relativno su sigurni što se tiče farmakodinamski posredovanih interakcija, ali mogu imati klinički značajne farmakokinetičke interakcije zbog interferencije sa CYP enzimima, a pretpostavlja se i P-glikoproteinom (Lam i sur, Roberts i sur, 2002, Weiss i sur, 2003.). SSRI mogu proizvesti klinički značajnu inhibiciju enzima CYP i nužan je oprez pri propisivanju SSRI u politerapiji. Potencijal različitih SSRI u inhibiciji enzima CYP znatno varira (Brosen i sur, 2004.).

Za razliku od TCA, SSRI imaju širok terapijski raspon. Većina kliničara smatra da terapijsko praćenje SSRI nije potrebno, jer nije ustanovljena jasna korelacija između serumske koncentracije i terapijske učinkovitosti za fluoksetin, paroksetin ili sertralin. Općenito se smatra da će primjena standardne doze proizvesti koncentracije znatno iznad minimalnih učinkovitih i ispod potencijalno toksičnih koncentracija u gotovo svakog bolesnika. Mišljenje je da se ne može očekivati bitnija korist od predterapijske genotipizacije metaboličkih polimorfnih enzima. Međutim, ovo je mišljenje u posljednje vrijeme postalo upitno (Baker i sur, 2003.). Različiti klinički slučajevi publicirani u novije vrijeme, poput izvještaja o smrti devetogodišnjeg dječaka, slabog metabolizatora CYP2D6 na terapiji fluoksetinom, i posljedična optužba njegovih roditelja za ubojstvo (oslobođeni optužbe nakon što je provedena genotipizacija CYP2D6), te drugi slučajevi ukazuju i upozoravaju da takozvani sigurni supstrati CYP2D6 mogu prouzročiti, teške čak smrtne ishode (Salle i sur, 2000.). U takvim slučajevima genotipizacija može poslužiti kao molekularna autopsija.

### **1.3.3. Metaboličke interakcije psihotropnih lijekova**

O interakcijama lijekova govorimo u slučaju kada je učinkovitost ili toksičnost nekog lijeka promijenjena zbog istovremene primjene drugog lijeka (Lin i sur, 1998.). U nekim slučajevima interakcije lijekova mogu rezultirati korisnim učincima zbog povećane učinkovitosti ili smanjenog rizika neželjenih reakcija. Ipak znatno češće interakcije lijekova smanjuju terapijsku učinkovitost ili štoviše povisuju toksičnost jedne ili više komponenata politerapije (Spina i sur, 2003.). Mehanizam interakcija lijekova se obično dijeli u dvije kategorije: farmakokinetsku i farmakodinamsku. Farmakokinetske interakcije se sastoje od promjena u absorpciji, distribuciji, metabolizmu ili izlučivanju lijeka i/ili njegova metabolita, odnosno količini aktivnog lijeka na mjestu djelovanja nakon primjene dodatnog lijeka (Rendić, 1997, Liston i sur, 2002.). Od svih nabrojanih, metabolički uzrokovane interakcije lijekova su najčešće (Conus i sur, 1996.). Farmakodinamske interakcije nastaju u slučaju kada dva lijeka djeluju na istom ili međusobno povezanom receptorskom mjestu, rezultirajući aditivnim, sinergističnim ili antagonističnim učincima (Kerwin i sur, 2001.).

Posljednjih 10-15 godina uvedeni su u psihijatrijsku praksu novi psihotropni lijekovi posebno antidepresivi i antipsihotici u svrhu poboljšanja učinkovitosti i tolerancije farmakoterapije. Interakcije lijekova predstavljaju značajan problem u evaluaciji psihotropnih lijekova koji se često moraju koristiti na duži period i u kombinaciji sa drugim medikamentima (Preskorn i sur, 1997.). Kombinirana farmakoterapija se često primjenjuje u kliničkoj psihijatriji u svrhu liječenja bolesnika sa komorbiditetom psihijatrijskih i somatskih poremećaja, za kontrolu

nuspojava određenih lijekova ili za pojačani terapijski učinak (Belle i sur, 2002.). Poželjna je uporaba psihotropnih spojeva sa niskim potencijalom za interakcije posebno u liječenju starijih bolesnika koji su češći kandidati za politerapiju. Ako se ipak propisuju lijekovi koji stupaju u interakcije potrebno je znati što sve može odrediti stupanj interakcija (Molden i sur, 2005.). U tom smislu posebno je važno razumjeti interindividualne različitosti, bilo genetičkog ili vanjskog podrijetla.

Psihotropni lijekovi su uz nekoliko iznimaka lipofilni spojevi koji se metaboliziraju u jetri kroz oksidacijsku fazu I, nakon koje slijedi konjugacijska faza II. Većina farmakokinetičkih interakcija sa psihotropnim lijekovima dešava se na metaboličkom nivou i najčešće uključuje promjene u aktivnosti citokroma P450-CYP monooksigenaza. Interakcije lijekova koje uključuju izoforme CYP uglavnom rezultiraju jednim od dva procesa: inhibicijom enzima, ili indukcijom enzima. Inhibicija enzima je često rezultat kompeticije lijekova za isto enzimsko mjesto, dok indukcija enzima nastaje u slučaju kada lijek stimulira sintezu enzimskih proteina i time povećava metabolički kapacitet (Lane i sur, 1996.). Značajna su istraživanja provedena na izoenzimima CYP i njihovim supstratima, inhibitorima i induktorima. Kao što je pokazano u Tablici 1, mnogi psihotropni lijekovi se metaboliziraju ili oni inhibiraju u određenom stupnju jednu ili više CYP izoformi (Nemeroff i sur, 1996.). Ove spoznaje mogu biti vrlo važne za kliničare jer im omogućuju da predvide i izbjegnu interakcije lijekova. Velika je vjerojatnost da će kombinacija navedenih lijekova dovesti do indukcije ili inhibicije CYP enzima. Posljedično, plazma koncentracija drugog lijeka može biti povećana ili snižena, s mogućim toksičnim učincima ili umanjenom terapijskom učinkovitosti. Kao što ističe Sproule u procjeni dometa i kliničke važnosti metaboličkih interakcija lijekova nužno je razmotriti više čimbenika (Sproule i sur, 1997.) :

1. Čimbenike povezane uz lijek: potencijal i koncentraciju inhibitora /induktora, terapijski indeks supstrata, opseg metabolizma supstrata pomoću zahvaćenog enzima, prisustvo aktivnih ili toksičnih metabolita.
2. Čimbenike povezane sa bolesnikom: individualne nasljedne razlike u aktivnosti enzima ( fenotip / genotip ), dob, spol.
3. Epidemiološki čimbenici: vjerojatnost da će dva lijeka biti uzeta istovremeno

### 1.3.3.1 Politerapija velikog depresivnog poremećaja

Farmakoterapija bolesnika s velikim depresivnim poremećajem često uključuje kombinaciju tri-tetracikličnih antidepresiva, SSRI i benzodiazepina. Jedna od mogućih kombinacija u politerapiji je paroksetin, maprotilin, i diazepam.

#### *Paroksetin*

Oksidacija paroksetina katalizirana je s CYP2D6 čija je saturacija odgovorna za nelinearnu kinetiku lijeka. Pretpostavlja se da je sekundarni metabolički put kataliziran s CYP3A4, a postaje značajan pri visokim koncentracijama lijeka (Blamer i sur, 1992.). Pri jednokratnoj dozi od 20 mg  $t_{1/2}$  za paroksetin iznosi 10 sati dok se pri višekratnoj uporabi lijeka  $t_{1/2}$  produžuje na 24 sata. Stanje ravnoteže se postiže za 7-14 dana nakon početka terapije. U odsutnosti aktivnog enzima CYP2D6 (slabi metabolizatori) plazma koncentracije paroksetina mogu biti više i do 25 puta u odnosu na brze metabolizatore (Sindrup i sur, 1992.). Osim toga značajan utjecaj na biodostupnost i farmakokinetiku paroksetina mogli bi imati i polimorfni oblici P-glikoproteina, s kojim kako je već istraženo *in vitro* paroksetin stupa u interakcije. Paroksetin je *in vitro* najmoćniji inhibitor CYP2D6 između svih SSRI (Leucht i sur, 2000.). Štoviše, jedan intermedijarni metabolit paroksetina (M2) posjeduje također inhibitorna svojstva prema CYP2D6 (Crewe i sur, 1992.). Stoga paroksetin može prouzročiti klinički značajne interakcije u koadministraciji s supstratima CYP2D6. Doza paroksetina od 20 mg/dan u stanju ravnoteže može povisiti plazma koncentracije desipramina, supstrata CYP2D6, za 327-421 % (Alderman i sur, 1997.). U zdravih dragovoljaca paroksetin je izazvao 2-13 puta povećanje plazma koncentracije perfenazina pri jednokratnoj primjeni lijeka, uz pojavu učinaka na SŽS poput sedacije, ekstrapiramidnih simptoma i promjenjenih psihomotornih sposobnosti (Ozdemir i sur, 1997.). U shizofrenih bolesnika doza od 20 mg/dan proizvela je tri do devet puta više plazma koncentracije risperidona što je u nekih bolesnika izazvalo pojavu ekstrapiramidnih nuspojava (Spina i sur, 2001.). Polimorfni oblici gena CYP2D6 mogu imati značajan utjecaj na visinu inhibicije. Tako je Laine pokazao da fenotipski vrlo brzi metabolizatori s umnoženim genom CYP2D6 pri primjeni paroksetina postaju fenotipski normalni metabolizatori (fenokopiranje) (Laine i sur, 2001.). Učinak paroksetina može imati klinički značajne posljedice na farmakokinetiku drugih lijekova koje bolesnik istovremeno uzima a koji su supstrati ne samo CYP2D6 već i P-glikoproteina. Ozbiljne nuspojave na terapiju paroksetinom nisu česte. Važnije uočene nuspojave su: vrtoglavica, smetenost, znojenje, tremor, suha usta, insomnia, poremećene seksualne funkcije, zatvor, proljev.

### *Maprotilin*

Maprotilin se svrstava u tetracikličke antidepresive. Ima vrlo dobar antidepresivni učinak uz anksiolitičko djelovanje i bolju podnošljivost u usporedbi sa starijim tricikličkim antidepresivima pa je ušao u vrlo široku primjenu. Resorbira se sporo, ali potpuno iz crijeva i maksimalne koncentracije postiže nakon 9 do 16 sati. Za biotransformaciju maprotilina u glavni metabolit desmetilmaprotilin najvećim dijelom (83%) odgovoran je enzim CYP2D6 dok se preostalih 17 % pripisuje enzimu CYP1A2 (Firkusing i sur, 1994.). Poluvrijeme eliminacije maprotilina pri monoterapiji,  $t_{1/2}$ , iznosi 27-50 sati. Ova varijabilnost u politerapiji može dodatno biti opterećena različitim opsegom interakcija lijekova na nivou metaboličkih enzima i P-glikoproteina (Eichelbaum i sur, 2004, Weiss i sur, 2003.).

### *Diazepam*

Diazepam se metabolizira preko sustava CYP2C19 i CYP3A4 u jedan glavni aktivni metabolit desmetildiazepam (nordiazepam) i dva manje aktivna metabolita, 3-hidroksidiazepam (temazepam) i 3-hidroksi-N-diazepam (oksazepam) (Bertilson i sur, 1989, Kosuge i sur, 2001.). U terapijskim dozama desmetildiazepam je prisutan u plazmi u koncentracijama jednakima onima diazepamima dok se druga dva metabolita često ne mogu detektirati (Anderson i sur, 1994). Značajna interindividualna varijabilnost u klirensu diazepamima pripisuje se polimorfizmu CYP2C19 i CYP3A4. Poluvrijeme eliminacije diazepamima može varirati od 24 sata do više od dva dana. Ravnotežne koncentracije diazepamima postižu se u intervalu od 5 dana do 2 tjedna (Mandeli i sur, 1978.). Aktivni metabolit nordiazepam ima duži poluživot od diazepamima i potrebno je duže vrijeme za postizanje ravnotežnih koncentracija. Zbog naglašene varijabilne farmakokinetike diazepamima nužno je ispitivanje i genetičke osnove varijabilnosti u absorpciji, distribuciji, metabolizmu i eliminaciji. Diazepam ne inducira niti inhibira jetrene enzime.



#### **1.3.4. Antiepileptici i psihotropni lijekovi**

Učestalost depresije je znatno viša među bolesnicima s epilepsijom nego u općoj populaciji (9-22%) (Harden i sur, 2002.). Podatci za hospitalizirane bolesnike navode pojavu depresije u 27-58% bolesnika s epilepsijom ili refraktornom epilepsijom (Spina i sur, 2002.). Depresija se ujedno pojavljuje s puno težom kliničkom slikom u bolesnika s epilepsijom nego u bilo kojega drugog kroničnog bolesnika. Kako se antiepileptici (AE) i psihotropni lijekovi moraju koristiti u kombinaciji, mogućnost farmakokinetičkih interakcija je relativno česta. Neki AE, posebno karbamazepin, valproati i lamotrigin, sve se više koriste za liječenje psihijatrijskih poremećaja, općenito kao stabilizatori raspoloženja i često u kombinaciji s antidepresivima, litijem ili antipsihoticima. Osim toga psihotropni lijekovi poput antidepresiva i antipsihotika potencijalni su epileptogenici (Pisani i sur, 2002.). Konačno i antiepileptici i psihotropni lijekovi imaju izražen utjecaj na aktivnost jetrenih metaboličkih enzima, što omogućuje različite interakcije lijekova čija je biotransformacija ovisna o sustavu citokroma P-450 (Guengerich i sur, 1997.). Tako mnogi propisivani antidepresivi (fluoksetin, fluvoksamin, nefazodon, paroksetin, sertralin) pokazuju inhibicijski učinak na citokrome P-450, što može rezultirati toksičnim koncentracijama klasičnih AE fenitoina, fenobarbitona i karbamazepina. S druge strane, neki AE poput karbamazepina, fenitoina, fenobarbitona i primidona potentni su induktori enzima citokroma P-450 i stimuliraju oksidacijsku transformaciju mnogih istovremeno primijenjenih lijekova. AE posebice mogu sniziti plazma-koncentracije tricikličkih antidepresiva (TCA). Demetilacija TCA je katalizirana s više enzima, uključujući CYP2C19, CYP3A4 i CYP1A2, i upravo je njihova indukcija odgovorna za mnoge interakcije. Osim pažljivog kliničkog promatranja, praćenje plazma-koncentracija relevantnih lijekova može biti korisno za prilagođavanje doza. Osim toga poznavanje farmakogenetskog profila i metaboličkog kapaciteta u ovakvih bolesnika dodatno može doprinijeti racionalnoj prosudbi o mogućim dozama interakcija antidepresiva i antiepileptika (tablica 1). Istraživanja su za neke AE i psihotropne lijekove pokazala da su ujedno i supstrati polimorfno P-glikoproteina, što može činiti još složenijim njihove interakcije, farmakokinetiku i učinkovitost (Weiss i sur, 2003.). Imperativ je prepoznati i liječiti depresiju u bolesnika s epilepsijom. S obzirom na još mnoge nerazjašnjene mehanizme patogeneze i interakcija lijekova koji se primjenjuju, pronalazak relevantnih genskih biljega za ovu subpopulaciju bolesnika mogao bi biti od koristi.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U dosadašnjim farmakogenetičkim istraživanjima u drugim populacijama etnička različitost se pokazala relevantnom za farmakoterapiju, stoga pretpostavljamo da i u hrvatskoj populaciji postoje određene specifičnosti farmakogenetičkog profila psihijatrijskih bolesnika koje je važno definirati i valorizirati njihovu prediktivnu vrijednost u individualizaciji terapije te ih označiti kao moguće molekularne biljege u farmakodijagnostici i kliničkoj praksi. Prema dosadašnjim spoznajama odgovor bolesnika na terapiju antidepresivima je određen složenim sustavom interakcija na raznim razinama, stoga se može pretpostaviti da je prediktivna vrijednost genskih biljega: enzima citokroma P-450 (CYP); P-glikoproteina (MDR1); serotoninskog transportnog sustava (SERT) značajna. Držim da je vrijedno valorizirati ulogu navedenih polimorfizama u procjeni učinka naročito pri politerapiji velikog depresivnog poremećaja, kao što je učinjeno za primjenu kombinacije lijekova: benzodiazepina (diazepam), tetracikličnog antidepresiva (maprotilin), inhibitora ponovne pohrane serotonina (paroksetin).

### 2.1 Ciljevi istraživanja

Glavni cilj rada bio je provesti farmakogenetičko probiranje u hrvatskoj populaciji na zdravoj populaciji i u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem te istražiti utjecaj / prediktivnu vrijednost genetičkih čimbenika / genskih biljega na farmakološke i toksične učinke pri terapiji velikog depresivnog poremećaja.

Pojedinačni ciljevi istraživanja:

1. Istražiti učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u zdravoj populaciji i u psihijatrijskih bolesnika koji boluju od velikog depresivnog poremećaja.
2. Istražiti utjecaj genskih varijacija CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT na učinkovitost i nuspojave liječenja velikog depresivnog poremećaja različitim skupinama lijekova (tri-tetraciklični antidepresivi, SSRI, benzodiazepini).
3. Istražiti utjecaj genskih varijacija CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT na koncentracije lijekova u plazmi i učinkovitost lijekova pri liječenju velikog depresivnog poremećaja koje uključuje: benzodiazepin (diazepam), tetraciklični antidepresiv (maprotilin) i SSRI (paroksetin).

## 3. MATERIJAL I METODE

### 3.1. Ispitanici

Svi ispitanici bili su uključeni u ispitivanje nakon davanja informiranog pristanka.

Etička povjerenstva Kliničkog bolničkog centra-Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrila su istraživanje.

#### 3.1.1. Zdravi ispitanici

Zastupljenost pojedinih genotipova CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u hrvatskoj populaciji ispitana je na zdravim rodbinski nepovezanim osobama koje predstavljaju miješanu populaciju iz svih dijelova Hrvatske. Ispitanici su uglavnom bili zaposlenici KBC-a Zagreb i studenti medicinskog i farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Za ovu grupu ispitanika kriterij uključivanja je bio da ne boluju od bilo kojeg psihičkog poremećaja i anamnestički nemaju drugih teških tjelesnih bolesti. Ispitano je 286 osoba.

#### 3.1.2. Bolesnici

U ispitivanja psihijatrijskih bolesnika s velikim depresivnim poremećajem bili su uključeni hospitalizirani i ambulantni bolesnici na Psihijatrijskoj klinici, Kliničkog bolničkog centra - Zagrebu, u dobi između 18-65 godina. Ispitanici su udovoljili kriterijima za dijagnozu velikog depresivnog poremećaja :

- MKB-10 (Međunarodna klasifikacija bolesti, 10 revizija) i
- DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, IV revizija*)

Klinički su bolesnici bili procijenjeni ocjenskim ljestvicama za depresiju :

1. HAMD - *Hamilton Depression Rating Scale*
2. CGI - *Clinical Global Impression*

Ispitanici nisu smjeli imati druge psihičke poremećaje, niti bolovati od drugih teških tjelesnih bolesti. Ispitano je 114 bolesnika.

Stanje bolesti ocijenjeno je prema HAMD i CGI :

HAMD na dan 0  
HAMD na dan 21  
HAMD na dan 42  
CGI na dan 0  
CGI na dan 21  
CGI na dan 42

Klinički odgovor na terapiju

Od 21-42 dana

Potpun odgovor ( HAMD <10 )  
Djelomičan odgovor ( HAMD < 16)  
Rezistentni (HAMD > 16)

Nuspojave

Bodovi na dan 0  
Bodovi na dan 21  
Grupa a ( mentalne )  
Grupa b (neuromuskularne)  
Grupa c (antikolinergične / gastrointestinalne)  
Grupa d ( kardiovaskularne)  
Grupa e (druge)  
Značajne nuspojave na dan 21 (Bodovi >5)

Lijekovi za terapiju su uvedeni i doze povisivane prema prosudbi kliničara-psihijatra. Bolesnici koji su klinički dobro odgovarali na terapiju bili su oni koji su pokazali za 50 % ili više sniženje početnog statusa prema HAMD, odnosno učinkovit klinički odgovor na terapiju imao je rezultat prema HAMD ispod 10.

Redovito su se bilježile sve nuspojave. Nuspojave su valorizirane prema standardiziranoj UKU ljestvici (opisana u uvodnom dijelu).

Zasebnu grupu od 25 ispitanika činili su bolesnici koji boluju od velikog depresivnog poremećaja i koji su dobivali politerapiju s maprotilinom, diazepamom i paroksetinom. Njima je metabolički odnos dekstrometorfana / dekstrorfana u urinu (pokazatelj CYP2D6 aktivnosti) bio određen prije početka terapije i nakon 14. dana terapije. Bolesnik je započeo terapiju maprotilinom, 50 mg, i diazepamom 20 mg dnevno. Četvrtog dana uvela se terapija paroksetinom 20 mg dnevno. Određivale su se plazma koncentracije lijekova u serumu 1.- 4. i 11.-14. dana, zatim nakon 4. i 6. tjedna terapije. Krv za analizu vadila se prije uzimanja jutarnje doze. Bolesnici su redovito bili praćeni (učinkovitost, nuspojave), a njihovo kliničko stanje ocjenjivano prema HAMD i CGI te nuspojave prema UKU do 12. tjedna terapije.

## 3.2. Materijal

### *Analitički uzorci*

Za izolaciju DNA korištena je puna krv sa antikoagulantom EDTA (5 ml svježe krvi, pohranjene na +4 ° C najduže četiri dana ili pohranjene na -70° C).

Za određivanje koncentracija lijeka u serumu uzeto je 5 ml krvi za svaku analizu.

Za određivanje lijeka u urinu uzeto je 10 ml urina za svaku analizu prema shemi.

## 3.3. Analiza DNA

### 3.3.1. Izolacija DNA metodom isoljavanja

Izdvajanje DNA iz pune krvi provodilo se makro metodom isoljavanja ( Miller i sur, 1988.).

Metoda se temelji na lizi stanica te enzimskoj i kemijskoj ekstrakciji sa svrhom uklanjanja staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula, nakon čega slijedi taloženje DNA u apsolutnom alkoholu.

### Pribor

- 1) Sterilna epruveta od 2 mL s poklopcem
- 2) Sterilna epruveta od 50 mL s poklopcem
- 3) Sterilna Pasteurova pipeta (staklena, brušena)
- 4) Erlenmayerova tikvica
- 5) Automatske pipete
- 6) Centrifuga s hlađenjem
- 7) Termostati na 56° C i 37° C

### Kemikalije

- 1) Otopina za hemolizu

NH<sub>4</sub>Cl (155mM) 8,29 g

KHCO<sub>3</sub> (10 mM) 1,0 g

Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM) 0,37 g

Dest.H<sub>2</sub>O, sterilna do 1 L

- 2) STE-otopina za raspršivanje staničnog taloga

Tris-HCl (10 mM) 1,21 g (S-sodium)

NaCl (75 mM) 4,38 g (T-Tris)

Na<sub>2</sub>EDTA (24 mM) 8,93 g (E-EDTA)

Dest.H<sub>2</sub>O, sterilna do 1 L

3) Zasićena otopina NaCl

NaCl 35 g

Dest.H<sub>2</sub>O, sterilna do 100 mL

4) Pronaza-enzim za razgradnju proteina

Na 1 g pronaze dodati 50 mL sterilne vode

Autodigestirati 2 h na 37° C

Raspodijeliti u manje volumene (po 1 mL)

Čuvati na -20° C

5) 10 %-tna otopina natrijevog dodecil-sulfata (SDS)

6) 100 %-tni etanol

7) Tris-EDTA pufer (TE-pufer)

Tris (10mM) 1,21 g

Na<sub>2</sub>EDTA (1mM) 0,37 g

Dest.H<sub>2</sub>O, sterilna do 1 L

Podesiti pH na 7,5 sa HCl

Sterilizirati i čuvati na sobnoj temperaturi

### Postupak

1. Pet ml krvi svakog ispitanika miješati sa 15 ml (1x ) otopine za hemolizu
2. Inkubirati 20 minuta na ledu (-20° C).
3. Centrifugirati na 2200 rpm na + 4° C, 10 minuta
4. Odstraniti supernatant a talog još dva puta isprati otopinom 1, paziti da se talog ne odvoji od dna epruvete.
5. Talog raspršiti u 3 mL STE-liza pufera
6. Dodati 400µL 10 %-tne otopine SDS-a i pažljivo miješati
7. Dodati 200µL pronaze i lagano miješati.
8. Inkubirati 10 min do 1 sat na 56°C ili preko noći na 37°C
9. Dodati 1mL zasićene otopine NaCl i vrlo snažno miješati 15-20 sekundi
10. Centrifugirati 15 minuta na 3000 rpm
11. Supernatant prenijeti u čistu epruvetu, oprezno dodati 15 mL hladnog apsolutnog etanola. Epruveta se zatim lagano vrti dok DNA u obliku "meduze" ne ispliva na površinu. DNA se zatim prenese pomoću Pasteuerove pipete u tubicu i osuši.
12. Dodati 500µl TE pufera i inkubirati preko noći, (maksimalno 2-3 dana) na 37°C. DNA se čuva na + 4°C otopljena u TE-puferu ili na -20° C u apsolutnom etanolu.

### 3.3.2. Određivanje koncentracije DNA

Za određivanje koncentracije DNA otopinu razrijedimo 1:100 s TE – puferom i absorbancu (A) mjerimo spektrofotometrijski pri valnoj dužini 260 nm:

$$C_{\text{DNA}} = \text{razrjeđenje} \times F \times A = 100 \times 50 \times A$$

### 3.3.3. Ispitivanje kvalitete izolirane DNA

Kvaliteta izolirane DNA ispitivana je elektroforezom u 0,3 % agaroznom gelu s etidijevim bromidom

Pripravci

1) 0,3 % agarozni gel

Agarozna	0,6
Destilirana voda	do 200 mL

2) Etidij bromid 10 mg/mL

3) 50 x TAE-pufer

Tris	224 g
Octena kiselina	57,1 mL
EDTA-Na 0,5%, pH 7,5	100 mL
Destilirana voda	do 1 L

4) 1x TAE- pufer: 20 ml 50x TAE+ 200  $\mu$ L Et-br, 10  $\mu$ L/mL, ad 1 L vode

5) Pufer za nanošenje uzoraka na gel

Ksilen-cijanol 1%	1mL
Brom-fenol plavilo 1 %	1 mL
Glicerol 50 %	5 mL
50x TAE- pufer 2 %	190 $\mu$ L
Destilirana voda	2,75 mL

#### *Postupak*

1. U 200mL destilirane vode dodati 1 g agaroze
2. Zagrijati do vrenja, dodati 2,8  $\mu$ L Et-bromida i 400  $\mu$ L 50x TAE- pufera
3. Na izliven i pripremljen gel nanijeti uzorke koji sadrže 9 $\mu$ L otopine DNA u TE-puferu i 1 $\mu$ L pufera sa bojom. Uvjeti elektroforeze: 40 V.
4. Detekcija ulomaka se provodi pod fluorescentnom lampom a rezultati dokumentiraju fotografiranjem Polaroid filmom 667.

### 3.4. Metode genotipizacije

#### Kemikalije korištene za DNA molekularne analize

DNA polimeraza Taq	Roche
10xPCR pufer, 25 mM MgCl <sub>2</sub>	Roche
DNTP	Roche
GeneAmp XL PCR Kit	PerkinElmer /Applied Biosystems
Početnice-primeri	TIB Molbiol Syntheselabor
Restriksijske endonukleaze	Roche, NewEngland Biolab
DNA oligonukleotidi (PCR primeri)	TIB-MOLBIOL
100 bp i 1 kb biljezi DNA	Roche, Applied Biosystems
Molekularni biljeg III, V, XIII	Roche
Pronaza	Boehringer
Agarozna: višenamjenska, NuSieve	Roche, Biozym
Nujol mineral oil	Perkin Elmer/ Applied Biosystems

#### Oprema korištena za DNA molekularne analize:

Termocycler: Gene Amp PCR System 9600, Eppendorf 2400	Perkin Elmer/Applied Biosystems
Centrifuge	Beckman, Eppendorf
Tresilice	Koetterman
Sistemi za elektroforezu	Pharmacia, Hoefer, Elchrom Scientific
Spektrofotometar	LKB / Pharmacia
Dual wavelength transiluminator	Elchrom Scientific
Direct screen kamera	Elchrom Scientific



### 3.4.1. Polimerazna lančana reakcija - analiza duljine restrikcijskih ulomaka

#### PCR-RFLP (engl. *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*)

Za analizu gena (genotipizacija) provodila se metoda lančane reakcije polimerazom, engl. *polymerase chain reaction-PCR* (Mullis, 1990.). Osnovni princip PCR je u eksponencijalnom umnažanju dijelova DNA koji sadrže gene od interesa. Na umnoženim produktima provodi se analiza mogućih genskih promjena (mutacija, delecija, translokacija). Za umnažanje određenih ulomaka DNA, 100 ng DNA, DNA-polimeraza, deoksiribonukleotid trifosfati (dATP, dCTP, dGTP i dTTP) i dvije početnice (primeri) podvrgavaju se inkubaciji pod specifičnim uvjetima. PCR postupak sadržava tri faze:

1. Denaturacija DNA zagrijavanjem na 94 - 96°C pri čemu nastaje jednolančana DNA
2. Vežanje (engl. *annealing*) početnica pri temperaturi 50-65 °C
3. Sinteza novog lanca komplementarnog DNA regiji omeđenoj početnicama pomoću termostabilne polimeraze na temperaturi od 72° C

U sljedećem ciklusu, novostvorene molekule DNA postaju kalup. Da bi se dobilo dovoljno genetičkog materijala za daljnje analize umnažanje se provodi kroz 25-35 ciklusa.

Optimalni uvjeti, za svaku PCR reakciju tj. koncentracije DNA-polimeraze, početnica,  $Mg^{++}$ , i genomske DNA te temperature i vrijeme pojedinih faza ciklusa ovise o analitičkom sustavu i ispituju se za svaki pojedini ulomak DNA. Pet  $\mu$ l PCR umnoška analizira se u 1 % agaroznom gelu. Pozitivni uzorci su korišteni za daljnje analize odnosno digestiju pomoću restrikcijskih endonukleaza, što rezultira ulomcima različite dužine ovisno o genotipu. Heterozigotne osobe imaju ulomke tipične za divlji-tip i mutirane alele. Digestirani uzorak razdvaja se u 2 - 4 % gelu. 5  $\mu$ l DNA-markera korišteno je kao standard veličine ulomaka. Rezultati su dokumentirani snimanjem na Polaroid 667 filmu.

#### *Kemikalije i pribor*

- 1) Deoksiribonukleotidi (dNTP)
  - PCR nukleotidna smjesa, 10mM ATP, 10mM TTP, 10mM GTP i 10 mM CTP
- 2) PCR-pufer
  - Pufer x10 s 15 mM  $MgCl_2$
- 3) PCR- početnice

- Liofilizirane početnice, po  $0,2 \mu\text{M}$  - Matična otopina početnica,  $100 \mu\text{M}$ , dobivena otapanjem liofiliziranih početnica u sterilnoj destiliranoj vodi.

Slijed nukleotida početnica je odabran prema literaturnim podacima

4) Sterilna voda

5) DNA Tag-polimeraza

500 U,  $5\text{U}/\mu\text{l}$

6) Mineralno ulje

**Tablica 10. Empirijski utvrđeni uvjeti umnažanja pojedinih DNA ulomaka metodom PCR**

Gen-alel	Početna denaturacija T °C / t'	Broj ciklusa	Denaturacija T °C / t'	Vežanje početnica T °C / t'	Sinteza novog lanca T °C / t'	Završna sinteza T °C / t'
CYP2C9						
*2	95°C - 5'	35	94°C - 4 5''	60°C - 30'	72°C-3'	
*3	95°C - 5'	35	94°C - 45''	59°C- 30''	72°C-3'	
CYP2C19						
*2	95°C - 5'	37	94°C - 1'	52°C-30''	72°C-3'	72°C-7'
*3	95°C - 5'	37	94°C - 1'	52°C- 30''	72°C-3'	72°C-7'
CYP2D6						
Dupl	93°C - 1'	37	93°C - 1'	67°C- 30'	72°C-3'	72°C-10'
*3	94°C - 5'	37	92°C - 45''	57°C- 30''	72°C-3'	72°C-10'
*4	94°C - 5'	35	93°C - 45''	58°C-30''	72°C-3'	72°C-10'
*5	93°C - 5'	35	93°C - 1'	66°C-30''	72°C-3'	72°C-10'
*6	94°C - 5'	15 27	94°C - 30'' 94°C - 30''	63°C-30'' 53°C-30''	72°C-3' 72°C-3'	72°C-7'
CYP3A4						
*1B	95°C - 5'	25	95°C - 45''	55°C-30''	72°C-3'	72°C-5'
MDR1						
Ekson 21	94°C -3'	35	94°C - 20''	55°C-20''	72°C-3'	72°C-5'
Ekson 26	94°C - 3'	35	94°C - 20''	55°C-20''	72°C-3'	72°C-5'
SERT						
SERTPR	94°C - 2'	35	94°C - 1'	66°C-20''	72°C-3'	72°C-4'
SERTin2	94°C - 5'	35	94°C - 30''	60°C-20''	72°C-3'	72°C-5'

**Tablica 11. Uvjeti restrikcijskih reakcija za pojedine enzime**

Restrikcijski Enzim U/ $\mu$ L	Volumen restr. enzima $\mu$ L	Pufer	Volumen pufera x10 $\mu$ L	Sterilna destilirana voda $\mu$ L	Volumen PCR umnoška $\mu$ L	Temperatura inkubacije $^{\circ}$ C	Vrijeme inkub. sati
Ava II - 10	0,5	A	2	/	8	37	2
Nsi I - 10	0,3	H	2	7,7	10	37	4
Sma I - 10	0,5	A	1	5,7	10	25	18-20
Bam HI- 10	0,5	B	2	5,7	8	37	4
Msp I - 10	0,7	L	2	/	8	37	4
Mva I - 10	0,5	H	3	7,8	8	37	4
Pst I - 10	1,0	H	1	/	8	37	18-20
Ban I - 20	1,0	4	2	/	7	37	18-20
Nde II - 10	1,0	NdeIIb	2	/	7	37	4

**Tablica 12. Četiri haplotipa i devet genotipova MDR1 izvedenih prema SNP 2677 G/T i SNP 3435 C/T  
(Kodiranje genotipa i haplotipa: prva znamenka se odnosi na poziciju 2677, druga na poziciju 3435)  
Prema istoj shemi provedeno je kodiranje haplotipa za SERT: promotorska regija L/S i intron2 l/s**

	Genotip																	
	00		01		02		10		11		12		20		21		22	
p-2677	G	G	G	G	G	G	G	T	G	T	G	T	T	T	T	T	T	T
p-3435	C	C	C	T	T	T	C	C	C	T	T	T	C	C	C	T	T	T
Haplotip	11	11	11	12	12	12	11	21	11	22	12	22	21	21	21	22	22	22
									ili									
p-2677									G	T								
p-3435									T	C								
Haplotip									12	21								

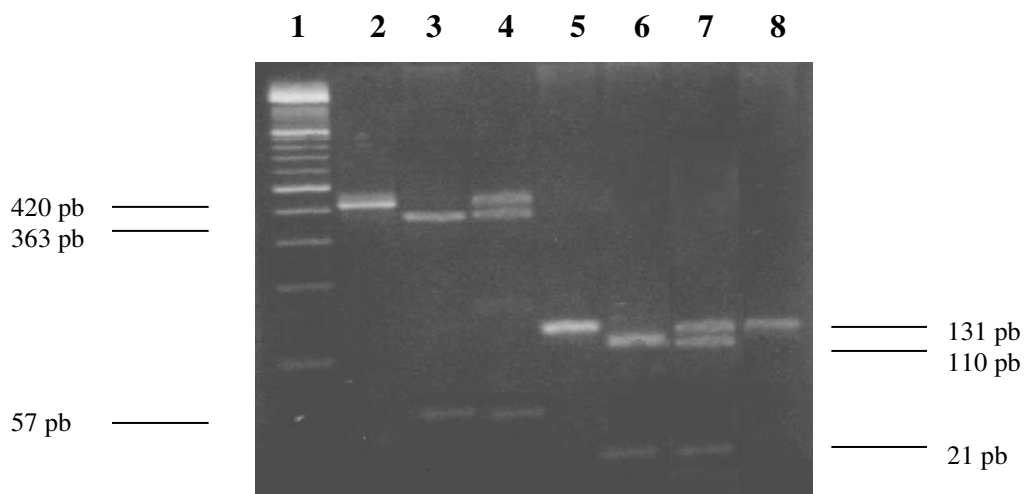
### 3.4.1.1. Genotipizacija CYP2C9

Za dokazivanje CYP2C9\*2 i \*3 alela korištena je PCR-RFLP metoda (Wang i sur, 1995.).

Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1x PCR pufer, 0.2 mM pojedinog dNTP, 0.5  $\mu$ M pojedine početnice, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ L.

CYP2C9\*2 PCR ulomak veličine 420 pb podvrgava se digestiji s Ava II.

CYP2C9\*3 PCR ulomak veličine 131 pb podvrgava se digestiji s Nsi I.



**Slika 1.** Analiza CYP2C9\*2 alela (stupci 2,3,4), \*3( stupci 5,6,7,8)

1. Mol marker    2. \*2 / \*2    3. wt / wt    4. \*2 / wt  
5. \*3 / \*3        6. wt / wt    7. \*3 / wt    8. \*3 / \*3

\* - mutirani aleli        wt - wild type – “divlji” alel

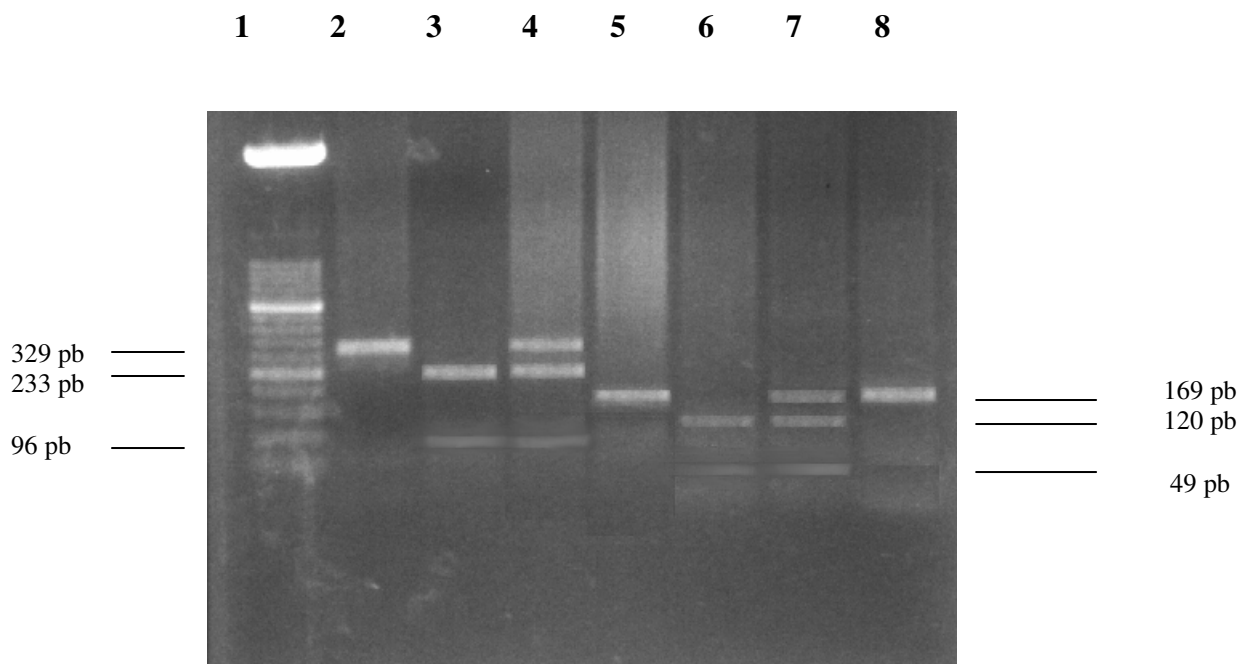
### 3.4.1.2. Genotipizacija CYP2C19

Za dokazivanje CYP2C19\*2 i \*3 alela korištena je PCR-RFLP metoda (deMoraes i sur, 1994.).

Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1x PCR pufer, 0,2 mM pojedinog dNTP, 0,5  $\mu$ M pojedine početnice, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25  $\mu$ L.

CYP2C19\*2 PCR ulomak veličine 169 pb podvrgava se digestiji s Sma I.

CYP2C9\*3 PCR ulomak veličine 131 pb podvrgava se digestiji s Bam HI I.



**Slika 2.** Analiza CYP2C19\*2 alela (stupci 5,6,7,8 ), \*3 (stupci 2,3,4)

1. Mol marker 2 . PCR umnožak 3. wt / wt 4. \*3 / wt  
5. PCR umnožak 6. wt / wt 7. \*2 / wt 8. \*2 / \*2

\* - mutirani aleli wt - wild type – “divlji” alel

### 3.4.1.3. Genotipizacija CYP2D6

Za otkrivanje funkcionalno najvažnijih alela \*1,\*3,\*4, \*5, \*6 i genskih duplikacija CYP2D6, korišteni su kombinirani PCR-RFLP testovi.

Za analizu CYP2D6\* duplikacija, provodila se Long –PCR analiza s GeneAmpXL PCR kitom (Steijns i sur,1998.). Provode se dva umnažanja: prvo s početnicama 17 f i 32 r, i drugo s početnicama 207 f i 32 r, sa svrhom potvrde rezultata. Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1x XL PCR pufer, 0,2 mM svakog dNTP, 0,35µM svake početnice, 1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>,

500 ng genomske DNA i 1 U rTth DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 50 µL.

Za dokazivanje CYP2D6\*3 i \*4 alela, provodila se PCR-RFLP metoda (Sachse i sur,1997.).

Svaka reakcijska smjesa sadržavala je 1x PCR pufer, 0,2 mM svakog dNTP, 0,5 µM svake početnice, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 50 µL.

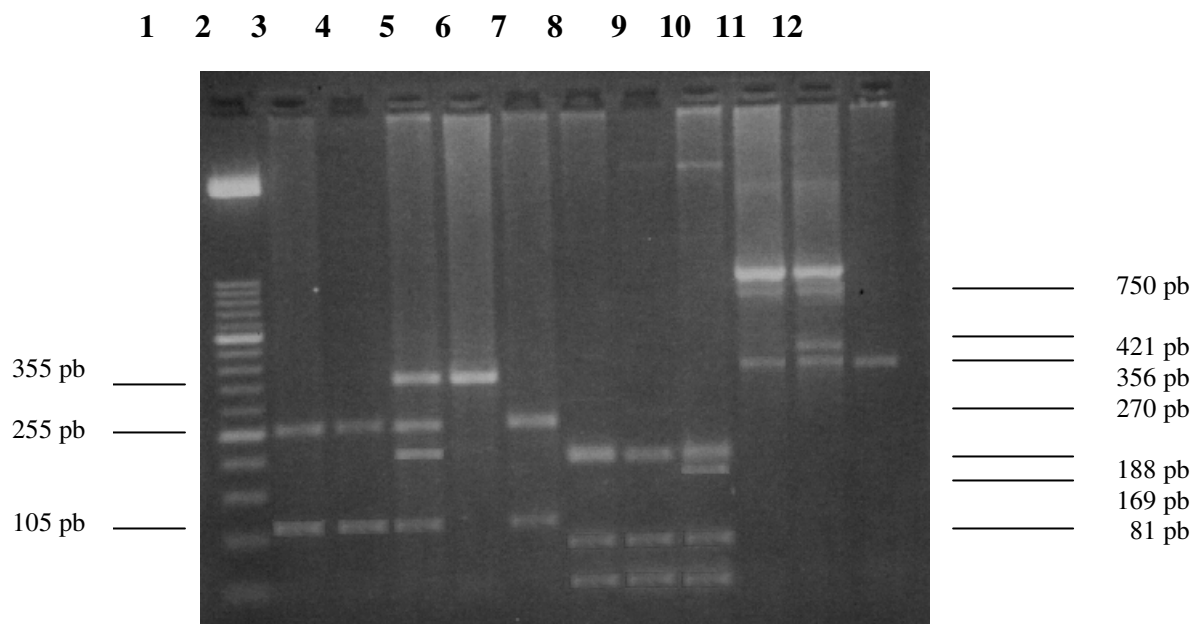
CYP2D6\*3 PCR ulomak veličine 270 pb podvrgava se digestiji s Msp I.

CYP2D6\*4 PCR ulomak veličine 355 pb podvrgava se digestiji s MvaI.

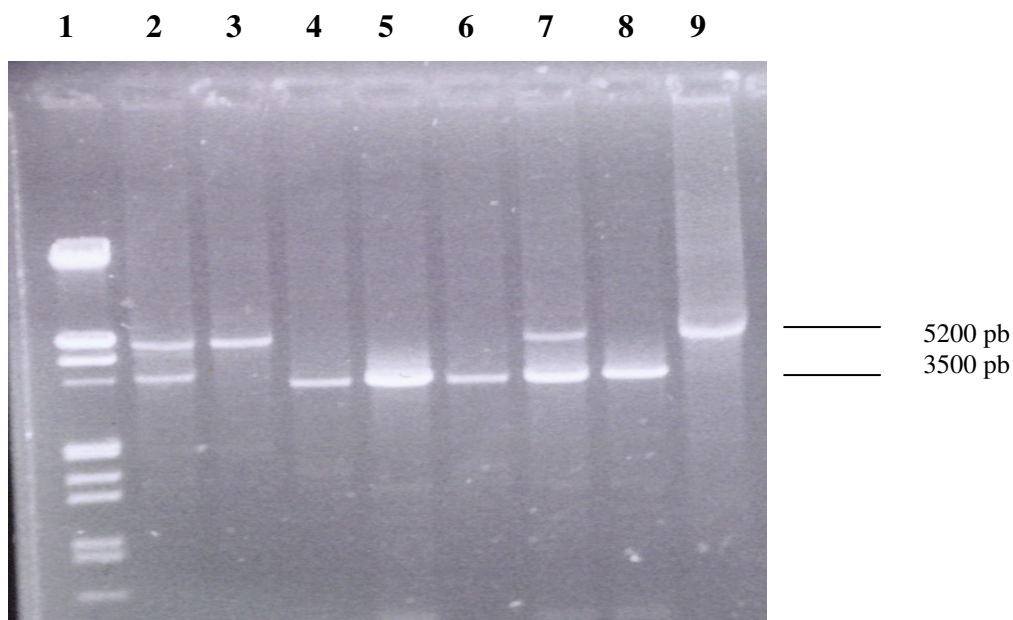
Za detekciju alela CYP2D6\*5 , provodila se Long- PCR analiza (Steen i sur,1995.). Reakcijska smjesa sadržavala je 1x XL PCR pufer, 1 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP, 0,4 µM pojedine početnice, 300 ng genomske DNA i 2 U rTth DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 50 µL. Analiza PCR produkta provodila se u 1 % agaroznom gelu ( Slika 3).

Za analizu CYP2D6\*6 alela, provodila se Tetra – primer PCR analiza (Hersberger i sur, 2000.). Reakcijska smjesa sadržavala je: 1x PCR pufer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP, 0,3 µM početnice 1new, 0,4 µM početnice Tmut, 0,4 µM početnice11, 0,3 µM početnice 2 new, 100 ng DNA i 1U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 µL.





**Slika 3.** Analiza CYP2D6 alela: CYP2D6 \*3 ( stupci 6-9),  
 CYP2D6\*4 ( stupci 2-5), CYP2D6\*6 (stupci 10-12)  
 1. Mol marker 2. wt/wt 3. wt/wt 4. wt/ \*4  
 5. PCR umnožak 6. PCR umnožak 7. wt/wt 8. wt / wt  
 9. wt/ \*3 10. wt/wt 11. wt/ \*6 12. \*6 / \*6  
 \*mutirani aleli wt - “wild” type – “divlji” aleli

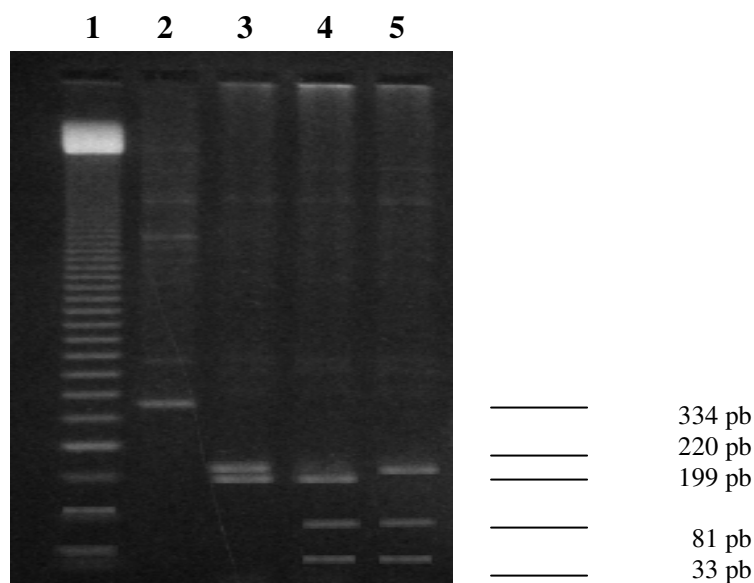


**Slika 4.** Analiza CYP2D6\*5 alela  
 1. Mol. marker 2.wt/\*5 3. wt / wt 4. \*5/\*5  
 5. int. Kon. 6.\*5/\*5 7.wt / \*5 8.\*5/\*5 9. wt / wt  
 \* - mutirani aleli wt - wild type – “divlji” alel

#### 3.4.1.4. Genotipizacija CYP3A4

Za analizu CYP3A4\*1B alela provodila se metoda PCR-RFLP (Ron 2000.). Reakcijska smjesa sadržavala je: 1x PCR pufer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM svakog dNTP, 0,1 μM svake početnice, 200 ng DNA i 1U Taq polimeraze, u volumenu od 25 μL.

CYP3A4\*1B PCR ulomak veličine 334 pb podvrgava se digestiji s Pst I.



**Slika 5.** Analiza CYP3A4\*1B alela u 3 % agaroznom gelu

1. Mol marker
2. PCR umnožak
3. wt / mut
4. mut / mut
5. wt / wt

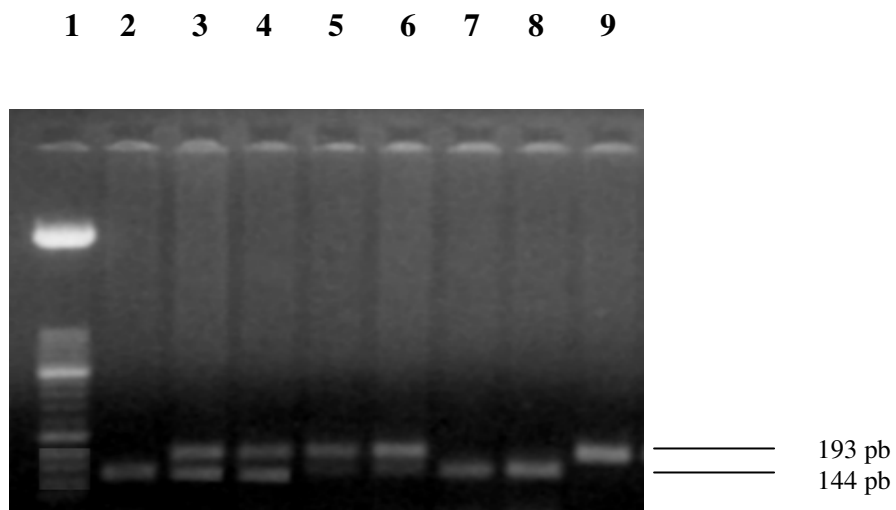
\* - mutirani aleli      wt - wild type – “divlji” alel

#### 3.4.1.5. Genotipizacija MDR1

Za detekciju polimorfizama G2677T u eksonu 21 i C3435T u eksonu 26 provodila se metoda PCR-RFLP (Cascorbi i sur, Sakaeda i sur, 2001.). Svaka reakcijska smjesa sadržavala je: 1x PCR pufer, 0,2 mM svakog dNTP, 0,5 μM svake početnice, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 150 ng genomske DNA i 1 U Taq DNA polimeraze u ukupnom volumenu od 25 μL.

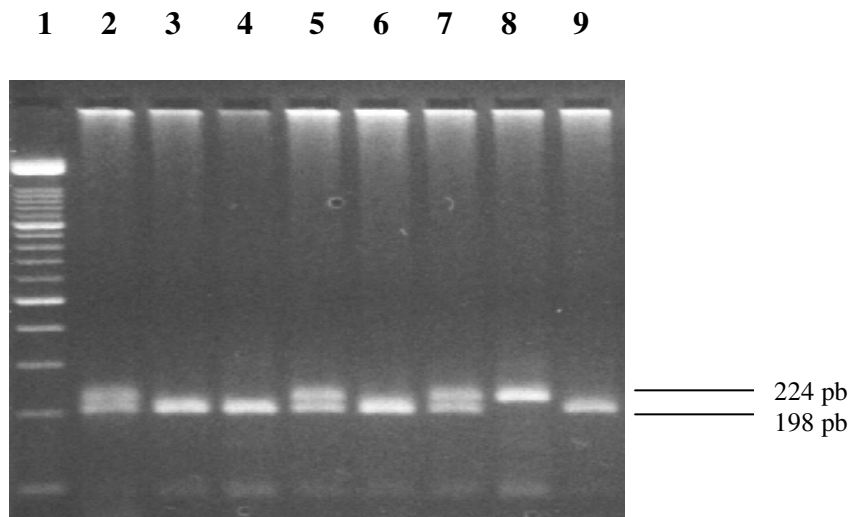
Umnoženi ulomak veličine 224 pb- ekson 21 digestira se s Ban I.

Umnoženi ulomak veličine 193 pb - ekson 26 digestira se s Nde II.



**Slika 6.** Analiza MDR1 G2677T mutacije

1. Mol marker 2. G/G 3. G/T 4. G/T  
5. T/T 6. G/T 7. G/G 8. G/G 9. T/T

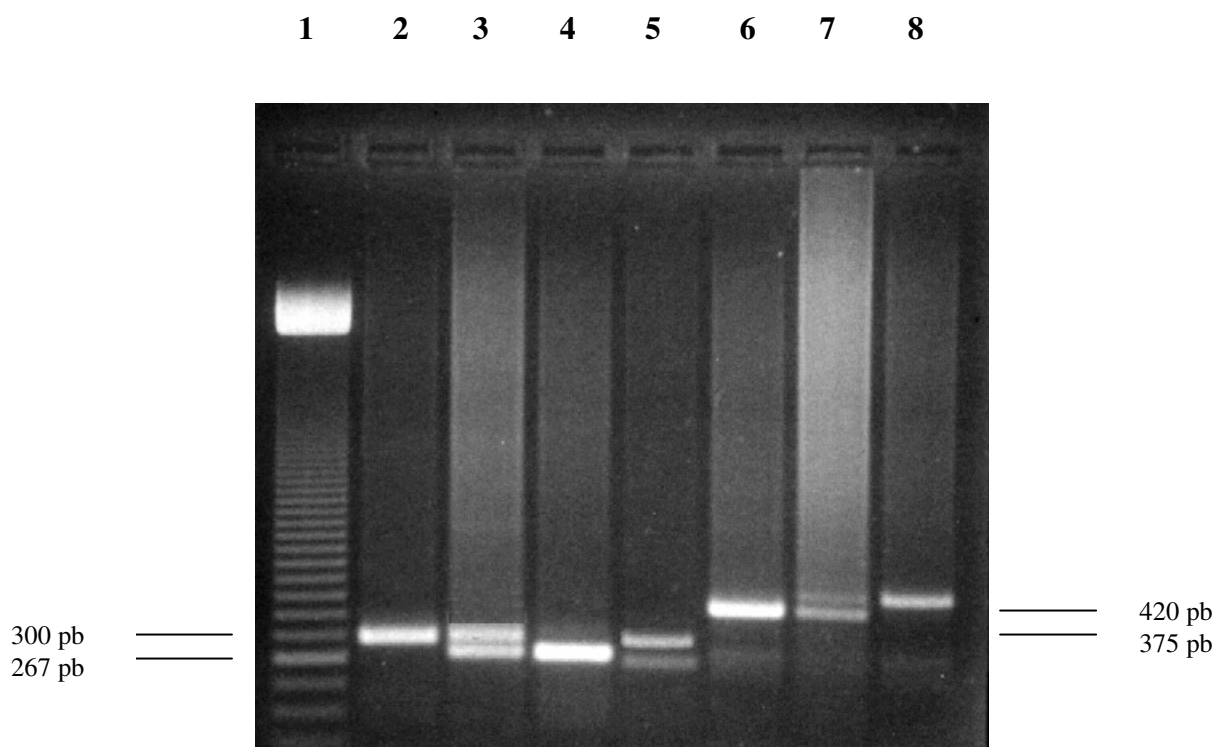


**Slika 7.** Analiza MDR1 C3436T mutacije

1. Mol marker 2. C/T 3. C/C 4. C/C  
5. C/T 6. C/C 7. C/T 8. T/T 9. C/C

### 3.4.1.6. Genotipizacija SERT

Za analizu polimorfizama SERTPR l/s i SERTin2-VNTR provodila se metoda PCR. (Rauch i sur, 2002.). Reakcijska smjesa sadržavala je: 1x PCR pufer , 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> , 0,2 mM svakog dNTP, 1 μM svake početnice, 1U Taq polimeraze, 50 ng DNA u volumenu od 25 μL.



**Slika 8.** Analiza SERTin2 (l, s) i SERTPR (L, S)  
1. Mol marker 2. 1/1 3. 1/s 4. s/s 5. 1/s  
6. S/S 7. L/S 8. L/L

**Tablica 13. Specifične početnice za PCR detekciju ispitivanih gena, očekivani PCR produkti i veličine restriksijskih ulomaka**

Gen alel	nukleotidni slijed početnica	PCR produkt (pb)	Restriksijski enzimi	Restriksijski ulomci (pb)
<b>CYP2C9</b>				
*2 f	5'- GGATATGAAGCAGTGAAGGAA-3'	420	Ava II	wt - 363, 57 mut - 420
r	5'- GGCCTTGGTTTTTCTCAACTC-3'			
*3 f	5'- TGCACGAGGTCCAGAGATGC-3'	131	NsiI	wt- 110, 21 mut - 131
r	5'- AAACATGGAGTTGCAGTGTAG-3'			
<b>CYP2C19</b>				
*2 f	5'- AATTACAACCAGAGCTTGGC-3'	169	Sma I	wt - 120, 49 mut- 169
r	5'- TATCACTTCCATAAAAAGCAAG-3'			
*3 f	5'- TATTATTATCTGTAACTAATATGA-3'	329	Bam HI	wt- 233, 96 mut- 329
r	5'- ACTTCAGGGCTTGGTCAATA-3'			
<b>CYP2D6</b>				
*dupl				
17 f	5' - TCCCCACTGACCCA ACTCT-3'	wt - 5 200		
32 r	5' -CACGTGCAGGGCACCTAGAT-3'	mut - 3 600		
207 f	5' -CCCTCAGCCTCGTCACCTCAC-3'	control - 3 200		
*3 f	5'- GATGAGCTGCTAACTGAGCCC -3'	270	Msp I	wt - 188, 82 mut - 168, 82,20
r	5'- CCCGAGAGCATACTCGGGAC -3'			
*4 f	5'- AAATCCTGCTCTTCCGAGGC -3'	355	Mva	wt - 250, 105 mut - 355
r	5'- GCCTTCGCCAACCACTCC - 3'			
*5 f	5'- ACCGGGCACCTGTACTCCTCA-3'	wt - 5 200		
r	5'- GCATGAGCTAAGGCACCCAGAC-3'	mut - 3 500		

wt - wild type-divlji tip alela

mut – mutirani aleli

Gen alel	nukleotidni slijed početnica	PCR produkt (bp)	Restriksijski enzimi	Restriksijski ulomci (bp)
*6	1new 5'-TCCCAGCTGGAATCCGGTGTCG -3' Tmut 5'-GTCGCTGGAGCAGG -3' 11 5'-TCCTCGGTCACCCA -3' 2new 5'-GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT-3'	wt - 421 mut - 356 kontrola - 750		
CYP3A4	*1B f 5'- GGACAGCCATAGAGACAACACTGCA-3' r 5'- CTTTCCTGCCCTGCACAG -3'	334	Pst I	wt – 220, 81, 33 mut- 199, 81, 33, 21
MDR1	Egz 26 f 5'- TGATGGCAAAGAAATAAAGCG A -3' r 5'- TGA CT CGATGAAGGCATGTATGT - 3' Egz 21 f 5'- TGCAGGCTATAGGTTCCAGG -3' r 5'- TTTAGTTTG ACTCACCTTCCCG-3'	193 224	Nde II Ban I	wt - 144, 49 mut- 193 wt - 198, 26 mut- 224
SERT	Stin2 f 5'-GTCAGTATCACAGGCTGCGAG-3' r 5'-TGTTCTAGTCTTACGCCAGTG-3'	l - 420 s - 375		
SERPR	f 5'- ATGCCAG CACCTAACCCCTAATGT-3' r 5'-GGACCG CAAGGTGGGCGGGA-3'	L (12) - 300 S (10) - 267 S (9) - 250		
wt - wild type- “divlji” tip alela		mut – mutirani aleli		

### 3.5. Metode fenotipizacije

#### 3.5.1. Fenotipizacija CYP2D6 (Bauman i sur, 1988, Kupfer i sur, 1986.)

##### *Kemikalije i pribor*

1. Dekstrometorfan hidrobromid, dekstrorfan tartarat, levalorfan tartarat (RBI)
2.  $\beta$ -glukuronidaza / arilsulfataza - 100 000 U/ml (Sigma)
3. Kolone za ekstrakciju na krutoj fazi (SPE), Chromabond drug (Macherey and Nagel-Duren-Njemačka)
4. KOH (Kemika), octena kiselina (Kemika), Na-acetat bezvodni (Merck), Na-karbonat (Aldrich), metanol (Merck), dikolormetan (Merck), amonijak (Kemika)

##### *Instrumenti*

Plinski kromatograf-maseni spektrometar (Agilent technologies)

- 5973 Network Mass Selective Detector
- 6890 N Network GC System,
- 7683 Series Injektor
- Chemstation software

##### *Standardi*

Matične otopine standarda i internog standarda priređene su u destiliranoj vodi (1mg/mL) i pohranjene na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Radne otopine za pripremu kalibracijske krivulje i standarda priprđene su razrjeđivanjem matičnica uzorkom mokraće koja nije sadržavala mjerene analite.

##### *Postupak*

Uzorci mokraće sakupljani su u intervalu od 8 h nakon što je bolesnik ujutro nakon noćnog gladovanja popio 30 mg dekstrometorfanhidrobromida. Uzorci mokraće su bili pohranjeni na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analize.

- 500  $\mu\text{L}$  mokraće, kalibratora ili kontrola inkubira se s 10 000 U/mL enzima pri pH 5,0 (acetatni pufer 0,5 M) na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 24 h
- Nakon inkubacije uzorcima se dodaje 40  $\mu\text{L}$  internog standarda (levalorfan 0,2 mg/ml) i 300  $\mu\text{L}$  karbonatnog pufera (pH 9; 1M)
- Uzorak se propušta preko ekstrakcijskih kolona koje su prethodno isprane s 4 mL metanola i 4 mL vode, Nakon propuštanja uzorka kolone se ispiru s 3 mL vode i 1,5 mL acetatnog pufera (pH 4,0; 0,1 M). Ispirane kolone suše se pod vakumom 5 min.
- Mjereni analiti se eluiraju s 4,5 mL otopine diklorometana-izopropanola (30:70, v/v) koja sadrži 3 % (v/v) amonij hidroksida.
- Organska faza se upari do suha u struji dušika pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- Upareni ostatak otopi se u 50  $\mu\text{L}$  smjese otapala diklorometana-izopropanola (30:70,v/v) i 1  $\mu\text{l}$  se inicira u GC-MS.
- Razdvajanje uzorka napravljeno je na kapilarnoj koloni HP-5 MS, 30 m. ID 0,25 mm i 0,25  $\mu\text{m}$  debljine stacionarne faze.
- Kolona je zagrijana na 90  $^{\circ}\text{C}$ , te nakon 1,5 min temperatura je rasla 15  $^{\circ}/\text{min}$  do 300  $^{\circ}\text{C}$  na kojoj se zadržava 20 min. Temperatura injektora je 250  $^{\circ}\text{C}$ , a detektora 280  $^{\circ}\text{C}$ .
- Snimljen je cijeli spektar (*SCAN mode*) i ciljani ioni (*SIM mode*). Uzorci su kvantificirani u SIM modu zbog bolje osjetljivosti.

### Validacija

Za procjenu metode za mjerenje dekstrometorfana i dekstrorfana ispitana je preciznost u seriji i iz dana u dan, donja granica osjetljivosti i donja granica kvantifikacije. Vrijednosti dobivene određivanjem površine pika dekstrometorfana i dekstrorfana prema internom standardu korištene su za kalibracijsku krivulju. Analizom linearne regresije koja koristi metodu najmanjih kvadrata (engl. *least-squares*) određen je nagib pravca, odsječak na osi y i koeficijent korelacije kalibracijske krivulje.

Određivanje metaboličkog omjera napravljeno je prema postupku Schmid (Schmid i sur,1985.).

$$\text{MR} = \frac{257,4 \times \text{dekstrometofan } (\mu\text{g/mL})}{271,4 \times \text{dekstrorfana } (\mu\text{g/mL})}$$

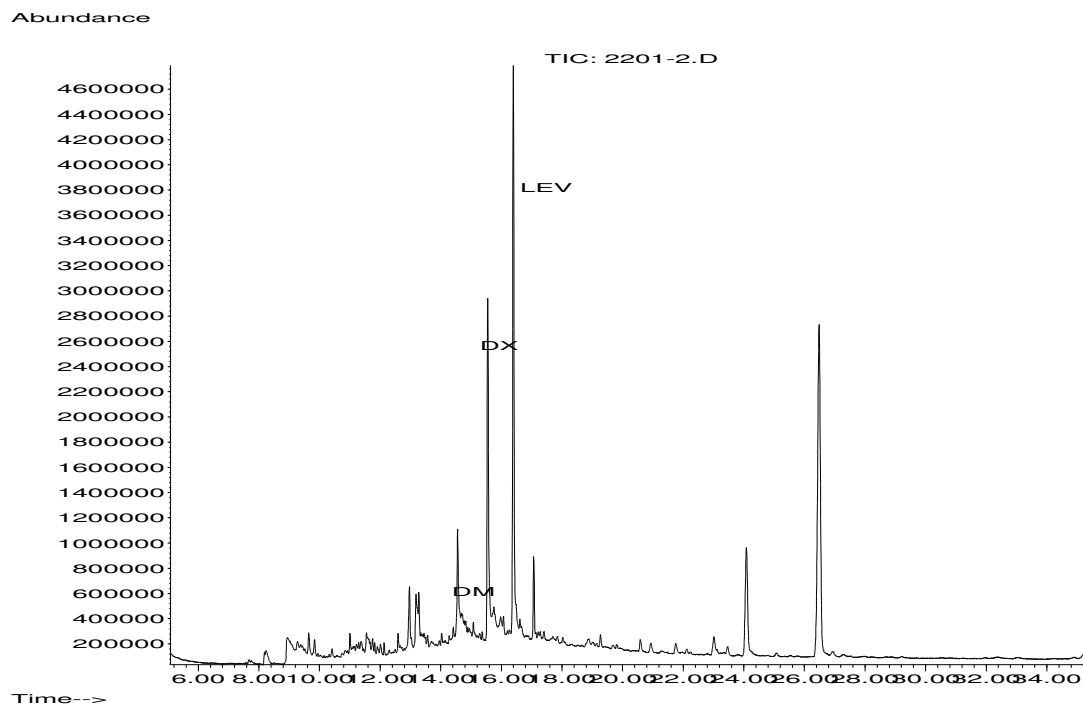
Metabolički omjer viši od 0,3 određuje spori metabolički fenotip (PM).

Metabolički omjer između 0,001 – 0,08 određuje brzi metabolički fenotip (EM).

Metabolički omjer između 0,08 – 0,3 određuje intermedijarni metabolički fenotip (IM).

Metabolički omjer niži od 0,001 određuju vrlo brzi metabolički fenotip (UEM).





**Slika 9.** Kromatogram dekstrometorfana (DM) i njegova metabolita dekstrorfana(DX) u 8- satnom uzorku mokraće nakon opterećenja ispitanika s 30 mg dekstrometorfana hidrobromida. DM i DX kvantificirani su preko površina ciljanih iona u *SIM modu* kako slijedi: ion 150 za DM i DX, ion 157 za levorfan kao interni standard. Kalibracijske krivulje su određene u rasponu: 20-1000 ng/mL za DM, i 200-30000 ng/mL za DX.

### 3.5.2. Određivanje koncentracija paroksetina, maprotilina i diazepama

(Frahner i sur. 2003.)

#### *Kemikalije i pribor*

Paroksetin, diazepam (Belupo)

Maprotilin (Pliva)

Fluoksetin (Siegfried )

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> X H<sub>2</sub>O (Sigma)

Orto-Fosforna kiselina (Aldrich)

Etilacetat (Aldrich)

Heksan (Aldrich)

#### *Aparati*

HPLC sistem sa UV/Visible Diode array -DAD detektorom (Shimadzu)

Dvije pumpe LC-10AT VP

Autoinjektor SIL-10AD VP

Grijač kolone CTO-10A VP

Detektor SPD-MA VP

Shimadzu CLASS-VP

Kolona: Symmetry C18 :150 x 4,6 mm I.D. veličina čestica 5 μm, (Waters)

#### Standardi

Matičnice standarda paroksetina, maprotilina i diazepama su priređene u metanolu (1mg/mL) i pohranjene na –20 °C. U serum zdravih dragovoljaca, koji nisu uzimali lijekove, dodana je matična otopina za pripremu standarda u rasponu od 20-500 ng/mL za paroksetin i maprotilin, te 10-1000 ng/mL za diazepam. Uzorci za kontrolu kvalitete su priređivani na isti način i pohranjeni u alikvotima na –20 °C do analize. Interni standard fluoksetin je razrijeđen sa vodom do koncentracije od 2000 ng/mL.

#### *Postupak*

Uzorak krvi se centrifugira pri 2000g 10 min i alikvoti smrzavaju do analize na –20 °C.

- 1 mL plazme se miješa s 50 μL vodene otopine internog standarda i 100 μL 0,5 M NaOH
- Smjesa se vorteksira 3 s, a zatim na nju dodaje 5 mL ekstrakcijske otopine ( heksan-etilacetat 1:1)
- Smjesa se protresa 15 min, zatim centrifugira 5 min na 3000g
- 4 mL organskog sloja se odvoji i upari u struji zraka na 37° C.
- Upareni ostatak otopi se u 150 μL mobilne faze i 50 μL se inicira u HPLC.

Analiti su razdvojeni tekućinskom kromatografijom, detektirani na određenom Rf, potvrđeni specifičnim UV spektrom od 190 do 360 nm, a kvantificirani su pri valnim duljinama kako slijedi.: paroksetin i maprotilin 210 nm, diazepam 230 nm, interni standard fluoksetin 210 nm.

- Ukupni protok 1,5 ml/min

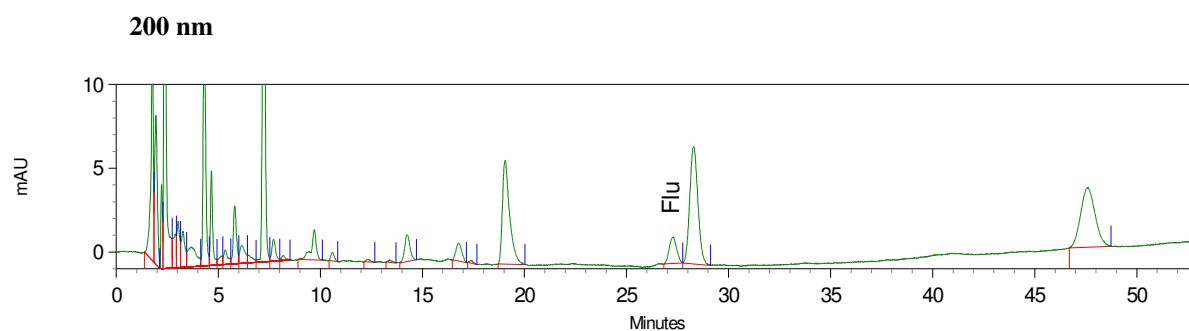
- Pumpa A: Acetonitril

- Pumpa B: 0,05 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O pH 3,8

<u>Vrijeme (min)</u>	<u>Pumpa A(ml/min)</u>	<u>Pumpa B (ml/min)</u>
0,0-17,00	0,45	1,05
17,00-50,00	0,60	1,4

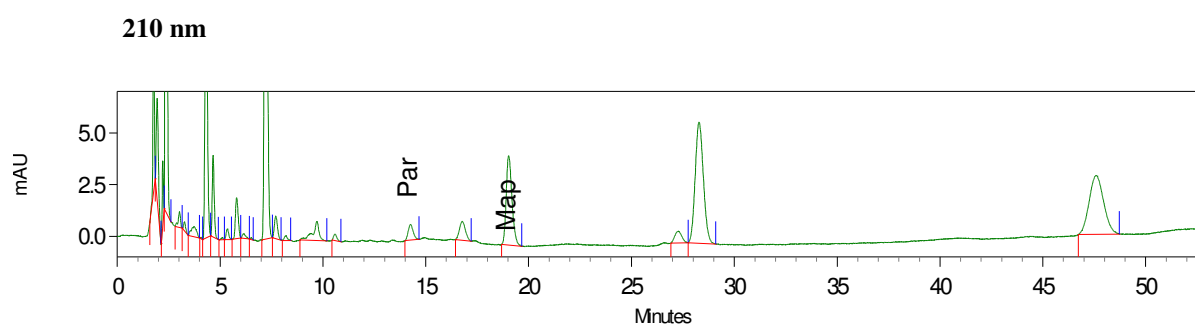
### *Validacija*

Za procjenu metode za simultano mjerenje paroksetina, maprotilina i diazepama ispitana je preciznost u seriji, preciznost iz dana u dan, donja granica osjetljivosti i donja granica kvantifikacije, linearnost. Vrijednosti dobivene određivanjem površine pika mjenenog analita prema internom standardu korištene su za kalibracijsku krivulju. Analizom linearne regresije koja koristi metodu najmanjih kvadrata određen je nagib pravca, odsječak na osi y i koeficijent korelacije kalibracijske krivulje.



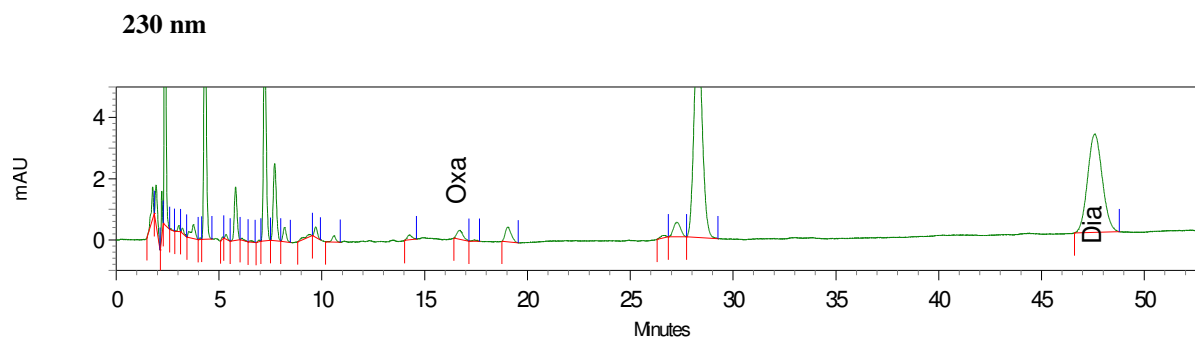
**1: 200 nm, 8 nm**

Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
<b>Fluoxetine</b>	27,253	39716	<b>1,000</b>	ng/ml



**2: 210 nm, 8 nm**

Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
<b>Pararoxetine</b>	14,261	12871	<b>42,668</b>	ng/ml
<b>Maprotilin</b>	19,029	84127	<b>137,223</b>	ng/ml



**3: 230 nm, 8 nm**

Name	Retention Time	Area	ISTD concentration	Units
<b>Oxazepam</b>	16,683	5966	<b>6,631</b>	ng/ml
<b>Diazepam</b>	47,595	159410	<b>235,776</b>	ng/ml

**Slika 10.** Kromatogrami seruma ispitanika na terapiji: 50 mg maprotilina, 20 mg paroksetina i 20 mg diazepam (koncentracije u stanju ravnoteže)

### 3.6 Statistička analiza

Za sve analizirane varijable učinjena je deskriptivna statistika. Učestalost pojedinih genotipova i haplotipova u zdravoj populaciji i bolesnika od velikog depresivnog poremećaja uspoređena je pomoću testa proporcija. Distribucija i učestalost genotipova po fenotipskim skupinama: wt/mut ( brzi / spori metabolizatori); dobar odgovor na terapiju / rezistentni ("responders"-nonresponders"); sa nuspojavama / bez nuspojava; analizirana je  $\chi^2$  testom i testom proporcija. Također je određen omjer vjerojatnosti «ODS RATIO» (OR) i 95%-tni intervali pouzdanosti procjene. Utjecaj polimorfizama ispitivanih gena na koncentracije lijeka i metabolički odnos lijeka / metabolita u plazmi ili urinu statistički je obrađen pomoću ANOVA, analizom varijance za ponovljena mjerenja. Razlike između pojedinih genotipskih grupa testirane su neparametrijskim Mann-Whitney U-testom. Interpretacija rezultata postavljena je na 5 %-tnoj razini značajnosti ( $p < 0,05$ ).

Medcalc 4.10 (Frank Schoonjans, Mariakerke, Belgium) kompjutorski program je korišten za statističku obradu podataka.

## 4.REZULTATI

**Tablica 14.**

Demografski podatci o ispitanicima

	Zdravi ispitanici	Bolesnici od VDP
Ukupan broj ispitanika	286	114
Spol (muški / ženski )	130/156	59 / 55
Dob (godine)(mean±SD)	40,2 ±16,4	44,3 ±12,6
Dobni raspon (godine)	21-52	24-59

### **4.1. Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT gena u zdravoj populaciji i bolesnicima s velikim depresivnim poremećajem (VDP)**

Molekularna analiza genotipa metaboličkih enzima CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, i transportnih proteina MDR1 i SERT provedena je u 286 zdravih ispitanika i 114 bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Napravljena je statistička analiza rezultata da bi se ustanovilo razlikuju li se dvije populacije po učestalosti ispitivanih genotipova i haplotipova. Ujedno je istraženo razlikuju li se populacije statistički po raspodjeli genotipova i haplotipova unutar svake populacije.

**Tablica 15. Učestalost “divljih” (wt) i mutiranih alela (\*) gena CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u zdravih ispitanika i bolesnika s VDP**

Geni i aleli	Zdravi (n=286)		VDP (n=114)		$\chi^2$	OR (95% CI)	test proporcija
	n	%	n	%			
<b>CYP2C9:</b>							
1-wt	460	80,4	177	77,6	p = 0,353	1,183 (0,814-1,720)	p = 0,619
*2	80	14,0	32	14,0	$\chi^2 = 2,078$		
*3	32	5,6	19	8,4	ss = 2		
ukupno mut	112	19,6	51	22,4			p = 0,431
<b>CYP2C19:</b>							
1-wt	486	84,9	182	79,8	p = 0,096	1,428 (0,961-2,123)	p = 0,077
*2	86	15,1	46	20,2	$\chi^2 = 3,765$		
*3	0	0,0	0	0,0	ss = 1		
ukupno mut	86	15,1	46	20,2			
<b>CYP2D6:</b>							
1- wt	436	76,3	145	63,6	<b>p = 0,0008</b>		<b>p = 0,003</b>
dupl.	24	4,2	16	7,1	$\chi^2 = 26,24$		p = 0,098
*3	14	2,5	15	6,6	ss = 5		
*4	80	13,9	31	13,6			
*5	11	1,9	12	5,2	$\chi^2 = 13,18$		
*6	7	1,2	9	3,9	ss = 2		
ukupno mut	112	19,5	67	29,3	<b>p = 0,0014</b>	<b>1,799(1,260-2,569)</b>	<b>p = 0,002</b>
<b>CYP3A4</b>							
1- wt	564	98,6	225	98,6	p = 0,806	0,940 (0,747-1,574)	p = 0,927
*1B	8	1,4	3	1,4	$\chi^2 = 0,060$		
ukupno mut	8	1,4	3	1,4	ss = 1		
<b>MDR1</b>							
Eks 21							
G	319	55,8	139	60,9	p = 0,207	0,807(0,590-1,104)	p = 0,180
T	253	44,2	89	39,1	$\chi^2 = 1,592$	ss=1	
Eks 26							
C	310	54,2	130	57,1	p = 0,518	0,892 (0,655-1,216)	p = 0,469
T	262	45,8	98	42,9	$\chi^2 = 0,417$	ss=1	
<b>SERT</b>							
SERTPR							
L	343	60,0	137	60,1	p = 0,961	0,995 (0,727-1,361)	p = 0,9744
S	229	40,0	91	39,9	$\chi^2 = 0,02$	ss= 1	
SERTin2							
l	355	62,0	120	52,6	<b>p = 0,017</b>	<b>1,472 (1,080-2,007)</b>	<b>p = 0,014</b>
s	217	38,0	108	47,3	$\chi^2 = 5,627$	ss= 1	

**Tablica 16 Učestalost genotipova CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u zdravih ispitanika i bolesnika s VDP**

Gen Genotip	Zdravi (n=286)		VDP (n=114)		$\chi^2$	test proporcija
	n	%	n	%		
<i>CYP2C9</i>						
wt/wt	184	64,3	68	59,6	p = 0,667	p= 0,380
wt/mut	92	32,2	41	36,1	$\chi^2 = 0,810$	p= 0,466
mut/mut	10	3,5	5	4,3	ss = 2	p= 0,672
<i>CYP2C19</i>						
wt/wt	209	73,1	68	59,6	<b>p=0,001</b>	<b>p= 0,008</b>
wt/mut	68	23,8	46	40,4	$\chi^2 = 13,567$	<b>p= 0,0009</b>
mut/mut	9	3,1	0	0,0	ss = 2	<b>p= 0,0554</b>
<i>CYP2D6:</i>						
wt/wt	172	60,1	55	48,2	<b>p= 0,00028</b>	<b>p= 0,03</b>
dupl	12	4,1	8	7,1	$\chi^2 = 18,937$	p= 0,242
wt/mut	94	32,7	35	30,7	ss = 3	p= 0,675
mut/mut	9	3,1	16	14,0		<b>p= 0,00005</b>
<i>CYP3A4</i>						
wt/wt	278	97,2	111	97,4	p= 0,8047	p=0,927
wt/mut	8	2,8	3	2,6	$\chi^2 = 10,061$	p=0,927
mut/mut	0	0,0	0	0,0	ss = 1	
<i>MDR1</i>						
Eks 21						
G/G	91	30,9	38	33,4	p = 0,161	p=0,769
G/T	137	48,9	62	54,4	$\chi^2 = 3,644$	p=0,241
T/T	58	20,2	14	12,2	ss = 2	<b>p=0,06</b>
Eks 26						
C/C	85	29,7	33	28,9	p = 0,501	p=0,878
C/T	140	48,9	62	54,3	$\chi^2 = 1,379$	p=0,326
T/T	61	21,4	19	16,6	ss = 2	p=0,292
<i>SERT</i>						
SERTPR						
L / L	100	34,9	40	35,1	p= 0,802	p=0,981
L / S	143	50,0	54	47,4	$\chi^2 = 0,441$	p=0,634
S / S	43	15,1	20	17,5	ss = 2	p=0,534
SERTin2						
l / l	117	40,9	35	30,7	<b>p= 0,084</b>	<b>p=0,05</b>
l / s	121	42,3	51	44,7	$\chi^2 = 4,942$	p=0,657
s / s	48	16,8	28	24,6	ss = 2	<b>p=0,07</b>



### CYP2C9

Istražena je učestalost dviju najčešćih mutacija CYP2C9\*2 i CYP2C9\*3. Rezultati su prikazani u tablicama 15 i 16. Mutacija 2C9\*2 pojavljivala se s učestalošću od 14,0% i u zdravoj (kontrolnoj) populaciji i u bolesnika s VDP. Učestalost mutacije 2C9\*3 iznosila je 5,6% za zdravu populaciju i 8,4% za bolesnike s VDP i statistički se nije značajno razlikovala. Udio "divljih" (engl. wildtype, wt) alela u zdravoj populaciji iznosio je 80,4%, a u VDP 77,6%. Udio ispitanika koji su bili homozigotni za wt-alele, odnosno imali ekstenzivni metabolički fenotip iznosio je u zdravoj populaciji 64,3%, a u VDP 59,6%; zdravi heterozigoti bili su zastupljeni s 32,2%, dok ih je među bolesnicima s VDP bilo 36,1%. Mutirani homozigoti, odnosno spori metabolički fenotip imao je učestalost u zdravih ispitanika 3,5% a u ispitanika s VDP 4,3%. Možemo zaključiti da se zdrava populacija i bolesnici s VDP nisu statistički značajno razlikovali po učestalosti polimorfnih alela i genotipova metaboličkog enzima CYP2C9.

### CYP2C19

Od analiziranih alela CYP2C19 i u zdravih i u bolesnih ispitanika identificiran je samo alel 2C19\*2, dok alel 2C19\*3 nije potvrđen niti u jednoj analizi. Učestalost homozigotnih nosioca divljih (wt) alela bila je veća (73,1%) u zdravoj populaciji nego u bolesnika s VDP (59,6%) i statistički se značajno razlikovala ( $p=0,008$ ). Homozigotnih mutacija bilo je 3,1% u zdravih ispitanika, dok u bolesnih ispitanika nisu pronađene, te se razlika približava statističkoj značajnosti ( $p=0,055$ ). Heterozigota je bilo manje u zdravoj populaciji (23,8%) u odnosu na bolesnike s VDP (40,4%), što je statistički značajna razlika ( $p=0,0009$ ). Podatci su prikazani u u Tablicama 15 i 16.

### CYP2D6

Istražili smo funkcionalno važne alele koji su najučestaliji u bijeloj populaciji: CYP2D6\*1\*3\*4\*5\*6 i genske duplikacije. Podatci su prikazani u Tablicama 15 i 16. Udio "divljih"(wt), umnoženih (dupl) i mutiranih (mut) alela se statistički značajno razlikovao u zdravoj populaciji i bolesnika s VDP. Učestalost "divljih"(wt) alela bila je statistički značajno veća u zdravoj populaciji (76,3%) nego u bolesnika s VDP (63,6%) ( $p=0,003$ ). Udio mutiranih alela bio je statistički značajno veći u bolesnika s VDP nego u zdravoj populaciji ( $p=0,0014$ ; OR= 1,799; 95% CI:1,260-2,569). Brzom metaboličkom fenotipu (wt/wt) pripada više (60,1%) zdravih ispitanika nego bolesnika s VDP (48,2%) i razlika je statistički značajna ( $p=0,030$ ). I učestalost sporoga metaboličkog fenotipa (mut/mut) značajno se razlikovala

među ispitivanim skupinama ( $p=0,00005$ ), a bila je manja (3,1%) u zdravih nego u bolesnika s VDP (14,0%). Stoga je i raspodjela genotipova unutar skupina statistički značajno različita ( $p=0,00028$ ;  $\chi^2 = 18,937$ ;  $ss=3$ ).

#### CYP3A4

U ispitivanim populacijama identificirano je svega 2,8% zdravih osoba i 2,6% bolesnika s VDP, heterozigotnih nosioca alela CYP3A4\*1B, dok mutirani homozigoti nisu identificirani.

#### MDR1

U tablicama 15 i 16 nalaze se i podatci o molekularnim analizama gena MDR1.

U genu MDR1 analiziran je polimorfizam G2679T u egzonu 21 i C3436T u egzonu 26. Učestalost G-alela bila je 55,8% u zdravih ispitanika i 60,9% u bolesnika s VDP. Učestalost C-alela bila je 54,2% u zdravih ispitanika i 57,1% u bolesnika s VDP. Učestalost genotipa GG bila je 31,9% u zdravih ispitanika i 33,4% u bolesnika s VDP, nosioci genotipa TT bili su zastupljeni s 20,2% u zdravoj populaciji i 12,2% u ispitanika s VDP. Genotip CC bio je prisutan u 29,7% zdravih i 28,9% bolesnih ispitanika, dok je učestalost genotipa TT iznosila 21,4% u zdravoj i 16,6% u populaciji s VDP. Zastupljenost i raspodjela genotipova u zdravoj populaciji i bolesnika od VDP nije bila statistički značajno različita. Kada smo grupirali genotip GG+GT i usporedili učestalosti u zdravoj populaciji i bolesnika s VDP utvrdili smo da se, premda je učestalost bila niža u zdravoj populaciji (79,8%) u odnosu na bolesnike s VDP (87,8%), nije radilo o statistički značajnoj razlici ( $p = 0,060$ ;  $\chi^2 = 3,530$ ;  $OR = 0,553$ , 95%  $CI: 0,293-1,032$ ). Podatak nije naveden u tablicama.

#### SERT

U genu SERT analizirana su dva polimorfizma: dugi aleli L, l i kratki aleli S, s u promotorskoj regiji i intronu 2 (tablice 15 i 16). Učestalost alela L promotorske regije iznosila je 60,0% za zdrave ispitanike i 60,1% za bolesnike s VDP. Učestalost l-alela introna 2 bila je statistički značajno veća (62,0%) u zdravih nego u bolesnih ispitanika (52,6%,  $p=0,014$ ). Raspodjela alela l i s u intronu 2 također se statistički značajno razlikovala u ispitivanim skupinama ( $p=0,017$ ;  $OR = 1,472$ , 95%  $CI: 1,080-2,007$ ). Učestalost genotipa LL bila je 34,9% u zdravoj populaciji i 35,1% među ispitanicima s VDP, a genotipa SS 15,1%, odnosno 17,5% za svaku navedenu skupinu, što nije statistički značajna razlika. Učestalost genotipa l/l bila je statistički značajno veća u zdravih ispitanika (40,9%) nego u bolesnika s VDP (30,7%) ( $p=0,05$ ). Raspodjela genotipova ll i ss u zdravoj populaciji razlikovala se od raspodjele istih genotipova u bolesnika od VDP, ali nije bila statistički značajna ( $p=0,084$ ).

## **4.2 Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u bolesnika s VDP prema odgovoru na terapiju**

Za analizu podataka ispitanici su bili podijeljeni u tri skupine prema odgovoru na terapiju koji se vrjednovao od 21. do 42. dana prema ljestvici HAMD:

- I. skupina s 38 ispitanika koji su imali dobar odgovor na terapiju, HAMD < 10
- II. skupina s 28 bolesnika koji su imali djelomičan odgovor na terapiju, HAMD < 16
- III. skupina s 48 ispitanika koji su bili rezistentni na terapiju, HAMD > 16.

Statistička analiza podataka za asocijacijsku studiju fenotipa učinkovitosti terapije i pojedinih genotipova i haplotipova napravljena je za skupinu ispitanika koji su imali dobar odgovor na terapiju, djelomičan odgovor, te skupinu koja je bila rezistentna na terapiju. Učestalost i raspodjela polimorfnih alela, genotipova i haplotipova po skupinama prikazana je u tablicama 17- 21.

**Tablica 17. Učestalost divljih (wt) i mutiranih alela (\*) gena CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u bolesnika s VDP prema odgovoru na terapiju**

Geni i aleli	Dobar o. (n=38)		Djelomičan o. (n=28)		Rezistentni (n=48)		$\chi^2$	OR (95% CI)	test proporcija
	N	%	n	%	n	%			
<b>CYP2C9:</b>									
1-wt	60	78,9	45	80,4	74	77,1	p= 0,988	1,115(0,538-2,310)	p=0,769
*2	10	13,2	7	12,5	13	13,6	$\chi^2= 0,318$		
*3	6	7,9	4	7,1	9	9,3	ss = 4		
ukupno mut	16	21,1	11	19,6	22	22,9	$\chi^2= 0,238$ , ss=2,		p= 0,888
<b>CYP2C19:</b>									
1-wt	62	81,6	48	85,7	72	5,0	p=0,254	1,476(0,703-3,099)	p=0,301
*2	14	18,4	8	14,3	24	25,0	$\chi^2=2,739$		
*3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	ss = 2		
ukupno mut	14	18,4	8	14,3	24	25,0			
<b>CYP2D6</b>									
1-wt	62	64,5	38	63,3	52	65,0	p=0,077	1,018 (0,547-1,896)	p=0,597
*dupl.	0	0,0	8	13,4	8	10,0	$\chi^2=16,863$	0,981(0,528-1,828)	<b>p=0,001</b>
*3	8	8,3	2	3,3	5	6,3	ss = 10		
*4	15	15,0	8	13,4	8	10,6			
*5	8	8,3	2	3,3	3	3,7			
*6	3	3,3	2	3,3	4	5,0			
ukupno mut	34	35,5	22	36,7	28	35,0			p=0,846
<b>CYP3A4</b>									
1- wt	76	100,0	54	96,4	95	98,9			p =0,372
*1B	0	0,0	2	3,6	1	1,1			
<b>MDR1</b>									
<b>Eks 21</b>									
G	40	52,6	35	62,5	64	66,7	p= 0,166	0,556(0,299-1,03)	p=0,06
T	36	47,4	21	37,5	32	33,3	$\chi^2=3,585$	ss= 2	
<b>Eks 26</b>									
C	40	52,6	33	58,9	57	59,3	p = 0,638	0,760(0,414-1,395)	p=0,375
T	36	47,4	23	42,1	39	40,7	$\chi^2= 0,898$	ss= 2	
<b>SERT</b>									
<b>SERTPR</b>									
L	50	65,8	33	58,9	54	56,3	p=0,422	1,496(0,803-2,787)	p=0,203
S	26	34,2	24	41,1	42	43,7	$\chi^2= 1,724$	ss= 2	
<b>SERTin2</b>									
l	36	47,4	34	60,7	50	52,1	p=0,312	0,828(0,453-1,513)	p=0,539
s	40	52,6	22	39,3	46	47,9	$\chi^2=2,323$	ss= 2	

**Tablica 18. Učestalost genotipova CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u skupini 114 bolesnika s VDP prema odgovoru na terapiju**

Geni i aleli	Dobar odgovor (n=38)		Djelomičan o(n=28)		Rezistentni (n=48)		$\chi^2$	test proporcija
	n	%	n	%	n	%		
<i>CYP2C9</i>								
wt/wt	23	60,5	17	60,8	28	58,4	p=0,990	p = 0,837
wt/mut	14	36,9	11	39,2	18	37,5	$\chi^2=0,019$	p = 0,950
mut/mut	1	2,6	0	0,0	2	4,1	ss = 2	p = 0,700
<i>CYP2C19:</i>								
wt/wt	24	63,1	20	71,4	24	50,0	p= 0,160	p = 0,222
wt/mut	14	36,9	8	28,6	24	50,0	$\chi^2=3,665$	p = 0,222
mut/mut	0	0,0	0	0,0	0	0,0	ss = 2	
<i>CYP2D6:</i>								
wt/wt	19	50,0	14	50,0	22	45,9	p= 0,239	p = 0,700
dupl	0	0,0	4	14,3	4	10,5	$\chi^2=7,978$	<b>p = 0,021</b>
wt/mut	10	26,3	7	25,0	18	37,5	ss = 6	p = 0,271
mut/mut	5	13,1	3	10,7	8	16,6		p = 0,652
<i>CYP3A4</i>								
wt/wt	38	100,0	26	92,9	47	97,9		p= 0,370
wt/mut	0	0,0	2	7,1	1	2,1		
mut/mut	0	0,0	0	0,0	0	0,0		
<i>MDR1</i>								
Ekson 21								
G/G	10	26,3	7	25,0	21	43,8	p=0,247	p = 0,094
G/T	21	55,3	18	63,3	23	47,9	$\chi^2=5,418$	p = 0,498
T/T	7	18,4	3	10,7	4	8,3	ss = 4	p = 0,164
ekson 26								
C/C	10	26,3	8	28,6	19	39,6	p = 0,370	p = 0,196
C/T	20	52,6	17	60,7	19	39,6	$\chi^2= 4,270$	p = 0,227
T/T	8	21,1	3	10,7	10	20,8	ss = 4	p = 0,980
<i>SERT</i>								
SERTPR								
L / L	17	44,8	10	35,7	13	27,1	p = 0,459	p = 0,088
L / S	14	36,8	13	46,4	27	56,2	$\chi^2=3,621$	p = 0,073
S / S	7	18,4	5	17,9	8	16,7	ss = 4	p = 0,831
SERTin2								
1/1	12	31,6	11	39,3	12	25,0	p = 0,202	p = 0,499
1/s	13	34,2	11	39,3	27	56,2	$\chi^2=5,952$	<b>p = 0,041</b>
s/s	13	34,2	6	21,4	9	18,8	ss = 4	p = 0,102

**Tablica 19. Analiza haplotipova gena MDR1 izvedenih iz 2677 G/T i 3435 C/T prema odgovoru na terapiju**

Haplotip	Dobar o. (n=38)		Djelomičan o.(n=28)		Rezistentni (n=48)		test proporcija
	n	%	n	%	n	%	
11 (G-C)	29	29,6	26	32,1	40	36,4	p=0,322
12 (G-T)	23	23,5	21	25,9	27	24,3	p=0,885
21 (T-C)	21	21,4	17	21,0	18	16,2	p=0,334
22 (T-T)	25	25,5	17	21,0	26	23,4	p=0,726

**Tablica 20. Analiza haplotipova gena MDR1 izvedenih iz 2677A/T i 3435C/T prema odgovoru na terapiju**

Haplotip	$\chi^2$	p	Odd ratio	95% CI odds ratio
11 vs ostali	0,708	0,400	0,746	0,417-1,335
12 vs ostali	0,000	0,985	0,954	0,504-1,805
21 vs ostali	0,620	0,431	1,409	0,701-2,833
22 vs ostali	0,036	0,850	1,120	0,595-2,106

**Tablica 21. Analiza haplotipova gena SERT izvedenih iz SERTPR – L/S i SERTin2-l/s u skupinama ispitanika prema odgovoru na terapiju**

Haplotip	Dobar o. (n=38)		Djelomičan o.(n=28)		Rezistentni (n=48)		test proporcija
	n	%	n	%	n	%	
11 (L-l)	27	27,5	26	32,1	30	27,0	p= 0,9324
12 (L-s)	29	29,5	22	27,2	28	25,2	p= 0,4794
21 (S-l)	23	23,5	23	28,4	29	26,2	p= 0,6576
22 (S-s)	19	19,5	10	12,0	24	21,6	p= 0,6902

$$\chi^2 = 3,570 \quad ss = 6 \quad p = 0,7346$$

### CYP2C9

Bolesnici s dobrim odgovorom na farmakoterapiju, djelomičnim odgovorom i bolesnici rezistentni na terapiju nisu se statistički značajno razlikovali po učestalosti alela i genotipova enzima CYP2C9. Homozigoti za wt-alel bili su zastupljeni sa 60,5% u skupini s dobrim odgovorom na terapiju, 80,4% u skupini s djelomičnim odgovorom, dok je učestalost među rezistentnima bila 58,4%. Mutiranih je homozigota bilo 2,6% u skupini s dobrim učinkom terapije, a 4,1% među rezistentnima, dok u skupini s djelomičnim odgovorom na terapiju nije bilo mutiranih homozigota. Rezultati su prikazani u tablicama 17 i 18.

### CYP2C19

Učestalost polimorfnih alela i genotipova enzima CYP2C19 također se nije statistički značajno razlikovala među bolesnicima. Jedini identificirani mutirani alel 2C19\*2 imao je učestalost 18,4% među bolesnicima s učinkovitim odgovorom, 14,3% u bolesnika s djelomičnim odgovorom i 25% među rezistentnim bolesnicima. Rezultati su prikazani u tablicama 17 i 18.

### CYP2D6

Uočena je različita raspodjela alela između ispitanih skupina bolesnika koja, međutim, nije dosegla statističku značajnost na razini od 5% ( $p=0,077$ ). Razlika u učestalosti genskih duplikacija CYP2D6 između bolesnika s različitom učinkovitošću terapije i statistički je potvrđena ( $p=0,001$ ). Učestalost genskih duplikacija je u rezistentnih bolesnika iznosila 10,5%, u bolesnika s djelomičnim odgovorom na terapiju 14,3%, dok među bolesnicima s dobrim odgovorom duplikacije nisu ustanovljene ( $p=0,021$ ) (Tablica 18). Učestalost ostalih alela i genotipova nije se statistički razlikovala po skupinama. Rezultati su prikazani u tablicama 17 i 18.

### CYP3A4

Zastupljenost alela \*1B vrlo je niska među svim ispitivanim skupinama i nije se značajno razlikovala u fenotipu učinkovitog odgovora, djelomične učinkovitosti i rezistencije (0,0% : 3,6% : 1,1%). Rezultati su prikazani u tablicama 17 i 18.

### MDR1

Rezultati istraživanja učestalosti polimorfnih alela u skupinama ispitanika pokazuju da postoji razlika u učestalosti alela G2677, koji je učestaliji u skupini bolesnika koja je bila rezistentna na terapiju (66,7%) u odnosu na bolesnike s djelomičnim odgovorom (62,5%) i dobrim odgovorom (52,6%), ali ta razlika nije statistički značajna ( $p=0,061$ ) (Tablica 17).

Raspodjela genotipova također pokazuje da je genotip GG2677 bio učestaliji u rezistentnih bolesnika (43,8%) prema bolesnicima s dobrim odgovorom (26,39%) i djelomičnim odgovorom (25%), ali razlika nije statistički značajna ( $p=0,094$ ) (Tablica 18). Također nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli haplotipova na pozicijama 2677GT i 3435CT. Rezultati su prikazani u tablicama 19 i 20.

#### Serotoninski transporter -SERT

Učestalost alela S, s i L, l promotorske regije i introna 2 u genu serotoninskog transportera nije se značajno razlikovala među ispitivanim skupinama bolesnika s obzirom na učinkovitost farmakoterapije (Tablica 17). Prema učestalosti pojedinih genotipova postojala je razlika u učestalosti genotipa LL promotorske regije između bolesnika s dobrim odgovorom (44,8%), djelomičnim odgovorom (35,7%), i rezistentnih bolesnika (27,1%) koja, međutim, nije dosegla statističku značajnost ( $0,088$ ). Učestalost genotipa L/S bila je 36,8% za učinkovitu terapiju, 46,4% za djelomičan odgovor i 56,2% u rezistentnih bolesnika, ali razlika nije dosegla statističku značajnost ( $p=0,073$ ) (Tablica 18). Zastupljenost genotipa l/s u intronu 2 bila je niža u bolesnika s dobrim odgovorom na terapiju (34,2%) u odnosu na rezistentne bolesnike, 56,2%) i ta razlika je bila statistički značajna ( $p=0,041$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti haplotipova promotorske regije i introna 2 između skupina ispitanika. Rezultati su prikazani u tablici 21.



### **4.3. Učestalost polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove**

Za analizu podataka ispitanici su bili podijeljeni u dvije skupine prema nuspojavama lijekova:

I. skupina od 36 bolesnika s VDP koji su imali nuspojave na lijekove prema ljestvici UKU

II. skupina od 78 bolesnika s VDP koji nisu imali nuspojave na lijekove prema ljestvici UKU. Učestalost polimorfnihi alela i genotipova po skupinama prikazana je u tablicama 22 i 23.

**Tablica 22. Učestalost polimorfnih alela CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1,i SERT u bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove**

Geni i aleli	S nuspojavama (n=36)		Bez nuspojava (n=78)		$\chi^2$	OR (95% CI) ukupno mut-wt	test proporcija
	n	%	n	%			
<b>CYP2C9:</b>							
1-wt	57	79,2	126	80,8	p= 0,9609	0,905(0,452-1,812)	p= 0,777
*2	9	12,5	18	11,5	$\chi^2= 0,08$		
*3	6	8,3	12	7,7	ss= 2		
ukupno mut	15	20,8	30	19,2			p= 0,917
<b>CYP2C19:</b>							
1-wt	58	80,6	126	79,8	p = 0,886	0,986 (0,487-1,999)	p = 0,969
*2	14	19,4	30	19,2	$\chi^2= 0,02$		
*3	0	0,0	0	0,0	ss = 1		
ukupno mut	14	19,4	30	19,2			
<b>CYP2D6:</b>							
1- wt	39	54,2	103	66,0	p = 0,096		p = 0,086
dupl	4	5,6	16	10,5	$\chi^2= 9,331$		p = 0,243
*3	5	6,9	7	4,3	ss = 5		
*4	11	15,2	19	12,2			
*5	8	11,2	8	5,1	$\chi^2= 7,02$ (ukupno prema mut)		
*6	5	6,9	3	1,9	ss = 2		
ukupno mut	29	45,8	3	23,7	<b>p = 0,029 2,169 (1,192-3,945)</b>		<b>p = 0,01</b>
<b>CYP3A4</b>							
1- wt	71	98,6	154	98,7			p = 0,947
*1B	1	1,4	2	1,3			
<b>MDR1</b>							
<b>Eks 21</b>							
G	45	62,5	106	67,9	p = 0,510	0,786 (0,439-1,409)	p = 0,418
T	27	37,5	50	32,1	$\chi^2= 0,433$	ss = 1	
<b>Eks 26</b>							
C	43	59,7	103	66,0	p = 0,439	0,763 (0,429-1,357)	p = 0,356
T	29	41,3	53	34,0	$\chi^2= 0,598$	ss = 1	
<b>SERT</b>							
<b>SERTPR</b>							
L	36	50,0	108	69,2	<b>p = 0,008</b>	<b>0,444(0,250-0,789)</b>	<b>p = 0,005</b>
S	36	50,0	48	30,8	$\chi^2= 2,616$	ss = 1	
<b>SERTin2</b>							
l	45	62,5	78	50,0	p = 0,105	1,667(0,942-2,950)	p = 0,078
s	27	37,5	78	50,0	$\chi^2= 2,616$	ss = 1	

**Tablica 23. Učestalost genotipova CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, MDR1 i SERT u bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove**

Gen Genotip	S nuspojavama (n=36)		Bez nuspojava (n=78)		$\chi^2$	test proporcija
	n	%	n	%		
<i>CYP2C9</i>						
wt/wt	22	61,1	49	62,8	p= 0,894	p= 0,861
wt/mut	13	36,1	28	35,9	$\chi^2=0,017$	p= 0,940
mut/mut	1	2,8	1	1,3	ss= 1	
<i>CYP2C19:</i>						
wt/wt	21	60	52	67	p= 0,5145	p= 0,388
wt/mut	15	40	26	33	$\chi^2= 0,425$	p= 0,353
mut/mut	0	0	0	0	ss= 1	
<i>CYP2D6:</i>						
wt/wt	12	33,4	41	52,7	p= 0,118	p= 0,055
dupl	2	5,6	8	10,2	$\chi^2=5,856$	p= 0,409
wt/mut	15	41,6	21	26,9	ss= 3	p= 0,115
mut/mut	7	19,4	8	10,2		p= 0,177
<i>CYP3A4</i>						
wt/wt	35	97,2	76	97,4	p = 0,5734	p= 0,947
wt/mut	1	2,0	2	2,6	$\chi^2= 0,317$	
mut/mut	0	0,0	0	0,0	ss= 1	
<i>MDR1</i>						
ekson21						
G/G	12	33,3	37	47,4	p = 0,352	p= 0,157
G/T	20	55,6	33	42,3	$\chi^2= 2,087$	p= 0,187
T/T	4	11,1	8	10,3	ss = 2	p= 0,890
Eks 26						
C/C	12	33,3	29	37,2	p = 0,272	p= 0,690
C/T	19	52,8	45	57,7	$\chi^2= 2,602$	p= 0,623
T/T	5	13,9	4	5,1	ss= 2	p= 0,106
<i>SERT</i>						
SERTPR						
L / L	11	30,6	44	56,4	<b>p = 0,037</b>	<b>p= 0,01</b>
L / S	14	38,8	19	24,4	$\chi^2= 6,594$	p= 0,111
S / S	11	31,6	15	19,2	ss= 2	p= 0,180
SERTin2						
l / l	15	41,7	29	37,2	p=0,061	p= 0,647
l / s	15	41,7	20	25,6	$\chi^2=5,565$	p= 0,08
s / s	6	16,6	29	37,2	ss= 2	<b>p= 0,027</b>

**Tablica 24. Učestalost MDR1 haplotipova izvedenih iz 2677 G/T i 3435 C/T u skupinama ispitanika prema nuspojavama na lijekove**

Haplotip	S nuspojavama (n=36)		Bez nuspojava (n=78)		test proporcija
	n	%	n	%	
11 (G-C)	28	30,8	70	37,6	p = 0,261
12 (G-T)	21	23,1	48	25,8	p = 0,621
21 (T-C)	20	22,0	35	17,8	p = 0,535
22 (T-T)	22	24,1	33	17,8	p = 0,220

$$\chi^2 = 2,578 \quad ss = 3 \quad p = 0,461$$

**Tablica 25. Učestalost SERT haplotipova izvedenih iz iz SERTPR – L/S i SERTin2 l/s u skupinama bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove**

Haplotip	S nuspojavama (n=36)		Bez nuspojava (n=78)		test proporcija
	n	%	n	%	
11 (L-l)	25	27,4	61	32,8	0,3684
12 (L-s)	21	23,2	41	22,2	0,8462
21 (S-l)	28	30,7	42	22,5	0,1408
22 (S-s)	17	18,7	42	22,5	0,4566

$$\chi^2 = 2,644 \quad ss = 3 \quad p = 0,4498$$

**Tablica 26. OR SERT haplotipova izvedenih iz SERTPR – L/S i SERTin2 - l/s u skupinama bolesnika s VDP prema nuspojavama na lijekove**

Haplotip	$\chi^2$	p	Odds ratio	95% CI odds ratio
11 vs ostali	0,579	0,4466	0,776	0,447 – 1,349
12 vs ostali	0,002	0,9677	1,061	0,583 – 1,930
21 vs ostali	1,758	0,1849	1,524	0,868 – 2,674
22 vs ostali	0,346	0,5564	0,788	0,420 – 1,478

### CYP2C9

Učestalost divljih (wt) i mutiranih alela i pridruženih genotipova CYP2C9 nije se statistički značajno razlikovala među bolesnicima koji su na terapiju razvili nuspojave i bolesnika bez nuspojave. Učestalost mutiranih homozigota bila je u bolesnika s nuspojavama 2,8%, a u bolesnika bez nuspojave 1,3%. Rezultati su prikazani u tablicama 22 i 23.

### CYP2C19

Učestalost polimorfnih alela i pridruženih genotipova CYP2C19 u skupini bolesnika s nuspojavama i bez nuspojave nije se statistički značajno razlikovala. Učestalost mutiranog alela 2C9\*2 bila je u skupini bez nuspojave 19,4%, a u skupini s nuspojavama 19,2%. Rezultati su prikazani u tablicama 22 i 23.

### CYP2D6

Učestalost divljih "wt" alela razlikovala se među skupinama bolesnika sa i bez nuspojave (54,2% prema 66,0%), ali razlika nije statistički potvrđena ( $p=0,086$ ) (Tablica 22). Međutim, ukupno mutiranih alela bilo je statistički značajno više u skupini s nuspojavama (45,8%) u odnosu na skupinu bolesnika bez nuspojave (23,7%) ( $p=0,01$ ). Udio mutiranih prema ukupnom broju alela također se statistički značajno razlikovao među skupinama ( $p=0,029$ ; OR= 2,169, 95%CI:1,192-3,945). Učestalost genotipa wt/wt bila je viša u skupini bez nuspojave (52,7%) u odnosu na skupinu s nuspojavama (33,4%), ali nije dosegla statističku značajnost ( $p=0,055$ ). Rezultati su prikazani u tablicama 22 i 23.

### CYP3A4

U ispitivanim skupinama nije ustanovljen genotip homozigotnih nosioca mutiranog alela \*1B, a raspodjela alela i genotipova nije se statistički razlikovala između dvije ispitivane skupine. Rezultati su prikazani u tablicama 22 i 23.

### MDR1

Učestalost alela G i T na egzonu 21 i alela C i T na egzonu 26 gena MDR1 nije se statistički razlikovala između bolesnika s nuspojavama i bolesnika bez nuspojave. Nije bilo statistički značajne razlike ni u raspodjeli genotipova niti haplotipova. Rezultati su prikazani u tablicama (22, 23, i 24).

## SERT

Analizirani su dugi – L, l i kratki - S, s aleli promotorske regije i introna 2 (Tablice 22 i 23). Skupina bolesnika bez nuspojava imala je statistički značajno veću učestalost ( $p=0,005$ ) alela L u promotorskoj regiji, SERTPR (69,2%) u odnosu na skupinu s nuspojavama (50,0%). Isto potvrđuju i rezultati raspodjele alela L i S među ispitanicima s nuspojavama i bez nuspojava ( $p=0,008$ , OR= 0,444, 95%CI: 0,250-0,789). Također postoji razlika u učestalosti alela l u intronu 2: 62,5% u bolesnika s nuspojavama, 50,0% u bolesnika bez nuspojava, no nije statistički značajna ( $p=0,078$ ). Učestalost genotipa LL bila je u bolesnika s nuspojavama statistički značajno niža (30,6%) nego u bolesnika bez nuspojava (56,4%), ( $p=0,01$ ). I učestalost genotipa s/s statistički se značajno razlikovala u bolesnika s nuspojavama (16,6%) i bolesnika bez nuspojava (37,2%) ( $p=0,027$ ). Nije bilo statistički značajne razlike u raspodjeli učestalosti haplotipova promotorske regije i introna 2. Rezultati su prikazani u tablicama 25 i 26.

## **4.4 Utjecaj polimorfizama gena CYP2D6 i MDR1 na**

### **metabolički omjer, koncentracije paroksetina i maprotilina**

U tablici 27 prikazani su rezultati analize genotipa CYP2D6 te haplotipa MDR1 u skupini od 21 ispitanika i njihove pripadajuće vrijednosti metaboličkog omjera (MR) dekstrometorfana prema dekstorfanu (DX/DM) te koncentracije paroksetina i maprotilina u plazmi na početku terapije i u stanju ravnoteže. U svrhu provođenja asocijacijske studije korelacije genotipova metaboličkih enzima (CYP) i haplotipova transportnog proteina (MDR1) s fenotipskim osobinama izraženima u obliku metaboličkog omjera DX/DM i koncentracija paroksetina i maprotilina u plazmi, ispitanike smo podijelili u dvije skupine. Prva skupina je uključivala osobe s genotipom wt/wt i duplikacijama za CYP2D6, dakle funkcionalnim alelima, što pretpostavlja dobru enzimsku aktivnost i metabolički kapacitet. Druga skupina je imala genotip wt/mut, jedan funkcionalni alel i jedan nefunkcionalni, mutirani alel, što pretpostavlja slabiju aktivnost enzima CYP2D6 i smanjen metabolički kapacitet. Samo je jedan ispitanik imao mut/mut CYP2D6 genotip i stoga nije uključen u analizu, već je obrađen zasebno. Razlike između skupina testirane su neparametrijskim Mann-Whitney U-testom. Utjecaj polimorfizama ispitivanih gena na koncentracije lijeka i metabolički odnos na početku terapije (1.-4. dan) i u ravnoteži (10.-14. dan) statistički je ispitan pomoću ANOVA za ponovljena mjerenja.

**Tablica 27. Genotip CYP2D6, haplotip MDR1, metabolički omjer MR (DX/DM) i koncentracije paroksetina i maprotilina u skupini ispitanika (n= 21)**

Grupa	Genotip	Haplotip	MR DX/DR		Paroksetin ug/ml		Maprotilin ug/ml	
			početak	ravnoteža	početak	ravnoteža	početak	ravnoteža
	CYP2D6	MDR1						
1	wt/wt	GG-CC	0,003	0,094	12	17	30	40
1	wt/wt	GG-CC	0,002	0,087	15	19	35	42
2	wt/wt	GG-CC	0,012	1,239	15	23	20	40
2	wt/wt	GT-CT	0,005	0,247	20	28	25	46
2	wt/wt	GT-CT	0,006	0,256	20	27	25	45
2	wt/wt	GT-CT	0,006	0,429	23	26	24	48
2	wt/wt	GG-CT	0,007	0,628	16	22	25	49
3	wt/wt	GT-CC	0,004	0,089	19	26	22	38
3	wt/wt	GT-CC	0,004	0,069	18	24	27	37
4	wt/wt	TT-TT	0,002	0,086	18	20	30	50
5	wt/mut	GT-CC	0,023	0,234	15	30	25	40
5	wt/mut	GT-CC	0,034	0,368	19	32	25	43
6	wt/mut	GT-CT	0,018	0,298	21	33	27	44
7	wt/mut	GG-CT	0,009	0,246	20	35	24	43
8	wt/mut	GT-TT	0,007	0,098	18	35	38	49
9	duplikacije	GG-CC	0,001	0,098	0	12	15	30
10	duplikacije	GT-CT	0,002	0,084	0	13	20	40
11	mut/mut	GT-CT	0,354	0,368	40	80	30	110
12	wt/wt	GG-CT	0,002	0,002	0	0	14	35
13	wt/mut	GT-CT	0,073	0,077	0	0	25	40
14	duplikacija	GT-CT	0,001	0,001	0	0	10	15

U tablicama 28, 29 i 30 prikazane su prosječne vrijednosti (na početku terapije, u ravnoteži i razlika tih dviju vrijednosti) navedenih parametara za svaku skupinu genotipa posebno. Razlike između skupina testirane su neparametrijskim Mann-Whitney U-testom.

**Tablica 28. MR DX/DR**

Razdoblje terapije	Genotip wt/wt i duplikacije (N = 12)	Genotip wt/mut (N = 5)	U-test p
	Medijan (min – max)	Medijan (min – max)	
Početak (1. dan)	0,004 (0,001 – 0,007)	0,018 (0,007 – 0,034)	<b>0,0017</b>
Ravnoteža (14. dan)	0,096 (0,039 – 0,129)	0,246 (0,098 – 0,368)	0,2678
Promjena	0,094 (0,035 – 0,423)	0,237 (0,091 – 0,334)	0,3988

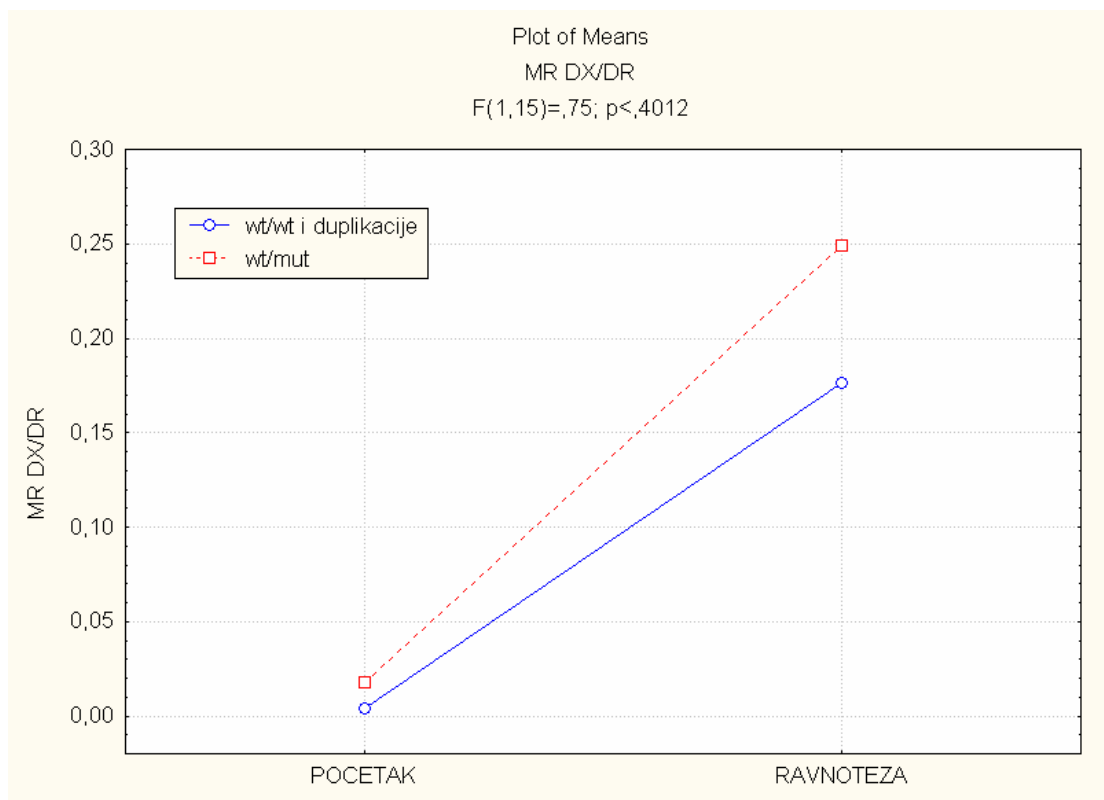
**Tablica 29. Paroksetin**

Razdoblje terapije	Genotip wt/wt i duplikacije (N = 12)	Genotip wt/mut (N = 5)	U-test p
	Medijan (min – max)	Medijan (min – max)	
Početak (1.- 4. dan)	17 (0 – 23)	19 (15 – 21)	0,2643
Ravnoteža (10.-14.dan)	22,5 (12 – 28)	33 (30 – 35)	<b>0,0015</b>
Promjena	6,5 (2 – 13)	15 (12 – 17)	<b>0,0031</b>

**Tablica 30. Maprotilin**

Razdoblje terapije	Genotip wt/wt i duplikacije (N = 12)	Genotip wt/mut (N = 5)	U-test
	Medijan (min – max)	Medijan (min – max)	
Početak (1. - 4. dan)	25 (15 – 35)	25 (24 – 38)	0,3920
Ravnoteža (10.-14.dan)	41 (30 – 50)	43 (40 – 49)	0,5240
Promjena	20 (7 – 24)	17 (11 – 19)	0,3664

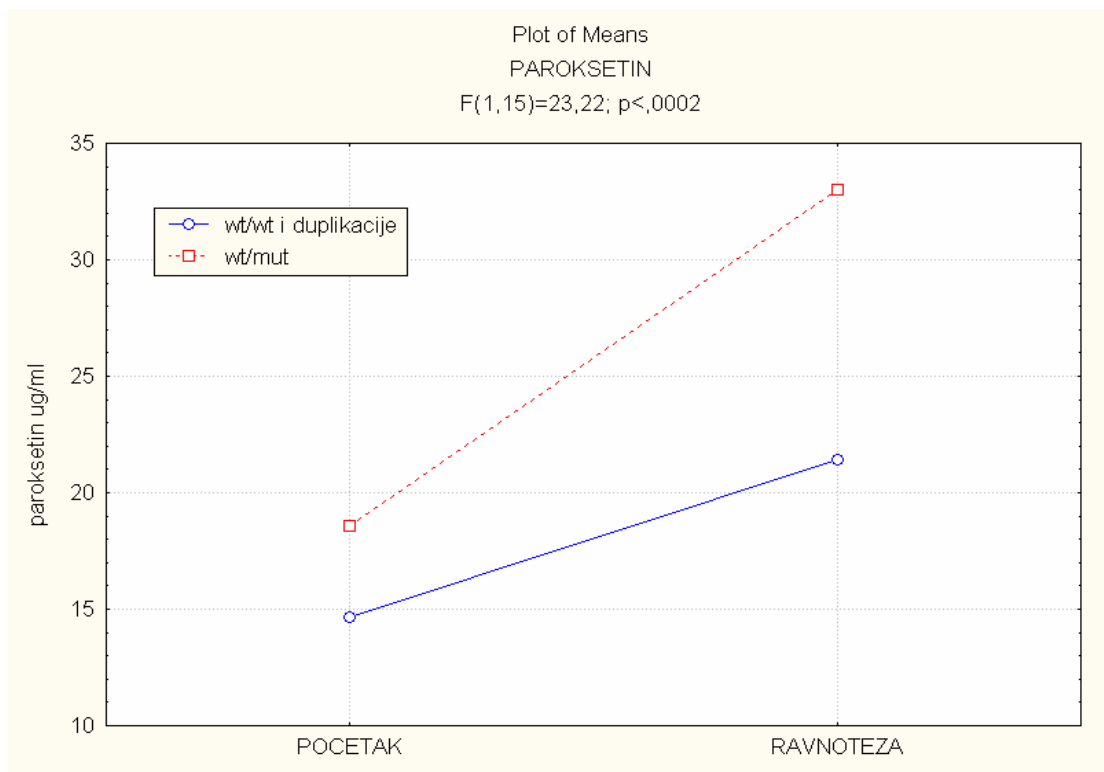




**Krivulja 1. Promjene vrijednosti metaboličkog omjera DX/DR od početak terapije do ravnoteže s obzirom na genotip**

**Tablica 31. Rezultati ANOVE za ponovljena mjerenja za MR DX/DR**

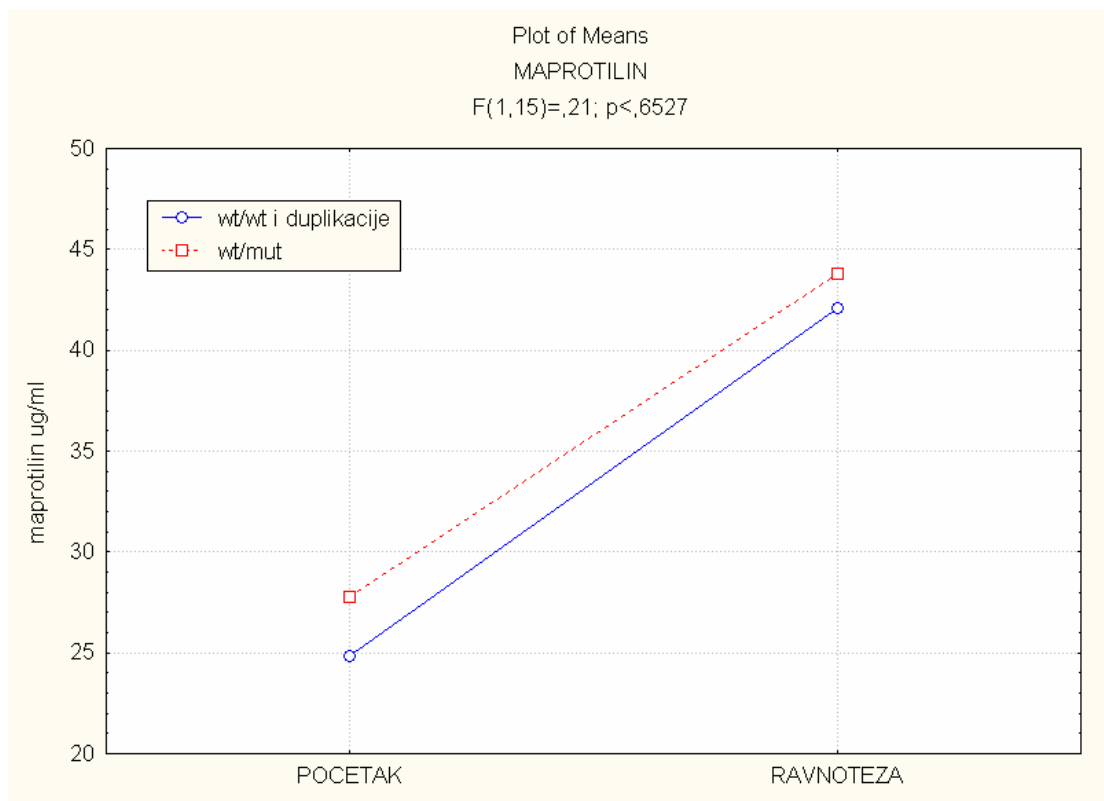
	St.sl.	MS	st.sl greške	MS greške	F	p
grupa	1	,013306	15	,008840	1,50515	0,238789
vrijeme	1	,286509	15	,008026	35,69678	<b>0,00025</b>
grupa*vrijeme	1	,005991	15	,008026	,74645	0,401206



**Krivulja 2. Promjene koncentracija paroksetina od početaka terapije do ravnoteže s obzirom na genotip**

**Tablica 32. Rezultati ANOVE za ponovljena mjerenja za paroksetin**

	St.s.l.	MS	st.s.l greške	MS greške	F	p
grupa	1	424,8828	15	59,47055	7,1444	<b>0,017377</b>
vrijeme	1	789,3926	15	4,44833	177,4581	<b>0,000000</b>
grupa*vrijeme	1	103,2750	15	4,44833	23,2166	<b>0,000226</b>



**Krivulja 3. Promjene koncentracija maprotilina od početaka terapije do ravnoteže s obzirom na genotip**

**Tablica 33. Rezultati ANOVE za ponovljena mjerenja za maprotilin**

	St.sl.	MS	st.sl greške	MS greške	F	p
grupa	1	38,706	15	44,40389	,8717	0,365275
vrijeme	1	1950,993	15	13,07500	149,2155	<b>0,000000</b>
grupa*vrijeme	1	2,757	15	13,07500	,2109	0,652657

U istraživanju provedenom na skupini ispitanika na terapiji maprotilinom i paroksetinom željeli smo ispitati:

1. Utjecaj genotipova CYP2D6 i haplotipova MDR1 na koncentracije paroksetina i maprotilina u plazmi;
2. Utjecaj genotipova CYP2D6 i haplotipova MDR1 na metabolički omjer (MR) dekstrometorfana prema metabolitu dekstrorfanu.
3. Utjecaj genotipova na promjene MR i koncentracije lijeka u početku terapije i u ravnoteži. Statističkom obradom dobiveni su sljedeći rezultati:

1. Za metabolički omjer je značajna samo razlika između vrijednosti na početku i u ravnoteži, bez obzira na skupinu genotipa. Skupine se međusobno ne razlikuju, niti se razlikuju promjene između tih dvaju mjerenja s obzirom na skupine (tablica 31, krivulja 1).

2. Za paroksetin su sve razlike značajne. Sve su vrijednosti niže u skupini wt/wt nego u wt/mut, bez obzira na mjerenje. Također su sve vrijednosti više u ravnoteži nego na početku, bez obzira na skupinu genotipa. I, što je važno, razlikuju se i njihove promjene s obzirom na skupine genotipa, tj. u skupini wt/mut vrijednosti su se u ravnoteži više povećale nego u skupini wt/wt (tablica 32, krivulja 2).

Za maprotilin postoji značajna razlika samo između vrijednosti na početku i u ravnoteži, bez obzira na skupinu genotipa. U obje su skupine promjene bile jednake (tablica 33, krivulja 3).

## **5. RASPRAVA**

U različitim je istraživanjima ustanovljeno da je populacijska učestalost mnogih farmakogenetičkih osobina određena etničkim specifičnostima. Ovo je bila prva studija koja je istražila raspodjelu učestalosti alela skupine enzima važnih za biotransformaciju lijekova i drugih ksenobiotika, te nekih transportnih proteina u hrvatskoj populaciji.

Osnovna ideja rada bila je istražiti značenje potencijalnih molekularnih biljega u etiopatogenezi bolesti (velikom depresivnom poremećaju), te odrediti njihovu prediktivnu vrijednost za učinke terapije i pojavu neželjenih reakcija izazvanih farmakoterapijom osnovne bolesti.

### **5.1 Interetnička varijabilnost enzima I. faze metabolizma**

Kako bi se izbjeglo nakupljanje štetnih tvari u stanici, živi su organizmi razvili različite puteve njihove eliminacije. Mnogi metabolički enzimi s različitim ili djelomično preklapajućim katalitičkim svojstvima imaju ključnu ulogu u eliminacijskim procesima. Ti su enzimi kodirani superporodicom gena čija je evolucija omogućila različitim vrstama preživljavanje u različitim staništima i upotrebu hrane koja je sadržavala i određene štetne ksenobiotike. Zbog navedenih evolucijskih procesa vrste su postigle sposobnost metaboliziranja-biotransformacije u oblicima i dosegima koji su im omogućili preživljavanje, ali koji se mogu značajno razlikovati između vrsta (Guengerich i sur, 1987). Ovi evolucijski procesi mogu također objasniti interetničke i interindividualne varijabilnosti u metabolizmu lijekova u ljudi (Meyer i sur, Shimada i sur, 1994.).

#### **5.1.1 Učestalost genotipova metaboličkih enzima citokroma P450-CYP u hrvatskoj populaciji**

U istraživanju je određena učestalost genskih polimorfizama CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 u hrvatskoj populaciji. U studiju su bili uključeni stanovnici iz zagrebačkog područja, podrijetlom iz različitih dijelova Hrvatske i predstavljaju dobar uzorak miješane hrvatske populacije. Učestalosti polimorfnih alela i genotipova bile su u skladu s vrijednostima za druge europske bijele populacije (Bertilsson i sur, Desta i sur, 2002.). Nosioči alela CYP2C9\*2 i 3 koji imaju nižu enzimsku aktivnost u usporedbi s nosiocima "divljih-wt" alela pojavljuju se prema dokumentiranim podatcima s učestalošću od 12% i 8% u bijeloj populaciji (Goldstein i sur, 2001.). Alel CYP2C9\*2 je rijedak u azijskoj populaciji (Wang i

sur, 1995.). Prema rezultatima ovog istraživanja, učestalost polimorfnih alela i genotipova CYP2C9 u hrvatskoj populaciji slična je drugim srednjeeuropskim populacijama (približno 3,5% sporih metabolizatora). Analizom polimorfnih alela CYP2C19 uspjeli smo dokazati alel CYP2C19\*2 (učestalost 15%), ali ne i alel CYP2C19\*3 koji je glavna mutirana alelska varijanta u orijentalnoj populaciji s učestalošću i do 25% (Desta i sur, 2002, Odani i sur, 1997.). Rezultati ovog ispitivanja su u suglasju s rezultatima objavljenima za druge europske populacije (Goldstein i sur, 1997, Dojo i sur, 2001.).

Ranija su ispitivanja pokazala da učestalost polimorfnih alela i genotipova CYP2D6 varira među populacijama (From i sur, 1997, Bertilson i sur, 2002.). Insuficijentni alel 2D\*4 pokazuje najveću etničku varijabilnost. U bijeloj populaciji alel \*4 je najčešći mutirani alel. Gotovo je potpuno odsutan u istočno-azijskoj populaciji, što je i glavni razlog niske prevalencije sporih metabolizatora u tim populacijama (Shimada i sur, 1994, Lamba i sur, 1998.). Unutar europskih populacija postoje međuetničke razlike u raspodjeli genotipa CYP2D6 s vrijednostima od 1-10%. Uočen je trend opadanja frekvencija sporih metabolizatora prema jugu (gradijent sjever-jug) i povećanje vrlo brzih metabolizatora (Dahl i sur, Agundez i sur, 1995, Bernal i sur, 1999, Niewinski i sur, 2002.). Ovo je istraživanje pokazalo da je raspodjela učestalosti ispitivanih alela slična vrijednostima za druge europske bijele populacije. Ustanovljene vrijednosti od 3,1% za mutirane homozigote i 4,1% za genske duplikacije nalaze se između vrijednosti za sjeverne i srednjeeuropske zemlje i mediteranske zemlje.

Naša istraživanja pokazuju da je učestalost alela CYP3A4\*1B u hrvatskoj populaciji (2,8%) nešto niža od vrijednosti koje se navode za neke europske populacije (oko 7%).

## **5.2. Korelacija genotipova metaboličkih enzima s fenotipskim osobinama bolesnika s velikim depresivnim poremećajem (VDP)**

U ovom ispitivanju provedeno je nekoliko asocijacijskih studija u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem (VDP). Provedena je korelacija između različitih genotipova metaboličkih enzima s nekim fenotipskim karakteristikama bolesnika da bi se pokušalo ustanoviti :

1. Razlikuju li se bolesnici s VDP po genotipu od zdravih ispitanika?
2. Postoje li značajne genotipske i haplotipske razlike između skupine bolesnika koja je dobro reagirala na terapiju i skupine koja je bila rezistentna na terapiju ?
3. Razlikuju li se bolesnici s VDP, koji na terapiju nisu razvili neke od nuspojave lijekova, po genotipu od bolesnika koji su razvili određene nuspojave na provedenu farmakoterapiju?

### **5.2.1. Učestalost genotipova metaboličkih enzima citokroma P450-CYP u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem**

Premda je jetra organ u kojem se nalazi glavna metaboličkih enzima citokroma P-450, u posljednje vrijeme sve se više ispituju i mogući drugi lokaliteti i njihova funkcija u fiziološkim, ali i patološkim procesima. Novija istraživanja potvrđuju da se neki od metaboličkih enzima sustava citokroma P450 nalaze i u mozgu (Hedlung i sur, 2001, Funae i sur, 2004.). U tom smislu do sada je najviše ispitivana lokalizacija i funkcija enzima CYP2D6. U objavljenim radovima možemo naći podatke o ulozi polimorfni metaboličkih enzima u patobiokemijskim reakcijama i etiopatogenezi nekih bolesti. Objavljena su istraživanja koja polimorfne oblike enzima CYP2D6 povezuju s Parkinsonovom bolešću, (Armstrong i sur, 1992.). Neki istraživači drže da bi enzimski sustav CYP2D u mozgu mogao zbog aktivne uloge u metabolizmu amina i steroida posredno biti uključen u regulaciju određenih procesa u središnjem živčanom sustavu (Hiroi i sur, 1998, Yu i sur, 2003.). Među endogene supstrate CYP2D6 ubraja se dopamin. Dobro je poznat metabolički put sinteze dopamina iz L-tirozina putem tirozin-kinaze i aromatske L-aminokiselinske dekarboksilaze. Uz ovaj metabolički put u literaturi je opisana sinteza kateholamina uključujući i dopamin iz amina poput tiramina putem metaboličkog sustava CYP2D (Niwa i sur, 2004.). Istraživači opisuju uspješnu inhibiciju hidrosilacije tiramina u dopamin (pri

primjeni humanih jetrenih mikrosoma) s bufuralolom koji je tipični supstrat CYP2D. Isto je postignuto i s anti-CYP2D1-antiserumom (Funae i sur, 2003.). U istraživanjima Yu i suradnika koji su koristili rekombinantne enzime i CYP2D6-transgenične miševe potvrđeno je da je 5-metoksitriptamin, metabolit i preteča (prekursor) melatonina specifičan endogeni supstrat CYP2D6 (Yu i sur, 2003.). Istraživanje je pokazalo da se ovaj snažan serotonergični neuromodulator u brojnim fiziološkim sustavima čvrsto veže uz CYP2D6 i demetilira u serotonin. U istom ispitivanju istraživači su također pomoću selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina uspjeli inhibirati proces stvaranja serotonina (5-HT) iz 5-metoksitriptamina (5-MT) putem enzima CYP2D6. Na osnovi ovih spoznaja isti istraživači drže da varijabilna aktivnost enzima CYP2D6 i posljedično različita demetilacija 5-MT u serotonin može utjecati na niz neurofizioloških i patofizioloških događanja u organizmu.

U literaturi su također objavljeni rezultati istraživanja koji navode i polimorfizme metaboličkog enzima CYP2C9 (alel 2C\*3 je bio značajno učestaliji među bolesnicima s velikim depresivnim poremećajem u odnosu na zdravu, kontrolnu skupinu) kao moguće čimbenike povezane s nastankom psihičkih poremećaja (Llerena i sur, 2003.). Na tragu navedenih spoznaja o metabolizmu endogenih supstrata važnih za funkciju središnjeg živčanog sustava, dokumentiranih istraživanja koja potvrđuju da je CYP2D6 uključen u serotoninu i dopaminsku homeostazu te ranijih nalaza nekih istraživača (Bertilson i sur, 1989.) da postoji razlika u osobnosti između brzih i sporih metabolizatora supstrata CYP2D6, nametnula se ideja o ispitivanju uloge polimorfnih alela i genotipova metaboličkih enzima u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem.

Prema našim podacima alel CYP2C9\*3 nije pokazivao statistički značajnu razliku u učestalosti u bolesnika s VDP u odnosu na zdravu populaciju. Naši podatci govore u prilog veće učestalosti mutiranog alela CYP2C19\*3u bolesnika s VDP, međutim to nije statistički potvrđeno ( $p=0,077$ ). Kako se rezultat približio statističkoj značajnosti na razini od 5%, trebalo bi ispitati učestalost ovog polimorfizma na većem broju ispitanika.

Prema rezultatima našeg ispitivanja statistički značajna razlika postoji u učestalosti “divljeg”-wt/wt genotipa CYP2C19 ( $p=0,008$ ) i heterozigotnog genotipa wt/mut ( $p=0,001$ ) u zdravih ispitanika i bolesnika s VDP. I u ovom slučaju možemo primijeniti teoriju o varijabilnom metabolizmu endogenih supstrata kao mogućem čimbeniku predispozicije za razvoj depresivnog psihičkog poremećaja (Hiroi i sur, 1998, Funae i sur, Yu i sur, 2003.).

Naši podatci ističu statistički značajnu razliku u raspodjeli učestalosti “divljih” i mutiranih alela gena CYP2D6 (OR 1,799, 95% CI 1,260-2,256). Raspodjela genotipova među zdravim i bolesnim ispitanicima također se razlikuje. U zdravoj populaciji bilo je značajno više



homozigota za wt-“divlji” tip alela gena CYP2D6 dok je u bolesnoj populaciji bilo značajno više homozigotnih nosioca mutiranih alela u odnosu na zdrave ispitanike ( $p=0,00028$ ). Ovaj je nalaz u podudarnosti s nalazima i pretpostavkama prethodnih istraživanja (Funai sur, 2003, Yu i sur, 2003, Niwa i sur, 2004.). Navedena istraživanja, uključujući i ovdje opisana, govore u prilog zaključaka da varijabilna aktivnost enzima CYP2D6 *in situ* u moždanom tkivu može modulirati serotoninsku homeostazu zbog aktivne uloge u regeneraciji serotonina iz 5-metoksitriptamina, te stoga možemo pretpostaviti da polimorfizam CYP2D6 može utjecati na razvoj psihičkih poremećaja ovisnih o serotoninu.

### **5.2.2. Korelacija genotipova metaboličkih enzima s učinkovitošću terapije u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem**

U opisanom smo istraživanju proveli studiju povezanosti različitih polimorfnih alela i genotipova metaboličkih enzima citokroma P450 s učinkovitošću lijekova u bolesnika na terapiji koja je uključivala tri-tetracikličke antidepresive i inhibitore ponovne pohrane serotonina te benzodiazepine. Svi se nabrojeni lijekovi glavnim dijelom metaboliziraju putem enzima citokroma: CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4. Prema dostupnim podacima i objavljenim istraživanjima ovo je prvo istraživanje koje je provelo ovakvu asocijacijsku studiju u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem..

Rezultati ispitivanja upućuju na zaključke da polimorfizam CYP2D6 metaboličkog enzima može modulirati učinkovitost terapije antidepresivima. U ispitivanoj populaciji bolesnika uočena je statistički značajna razlika u učestalosti vrlo brzih metabolizatora CYP2D6 ( $p=0,02$ ). U skupini ispitanika koji su dobro reagirali na terapiju nije bilo genotipa vrlo brzih metabolizatora, nije bilo višestruko umnoženih gena CYP2D6, dok je genotip vrlo brzih metabolizatora u populaciji rezistentnih bolesnika imao učestalost od 10%. Ovaj nalaz upućuje na pretpostavku da je populacija vrlo brzih metabolizatora zbog visoke aktivnosti enzima i ubrzane biotransformacije lijeka izložena većem riziku poddoziranosti, odnosno postizanju subterapijskih koncentracija lijeka u plazmi pa time i smanjenoj učinkovitosti terapije ili potpunoj neučinkovitosti, što može rezultirati učestalijom hospitalizacijom ove skupine bolesnika nego drugih fenotipskih kategorija (normalnih metabolizatora, intermedijarnih metabolizatora, dakle s genotipom wt/wt ili wt/mut). Rezultati ovog istraživanja su u suglasju sa najnovijim rezultatima istraživanja Kawanishi-a i suradnika koji su također izvijestili o povećanoj učestalosti genskih duplikacija CYP2D6 i posljedično vrlo

brzoga metaboličkog fenotipa u bolesnika s ustrajnim poremećajima raspoloženja (Kawanishi i sur, 2004.). Dobiveni rezultati također govore u prilog ranije izrečenoj pretpostavci da zbog vrlo brzoga metaboličkog kapaciteta enzima CYP2D6 *in situ* u mozgu mogu, pri uzimanju standardnih doza lijeka, perzistirati smanjene - nedostatne koncentracije lijeka na efektornom mjestu, uz posljedičnu manje učinkovitu ili neučinkovitu terapiju (Funae i sur, 2003, Hedlung i sur, 2001.).

### **5.2.3. Korelacija genotipova metaboličkih enzima s nastankom nuspojava na terapiju antidepressivima u bolesnika s VDP**

Već su i ranija istraživanja pokazala da metabolički fenotip može predstavljati važnu predispoziciju za nastanak nuspojava lijekova (Chen i sur, 1996, Fromm i sur, 1997.). Spori metabolički fenotip pri standardnim dozama lijeka može postići visoke toksične koncentracije lijeka i biti podložan različitim oblicima nuspojava (Steimer i sur, 2005.). Premda noviji antidepressivi, osobito inhibitori ponovne pohrane serotonina, imaju širok terapijski raspon i ne očekuju se toksične koncentracije pri standardnim dozama lijeka, za njih također postoje dokumentirani podaci koji pokazuju da i oni mogu u ekstremnih fenotipova sporih metabolizatora izazvati štetne pa i smrtonosne učinke (Salle i sur, 2000.). Rizik za nastanak nuspojava povećava se osobito u istovremenoj primjeni više lijekova. Poznato je da su neki antidepressivi, poput paroksetina i fluoksetina, snažni inhibitori metaboličkih enzima citokroma P-450-CYP (Preskorn, 1996.). Njihova primjena u politerapiji predstavlja rizik za nastanak različitih oblika interakcija. U naših bolesnika koji su bili na terapiji paroksetinom, maprotilinom i diazepamom također su uočene interakcije lijekova. Zbog inhibicijskoga učinka paroksetina na CYP2D6 koji je jasno evidentiran vrijednostima metaboličkog omjera dekstrometorfana prema metabolitu dekstrorfanu, neki su bolesnici iz fenotipa brzih metabolizatora i vrijednosti metaboličkog omjera  $DX/DM < 0,08$  pri primjeni doze od 20 mg paroksetina fenotipski postali spori metabolizatori, što je pokazao i metabolički omjer  $DX / DM > 0,3$  (rezultati prikazani u tablici 27). Kod nekih je bolesnika inhibicija enzima CYP2D6 dovela do viših koncentracije maprotilina koje su u tih bolesnika uzrokovale nuspojavu u obliku prekomjerne sedacije. Konverzija jednog fenotipa u drugi zbog metaboličkih interakcija poznata je pod nazivom fenokopiranje. U našem ispitivanju korelacije genotipa s fenotipom nuspojava sve smo bolesnike od VDP pratili i bilježili reakcije na lijekove prema ljestvici UKU. Najčešće zabilježene psihičke nuspojave bile su poteškoće koncentracije,

sedacija, nesanica, napetost, unutarnji nemir. Neurološke nuspojave su bile rijetke, zabilježeni su tremor i parestezije. Od autonomnih nuspojava zabilježene su smanjena salivacija, mučnina, povraćanje, proljev, ortostatska vrtoglavica, palpitacije, tahikardija, pojačano znojenje. Od ostalih nuspojava dokumentirano je povećanje tjelesne težine, gubitak tjelesne težine, seksualne smetnje i glavobolja.

Prema analiziranim rezultatima potvrdili smo značajno višu učestalost mutiranih alela CYP2D6 u skupini bolesnika koja je imala neku od neželjenih reakcija od skupine bez nuspojava, ( $p=0,029$ , OR 2,169, 95% CI 1,192-3,945). Također je zapažena viša zastupljenost brzih metabolizatora (wt/wt) u skupini bolesnika bez nuspojava koja, međutim, nije dosegla statističku značajnost ( $p=0,055$ ), što pak možemo pripisati relativno malom uzorku. Stoga bi preporuka bila nastaviti ispitivanje i utvrditi statističku značajnost na većem broju ispitanika. Ipak, držimo da brzi metabolički fenotip možemo povezati sa smanjenom učestalošću nuspojava na farmakokinetičkoj razini i smatrati ga zaštitničkim čimbenikom, što temeljimo na spoznajama da za taj fenotip rijetko bilježimo toksične koncentracije lijeka u plazmi. Navedeni rezultati su u suglasju sa nekim ranijim istraživanjima (Vandel i sur, 1999, Topić i sur, 2000.). Povećana učestalost nuspojava u nosioca insuficijentnih alela CYP2D6 može također biti povezana s nedostatnim metaboličkim kapacitetom enzima u samom moždanom tkivu. U tim slučajevima usporena biotransformacija lijeka i povišene toksične koncentracije lijeka mogu potaknuti različite patobiokemijske procese s rezutirajućim toksičnim učincima.

### **5.3. Korelacija polimorfizama P-glikoproteina, gena MDR1, s fenotipskim osobinama bolesnika s VDP**

Uvođenje farmakogenetičkog koncepta u kliničku praksu može rezultirati značajnim doprinosom individualizaciji farmakoterapije i podizanju stupnja učinkovitosti i sigurnosti liječenja, što je već potvrđeno za metaboličke enzime. U novije vrijeme objavljena su istraživanja koja polimorfne oblike gena MDR1 dovode u vezu s varijabilnim kliničkim učincima (Roberts i sur, Yamauchi i sur, 2002.), različitom ekspresijom P-glikoproteina u humanim tkivima (Nakamura i sur, 2002, Hoffmeyer i sur, 2000.) ili biodostupnosti oralno primijenjenih lijekova (Kurata i sur, 2002.). Štoviše, pojavljuju se i dokazi da polimorfne varijante MDR1 mogu kvantitativno i kvalitativno odrediti visinu indukcije P-glikoproteina i domete interakcija lijekova Pgp-supstrata (Hoffmeyer i sur, 2000, Kurata i sur, Siegmund i sur, 2002.). Za gen MDR1 također je uočena značajna interetnička varijabilnost. Dokumentirana je učestalost alela C3435: 43-54% u bijeloj populaciji (Roberts i sur, 2002.),

34-63% u azijskoj (Nakamura i sur, 2002.) i 73-90% u Afrikanaca. Učestalost genotipa C/T i C/C3435 u Afrikanaca je značajno viša nego u drugim rasama. SNP u egzonu 21 G2677 ima učestalost u bijeloj populaciji od 57% u Japanaca 43%, dok su niže vrijednosti (34%) dokumentirane za indijsku populaciju (Ieiri i sur, 2004.). Naša su ispitivanja svrstala učestalost alela C3435 (54%) i alela G2677 (55%) unutar vrijednosti za bijelu europsku populaciju. Distribucija genotipa CC-CT-TT i GG-GT-TT također korelira s vrijednostima objavljenima za druge europske populacije (Hoffmeyer i sur, 2000, From i sur, 2002, Ieiri i sur, 2004.). Interetničke razlike farmakokinetičke aktivnosti P-glikoproteina nisu intenzivno ispitivane. Ipak se razlike u raspodjeli polimorfni oblika gena MDR1, prema do sada objavljenim podacima, smatraju mogućim uzrokom interetničkih razlika u farmakokinetici lijekova supstrata P-glikoproteina. Tako je oralna biodostupnost ciklosporina bila značajno niža u crnaca (30,9%) prema bijelcima (39,6%) ili Hispanicima (42,1%), bez jasnih razlika u klirensu ili volumenu distribucije u ravnoteži (Lindholm i sur, 1992.). Bolesnici s većim sadržajem intestinalnog P-glikoproteina mogu imati nižu biodostupnost i ukupnu koncentraciju lijeka u plazmi i obrnuto. Slični su rezultati objavljeni i za takrolimus (Mancinelli i sur, 2001.).

Neke studije ističu da je visoka učestalost alela C3435 u Afrikanaca povezana s visokom pojavnošću rezistentnih i agresivnijih tumora, poput raka dojke u osoba afričkog podrijetla (Elmore i sur, 1998, Ameyaw i sur, 2000.). Istraživanja također ističu polimorfne oblike gena MDR1 kao moguće kofaktore u etiopatogenezi različitih bolesti, poput Crohnove bolesti, ulceroznog kolitisa ili sindroma iritabilnog crijeva, nekih vrsta epitelnih tumora urogenitalnog sustava (Ho i sur, 2005, Hirano i sur, 2004.). Druge studije predlažu da se nalaz prekomjernog izričaja P-glikoproteina zbog varijabilnog gena MDR1 primijeni kao prognostički biljeg u bolestima poput leukemije ili raka jajnika; visoka razina MDR1 značila bi lošiju prognozu bolesti (Baekelandt i sur, Van der Heuvel i sur, 2000, From i sur, 2002.).

U više je ispitivanja ustanovljeno da MDR1 također doprinosi farmakoterapijskoj rezistenciji u različitim bolestima, uključujući neke vrste karcinoma (Gottesman i sur, 2002.), reumatoidni artritis (Llorente i sur, 2000.), i upalne bolesti crijeva (Farrell i sur, 2000, Cho i sur, 2004, Ho i sur, 2005.). Studije su dokazale da je u bijeloj populaciji genotip 3435TT povezan sa sniženim vrijednostima Pgp u enterocitima, stanicama ubojicama CD56+ i mononuklearima (Hitzl i sur, 2001, Fellay i sur, 2002.).

Najnovija istraživanja povezuju polimorfizam MDR1 gena s farmakorezistentnim epilepsijama (Siddiqui i sur, 2003, Kwan i sur, 2005.). Nekoliko studija opisuje značajno povišenu ekspresiju transportnih proteina (Pgp i MRP1) u svim analiziranim uzorcima tkiva iz

epileptogenih zona, a ustanovljen je i znatan porast varijante C3435 u genu MDR1. Stanično-specifični izričaj transportnog proteina može umanjiti učinkovitost lijeka na tri razine: 1) na razini endotelne stanice lezijskih kapilara (Pgp) smanjujući koncentracije lijeka u tkivu; 2) na razini astrocita koji okružuju kapilare i neurone (Pgp i MRP1) pojačavajući prijenos iz izvanstaničnih prostora mozga natrag u krvotok, umanjujući dostatne količine lijeka na ciljnim mjestima u neuronima; 3) na razini neuralnih i neuro-glijalnih epileptogenih komponenata lezija, interferirajući s unutarstaničnom aktivnošću lijeka. U svojim istraživanjima Siddiqui je ustanovio značajnu korelaciju polimorfizama C3435T s rezistentnom epilepsijom, neovisno o tipu epilepsije ili korištenim antiepilepticima (Siddiqui 2003.). Bolesnici s farmakorezistentnom epilepsijom češće su imali genotip CC nego genotip TT (omjer vjerojatnosti, engl. odds ratio, 2,66; 95% CI 1,32 -5,38; p= 0,006). Nalazi navedenih istraživanja pokrenuli su ideje za pronalaženje i uporabu inhibitora Pgp i MRP kao moguće pomoćne terapije farmakorezistentnih epilepsija.

Postoje i oprječni rezultati. Tako istraživanja u škotskoj populaciji nisu mogla potvrditi rezultate Siddiqui-a (Sills i sur, 2005.).

U provedenom ispitivanju ispitali smo učestalost i značaj polimorfizama gena MDR1 u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Analizirani su polimorfni aleli G2677T i C3435T. Razlika u učestalosti polimorfizama i raspodjeli genotipova u bolesnika s VDP u odnosu na zdravu populaciju nije bila statistički značajna. Premda se učestalost genotipa TT (egzon 21) razlikovala između zdrave populacije i bolesnika s VDP (genotip TT je bio zastupljeniji u zdravoj populaciji), to nije potvrđeno statističkom analizom (p=0,060). Kada smo testirali ispitanike grupirane u dvije skupine na raspodjelu učestalosti nosioca genotipa GG i G/T prema genotipu TT, postojala je razlika između zdravih i bolesnih ispitanika koja, međutim, nije dosegla statističku značajnost (p=0,060;  $\chi^2 = 3,533$ ; OR =0,553, 95% CI 0,293-1,032). Ipak, držim da bi bilo vrijedno napraviti analizu na većem broju ispitanika.

### **5.3.1. MDR1 i odgovor na terapiju antidepresivima**

Istražili smo utjecaj MDR1 na terapiju zbog toga jer u literaturi nema podataka o mogućoj ulozi MDR1 kao modulatora učinkovitosti antidepresivne terapije i mogućega molekularnoga prognostičkog biljega. S obzirom da je pokazano da polimorfni oblici P-glikoproteina moduliraju biodostupnost nekih lijekova i druge farmakokinetičke parametre, željeli smo ispitati ulogu različitih polimorfnih alela i genotipova na učinkovitost terapije u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Osim toga, zbog spoznaja o aktivnoj ulozi P-glikoproteina

na krvno-moždanoj brani te činjenice da je već za velik broj antidepresiva potvrđeno da su Pgp supstrati (Weiss i sur, 2003.), pretpostavili smo da bi različit izričaj P-glikoproteina mogao doprinosti kvantitativnom i kvalitativnom učinku lijekova u SŽS-u. Stoga smo antidepresive smatrali dobrim kandidatima za asocijacijsku studiju genotipa i učinkovitosti terapije.

U provedenim istraživanjima učestalosti polimorfnih alela u tri skupine ispitanika rezultati pokazuju da je alel G2677 češće zastupljen u skupini bolesnika koja je bila rezistentna na terapiju (66,7%) u odnosu na bolesnike s dobrim odgovorom (52.%), no statistička značajnost nije potvrđena ( $p=0,0061$ ). Postoji i razlika u raspodjeli genotipa. Razlike u raspodjeli genotipa GG također se približavaju statističkoj značajnosti ( $p=0,094$ ). Rezultati upućuju da bi ispitivanje svakako trebalo nastaviti i statističku analizu provesti na većem uzorku za donošenje konačnih zaključaka. Ovi se rezultati mogu dijelom dovesti u vezu s rezultatima dobivenima u ispitivanjima farmakorezistentne epilepsije, što navodi na zaključke da bi MDR1 mogao modulirati učinke farmakoterapije lijekovima koji djeluju u SŽS-u. Prema spoznajama iz prethodnih istraživanja i s obzirom na spoznaje o aktivnoj ulozi P-glikoproteina na krvno-moždanoj brani te drugim mjestima u mozgu, pretpostavili smo da bi različita ekspresija Pgp-a mogla također imati utjecaj na različite kvantitativne i kvalitativne učinke lijekova u SŽS-u, a time i za nastanak nuspojava. Do sada su ispitivanja na životinjskim modelima pokazala da P-glikoprotein može imati značajnu ulogu u interakcijama lijekova koji djeluju na središnji živčani sustav. Bez P-glikoproteina na krvno-moždanoj brani (mišji model) koncentracije lijekova bile su i do 10 puta veće (Grauer i sur, 2004.). Da smanjena Pgp aktivnost može dovesti do povećane akumulacije lijeka u mozgu i neželjenih nuspojava, pokazuju rezultati nekih istraživanja (Eichelbaum i sur, 2004.). Postoje izvještaji o neurotoksičnosti takrolimusa nakon transplantacije jetre u kojima se navodi da su koncentracija lijeka, funkcija jetre, težina presatka i mutacije na poziciji 2677 u egzonu 21 gena MDR1 pozitivni pretkazatelji takrolimusom inducirane neurotoksičnosti (Yamauchi, 2002.). U našem ispitivanju korelacije pojedinih polimorfnih oblika i genotipova MDR1 s nastankom nuspojava rezultati ne ukazuju da postoji statistički značajna razlika između skupine ispitanika koji su razvili neki oblik nuspojava i onih koji na farmakoterapiju nisu razvili nuspojave.

I dok se znatan broj ispitivanja bavio farmakološkom i fiziološkom ulogom P-glikoproteina, objavljen je manji broj istraživanja koja iznose podatke o ulozi polimorfizama MDR1 u interakcijama lijekova. Hoffmeyer sa suradnicima prvi je dokumentirao nalaze da su rifampicinom inducirane koncentracije digoksina bile u C3435-populaciji niže od onih u

T3435-populaciji (Hoffmeyer i sur, 2000.). Nekoliko je studija izvijestilo o digoksin-klaritromicin interakcijama te značajnom porastu ravnotežnih koncentracija digoksina. Oralna biodostupnost digoksina u istovremenoj primjeni s klaritromicinom bila je značajno povišena u nosioca haplotipa 2677GG / 3435CC osoba (Kurata i sur, 2002.). Također postoje spoznaje o značajnosti interakcija između P-glikoproteina i CYP3A4 na intestinalnoj razini (Hesselink i sur, 2003.). Mnogi su lijekovi istovremeno supstrati i Pgp i CYP3A4. Istraživanja su pokazala da P-glikoprotein može biti inhibiran i različitim antidepresivima (Weiss i sur, 2003.).

#### **5.4. Korelacija polimorfizama serotoninskog transportera - SERT s fenotipskim osobinama bolesnika s VDP**

S obzirom na ulogu serotoninskog transportera u regulaciji izvanstanične koncentracije serotonina, a time i posrednog utjecaja na čitav serotonergični sustav, nametnula se ideja o molekularnim varijantama gena SERT kao mogućim biljezima za različite psihičke poremećaje u čijoj etiopatogenezi, predmnijeva se, serotonin ima važnu ulogu. Također je utemeljena pretpostavka da polimorfni oblici serotoninskog transportera mogu biti moderatori terapije kojoj je ciljno mjesto upravo serotoninski transporter. Dosadašnja istraživanja važnosti i uloge polimorfizama gena za serotoninski transportni protein -SERT, kako je već navedeno u uvodu, iznose nedosljedne i u nekim slučajevima oprečne podatke koji se pokušavaju pojasniti etničkim različitostima u učestalosti ispitivanih polimorfizama. Podatci iz ovog istraživanja o učestalosti alela S i L promotorske regija i s i l alela u intronu 2 u hrvatskoj populaciji pokazuju da su dobivene vrijednosti za alele L (60%) i S (40 %) slične vrijednostima objavljenima za bijele sjevernoameričke i europske populacije (57% i 43%) (Lesch i sur, 1996.). Slični su rezultati potvrđeni i za raspodjelu genotipova: u hrvatskoj populaciji (LL 35%, LS 50%, SS 15%) (Hranilović i sur, 2003.); u drugim bijelim populacijama (LL 32%, LS 49%, SS 19%). Podatci za azijske populacije navode dvostruko višu učestalost genotipova SS (39%) (Delbruck i sur, 1997.). Aleli S i L SERTPR različito moduliraju transkripcijsku aktivnost serotoninskog promotora. O povezanosti oblika S sa smanjenom ekspresijom i funkcijom SERTPR izvještavaju, među ostalima, istraživanja na mozgu *post mortem* (Little i sur, 1998.), istraživanja o inhibiciji intrakortikalnog odgovora na citalopram (Eichhammer i sur, 2003.) te istraživanja promjene raspoloženja nakon deplecije triptofana (Neumeister i sur, 2002.).

Polimorfizam u intronu 2-VNTR sadrži 9,10(s) ili 11(l) kopija 16 pb ponavljajućeg ulomka. Podatci o njihovoj funkcionalnosti, dobiveni testovima *in vitro* u staničnim kulturama, govore u prilog više ekspresije u genotipu s "l" alelom prema "s" alelu (Fikerstrand i sur, 1999, Lovejoy i sur, 2003.). Tragom ovih rezultata provedena su istraživanja o mogućoj ulozi polimorfničkih oblika serotoninskog transportera u etiopatogenezi različitih depresivnih poremećaja, te modulaciji farmakoloških učinaka pojedinih antidepresiva. I ta istraživanja imaju proturječne rezultate. Neka su istraživanja pokazala da je 5-HTLPR odgovoran za promijenjenu funkciju serotoninskog sustava, što može predstavljati neurobiološki supstrat za različiti odgovor na antidepresivnu terapiju i ujedno pojavu neuropsihijatrijskih simptoma u neurodegenerativnim bolestima (Smith i sur, 2004.). Druga istraživanja (Pao-Yen Lin 2004, Hranilović i sur, 2003.) navode značajnu povezanost alela "S" polimorfizma 5-HTTLPR sa suicidalnim ponašanjem u psihijatrijskoj populaciji, što podupire teoriju o smanjenoj funkciji serotoninskog transportera i vulnerabilnosti prema suicidu u određenoj populaciji. Velika europska multicentrična studija nije uspjela dokazati povezanost polimorfizama 5-HTTLPR s afektivnim poremećajima: unipolarnim i bipolarnim (Mendlewicz i sur, 2004.). Neke studije ističu genotip LL-SERTPR kao zaštitni čimbenik u traumatskim životnim situacijama i navode da će više depresivnih epizoda imati osobe sa genotipom SS-SERTPR (Caspi i sur, 2003.).

U istraživanjima provedenima u hrvatskoj populaciji učestalost alela L i S i genotipova SERTPR nije se statistički značajno razlikovala između zdrave populacije i bolesnika od VDP. Međutim, razlike u učestalosti alela l i s za intron 2 bile su statistički značajne: l- zdravi (62%), bolesnici od VDP (52%), s – zdravi (38%), s-bolesnici od VDP (47%) ( $p=0,017$ ; OR = 1,472; 95%CI = 1,080-2,007). Uočena je i razlika u raspodjeli genotipova: l/l- zdravi (41%), bolesnici s VDP (31,7%), s/s zdravi (16,8%), bolesnici od VDP (24,6%), ali nije statistički potvrđena (za ll:  $p= 0,057$ ; za ss:  $p= 0,073$ ); ipak, ona upućuje na daljnju potvrdu na većem broju ispitanika.

Objavljena istraživanja provedena u drugim populacijama (bijeloj, azijskoj) o mogućoj prediktivnoj ulozi polimorfizama serotoninskog transportera na učinkovitost terapije antidepresivima i za nastanak nuspojava ne iznose jednoznačne rezultate. Nekoliko studija navodi genotip LL SERTPR ili alel L kao prognostički čimbenik bolje antidepresivne učinkovitosti fluvoksamina, fluoksetina, paroksetina i citaloprama. Istraživanja su provedena u različitim skupinama bolesnika: s unipolarnom, bipolarnom, i depresijom s psihotičnom komponentom (Serretti i sur, 2002, Kim i sur, 2000.). Dvije studije provedene u korejskoj i japanskoj populaciji iznose potpuno suprotne rezultate (Yoshida i sur, 2002.). Ovaj se nesklad



pokušava objasniti znatno nižom prevalencijom genotipa LL u navedenim populacijama. Osim toga, serotonininski receptor 5HT<sub>2</sub> posjeduje dvije varijante koje se s nejednakom učestalošću pojavljuju u istočnjačkim i europskim populacijama; također se učestalost polimorfizama CYP2D6 koji određuju brzinu metabolizma većine antidepresiva razlikuju između Azijata i Europljana.

Neka istraživanja ističu da je polimorfizam SERTPR povezan s brzinom pozitivnog odgovora na terapiju sa SSRI (Durham i sur, 2004.).

Objavljeni podaci o nuspojavama na antidepresivnu terapiju koja je uključivala SSRI najčešće spominju insomniju, agitaciju i maniju u korelaciji s genotipom SS-SERT (Mundo i sur, 2001, Perlis i sur, Rousseva i sur, 2003.).

U ovoj korelacijskoj studiji ispitivana je povezanost alela L, l i S, s promotorske regije i introna 2 sa nuspojavama lijekova. U studiju su bili uključeni bolesnici koji su dobivali terapiju koja je uključivala neki od inhibitora ponovne pohrane serotonina. Raspodjela učestalosti alela L i S promotorske regije značajno se razlikovala u bolesnika bez nuspojava u odnosu na bolesnike s nuspojavama ( $p=0,008$ ;  $OR=0,444$ ,  $95\% CI= 0,250-0,789$ ). Postoji i razlika u učestalosti alela l i s u intronu 2, ali nije statistički potvrđena ( $p= 0,078$ ). Učestalost genotipa LL promotorske regije bila je statistički značajno viša u bolesnika bez nuspojava u odnosu na skupinu s nuspojavama ( $p= 0,01$ ). Također se i zastupljenost genotipa ss u intronu 2 statistički značajno razlikovala među bolesnicima sa i bez nuspojava ( $p= 0,027$ ). Naši rezultati pokazuju da bi genotip “ss” mogao biti zaštitni prognostički biljeg jer je pokazao višu učestalost u bolesnika bez nuspojava.

Nastajanje nakane i izvršenje suicida koji predstavlja prijevornu moguću nuspojavu na terapiju selektivnim inhibitorima ponovne pohrane serotonina, također se u nekim istraživanjima povezuje sa genotipom SS (Anguelova i sur, 2003.). U ovoj studiji koja je imala 114 bolesnika na terapiji koja je uključivala i SSRI dokumentirano je 10 pokušaja suicida (2 izvršena) sa sljedećom raspodjelom genotipova SERTPR: LL-1, LS-5, SS-4. Na ovom malom uzorku uočljiva je veća učestalost alela S prema alelu L (13:7). Treba istaknuti da je ponekad teško razlučiti je li pokušaj suicida simptom osnovne bolesti ili nuspojava na terapiju s SSRI.

## **5.5. Korelacija polimorfizama CYP2D6 i MDR s metaboličkim omjerom dekstrometorfana prema metabolitu i koncentracijama paroksetina i maprotilina**

Kombinirana farmakoterapija često se primjenjuje u kliničkoj psihijatriji u svrhu liječenja bolesnika s psihijatrijskim poremećajem, ali i drugih komorbiditeta. Interakcije lijekova predstavljaju značajan problem u evaluaciji psihotropnih lijekova (Preskorn i sur, 1997.). Metabolički enzimi citokromi P-450 imaju središnju ulogu u farmakokinetičkim interakcijama (De Vane i sur, 2003.). Rezultati interakcija psihotropnih lijekova mogu biti toksični učinci ili umanjena terapijska učinkovitost (Preskorn, 1996.). U procjeni dometa i kliničke važnosti metaboličkih interakcija lijekova nužno je razmotriti više čimbenika među kojima polimorfizam metaboličkih enzima ima značajnu ulogu (Hemeryck i sur, 2002, Spina i sur, 2003.). U ispitivanju provedenom na skupini ispitanika na politerapiji maprotilinom, paroksetinom i diazepamom željeli smo ispitati utjecaj genotipova CYP2D6 i haplotipova MDR1 na koncentracije lijekova u plazmi; visinu inhibicijskog učinka paroksetina s obzirom na metabolički kapacitet bolesnika koji je određen genotipizacijom i fenotipizacijom s testnim lijekom dekstrometorfanom. Za statističku obradu podataka ispitanike smo prema genotipu grupirali u dvije skupine. Prva je imala genotip wt/wt i genske duplikacije, dakle funkcionalne alele i dobru ekspresiju enzima. Druga skupina je imala genotip wt/mut, s jednim funkcionalnim alelom i jednim nefunkcionalnim mutiranim alelom. Prema dobivenim podacima možemo zaključiti da su za vrijednosti metaboličkog omjera uočene značajne razlike između vrijednosti na početku i u ravnoteži, bez obzira na skupinu genotipa. Rezultati upućuju da su genotipski i fenotipski potvrđeni brzi metabolizatori (genotipizacija i fenotipizacija provedene prije početka terapije) ( $MR:0,001-0,08$ ) na terapiju paroksetinom postali intermedijarni ili spori metabolizatori nakon dvotjedne terapije ( $MR>0,08$ ). Terapija s 20 mg paroksetina dnevno izazvala je snažan inhibicijski učinak na CYP2D6, što se očitava iz vrijednosti metaboličkog odnosa za dekstrometorfan. U ravnoteži ne postoji značajna razlika u vrijednostima za metabolički odnos (MR) između dva ispitivana genotipa. Prevladao je inhibicijski učinak paroksetina. Ovaj nalaz je u podudarnosti s podacima koje iznosi Kirchheiner (Kirchheiner i sur, 2004.).

Za vrijednosti koncentracija paroksetina su sve testirane razlike bile značajne. Sve su vrijednosti koncentracija niže u skupini wt/wt nego u wt/mut. Uočeno je također da su sve

vrijednosti više u ravnoteži nego na početku terapije. Razlikovale su se i promjene s obzirom na skupine genotipa, tj. u skupini wt/mut vrijednosti su se u ravnoteži više povećale nego u skupini wt/wt.

Za vrijednosti koncentracija maprotilina postoji značajna razlika samo između vrijednosti na početku i u ravnoteži, bez obzira na skupinu genotipa. U obje su skupine promjene bile jednake, što znači da je inhibicijski učinak paroksetina na enzim CYP2D6 prevladao nad učincima različitih genotipova CYP2D6 na vrijednosti koncentracija maprotilina u plazmi. . Ovi rezultati su u skladu s istraživanjima Leuchta i suradnika koji su istraživali utjecaj paroksetina na visinu koncentracija i nuspojave tricikličkih antidepresiva (Leucht i sur, 2000.) Iz Tablice 27 također je vidljivo da je genotip mut/mut potvrđen i fenotipskim vrijednostima metaboličkog omjera DX/DM (0.354) za spore metabolizatore. Spori metabolizatori su pri terapiji paroksetinom ostali spori metabolizatori. U ispitivanju smo također imali tri bolesnika koji se nisu u potpunosti pridržavali uputa liječnika i nisu uzimali propisanu terapiju, odnosno izostavili su paroksetin i uzimali samo maprotilin i diazepam. U njih je, dakle, izostao inhibicijski učinak paroksetina te je stoga metabolički odnos ostao nepromijenjen na početku terapije i u ravnoteži. Iz Tablice 27 također je važno uočiti da su koncentracije paroksetina u dva bolesnika, genotipski vrlo brza metabolizatora, na početku terapije bile ispod granica detekcije, iz čega možemo zaključiti da su bile u subterapijskom području. Prema ovom nalazu možemo komentirati podvojene stavove o potrebi terapijskog praćenja koncentracija lijekova inhibitora ponovne pohrane serotonina (Rasmussen i sur, 2000.). Premda imaju širok terapijski raspon i rijetko se bilježe toksične koncentracije lijeka u plazmi u slučaju vrlo brzih metabolizatora, kao što je zapaženo u ovom ispitivanju, postoji realna opasnost od poddoziranja ove fenotipske kategorije bolesnika. Stoga bi preporuka bila da se barem na početku terapije prate koncentracije lijekova inhibitora ponovne pohrane serotonina, dok se ne postignu ravnotežne koncentracije lijeka. Simultana metoda određivanja lijekova koja je primijenjena u ovom ispitivanju može se preporučiti. Simultane metode ujedno imaju prednost pred pojedinačnim određivanjem lijekova. Istovremeno očitani rezultat u jednom analitičkom uzorku je najpouzdaniji pokazatelj visine mogućih interakcija lijekova u određenom vremenskom intervalu.

Analizu učinka genotipa CYP2C19 na koncentracije diazepamata nismo mogli provesti jer su izmjerene koncentracije diazepamata bile u vrlo širokom rasponu od 50-700 ug, što je značilo da se bolesnici nisu pridržavali uputa liječnika o propisanom uzimanju lijekova i doza i da su uzimali lijekove prema nahođenju. I neke smo druge bolesnike morali isključiti iz studije zbog nepridržavanja uputa o uzimanju propisanih lijekova, što je otkriveno tek nakon analize

uzoraka. Ovaj problem nesuradljivosti je poznat u psihijatriji. Stoga bi terapijsko praćenje ovakvih bolesnika i s ovog motrišta bilo vrlo poželjno jer bi značajno pridonijelo objektivnoj procjeni učinaka terapije.

Na osnovi provedenih istraživanja možemo zaključiti da genotipizacija metaboličkih enzima ima vrijednost u otkrivanju ekstremnih fenotipova sporih i vrlo brzih metabolizatora i mogućoj individualizaciji terapije. U literaturi nalazimo izvještaje o primjeni matematičkih metoda za izračune "gen-doza" gdje se na osnovi genotipa egzaktnim metodama mogu izračunati preporučene doze za svaku fenotipsku skupinu bolesnika. Steimer je sa suradnicima objavio jednu takvu studiju u kojoj je pokazao da već fenotipska kombinacija normalne funkcije enzima CYP2C19 i lagano snižene funkcije enzima CYP2D6 može pri standardnim dozama proizvesti visoke koncentracije toksičnih intermedijarnih metabolita (nortriptilina pri terapiji amitriptilinom) i predstavlja visok rizik nastanka nuspojava (Steimer i sur, 2004.) .

Na osnovi provedenih istraživanja možemo istaknuti da fenotipizacija s deksstrometorfanom može imati važnu primjenu u analitičke svrhe u procjeni dometa farmakokinetičkih interakcija lijekova u politerapiji, što je u slučaju liječenja depresije vrlo čest slučaj.

## 6. ZAKLJUČCI

1.

U provedenom istraživanju u hrvatskoj populaciji uočena je značajna učestalost polimorfnih oblika gena metaboličkih enzima citokroma P450-CYP: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, koja može biti važan čimbenik u farmakoterapiji. Učestalosti polimorfnih alela i genotipova bile su slične vrijednostima objavljenima za druge europske bijele populacije.

2.

Pronađena je statistički značajna razlika u učestalosti genotipa metaboličkog enzima citokroma P450 - CYP2C19, wt/wt ("divlji" homozigot) i genotipa wt/mut (heterozigot) u zdravoj populaciji i u bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Učestalost genotipa s mutiranim alelima bila je viša u populaciji bolesnika s velikim depresivnim poremećajem.

3.

Uočena je statistički značajna razlika u raspodjeli učestalosti "divljih" i mutiranih alela gena CYP2D6 u zdravih ispitanika i bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. U zdravoj populaciji značajno je više homozigota za wt-"divlji" tip alela gena CYP2D6 dok je u populaciji bolesnika s velikim depresivnim poremećajem značajno više homozigotnih nosioca mutiranih alela.

4.

U istraživanju povezanosti genetičke predispozicije s učinkovitošću terapije antidepresivima u populaciji bolesnika s velikim depresivnim poremećajem statistički je značajna razlika pronađena u učestalosti genotipa vrlo brzih metabolizatora CYP2D6 koja je bila viša u bolesnika rezistentnih na terapiju.

5.

Prema dobivenim rezultatima potvrdili smo statistički značajno višu učestalost mutiranih alela CYP2D6 u skupini bolesnika s nekim oblikom nuspojava od skupine bez nuspojava. Držimo da brzi metabolički fenotip možemo povezati sa smanjenom učestalošću nuspojava na farmakokinetskoj razini i smatrati ga zaštitničkim čimbenikom.

6.

Prema nalazu ovog istraživanja učestalost polimorfizama gena MDR1: C3435 alel i G2677 alel podudara se s vrijednostima objavljenima za druge bijele europske populacije. I distribucija genotipova CC-CT-TT i GG-GT-TT slična je vrijednostima dosad objavljenima za druge europske populacije.

7.

Učestalost polimorfnih oblika gena MDR1 nije se statistički razlikovala između zdrave populacije i bolesnika s velikim depresivnim poremećajem.

8.

U skupinama ispitanika s dobrim odgovorom na terapiju, djelomičnim odgovorom i ispitanika rezistentnih na terapiju antidepresivima rezultati pokazuju da je G2677 alel gena MDR1 češće zastupljen u skupini bolesnika koja je bila rezistentna na terapiju u odnosu na bolesnike s dobrim odgovorom.

9.

Podatci istraživanja učestalosti alela S i L promotorske regije, s i l alela u intronu 2, te genotipova u hrvatskoj populaciji pokazuju da su dobivene vrijednosti slične vrijednostima objavljenima za bijele sjevernoameričke i europske populacije.

10.

Učestalost alela L i S i genotipova SERTPR nije se statistički značajno razlikovala između zdrave populacije i bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Međutim učestalost alela l (int2) bila je statistički značajno niža u bolesnika s VDP.

11.

Raspodjela učestalosti alela L i S promotorske regije SERTR bila je značajno različita u bolesnika bez nuspojava u odnosu na bolesnike s nuspojavama. Postoji i razlika u učestalosti alela l i s u intronu 2, ali nije statistički potvrđena. Učestalost genotipa LL promotorske regije bila je statistički značajno viša u bolesnika bez nuspojava u odnosu na skupinu s nuspojavama. Također se i zastupljenost genotipa ss u intronu 2 statistički značajno razlikovala među bolesnicima sa i bez nuspojava. Naši rezultati pokazuju da bi genotip "ss" bio zaštitni biljeg jer je pokazao višu učestalost u bolesnika bez nuspojava.

12.

U ispitivanju zavisnosti farmakokinetičkih parametara i genotipa metaboličkih enzima potvrđeno je da je metabolički kapacitet CYP2D6 i biodostupnost lijeka genetički određena. Rezultati potvrđuju da su interakcije lijekova na farmakokinetičkoj razini vrlo izražene u politerapiji antidepresivima koja uključuje inhibitor ponovne pohrane serotonina, u ovom slučaju paroksetin. O genotipu ovisne varijabilne koncentracije lijeka osobito su izražene na početku terapije, dok su razlike u ravnoteži smanjene. Stoga bi značajan doprinos individualizaciji terapije bio prema genotipu temeljena prilagodba doze ili određivanje koncentracije lijeka barem do postizanja ravnoteže. Simultana metoda određivanja koncentracija lijekova u plazmi koja je primijenjena u ovom ispitivanju može biti preporučena

i ima prednost pred pojedinačnim određivanjem koncentracija, jer je pouzdan indikator visine mogućih interakcija lijekova u određenom vremenskom periodu.

13.

Biljezi koji su prema rezultatima statističke analize pokazali značajnu korelaciju s određenim fenotipskim osobinama bolesnika s velikim depresivnim poremećajem mogu se preporučiti kao mogući kandidati za farmakogenetičku analizu (npr. CYP2D6, SERTR, MDR1) i biti doprinos individualizaciji i racionalizaciji psihofarmakoterapije.

## 7.POPIS LITERATURE

Agundez J A G, Ledesma M C, Ladero J M, Benitez J. Prevalence of CYP2D6 gene duplication and its repercussion on the oxidative phenotype in white population. *Clin Pharmacol Ther* 1995;57(3):265-269.

Alderman J, Preskorn SH, Greenblatt DJ, et al. Desipramine pharmacokinetics when coadministered with paroxetine or sertraline in extensive metabolizers. *J Clin Psychopharmacol* 1997;17:284-291.

Alvan G, Bechtel P, Iselius L, Gundert-Remy U. Hydroxylation polymorphism of debrisoquine and mephenytoin in European populations. *Eur J Clin Pharmacol* 1990;39:533-537.

American Psychiatric Association, *Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders*, 4<sup>th</sup> edn. American Psychiatric Press, Washington, D.C.1994.

Ameyaw M-M, Regateiro F, Li T, et al. MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C34435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity. *Pharmacogenetics* 2001;11:217-21.

Andersson T, Miners JO, Veronese ME, and Birkett DJ; Diazepam metabolism by human liver microsomes is mediated by both S-mephenytoin hydroxylase and CYP3A4 isoforms. *Br J Clin Pharmacol* 1994; 38:131-137.

Anguelova M, Benkelfat C, Turecki GA. A systematic review of association studies investigating genes coding for serotonin receptors and the serotonin transporter: II.Suicidal behavior. *Mol Psychiatry* 2003;8:646-653.

Armstrong, M., Daly, A. K., Cholerton, S., Bateman, D.N. and Idle, J.R.: Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease. *Lancet* 1992;339:1017-1018.

Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000; 464: 65-76.

Baekelandt MM, Holm R, nesland JM, et al. P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1061-7.

Baker CB, Tweedie R, Duval S, Woods SW. Evidence that the SSRI dose response in treating major depression should be reassessed. A meta-analysis. *Depress Anxiety* 2003;17:1-9.

Baumann P, Jonzier-Perey M. GC and GC-MS procedures for simultaneous phenotyping with dextromethorphan and mephenytoin. *Clin Chem Acta* 1988:171:211-222.

Belle DJ, Ernest CS, Sauer JM, Smith BP, Thomasson HR, Witcher JW. Effect of potent CYP2D6 inhibition by paroxetine on atomoxetine pharmacokinetics. *J Clin Pharmacol* 2002;42(11):1219-27.



- Bengtsson F. Therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. TDM "nouveau". *Ther Drug Monit* 2004;26(2):145-51.
- Bernal ML, Sinues B, Johansson I, Mc Lellan RA, Wennerholm A, Dahl MA, Ingelman-Sundberg M, Bertilsson L. Ten percent of north Spanish individuals carry duplicated or triplicated CYP2D6 genes associated with ultrarapid metabolism of debrisoquine. *Pharmacogenetics* 9:657-660.
- Bertilsson L, Henthorn TK, Sanz E, Tybring G, Sawe J, Villen T. Importance of genetic factors in the regulation of diazepam metabolism: relationship to S-mephenytoin, but not debrisoquin hydroxylation phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 1989; 45:348-355.
- Bertilsson L, Alm C, De Las Carreras C, Widen J, Edman G, Schalling D. Debrisoquine hydroxylation polymorphism and personality. *Lancet* 1989;11:555.
- Bertilsson L, Ya-Qing L, Yun-Long D et al. Pronounced differences between native Chinese and Swedish populations in the polymorphic hydroxylations of debrisoquin and S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* 1992;51:388-97
- Bertilsson L, Dahl ML, Dalen P, AL-Shurbaji A. Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. *Br J Clin Pharmacol* 2002;53(2):111-22.
- Bloomer JC, Woods FR, Haddock RE, Lennard MS, Tucker GT. The role of cytochrome P4502D6 in the metabolism of paroxetine by liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1992;33:521-523.
- Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1295-302.
- Botsch S, Heinkele G, Meese C.O, Eichelbaum M, Kroemer H.K. Rapid determination of CYP2D6 phenotype during propafenone therapy by analysing urinary excretion of propafenone glucuronides. *Eur J Clin Pharmacol* 1994; 46:133- 135.
- Božina N, Granić P, Lalić Z, Tramišak I, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of cytochromes P450: CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in Croatian Population. *Croat Med J* 2003;44(4): 425-428.
- Božina N, Tramišak I, Medved V, Mihaljević-Peš A, Granić P, Stavljenić-Rukavina A. CYP2D6 genotype and psychotropic drug-induced adverse effects. *Period Biol* 2001;103(4):309-314.
- Božina N. Uloga farmakogenomike u farmakoterapiji. *Pharmaca* 2004;42:71-86.
- Božina N, Granić P, Hajnšek S, Lalić Z, Bašić S, Lovrić M, Stavljenić-Rukavina A. Genetic polymorphisms of CYP2C9, CYP2C19 and MDR1 genes and their effects on phenytoin disposition. *Period Biol* 2005:107(2).
- Brosen K, Gram L F. First-pass metabolism of imipramine and desipramine: Impact of the sparteine oxidation phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 1988;43(4):400-406.

Brosen K. Drug metabolizing enzymes and therapeutic drug monitoring in psychiatry. *Ter Drug Monit* 1996;18(4):393-6.

Brosen K. Some aspects of genetic polymorphism in the biotransformation of antidepressants. *Therapie* 2004;59(1):5-12.

Burke MJ, Preskorn SH. Therapeutic drug monitoring of antidepressants: cost implications and relevance to clinical practice. *Clin Pharmacokinet* 1999;37(2):147-65.

Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, et al. Frequency of single nucleotide polymorphism in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:169-74.

Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, et al. Influence of life stress on depression: moderation by polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 2003;301:386-389.

Chen JJ, Li Z, Pan H, Murphy D.L, Tamir H, Koepsell H, and Gershon M.D. Maintenance of serotonin in the intestinal mucosa and ganglia of mice that lack the high-affinity serotonin transporter: Abnormal intestinal motility and the expression of cation transporters. *J Neurosci* 2001; 21:6348-6361.

Chen S, Chou WH, Blouin RA, et al. The cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) enzyme polymorphism: screening costs and influence on clinical outcomes in psychiatry. *Clin Pharmacol Ther* 1996;60(5):522-34.

Checkley S.(Mr): *The Management of depression*. Blackwell Science, London, 1998.

Cho JH. Advances in the genetics of inflammatory bowel disease. *Curr Gastroenterol Rep*. 2004;6(6): 467-73.

Conus P, Bondolfi G, Eap CB, Macciardi F, Baumann P. Pharmacokinetic fluvoxamine-clomipramine interaction with favorable therapeutic consequences in therapy-resistant depressive patient. *Pharmacopsychiatry* 1996;29(3):108-10.

Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, Woods FR, Haddock RE. The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 1992;34:262-265.

Dahl ML, Johansson I, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Sjoqvist F. Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. *J Pharmacol Exper Ther* 1995; 274: 516-520.

Daly A.K, Brockmoller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans W.E, Gonzales F.J, Huang J.-D, Idle J.R, Ingelman-Sundberg M, Ishizaki T, Jacqz-Aigrain E, Meyer U. A, Nebert D.W, Steen V.M, Wolf C.R, Zanger U.M. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 1996;6:193-201.

de Leon J, Barnhill J, Rogers T, et al. Pilot study of the cytochrome P450-2D6 genotype in a psychiatric state hospital. *Am J Psychiatry* 1998;155(9):1278-80.

Delbruck S J, Wendel Bgrunewald I, Sander T, Morris-Rosendahl D, Crocq M A, Berrettini W H, Hoehe M R. A novel allelic variant of the human serotonin transporter gene regulatory polymorphism. *Cytogenet Cell genet* 1997;79:214-220.

DeMorais SMF, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)- mephenytoin metabolism in Japanese. *Mol Pharmacol* 1994; 46:594-598.

Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(12):913-58.

DeVane CL. Pharmacokinetics, drug interactions, and tolerability of paroxetine and paroxetine CR. *Psychopharmacol Bul* 2003 Spring;37 Suppl 1:29-41. CR.

Dojo M, Azuma T, Saito T, Ohtani M, Muramatsu A, Kuriyama M. Effects of CYP2C19 gene polymorphism on cure rates for *Helicobacter pylori* infection by triple therapy with proton pump inhibitor (omeprazole or rabeprazole), amoxicillin and clarithromycin in Japan. *Dig Liver Dis* 2001;33(8): 671-5.

Dombrowski S.M, Desai S.Y, Marroani M, et al. Overexpression of multiple drugresistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 2001;42(12):1501-6.

Douglas AM, Atchinson BA, Somogyi AA, Drummer OH. Interpretation of a simple PCR analysis of the CYP2D6(A) and CYP2D6(B) null alleles associated with the debrisoquine/spartein genetic polymorphism. *Pharmacogenetics* 1994;4:154-158.

Drummer OH. Methods for measurement of benzodiazepines in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;713 (1):201-25.

Durham LK, Webb SM, Milos PM, Clary CM, Seymour AB. The serotonin transporter polymorphism, 5HTTLPR, is associated with a faster response time to sertraline in an elderly population with major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;174(4):525-9.

Eichamer P, Langguth B, Wiegand R, Kharraz A, Frick U, Hajak G. Allelic variation in the serotonin transporter promoter affects neuromodulatory effects of a selective serotonin transporter reuptake inhibitor (SSRI). *Psychopharmacology (Berl.)* 2003;166:294-297

Eichelbaum M, Fromm MF, Schwab M. Clinical aspects of the MDR1 (ABCB1) gene polymorphism. *Ther Drug Monit* 2004;26(2):180-5.

Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, et al. Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001;11:447-458.

Elmore JG, Mocerri VM, Carter D, et al. Breast carcinoma tumor characteristic in black and white women. *Cancer* 1998;83:2509-15.

Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999;286:487-91.

Evans WE, McLeod L Pharmacogenomics-Drug Disposition, Drug Targets, and Side Effects. *N Engl J Med* 2003;348(6): 538-549.

Farrell RJ, Murphy A, Long A, et al. High multidrug resistance (P-glycoprotein 170) expression in inflammatory bowel disease patients who fail medical therapy. *Gastroenterology* 2000;118:279-88.

Fava M, Papakostas GI, Petersen T, Mahal Y. Switching to bupropion in fluoxetine-resistant major depressive disorder. *Ann Clin Psychiatry* 2003;15(1):17-22.

Fellay J, Marzolini C, Maeden ER, et al. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter1: a pharmacogenetic study. *Lancet* 2002;359:30-6.

Fikerstrand C E, Lovejoy E A, Quinn J P. An intronic polymorphic domain often associated with susceptibility to affective disorders has allele dependent differential enhancer activity in embryonic stem cells. *FEBS Lett* 1999;458:171-174.

Firkusny L, Gleiter CH. Maprotiline metabolism appears to co-segregate with the genetically-determined CYP2D6 polymorphic hydroxylation of debrisoquine. *Br J Clin Pharmacol* 1994;37(4):383-8.

Frahnert C, Rao ML, Grasmaeder K. Analysis of eighteen antidepressant, four atypical antipsychotics and active metabolites in serum by liquid chromatography: a simple tool for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr B* 2003;794:35-47.

From M F, Kroemer H K, Eichelbaum M. Impact of P450 genetic polymorphism on the first-pass extraction of cardiovascular and neuroactive drugs. *Adv Drug Del Rev* 1997;27:171-199.

From M F. genetically determined differences in P-glycoprotein function. implications for disease risk. *Toxicology* 2002; 181-182:299-303.

Funae Y, Kishimoto W, Cho T, Niwa T, Hiroi T. CYP2D in the Brain. *Drug Metab Pharmacokinet* 2003;18(6):337-49.

Garcia-Martin E, Martinez C, Ladero JM, Gamito FJG, Agundez JAG. High frequency of mutations related to impaired CYP2C9 metabolism in a Caucasian population. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:47-49.

Glauser TA. Advancing the medical management of epilepsy: disease modification and pharmacogenetics. *J Child Neurol* 2002;17(1):S85-93.

Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, De Morais SM, Bell D, Krahn PM, et al. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* 1997;7:59-64.

- Goldstein JA. Clinical relevance of genetic polymorphism in the human CYP2C subfamily. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:349-355.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nat Rev Cancer* 2002;2:48-58.
- Grauer MT, Uhr M. P-glycoprotein reduces the ability of amitriptyline metabolites to cross the blood brain barrier in mice after 10-day administration of amitriptyline. *J Psychopharmacol*. 2004;18(1):66-74.
- Griese E.U, Zanger U.M, Breudermanns U, Gaedigk A, Mikus G, Morike K, et al. Assessment of the predictive power of genotypes for the in-vivo catalytic function of CYP2D6 in a German population. *Pharmacogenetics* 1998;8:15-26.
- Guengerich FP. *Mammalian Cytochrome P450*. Boca Raton,FL:CRC,1987.
- Guengerich FP. Role of cytochrome P450 enzyme in drug-drug interactions. *Adv Pharmacol* 1997;43:7-35.
- Guy W. *ECDEU assessment manual for psychopharmacology*, revised 1976 Rockville,MD.National Institutes of Mental Health,1976.
- Hamilton M: A rating scale for depression. *Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960;23:56-62.
- Harden CL, The co-morbidity of depression and epilepsy: epidemiology, etiology, and treatment. *Neurology* 2002;59(Suppl 4):S48-S55.
- Hay F, Linkowski P. Antidepressants.TCA versus SSRI versus other new agents. *Rev Med Brux*. 2004;25(4):A315-20.
- Healy D. *Psychiatric Drugs Explained*. Mosby, London,1997.
- Hedlung E, Gustafsson JA,Warner M. Cytochrome P450 in the Brain; A Review. *Curr Drug Metabol* 2001;2:245-263.
- Hemeryck A, Belpaire FM. Selective serotonin reuptake inhibitors and cytochrome P-450 mediated drug-drug interactions:an update. *Curr Drug Metab* 2002;3:13-37.
- Hersberger M, Marti-Jaun J, Rentsch K, Haenseler E. Rapid detection of the CYP2D6\*3, CYP2D6\*4, and CYP2D6\*6 alleles by tetra-primer PCR and of the CYP2D6\*5 allele by multiplex Long PCR. *Clin Chem* 2000;46 (8):1072-1077.
- Hesselink DA. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther* 2003;74(3):245-54.
- Hirano T, Onda K, Toma T, Miyaoka M, Moriyasu F, Oka K. MDR1 mRNA expressions in peripheral blood mononuclear cells of patients with ulcerative colitis in relation to glucocorticoid administration. *J Clin Pharmacol* 2004;44(5):481-6.

Hiroi, T., Imaoka, S. and Funae, Y.: Dopamine formation from tyramine by CYP2D6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 838-843 (1998).

Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics* 2001;11:293-8.

Ho GT, Nimmo ER, Tenesa A, Fennell J, et al. Allelic variations of the multidrug resistance gene determine susceptibility and disease behavior in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2005;128(2):288-96.

Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug- resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473-8.

Hotopf M, Barbui C. Bias in the evaluation of antidepressants. *Epidemiol Psychiatr Soc* 2005;14(2):55-7.

Hranilovic D, Stefulj J, Furac I, Kubat M, Baliija M, Jernej B. Serotonin transporter gene promoter (5-HTTLPR) and intron 2 (VNTR) polymorphisms in Croatian suicide victims. *Biol Psychiatry* 2003;54:884-889.

Ieiri I, Hiroshi T, Otsubo K. The MDR1(ABCB1) Gene Polymorphism and its Clinical Implications. *Clin Pharmacokinet* 2004;43(9):553-576.

Ieiri I, Mamiya K, Urae A, Wada Y, Kimura M et al. Stereoselective 4'hydroxylation of phenytoin: relationship to(S)-mephenytoin polymorphism in Japanese. *Br J Clin Pharmacol* 1997;43:441-445.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, Daly AK, Garte S, Nebert DW. Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10(12):1307-8.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 1999;20:342-9.

Ingelman-Sundberg M, Oscarson M. Human CYP allele database: submission criteria procedures and objectives. *Methods Enzymol* 2002;357:28-36.

Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002;181-182:447-52.

Ito K, Yoshida K, Sato K, et al. A variable number of tandem repeats in the serotonin transporter gene does not affect the antidepressant response to fluvoxamine. *Psychiatry Res* 2002;111:235-239.

Ito RK, demers LM. Pharmacogenomics and Pharmacogenetics. Future Role of Molecular Diagnostics in the Clinical Diagnostic Laboratory. *Clin Chem* 2004;50(9):1526-1527.

Jakovljević M. Depresija, prepoznavanje i liječenje u primarnoj zdravstvenoj zaštiti. Pro Mente. Zagreb 1998.

Jeanpierre MA. A rapid method for the purification of DNA from blood. Nucl Acid Res 1987;15:9611.

Johne A, Kopke K, Gerloff T, et al. Modulation of ready-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. Clin Pharmacol Ther 2002;72(5):584-593.

Kawanishi Ch, Lundgren S, Agren H, Bertilsson L. Increased incidence of CYP2D6 gene duplications in patients with persistent mood disorders: ultrarapid metabolism of antidepressants as a cause of nonresponse. A pilot study. Eur J Clin Pharmacol 2004;59:803-807.

Kerwin RW, Mancama DT, Arranz MJ. Genetic strategies for the personalization of antipsychotic treatment. Expert Rev Mol Diagn 2001;1(3):275-280.

Kim DK, Lim SW, Lee S, et al. Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. Neuroreport 2000;11(1):215-219.

Kim RB, Fromm MF, Wandel C, Leake B, et al. The drug transporter P-glycoprotein limits oral absorption and brain entry of HIV-1 protease inhibitors. J Clin Invest 1998;118:1879-1885.

Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, et al. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. Mol Psychiatry 2004;9:442-473.

Kosuge K, Jun Y, Watanabe H, Kimura M, Nishimoto M, Ishizaki T, Ohashi K. Effects of CYP3A4 inhibition by diltiazem on pharmacokinetics and dynamics of diazepam in relation to CYP2C19 genotype status. Drug Metab Dispos 2001;29:1284-1289.

Kurata Y, Ieiri I, Kimura M et al. Role of human MDR1 gene polymorphism in bioavailability and interaction of digoxin, a substrate of P-glycoprotein. Clin Pharmacol Ther 2002;72:209-29.

Kupfer A, Schmid B, Pfaff G. Pharmacogenetics of dextromethorphan O-demethylation in man. Xenobiotica. 1986 May;16(5):421-33.

Laine K, Tybring G, Haertter S, Andersson K, Svensson J-O, Widen J, Bertilsson L. Inhibition of cytochrome P4502D6 activity with paroxetine normalizes the ultrarapid metabolize phenotype as measured by nortriptyline pharmacokinetics and the debrisoquin test. Clin Pharmacol Ther 2001;70:327-35.

Lam YW, Gaedigk A, Ereshefsky L, Alfaro CL, Simpson J. CYP2D6 inhibition by selective serotonin reuptake inhibitors: analysis of achievable steady-state plasma concentrations and the effect of ultrarapid metabolism at CYP2D6. Pharmacotherapy 2002;22(8):1001-6.

Lamba V, Lamba J.K, Dilawari J.B, Kohli K.K. Genetic polymorphism of CYP2D6 in North Indian subjects. Eur J Clin Pharmacol 1998;54:787-791.

- Lane RM. Pharmacokinetic drug interaction potential of selective serotonin reuptake inhibitors. *Int Clin Psychopharmacol* 1996;11(Suppl.5):31-61.
- Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA* 1998;279:1200-05.
- Lerer B, Macciardi F. Pharmacogenetics of antidepressant and mood-stabilizing drugs: a review of candidate-gene studies and future research directions. *Int J Neuropsychopharmacol* 2002;5:255-75.
- Lesch K-P, Bengel D, Heils A et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 1996;274:1527-1531.
- Leucht S, Hackl HJ, Steimer W, Angersbach D, Zimmer R. Effect of adjunctive paroxetine on serum levels and side-effects of tricyclic antidepressants in depressive inpatients. *Psychopharmacology (Berl)*.2000;24(3):378-83.
- Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin pharmacokinet*. 1998;35:361-390.
- Lin P-Y, Tsai G. Association Between Serotonin Transporter Gene Promoter Polymorphism and Suicide: Results of a Meta-Analysis. *Biol psychiatry* 2004;55:1023-1030.
- Lin YS, Dowling AL, Quigley SD, et al. Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism. *Mol Pharmacol* 2002;62(1):162-72.
- Linder MW, Prough RA, Valdes R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chemistry* 1997; 43 (2 ): 254 –266.
- Lindholm A, Welsh M, Alton C, et al. Demographic factors influencing cyclosporine pharmacokinetic parameters in patients with uremia: racial differences in bioavailability. *Clin Pharmacol Ther* 1992;52:359-71.
- Lingjaerde O, Ahlors U G, Beach P, Dancker S J, Elgen K The UKU Side Effect rating Scale. *Acta Psychiatrica Scandinavica* 1998; Suppl 334:76
- Liston HL, DeVane CL, Boulton DW, Risch SC, Markowitz JS, Goldman J. Differential time course of cytochrome P450 2D6 enzyme inhibition by fluoxetine, sertraline, and paroxetine in healthy volunteers. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22(2):169-73.
- Little K Y, McLaughlin D P, Zhang L et al. Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. *Am J Psychiatry* 1998;155:207-213.
- Llerena A, Berez R, Dorado P, Gonzalez AP, Penas-Lledo EM De La Rubia A. CYP2C9 gene susceptibility to major depressive disorder. *Pharmacogenomics J*. 2003;3(5):300-2.



Lovejoy E A, Scott A C, Fikerstrand CE, Bubb V J, Quinn J P. The serotonin transporter intronic VNTR enhancer correlated with a predisposition to affective disorders has distinct regulatory elements within the domain based on the primary DNA sequence of the repeat unit. *Eur J Neurosci*. 2003;17:417-420.

Mancinelli LM, Frassetto LM, Floren LC, et al. The pharmacokinetics and metabolic disposition of tacrolimus: a comparison across ethnic groups. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:24-31.

McLeod HL, Evans WE. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001;41:101-21.

Mandelli M, Tognoni G, and Garattini S. Clinical pharmacokinetics of diazepam. *Clin Pharmacokinet* 1978;3:72-91.

Mendlewicz J, Massat i, Souery D et al. Serotonin transporter 5HTTLPR polymorphism and affective disorders: no evidence of association in a large European multicenter study. *Eur J Hum Genet* 2004;12(5):377-82.

Meyer UA. The molecular basis of genetic polymorphisms of drug metabolism. *J Pharm Pharmacol* 1994;46(Suppl 1):409-15.

Meyer UA. Pharmacogenetics and adverse drug reactions. *Lancet* 2000;356:1667 - 71

Meyer U. Molecular mechanisms of genetic polymorphisms of drug metabolism. *Annu Rev pharmacol Toxicol* 1997;37:269-96.

Miksys, Rao Y, Hoffman E, Mash DC, Tyndale RF. Regional and cellular expression of CYP2D6 in human brain: higher levels in alcoholics. *J Neurobiochemistry* 2002;82:1376- 1387.

Miller SA, Dykes DD, Polesky H F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucl Acid Res* 1988;16 (3):1215

Mullis K. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. *Scientific American* 1990;April:36-43.

Murphy DL, Leren A, Rudnick G, Lesch K-P. Serotonin transporter: Gene, Genetic Disorders, and Pharmacogenetics. *Mol Intervent* 2004;4(2):109-123.

Murray CJL, Lopez AD. The Global Burden of Disease: A comprehensive assessment of mortality and disability, injuries and risk factors in 1990 and projected to 2020. World Bank, Harvard School of Public Health and World Health Organisation, Geneva (1996).

Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M et al. Effect of the mutation (C3435T) et exon 26 of the MDR1 gene on expression level of MDR1 messenger ribonucleic acid in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. *Clin Pharmacol Ther* 2002;71:297-303.

Nebert DW, Ingelman-Sundberg M, Daly AK. Genetic epidemiology of

environmental toxicity and cancer susceptibility: human allelic polymorphisms in drug-metabolizing enzyme genes, their functional importance, and nomenclature issues. *Drug Metabol Rev* 1999;31(2):467-487.

Nelson D. ([http://drnelson.utmem.edu/Cytochrome P450.html](http://drnelson.utmem.edu/Cytochrome%20P450.html)). Accessed May 10, 2005.

Nemeroff CB, DeVane CL, Pollock BG. Newer antidepressants and the cytochrome P450 system. *Am J Psychiatry* 1996;153:311-320.

Neumeister A, Konstantinidis A, Stastny J, et al. Association between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5HTTLPR) and behavioral responses to tryptophan depletion in healthy women with and without history of depression. *Arch Gen Psychiatry* 2002;59:513-620.

Niewinski P, Orzechowska-Juzwenko K, Hurkacz M, et al. CYP2D6 extensive, intermediate, and poor phenotypes and genotypes in Polish population. *Eur J Clin Pharmacol* 2002;58:533-535.

Niwa T, Hiroi T, Tsuzuki D, Yamamoto S, Narimatsu S, Fukuda T, Azuma J, Funae Y. Effect of genetic polymorphism on the metabolism of endogenous neuroactive substances, progesterone and p-tyramine, catalyzed by CYP2D6. *Molecular Brain Research* 2004;129:117-123.

Nomenclature for human cytochrome P450 alleles. Available at [Http://www.imm.ki.se/CYP alleles](http://www.imm.ki.se/CYPalleles).

Ozdemir V, Naranjo CA, Herrmann N, Reed K, Sellers E, Kalow W. Paroxetine potentiates the central nervous system side effects of perphenazine: contribution of Cytochrome P450 2D6 inhibition in vivo. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62:334-347.

Pisani F, Oteri G, Costa C, et al. Effects of psychotropic drugs on seizure threshold. *Drug Saf*. 2002;25(2):91-110.

Preskorn HS, Baker B. Fatality Associated With Combined Fluoxetine-Amitriptyline Therapy. *JAMA* 1997;277(21):1682.

Rao VV, Dalheimer JL, Bardgett ME, et al. Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood cerebrospinal-fluid drug permeability barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3900-5.

Rauch JL, Johnson ME, Fei You-Jun, et al. Initial conditions of serotonin transporter kinetics and genotype: influence on SSRI trial outcome. *Biol Psychiatry* 2002;51:723-732.

Reis M, Prochazka J, Sitsen A, Ahlner J, Bengtsson F. Inter- and Intraindividual Pharmacokinetic Variations of Mirtazapine and Its N-Demethyl Metabolite in Patients Treated for Major Depressive Disorder: A 6-Month Therapeutic Drug Monitoring Study. *Ther Drug Monit* 2005;27(4): 469-477.

Rendić S. Uloga i značenje metaboličkih reakcija kataliziranih citokrom P450(CYP) kod bioloških djelovanja lijeka. *Medicus* 1995;1:49-66.

Rendic S, DiCarlo FJ. Human Cytochrome P450 Enzymes: A Status Report Summarizing Their Reactions, Substrates, Inducers and Inhibitors. *Drug Metab Rev* 1997; 29:413- 580.

Rendic S. Summary of information on human CYP enzymes A. Human P450 Metabolism Data. *Drug Metab Rev* 2002; 34(1-2):83-488.

Roberts RL, Joyce PR, Mulder RT, et al. A common P-glycoprotein polymorphism is associated with nortriptyline induced postural hypotension in patients treated for major depression. *Pharmacogenetics J* 2002;2:191-6.

Ron HN, van Schaik G, Saskia N, et al. CYP 3A4-V Polymorphism detection by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis and its allelic frequency among 199 Dutch Caucasian. *Clin Chem* 2000;46(11):1834-1836.

Rouseva A, Henry C, van den Bulke D, Fournier G, Laplanche JL, Leboyer M, Bellivier F, Aubry JM, Baud P, Boucherie M, Buresi C, Ferrero F, Malafosse A. Antidepressant-induced mania, rapid cycling and the serotonin transporter gene polymorphism. *Pharmacogenomics J* 2003;3(2):101-4.

Sachse C, Brockmoeller J, Bauer S, Roots I. Cytochrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: Allele frequencies and phenotypic consequences. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 284-295.

Sakaeda T, Nakamura T, Horinouchi M, et al. MDR1 genotype related pharmacokinetics of digoxin after oral administration in healthy Japanese subjects. *Pharm Res* 2001;18(10):1400-1404.

Sallee FR, De Vane CL, Ferrell RE. Fluoxetine-related death in a child with cytochrome P-450 2D6 genetic deficiency. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 2000;10(1):27-34.

Schmid B, Bircher J, Preisig R, Kupfer A. Polymorphic dextromethorphan metabolism: cosegregation of oxidative O-demethylation with debrisoquin hydroxylation. *Clin Pharmacol Ther* 1985;38(6):618-24.

Schmitz G, Aslanidis C, Lackner KJ. Pharmacogenomics: implications for laboratory medicine. *Clin Chem Acta* 2001;308:43-53.

Serretti A, Lilli R, Smeraldi E. Pharmacogenetics in affective disorders. *Eur J Pharmacol* 2002;438:117-128.

Serretti A, Artioli P. From molecular biology to pharmacogenetics: a review of the literature on antidepressant treatment and suggestions of possible candidate genes. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;

Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270:414-23.

Siddiqui A, Kerb R, Weale M, Brinkman U, Smith A, Goldstein D.B, et al. Association of multidrug resistance in epilepsy with a polymorphism in the drug-transporter gene ABCB1. *N Engl J Med* 2003; 348(15):1442-8.

Siegmund W, Altmannsberg S, Paneitz A, et al. Effect of levothyroxine administration on intestinal P-glycoprotein expression: consequences for drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:256-64.

Sindrup SH, Broesen K, Gram LF; et al. The relationship between paroxetine and sparteine oxidation polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 1992;51:278-287.

Smith GS, Lotrich FE, Malhotra AK, Lee AT, Ma Y, Kramer E, Gregersen PK, Eidelberg D, Pollock BG. Effects of serotonin transporter promoter polymorphisms on serotonin function. *Neuropsychopharmacol* 2004;29(12):2226-34.

Smits KM, Smits LJM, Schouten JSAG, Stelma FF. Influence of SERTPR and Stin2 in the serotonin transporter gene on the effect of selective serotonin reuptake inhibitors in depression: a systematic review. *Mol Psychiatry* 2004;9:433-441.

Spina E, Avenoso A, Facciola G, Scordo MG, Ancione M, Madia A. Plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone during combined treatment with paroxetine. *Ther Drug Monit* 2001;23:223-227.

Spina E, Peruca E. Clinical significance of pharmacokinetic interactions between antiepileptic and psychotropic drugs. *Epilepsia* 2002; 43Suppl 2:37-44.

Spina E, Scordo MG, D'Arrigo C. Metabolic drug interactions with new psychotropic agents. *Fundamental Clin Pharmacol* 2003;17:517-538.

Sproule BA, Naranjo CA, Bremner KE, Hassan PC. Selective serotonin reuptake inhibitors and CNS drug interactions: a critical review of the evidence. *Clin Pharmacokinet* 1997;33:454-471.

Steen M. Detection of the poor metabolizer-associated CYP 2D6 (D) gene deletion allele by long-PCR technology. *Pharmacogenetics* 1995;5, 215-223

Steijns LSW, Van Der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem* 1998;44 (5 ):914-917.

Steimer W, Mueller B, Leucht S, Kissling W. Pharmacogenetics: genotyping of cytochromes P450 2D6 and 2C19 in psychiatric patients treated with tricyclic antidepressants (TCA) or neuroleptics. *Ther Drug Monit* 1999;21(4):474.

Steimer W, Muller B, Leucht S, Kissling W. Pharmacogenetics: a new diagnostic tool in the management of antidepressive drug therapy. *Clin Chim Acta*. 2001;308(1-2):33-41.

Steimer W, Zopf K, Von Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J et al. Allele – specific change of concentration and functional gene dose for the prediction of steady-state serum concentrations of amitriptyline and nortriptyline in CYP2C19 and CYP2D6 extensive and intermediate metabolizers. *Clin Chem* 2004;50:1623-33.

Steimer W, Zoepf K, Amelunxen S, Pfeiffer H, Bachofer J, Popp J, Messner B, Kissling W, Leucht S. Amitriptyline or Not, That Is the Question: Pharmacogenetic Testing of CYP2D6 and CYP2C19 Identifies Patients with Low or High Risk for Side Effects in Amitriptyline Therapy. *Clin Chem* 2005;51:1-10.

Stueven T, Griese E.U, Kroemer H. K, Eichelbaum M, Zanger U. M. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance and multiplex-polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 1996;6:417-421.

Sviri S, Shpizen S, Leitersdorf E, Levy M, Caraco Y. Phenotypic- genotypic analysis of CYP2C19 in the Jewish Israeli population. *Clin Pharmacol Ther* 1999;65:275-82.

Swanson JR, Graham RJ, Krasselt W, et al. Death of two subjects due to imipramine and desipramine metabolite accumulation during chronic therapy: a review of the literature and possible mechanisms. *J Forensic Sci* 1997;42(2):335-339.

Takahashi H, Wilkinson G.R, Caraco Y, Muszkat M, Kim R.B, Kashima T, et al. Population differences in S-warfarin metabolism between CYP2C9 genotype-matched Caucasian and Japanese patients. *Clin Pharmacol Ther* 2003;73:253-63.

Tamminga WJ, Wemer J, Oosterhuis B, De Boer A, Vranckx S, et al. Polymorphic drug metabolism (CYP2D6) and utilisation of psychotropic drugs in hospitalised psychiatric patients: a retrospective study. *Eur J Clin Pharmacol* 2003;59:57-64.

Tamminga W.J, Wemer J, Oosterhuis B, de Zeeuw R.A, de Leij L.F.M.H, Jonkman J.H.G. The prevalence of CYP2D6 and CYP2C19 genotypes in a population of healthy Dutch volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 2001;57:717-722.

Taningher M, Malacarne D, Izzotti A, Ugolini D, Parodi S. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat Res* 1999;436:227-261.

Taube J, Halsall D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 CYP2C9 polymorphism on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000;96(5):1816-19.

Thase ME. Effectiveness of antidepressants: comparative remission rates. *J Clin Psychiatry* 2003;64(Suppl 2):3-7.

Topić E, Štefanović M, Ivanišević AM, Blažinić F, Čulav J, Skočilić Ž. CYP2D6 genotyping in patients on psychoactive drug therapy. *Clin Chem Lab Med* 2000;38:921-7.

Touw DJ. Clinical implications of genetic polymorphisms and drug interactions mediated by cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metabol Drug Interact* 1997;14:55-82.

Uhr M, Steckler T, Yassouridis A, Holsboer F. Penetration of amitriptyline, but not of fluoxetine, into brain is enhanced in mice with blood-brain barrier deficiency due to mdr1a P-glycoprotein gene disruption. *Neuropsychopharmacology*. 2000;22:380-387.

Uhr M. Einfluss des P-Glykoproteins auf die Blut-Hirn-Schrankenfunktion. Ph.D. thesis, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany, 2002.

Valdes R, Linder MW. Fine-Tuning Pharmacogenetics: Paradigm for linking Laboratory Results to Clinical Action. *Clin Chem* 2004; 50(9): 1498-1499.

Van Asperen J, van Tellingen O, Beijnen JH. The pharmacological role of P-glycoprotein in the intestinal epithelium. *Pharmacol Res* 1998;37:429-435.

Vandel P, Haffen E, Vandel S, Bonin B, Nezelof S, Sechter D, Broly F, Bizourd P, Dalery J. Drug extrapyramidal side effects. CYP2D6 genotypes and phenotypes. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55:659-665.

Van der Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;38:94-110.

Van der Weide J, Steijns LS, van Weelden MJ, de Haan K. The effect of genetic polymorphism of cytochrome P450 CYP2C9 on phenytoin dose requirement. *Pharmacogenetics* 2001;11(4):287-91.

Wang SL, Huang JD, Lai MD, Tsai JJ. Detection of CYP2C9 polymorphisms based on the polymerase chain reaction in Chinese. *Pharmacogenetics* 1995;5:37-42.

Weber W W. *Pharmacogenetics*. New York: Motolski, Bobrow, Harper and Sriver; 1997.

Weide J, van Baalen-Benedek EH, Kootstra-Ros JE. Metabolic Ratios of Psychotropics as Indication of Cytochrome P450 2D6/2C19 Genotype. *Ther Drug Monit.* 2005 Aug;27(4):478-83.

Weinshilboum M D. Inheritance and Drug Response. *N Engl J Med* 2003;348(6): 529-537.

Weiss J, Kerpen CJ, Lindenmaier H, Dorman SM, Haefeli WE. Interaction of antiepileptic drugs with human P-glycoprotein in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;307:262-7.

Weiss J, Dorman S-M, Martin-Facklam M, et al. Inhibition of P-glycoprotein by newer antidepressants. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(1):197-204.

Wilson K, Mottram P. A comparison of side effects of selective serotonin reuptake inhibitors and tricyclic antidepressants in older depressed patients: a meta-analysis. *Int J Geriatr psychiatry* 2004;19(8):754-62.

Yamauchi A, Ieiri I, Kataoka Y, et al. Neurotoxicity induced by tacrolimus after liver transplantation. Relation to genetic polymorphisms of the ABCB1 (MDR1) gene. *Transplantation* 2002; 74:571-8.

Yoshida K, Ito K, Takahashi H et al. Influence of the serotonin transporter gene-linked polymorphic region on the antidepressant response to fluvoxamine in Japanese depressed patient. *Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2002;158:383-386.

Yu AM, Idle JR, Byrd LG, Krausz KW, Kupfer A, Gonzales FJ. Regeneration of serotonin from 5-methoxytryptamine by polymorphic human CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2003;13(3):173-81.

Yu, A.M., Idle, J.R., Herraiz, T., Kupfer, A. and Gonzalez, F.J.: Screening for endogenous substrates reveals that CYP2D6 is a 5-methoxyindolethylamineO-demethylase *Pharmacogenetics*, 13: 307-319 (2003).

Zanardi R, Benedetti F, Di Bella D, Catalano M, Smeraldi E. Efficacy of paroxetine in depression is influenced by a functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene. *J Clin Psychopharmacol* 2000;20(1):105-7.

Zimmerman M, Chelminski I, Posternak MA. Generalizability of antidepressant efficacy trials: differences between depressed psychiatric outpatients who would or would not qualify for an efficacy trial. *Am J Psychiatry*. 2005;162(7):1370-2.

Zuhlsdorf MT. Relevance of pheno-and genotyping in clinical drug development. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36:607-12.

## Sažetak

Genske varijacije metaboličkih enzima i transportnih proteina mogu biti važne odrednice učinkovitosti i toksičnosti farmakoterapije. Uz međuindividualne razlike značajne su i međuetničke razlike u učestalosti polimorfnih oblika gena. U ovoj smo studiji proveli farmakogenetičku analizu u hrvatskoj zdravoj populaciji i u bolesnika s depresijom te istražili utjecaj genskih varijacija metaboličkih enzima: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 i transportnih proteina: P-glikoproteina (MDR1) i serotoninskog transportera (SERTR) na farmakološke i toksične učinke pri terapiji velikog depresivnog poremećaja. U ispitivanju je sudjelovalo 286 zdravih osoba i 114 bolesnika s velikim depresivnim poremećajem. Za farmakogenetičke analize korištena je metoda PCR RFLP. Učestalosti polimorfnih alela i genotipova bile su uglavnom između vrijednosti za srednjeeuropske i mediteranske bijele populacije. Učestalost genotipa CYP2C19 s mutiranim alelima bila je viša u populaciji bolesnika s velikim depresivnim poremećajem u odnosu na zdravu populaciju. U zdravoj populaciji značajno je više homozigota za wt-“divlji” tip alela gena CYP2D6 dok je u populaciji bolesnika s velikim depresivnim poremećajem bilo značajno više homozigotnih nosioca mutiranih alela. Učestalosti genotipa vrlo brzih metabolizatora CYP2D6 bila je značajno viša u skupini bolesnika koji su bili rezistentni na terapiju u odnosu na skupinu s dobrim odgovorom. Pronađena je značajno viša učestalost mutiranih alela CYP2D6 u skupini bolesnika s nuspojavama prema skupini bez nuspojava. Alel G2677 gena MDR1 češće je zastupljen u skupini bolesnika koja je bila rezistentna na terapiju u odnosu na skupinu sa učinkovitom terapijom. Učestalost genotipova SERT-LL i SERT-ss bila je statistički značajno viša u bolesnika bez nuspojava u odnosu na skupinu s nuspojavama.

Varijabilne interindividualne vrijednosti koncentracija paroksetina koje su rezultat varijabilnog genotipa CYP2D6 u populaciji izraženije su na početku terapije, dok su razlike u ravnoteži smanjene. Ovi rezultati predstavljaju doprinos suvremenom trendu individualizacije terapije.



Doctoral Dissertation

THE ROLE OF PHARMACOGENETIC VARIATIONS IN THE THERAPY OF  
DEPRESSION

Nada Božina

Summary

Genetic variations of metabolic enzymes and transporter proteins are important determinants of pharmacotherapy efficacy and toxicity. In addition, interindividual, interethnic differences in the prevalence of genetic variations are significant. In this study, pharmacogenetic analysis was performed in Croatian healthy population and patients with depression. The influence of genetic variations of metabolic enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4 and transporter proteins: P-glycoprotein (MDR1) and serotonin transporter (SERT) on pharmacologic and toxicologic effects of major depression therapy were investigated. The study included 286 healthy subjects and 114 patients with major depression. Pharmacogenetic analyses were performed by PCR-RFLP methods. Drug concentrations were determined by GC-MS and HPLC methods. The prevalence of allelic variants and predicted genotypes in the Croatian population ranged between values for Mid-European and Mediterranean populations. The prevalence of CYP2C19 genotype with mutant alleles was higher in population with major depression than in healthy population. Frequencies of homozygous “wild type” alleles of CYP2D6 were higher in healthy population, while homozygous mutant alleles were significantly higher in patients with major depression. Frequencies of ultraextensive CYP2D6 genotype were significantly higher in non-responder than in responder group. Significantly higher frequencies of mutant CYP2D6 alleles were found in patients with adverse drug reactions compared to the group without adverse reactions. G2677 allele of MDR1 gene was more frequent in non-responder than in responder group. Frequencies of SERT-LL and SERT-ss genotypes were significantly higher in the group of patients without than in the group with adverse reactions. Variable paroxetine concentrations due to different CYP2D6 genotypes were more pronounced at the beginning of therapy, while differences in steady state were diminished. The results obtained could contribute to therapy individualization.

## ŽIVOTOPIS

Nada Božina (r. Cota) rođena je 4. prosinca 1953. godine u Suknovcima. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Zagrebu.

Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 1972.g a diplomirala 1977.g. Iste godine zaposlila se u Kliničkom bolničkom centru u Centru za biomedicinska istraživanja. Poslijediplomski studij na Sveučilištu u Zagrebu upisala je 1978. g. Akademski stupanj magistra medicinskih znanosti iz područja medicine ( biokemija) stekla je 1980. g. obranom magistarskog rada pod naslovom “ Određivanje pripadnosti vrsti pet sojeva streptomiceta s antibiotskim i citostatskim djelovanjem”.

1984. g. bila je osnivač Laboratorija za stanične kulture gdje je vodila ispitivanja aktivnosti i toksičnosti novih potencijalnih lijekova testovima in vitro.

1985.g. pohađala je tečaj “Monoclonal antibodies” u organizaciji Royal postgraduate medical school - University of London.

1986 g. pohađala je tečaj “ Workshop on techniques in molecular biology” u organizaciji The Hatfield Polytechnic – Division of biological Sciences.

Od 1997. g. voditelj je Laboratorija za farmakogenetiku Zavoda za farmakokinetiku i analitičku toksikologiju u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku – KBC Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Na poslijediplomskom studiju “Medicinske znanosti” na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu sudjeluje u kolegiju: “Metode molekularne biologije u medicini” s temom “Farmakogenomika” te u kolegiju “Metode istraživanja in vitro in vivo” s temom “Brza kolorimetrijska metoda za određivanje toksičnosti in vitro u kulturi stanica”.

Aktivno je sudjelovala na mnogim domaćim i inozemnim kongresima te na tečajevima trajne edukacije kao predavač.

Objavila je više znanstvenih i stručnih radova.