

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lana Ganoci

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija
CYP2D6 i *ABCB1* na liječenje
pripravkom risperidona s produljenim
oslobađanjem**

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Lana Ganoci

**Utjecaj farmakogenetičkih varijacija
CYP2D6 i *ABCB1* na liječenje
pripravkom risperidona s produljenim
oslobađanjem**

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku (u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije), Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

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

Posebno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Božina na bezrezervnoj podršci i divnom vodstvu, nesebičnom pružanju znanja, pomoći, usmjeravanju, razumijevanju i strpljenju.

Hvala doc. dr. sc. Mili Lovrić kao i svim kolegama iz Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Posebna zahvala Zrinki Mirković, Maji Mezak Herceg i Predragu Donat-Švaljeku na pruženoj pomoći i potpori.

Hvala izv. prof. dr. sc. Vladimiru Trkulji na pomoći u svim fazama rada, posebno statističkoj obradi i korisnim savjetima.

Hvala dr. sc. Maji Živković na ogromnom trudu i pomoći pri provedbi kliničkog dijela istraživanja.

Hvala mojoj obitelji, roditeljima, suprugu Daliboru i Beli na ljubavi i podršci na ovom putu.

„In nature's infinite book of secrecy.

A little I can read.“

~William Shakespeare~

SADRŽAJ

Popis oznaka i kratica

1.	UVOD I SVRHA RADA	1
1.1.	Farmakoterapija shizofrenije	2
1.1.1.	Općenito o shizofreniji	2
1.1.2.	Liječenje shizofrenije	4
1.1.3.	Praćenje terapijskog učinka i nuspojava - ocjenске ljestvice	4
1.1.4.	Antipsihotici	5
1.1.5.	Pripravci antipsihotika s produljenim oslobađanjem	6
1.1.6.	Risperidon	7
1.2.	Farmakogenetika i farmakogenomika	9
1.2.1.	Farmakogenetika/farmakogenomika i personalizirana medicina	9
1.2.2.	Farmakogenetički biljezi u klinici	9
1.2.3.	Odnos genotip – fenotip	10
1.2.4.	Polimorfizmi citokroma P450 2D6 (CYP2D6)	12
1.2.5.	Polimorfizmi citokroma P450 3A (CYP3A)	15
1.2.6.	Farmakogenetika prijenosnika lijekova	16
1.2.6.1.	Polimorfizmi ABCB1 (P-glikoprotein / MDR1)	17
1.2.6.2.	Polimorfizam ABCG2	19
1.2.7.	Farmakogenomika u psihijatriji	22
1.2.7.1.	Farmakogenetički biljezi u psihijatriji	22
1.2.7.2.	Interakcije psihofarmaka	28
1.2.7.3.	Farmakogenetika risperidona	29
1.3.	Terapijsko praćenje lijekova (TDM)	31
1.3.1.	TDM u kliničkoj praksi	31
1.3.2.	TDM u psihijatriji	32
1.3.3.	TDM risperidona	33
1.4.	Svrha rada	34
2.	HIPOTEZA	35
3.	CILJEVI RADA	37
4.	ISPITANICI I METODE	39
4.1.	Dizajn studije	40
4.2.	Ispitanici	41

4.2.1.	Kriteriji za uključivanje i isključivanje	41
4.2.2.	Analitički uzorci	42
4.3.	Praćenje učinkovitosti i nuspojava	42
4.3.1.	Procjena težine simptoma bolesti (PANSS)	42
4.3.2.	Procjena razvoja akutnih ekstrapiramidnih nuspojava (EPS)	47
4.4.	Određivanje koncentracija risperidona i 9-hidroksirisperidona	48
4.5.	Metode genotipizacije	51
4.5.1.	Izdvajanje DNA	51
4.5.2.	Genotipizacija <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A4</i> , <i>CYP3A5</i> , <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i>	51
4.5.2.1.	<i>TaqMan</i> metoda za PCR u stvarnom vremenu	51
4.5.2.2.	<i>LightCycler</i> metoda za PCR u stvarnom vremenu - genotipizacija <i>ABCB1 2677G>T/A</i>	54
4.5.2.3.	Genotipizacija duplikacija i delecije gena <i>CYP2D6</i> metodom PCR	57
4.6.	Statističke metode	61
4.6.1.	Veličina uzorka	62
4.6.2.	Osnovna analiza	62
4.6.3.	Analiza moderirane medijacije	64
5.	REZULTATI	65
5.1.	Osobine ispitanika	66
5.1.1.	Demografski i klinički podatci	66
5.1.2.	Koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona	67
5.1.3.	Učestalost polimorfizama <i>CYP2D6</i> , <i>CYP3A</i> , <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i>	68
5.1.4.	Ocjena težine simptoma bolesti (PANSS)	70
5.2.	Utjecaj polimorfizama <i>CYP2D6</i>, <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i> na koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona u stanju dinamičke ravnoteže	70
5.2.1.	Izvorni farmakokinetički podatci	70
5.2.2.	Farmakokinetički podatci ovisno o fenotipovima i genotipovima	74
5.2.3.	Interakcija između genotipova/fenotipova, primjene CYP inhibitora i vremena uzorkovanja	78
5.2.4.	Dodatna analiza farmakokinetičkih podataka – model slučajnih efekata	79
5.3.	Utjecaj polimorfizama <i>CYP2D6</i>, <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i> na učinkovitost i sigurnost risperidona s produljenim oslobađanjem	83
5.3.1.	Povezanost fenotipa <i>CYP2D6</i> i genotipova <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i> s kliničkim ishodima (PANSS)	83

5.3.2.	Dodatna analiza kliničkih ishoda (PANSS) - interakcija genotip/fenotip vrijeme	87
5.3.3.	Utjecaj polimorfizama <i>CYP2D6</i> , <i>ABCB1</i> i <i>ABCG2</i> na vrijednosti SAS	88
5.4.	Odnos fenotipa <i>CYP2D6</i> i genotipa <i>ABCG2</i> i <i>ABCB1</i> prema izloženosti risperidonu i kliničkim ishodima	89
5.4.1.	Odnos fenotipa <i>CYP2D6</i> i genotipa <i>ABCG2</i> i <i>ABCB1</i> prema izloženosti risperidonu i vjerojatnosti relevantne promjene PANSS: analiza moderirane medijacije	89
5.4.2.	Odnos fenotipa <i>CYP2D6</i> i genotipa <i>ABCG2</i> i <i>ABCB1</i> prema izloženosti risperidonu i vjerojatnosti relevantne promjene PANSS: analiza osjetljivosti	90
6.	RASPRAVA	97
6.1.	Utjecaj polimorfizama enzima CYP i transportera ABC na ravnotežne koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona	98
6.2.	Utjecaj polimorfizama enzima CYP i transportera ABC na kliničke ishode (PANSS)	100
6.3.	Usporedba rezultata s podacima u literaturi	103
6.3.1.	<i>ABCG2</i>	103
6.3.2.	<i>ABCB1</i>	104
6.3.3.	<i>CYP3A4/5</i>	105
6.3.4.	Farmakogenetika učinkovitosti i sigurnosti primjene risperidona	106
6.3.4.1.	<i>CYP2D6</i>	106
6.3.4.2.	<i>ABCB1</i>	106
6.4.	Utjecaj primjene inhibitora i induktora enzima CYP i transportera ABC na PK/PD risperidona	107
6.5.	Značaj za kliničku primjenu i preporuke za buduća istraživanja	108
6.6.	Ograničenja studije	109
7.	ZAKLJUČCI	110
8.	Sažetak	113
9.	Summary	115
10.	Popis literature	117
11.	Životopis	141

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABC	natporodica o ATP-u ovisnih prijenosnika (engl. <i>ATP-binding cassette</i>)
ABCB1	o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice B 1 (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>), također poznat kao MDR1 i P-glikoprotein
ABCG2	o ATP-u ovisan prijenosnik potporodice G 2 (engl. <i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>), također poznat kao BCRP
ADME	kratica koja dolazi od: apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija
AM	ukupni aktivni dio lijeka, suma lijeka i aktivnog metabolita (engl. <i>active moiety</i>)
AUC	površina ispod krivulje koncentracija - vrijeme od početka do kraja intervala doziranja (od engl. <i>area under curve</i>)
CPIC	Konzorcij za kliničku implementaciju farmakogenetike (engl. <i>Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium</i>)
CYP	natporodica metaboličkih enzima citokroma P450
CYP2D6	citokrom P450 2D6
CYP3A	citokrom P450 3A
CYP3A4	citokrom P450 3A4
CYP3A5	citokrom P450 3A5
C/D	koncentracija ujednačena prema dozi (od engl. <i>concentration/dose</i>)
CI	interval pouzdanosti (engl. <i>confidence interval</i>)
CNS	središnji živčani sustav (od engl. <i>central nervous system</i>)
C _{max}	vršna koncentracija, najveća koncentracija lijeka u plazmi/serumu nakon primjene
C _{trough}	ostatna koncentracija, koncentracija na kraju intervala doziranja (engl. <i>trough</i> , koncentracija u plazmi/serumu ispitanika prije sljedeće doze)
DAD	detektor s nizom dioda (engl. <i>diode array detector</i>)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DSM-V	dijagnostički kriteriji Američkog psihijatrijskog društva, 5. izdanje (engl. <i>Diagnostic or Statistical Manual of the American Psychiatric Association</i>)
EM	ekstenzivni metabolizator (engl. <i>extensive metabolizer</i>)
EMA	Europska agencija za lijekove (engl. <i>European Medicines Agency</i>)
FDA	Američka agencija za hranu i lijekove (engl. <i>U.S. Food and Drug Administration</i>)

FRET	prijenos energije fluorescentnom rezonancijom (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i>)
GMR	omjer geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. <i>geometric mean ratio</i>)
HALMED	Hrvatska agencija za lijekove i medicinske proizvode
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IM	intermedijarni ili srednje brzi metabolizator (engl. <i>intermediate metabolizer</i>)
LAI	pripravak lijeka s produljenim oslobađanjem (od engl. <i>long-acting injection</i>)
LAI-RIS	pripravak risperidona s produljenim oslobađanjem
LD	neravnoteža vezanosti alela (engl. <i>linkage disequilibrium</i>)
MAF	alel manje učestalosti (od engl. <i>minor allele frequency</i>)
MDR1	protein višestruke rezistencije na lijekove (engl. <i>multi-drug resistance protein 1</i>), također poznat kao ABCB1 i P-glikoprotein
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
<i>mut</i>	mutirani alel
MR	metabolički omjer, omjer lijeka i metabolita (od engl. <i>metabolic ratio</i>)
NM	normalni metabolizator (engl. <i>normal metabolizer</i>)
OR	omjer izgleda ili rizika (od engl. <i>odds ratio</i>)
pb	par baza
PCR	lančana reakcija polimerazom (od engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD	farmakodinamika (od engl. <i>pharmacodynamics</i>)
PK	farmakokinetika (od engl. <i>pharmacokinetics</i>)
PM	spori/slabi metabolizator (engl. <i>poor metabolizer</i>)
polimorfizam	genetička varijacija čija je učestalost u populaciji najmanje 1%
P-gp	P-glikoprotein, prijenosnik također poznat kao ABCB1 i MDR1
RIS	risperidon
RNA	ribonukleinska kiselina
SNP	polimorfizam jednog nukleotida (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
UM	vrlobrzi metabolizator (engl. <i>ultrarapid metabolizer</i>)
<i>wt</i>	alel divljeg tipa (od engl. <i>wild type</i>)
9-OH-RIS	9-hidroksirisperidon, 9-OH-risperidon
9-OH-risperidon	9-hidroksirisperidon

1. UVOD

1.1. Farmakoterapija shizofrenije

1.1.1. Općenito o shizofreniji

Shizofrenija je teški i često kronični psihički poremećaj kojeg karakteriziraju poremećaji mišljenja, percepcije, emocija, govora, osjećaja sebe i ponašanja (1,2). Pojavnost shizofrenije procjenjuje se na oko 0,3-0,7% u svjetskoj populaciji te prema posljednjim podacima pogađa više od 23 milijuna ljudi, nešto češće muškarce (oko 12 milijuna) (2,3). Shizofrenija je ozbiljan javnozdravstveni problem koji uvelike narušava kvalitetu života bolesnika, ali i njegove okoline (4). Uobičajeni su problemi, poput dugotrajne nezaposlenosti, siromaštva i beskućništva (1). Prosječni životni vijek u oboljelih je 10–25 godina kraći od opće populacije (5). To je rezultat učestalih tjelesno zdravstvenih problema, ali i veće stope suicida (oko 5%) (3). Procjenjuje se da godišnje oko 17000 ljudi u svijetu umire od ponašanja povezanih ili uzrokovanih sa shizofrenijom (6), ne samo zbog samoubojstava, već posebno zbog preuranjene kardiovaskularne bolesti (7).

Simptomi se obično javljaju postepeno, najčešće počinju u mlađoj odrasloj dobi (u muškaraca nešto ranije), i u mnogim slučajevima nikada ne nestaju (1). Simptomi shizofrenije dijele se na pozitivne simptome (zablude i halucinacije; takozvani psihotični simptomi kod kojih dolazi do gubitka kontakta sa stvarnošću), negativne simptome (oslabljena motivacija, smanjenje spontanog govora i socijalno povlačenje) i oštećenje kognitivnih funkcija (problemi s fokusiranjem, radnom memorijom i izvršavanjem (4).

Prema dijagnostičkim kriterijima Dijagnostičkog i statističkog priručnika mentalnih poremećaja Američkog psihijatrijskog društva, DSM-V (engl. *Diagnostic or Statistical Manual of the American Psychiatric Association*), glavni simptomi shizofrenije su (1):

- 1) deluzije,
- 2) halucinacije,
- 3) dezorganizirani govor,
- 4) jako dezorganizirano ili katatono motoričko ponašanje,
- 5) negativni simptomi, poput osjećajne zaravnjenosti, alogije i avolicije

Za postavljanje dijagnoze potrebno je da bolesnik pati od dva ili više gore navedena simptoma u trajanju od najmanje mjesec dana, a najmanje jedan od njih mora biti simptom 1, 2 ili 3.

Obilježja bolesti i simptomi variraju od osobe do osobe. Shizofrenija tijekom vremena može promijeniti obilježja. Početak bolesti može biti iznenadan ili pak simptomi mogu postupno rasti

tjednima, mjesecima pa i godinama u prodromalnoj fazi bolesti. Generalno radi se o kroničnoj bolesti s dvije izražene faze: ponavljajuće akutne epizode bolesti, i dugi periodi sa slabo izraženim simptomima bolesti ili periodima potpunog oporavka. Negativni i kognitivni simptomi prisutni su u obje faze bolesti (8).

Shizofrenija je složen, heterogeni bihevioralni i kognitivni sindrom za koji se čini da potječe od poremećaja razvoja mozga uzrokovanih genetičkim ili okolišnim čimbenicima, ili oboje (4). Unatoč opsežnim istraživanjima još uvijek nije poznato koji su etiopatogenetski čimbenici shizofrenije, kao ni mehanizmi nastanka ove bolesti. Smatra se da interakcija gena i okolišnih čimbenika, neurobiološka podloga, ali perinatalni i psihosocijalni čimbenici pridonose razvoju bolesti (9). Studije na blizancima, posvojenoj djeci i obiteljske studije utvrdile su da je shizofrenija genski poremećaj s visokom nasljednošću (4,10).

Nedavni napredak genomike i udruživanje podataka kroz inicijative poput Konzorcija za psihijatrijsku genomiku (*Psychiatric Genomics Consortium*), omogućili su identifikaciju brojnih uobičajenih (engl. *common variants*) i rijetkih (engl. *rare variants*) genetičkih varijacija koje pridonose nizu neuropsihijatrijskih poremećaja (11). U cjelogenomskim asocijacijskim studijama (GWAS, engl. *genome-wide association studies*) otkriveno je više od 108 uobičajenih varijanti (SNP, engl. *single nucleotide polymorphism*) povezanih sa shizofrenijom (12). Poseban interes predstavljaju strukturne varijante, delecije i varijacije broja kopija (CNV, engl. *copy number variants*), koje se smatraju rijetkim genetičkim varijantama te je sve više dokaza o njihovoj ulozi u nastanku neuropsihijatrijskih poremećaja (13). Najnovija istraživanja pokazuju da uobičajene SNP varijante kao i rijetke CNV varijante zajednički doprinose riziku nastanka shizofrenije, stoga se koriste za izračun poligenske procjene rizika (engl. *polygenic risk score*, PRS) koji je danas jedan od temeljnih principa za tumačenje genetičkih kompleksnih oboljenja poput shizofrenije. SNP varijante se pojedinačno povezuju s manjim rizikom za nastanak shizofrenije, dok se pojedine rijetke CNV povezuju s znatno većim rizikom (poput delecije 22q11.2), kao i velike delecije i povećana učestalost CNV u genomu (14). Osim toga, uobičajene i rijetke varijante predstavljaju rizik i za druge mentalne poremećaje, kao što su bipolarni poremećaj i autizam. Dokazivanje povezanosti genetičkih varijanti s biokemijskom i/ili biološkom posljedicom i mehanizmom nastanka psihijatrijskog poremećaja ili domene predstavlja veliki izazov. Stoga trenutni dijagnostički kriteriji, kao što je Dijagnostički i statistički priručnik mentalnih poremećaja Američkog psihijatrijskog društva, i dalje imaju veliku kliničku pouzdanost i korisnost (15).

1.1.2. Liječenje shizofrenije

Liječenje shizofrenije je najučinkovitije kada se koristi kombinacija farmakoterapije te psihoterapije uz obiteljsku i socijalnu podršku. Farmakoterapija je prvi korak i predstavlja nužni preduvjet za cjelovito i uspješno liječenje shizofrenije. Ona omogućuje ne samo potiskivanje simptoma bolesti, nego i kritički uvid bolesnika u bolest i njegovu aktivnu ulogu u zaustavljanju bolesti. Međutim, sama farmakoterapija nije dostatna za liječenje shizofrenije, nužna je primjena različitih psihoterapijskih i socioterapijskih tehnika i metoda, psihoedukacija bolesnika i njegove obitelji, obiteljska psihoterapija, individualna ili grupna bihevioralna terapija, aktivnosti u udruzi bolesnika itd. (16).

Primjena farmakoterapije za liječenje psihoze predstavlja veliki izazov u psihijatriji, jer iako antipsihotici mogu biti korisni za smirivanje psihoze, oni često izazivaju nuspojave poput ekstrapiramidnog sindroma, hiperprolaktinemije i metaboličkog sindroma (1). Danas postoje brojni algoritmi i smjernice kojima se rukovodimo pri izboru optimalnog antipsihotika. Ono što je zajedničko svima njima jest prednost atipičnih antipsihotika (druge generacije) u odnosu na antipsihotike prve generacije, kao lijekova prvog izbora u liječenju shizofrenije. Izbor lijeka temelji se uglavnom na razlikama u štetnim učincima i mogućim razlikama djelotvornosti (10).

1.1.3. Praćenje terapijskog učinka i nuspojava - ocjenske ljestvice

Općenito se u psihijatriji, pa tako i shizofreniji, tijekom bolesti i terapijski odgovor na antipsihotike procjenjuje kliničkim pregledom jer još uvijek ne postoje biološki markeri ili standardizirane dijagnostičke metode koje bi poslužile u tu svrhu. Kako bi se upravo objektivizirala klinička procjena, razvijeni su mjerni instrumenti u formi ocjenskih ljestvica (17).

Jedan takav mjerni instrument koji služi za ocjenu težine simptoma bolesti u oboljelih od shizofrenije je ocjenska ljestvica PANSS (od engl. *Positive and Negative Syndrome Scale*). PANSS je nastao kao pokušaj da se osigura sveobuhvatnija procjena simptoma shizofrenije (18,19). PANSS je do danas najviše korištena ocjenska ljestvica za shizofreniju. Sastoji se od 30 osnovnih čestica, a dizajnirana je tako da procijeni tri glavne skupine simptoma: podljestvica pozitivnih simptoma (7 čestica), podljestvica negativnih simptoma (7 čestica) i opća psihopatološka podljestvica (16 čestica). Ukupna vrijednost PANSS može biti u rasponu od 30 do 210. Ocjenu PANSS provode kvalificirani kliničari koristeći kombinacije nestrukturiranih, polustrukturiranih i strukturiranih intervjua (20). PANSS se koristi u kliničke i istraživačke

svrhe i smatra se pouzdano sredstvo za procjenu simptoma shizofrenije. Njegova uporaba u kliničke istraživačke svrhe pokazala je visoku pouzdanost (engl. *reliability*), konstruktivnu nepobitnost (engl. *validity*) te nepristranost (engl. *objectivity*) za procjenu simptoma shizofrenije (21,22).

Procjena akutnih ekstrapiramidnih nuspojava (ekstrapiramidnog sindroma, EPS) uzrokovanih antipsihoticima prvenstveno se bazira na kliničkoj slici jer još uvijek nema standardiziranih biljega ili dijagnostičkih pretraga kojima bi se one potvrdile ili isključile. Ipak, kao i pri procjeni terapijskog odgovora u liječenju shizofrenije, i ovdje se koriste standardizirane ocjenske ljestvice kako bi se objektivizirao klinički dojam (17). Ocjenska ljestvica SAS (od engl. *Simpson Angus Scale*) koristi se za procjenu pseudoparkinsonizma. Sastoji se od 10 čestica, a svaka čestica se ocjenjuje pomoću 4-bodovne ljestvice. SAS ocjena može biti u rasponu od 0 do 40. Procjene simptoma uključuju: držanje, padanje, trešnju, rigidnost lakta, rigidnost ručnog zgloba, okretanje glave, kuckanje po gabeli, tremor, salivaciju i akatiziju (20).

U više studija, za ocjenu pojave pseudoparkinsonizma za vrijeme liječenja definirana je vrijednost SAS veća od 3 u bilo kojem trenutku, nakon ocjene 3 ili manje (20).

1.1.4. Antipsihotici

Shizofrenija je temeljna indikacija za primjenu antipsihotika, koji se također primjenjuju u bolesnika s bipolarnim poremećajem, psihotičnom depresijom i depresijom rezistentnom na liječenje (10).

Antipsihotici se klasificiraju kao tipični i atipični, a podjela se temelji isključivo na njihovoj sposobnosti izazivanja ekstrapiramidnih nuspojava (EPS) (23). Tipični antipsihotici otkriveni 1950-ih (npr. haloperidol, klorpromazin) nazivaju se i antipsihoticima prve generacije. Smatraju se učinkovitima u liječenju psihotičnih simptoma, ali često dovode do motoričkih nuspojava. Novija generacija lijekova, atipični antipsihotici, poznati i kao druga generacija antipsihotika - risperidon, olanzapin, kvetiapin, ziprasidon i aripiprazol - rjeđe izazivaju motoričke nuspojave i hiperprolaktinemiju (3).

Ove dvije klase se razlikuju i po mehanizmu djelovanja. Antipsihotici prve generacije primarno djeluju blokadom D₂ receptora, dok su antipsihotici druge generacije serotoninско-dopaminski antagonisti koji djeluju simultano na serotoninске 5HT_{2A} i dopaminske D₂ receptore (7).

Različiti antipsihotici mogu se značajno razlikovati po učinkovitosti i nuspojavama (24). Tipični i atipični antipsihotici smatraju se podjednako djelotvornima u liječenju pozitivnih

simptoma. Međutim, smatra se da atipični antipsihotici imaju bolji učinak na negativne simptome i kogniciju, sa smanjenim rizikom za tardivnu diskineziju, EPS i hiperprolaktinemiju (10). Općenito se može reći da su EPS nuspojave više vezane uz antipsihotike prve generacije, dok su povećanje tjelesne težine, metaboličke nuspojave (hiperlipidemija, hiperglikemija, inzulinska rezistencija, dijabetes melitus) i kardiovaskularne bolesti više povezane s antipsihoticima druge generacije. Potencijal za razvoj nuspojava različit je za pojedini antipsihotik ovisno o njegovoj molekularnoj strukturi i vezanju za receptore (7).

1.1.5. Pripravci antipsihotika s produljenim oslobađanjem

Danas brojni antipsihotici pogotovo atipični imaju pripravke s produljenim oslobađanjem (LAI, od engl. *long-acting injection*), poput aripiprazola, olanzapina, risperidona i paliperidona. Radi se o injekcijama za intramuskularnu primjenu s intervalima doziranja od svaka dva tjedna pa čak do svaka 3 mjeseca (25). Primjena LAI antipsihotika je vrlo zastupljena u psihijatrijskoj praksi s ciljem da se izbjegne problem nesuradljivosti bolesnika (26). Osim toga, njihovom primjenom se postižu kontrolirani uvjeti za proučavanje farmakokinetičkih parametara.

Smatra se da LAI antipsihotici smanjuju rizik povrata simptoma u odnosu na oralne pripravke (27). Međutim, noviji podatci pokazuju da je stopa prekida liječenja prije završetka studije u bolesnika liječenih atipičnim LAI antipsihoticima bila kao i u pacijenata liječenih antipsihoticima prve generacije s oralnim ili LAI pripravcima, ili s atipičnim oralnim antipsihoticima te je u većini dugotrajnih studija bila veća od 50% (26).

U literaturi se također navode pogoršanje psihotičnih simptoma i nedjelotvornost kao čest razlog prekida terapije pripravkom risperidona s produljenim oslobađanjem, s incidencijom i do 41% (28). Također se navodi da je vodeći uzrok smrti u kliničkim ispitivanjima LAI risperidona samoubojstvo (29). Također pri Hrvatskoj agenciji za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) postoje prijave o nedjelotvornosti LAI risperidona (30), a klinička praksa svjedoči o smanjivanju intervala doziranja.

1.1.6. Risperidon

Risperidon (RIS) je atipični antipsihotik i jedan je od najčešće propisivanih antipsihotika (24,31). Koristi se u liječenju shizofrenije, bipolarnog poremećaja, teške demencije i razdražljivosti povezanih s autizmom (32). Pripravak risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) za intramuskularnu primjenu, indiciran je za liječenje shizofrenije u fazi održavanja bolesnika stabiliziranih oralnim antipsihotikom (33).

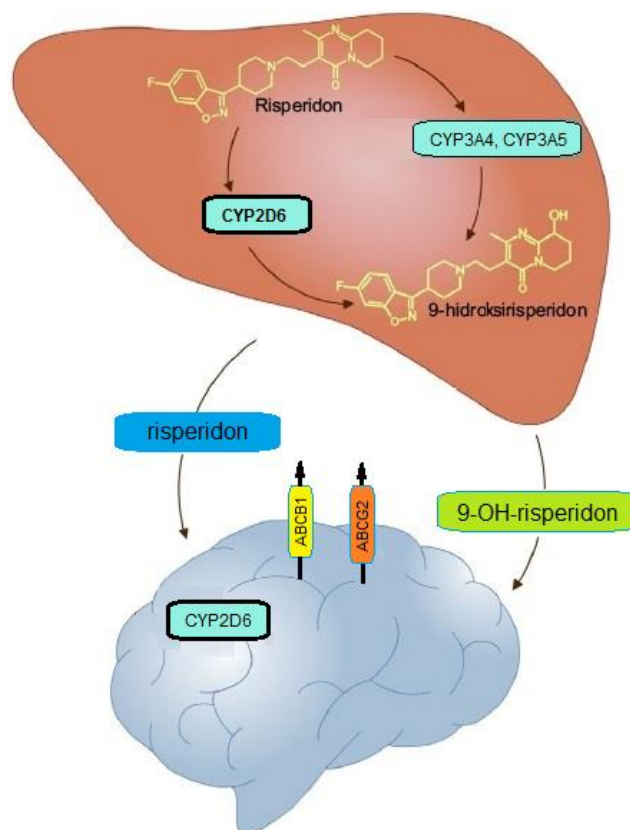
Glavni metabolički put risperidona je hidroksilacija u aktivni metabolit 9-hidroksirisperidon (9-OH-risperidon, 9-OH-RIS) enzimom CYP2D6 (34), a sporedni metabolički put je N-dealkilacija enzimima CYP3A4 (35) i CYP3A5 (36) (slika 1.). Klinički učinak lijeka rezultat je ukupne aktivnosti risperidona i njegovog aktivnog metabolita 9-OH-risperidona (ukupni aktivni lijek, engl. *active moiety*, AM) (37). Otkrića da snažni induktori i inhibitori CYP3A utječu na razinu risperidona u plazmi (38,39) ukazala su na moguću ulogu CYP3A4/5 u metabolizmu risperidona. To su potvrdila i ispitivanja *in vitro* (35,40). Noviji publicirani dokazi upućuju da je 9-OH-risperidon također podložan metabolizmu putem enzima CYP2D6 i CYP3A4, ali bez značajnijeg utjecaja na njegovu farmakokinetiku (41,42). Poznat je još jedan manje zastupljen metabolit risperidona, 7-hidroksirisperidon (43). Istraživanja *in vivo* pokazuju da CYP2D6 ima prevladavajuću ulogu u stvaranju enantiomera (+)-9-hidroksirisperidona, dok se čini da je CYP3A4 prvenstveno uključen u stvaranje enantiomera (-)-9-hidroksirisperidona (35).

Risperidon i 9-OH-risperidon su supstrati membranskih prijenosnika ABCB1 (MDR1, P-glikoprotein) i ABCG2 (BCRP) (slika 1.). Funkcionalni status P-glikoproteina može utjecati na bioraspoloživost lijeka (44,45). 9-OH-risperidon ima veći afinitet za P-glikoprotein u odnosu na risperidon, te stoga teže prelazi krvno-moždanu barijeru (46). Pretraživanjem dostupne literature nalazi se malo dokaza o ulozi membranskog prijenosnika ABCG2 u farmakokinetici risperidona i 9-hidroksirisperidona. Dvije *in vivo* studije ukazuju da je risperidon uz ABCB1 također supstrat ABCG2 (47,48). Studija s LAI-RIS izvijestila je da istodobna primjena inhibitora ABCG2 ketokonazola može povećati okupiranost D2 receptora (47), što indirektno ukazuje na produljenu bioraspoloživost risperidona i potencijalnu ulogu prijenosa pomoću ABCG2 na krvno-moždanu barijeru (slika 1.). Jedna *in vitro* studija pokazala je da risperidon može inhibirati ABCG2 (49).

Risperidon i 9-OH-risperidon se često smatraju ekvipotentnima, međutim pokazuju različite afinitete prema dva ciljna receptora (D₂ i 5HT_{2A}), pri čemu se čini da je risperidon otprilike dvostruko potentniji od 9-OH-risperidona. Također postoji razlika i u njihovoj raspodjeli u

središnjem živčanom sustavu (CNS) te se risperidon u većoj mjeri distribuira u CNS (50–52). Stoga se najrelevantnijom mjerom aktivnosti smatra ukupna koncentracija risperidona i njegovog aktivnog metabolita 9-OH-risperidona (AM). Prema smjernicama Europske udruge za neuropsihofarmakologiju i farmakopsihijatriju (njem. *Arbeitsgemeinschaft für europsychopharmakologie und farmakopsychiatrie*, AGNP) za terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM), referentni raspon za AM risperidona iznosi 50-150 nmol/L (20–60 ng/mL) (37). U pacijenata sa shizofrenijom ravnotežne koncentracije lijeka u krvi slabo koreliraju s primijenjenim dozama i ukazuju na inter- i intraindividualnu varijabilnost (53).

Risperidon ima svojstva atipičnih antipsihotika pogotovo pri primjeni manjih doza, međutim kod primjene većih doza često se pojavljuje EPS. Osim toga risperidon utječe na porast prolaktina neovisno o dozi (7). Otkriveno je da risperidon povećava QTc interval (54) te se povezuje s razvojem metaboličkih nuspojava (55)



Slika 1. Metabolizam risperidona – enzimi, membranski prijenosnici i njihova lokalizacija

1.2. Farmakogenetika i farmakogenomika

1.2.1. Farmakogenetika/farmakogenomika i personalizirana medicina

Farmakogenetika, odnosno farmakogenomika je disciplina suvremene medicine koja se bavi genetičkim uzrocima individualne varijabilnosti u odgovoru na lijek. Ova dva termina se vrlo često upotrebljavaju naizmjenično s istim značenjem (56,57). Po definiciji farmakogenetika proučava interakcije pojedinog lijeka i gena, dok farmakogenomika ispituje utjecaje mnogih gena pa i čitavog genoma na učinkovitost i nuspojave određenog lijeka (58). Izraz farmakogenetika se prvi put spominje 1959. godine (59). Prvi dokazi o povezanosti genetičkih odrednica s varijacijama u metabolizmu sežu još do antičkih vremena i Pitagorine spoznaje da on kao i dio populacije, ima teške smetnje nakon konzumacije boba (*Vicia faba*), tj. hemolitičku anemiju uzrokovanu deficijencijom enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PDH) (60).

Danas su poznate nasljedne varijacije za preko 20 gena koji utječu na lijekove u kliničkoj praksi (60), a više od 95% ljudi nosi barem jednu varijantu tzv. „*actionable*“ farmakogena za koji postoji smjernica za doziranje nekog lijeka (61). Smatra se da čimbenik genetičke varijabilnosti može doprinosti udjelom od 25 do 50% u ukupnoj pojavnosti neočekivane reakcije na lijek (58). Danas u vrijeme „*omic-a*“ farmakogenomika je vjerojatno najpropulzivniji dio suvremene personalizirane medicine, pristupa liječenju koji je sve prisutniji u medicinskoj praksi. Farmakogenomika je dobila snažan zamah razvojem molekularnih dijagnostičkih metoda poput naprednog paralelnog sekvenciranja (sekvenciranja nove generacije, engl. *next generation sequencing*, NGS) koje omogućavaju analizu velikog broja gena i otkrivanje novih genomskih varijacija (62).

1.2.2. Farmakogenetički biljezi u klinici

Postoje brojni dokazi za primjenu farmakogenetičkih testiranja u svrhu optimizacije propisivanja lijekova, međutim te se informacije teško primjenjuju za poboljšanje skrbi o pacijentu (63,64). Europska agencija za lijekove (EMA, engl. *European Medicines Agency*) i Američka agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *U.S. Food and Drug Administration*) uvrstile su farmakogenetičke informacije u preko 360 uputa o lijeku vezane za djelotvornost i sigurnost lijekova (65). Sa svrhom brže implementacije kliničke farmakogenetike osnovana je mreža farmakogenetičkih društava na međunarodnoj razini, a među najvažnijima je *The*

Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB, <http://www.pharmgkb.org>) (66). Udruženja poput Konzorcija za implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu (CPIC, *Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*) i Nizozemske radne skupine za farmakogenetiku (DPWG, od engl. *Dutch Pharmacogenetics Working Group*) osnovana su s ciljem izdavanja recenziranih, ažuriranih, na dokazima temeljenih, slobodno dostupnih uputa i smjernica za doziranje lijekova prema rezultatima farmakogenetičkih testova. U tablici 1. prikazani su lijekovi za koje postoje smjernice o doziranju prema farmakogenetičkim biljezima (58,67).

1.2.3. Odnos genotip – fenotip

Osnova za tumačenje rezultata farmakogenetičkih testiranja je odnos genotip – fenotip. Klasična podjela razlikuje četiri fenotipa metaboličkih enzima (68):

- slabi/spori metabolizator (engl. *poor metabolizer*, PM)
- srednje brzi ili intermedijarni metabolizator (engl. *intermediate metabolizer*, IM)
- normalni (engl. *normal metabolizer*, NM) ili ekstenzivni metabolizator (engl. *extensive metabolizer*, EM)
- vrlobrzi metabolizator (engl. *ultrarapid metabolizer*, UM).

2017. godine CPIC je izdao smjernice za standardizaciju terminologije te je uveden peti fenotip za CYP2C19 - „*rapid metabolizer*“ (RM) koji ima veću od normalne aktivnosti enzima (69). Prediktivni fenotip određuje se ovisno o funkcionalnoj karakterizaciji pojedine genetičke varijacije. Najčešće će se radi o promjenama koje rezultiraju smanjenjem ili izostankom funkcionalnosti, rjeđe o pojačanoj funkciji (npr. enzima ili transportera). Zbroj funkcionalne aktivnosti (AS, engl. *activity score*) dodjeljuje se za svaki alel: 0 za nefunkcionalnost, 0,5 za smanjenu funkciju i 1,0 za potpunu funkciju. Neki geni, poput *CYP2D6*, mogu biti potpuno izbrisani (npr. delecija *CYP2D6*5*) ili udvostručeni/umnogostručeni (npr. *CYP2D6*1xN*, gdje je N broj kopija gena). U slučaju prisutnosti više od jedne kopije gena, rezultat aktivnosti pomnoži se brojem evidentiranih kopija. Za definiranje fenotipova prema genotipu koristi se zbroj alelne aktivnosti: 0=PM; 0,5=IM; 1,0–2,0=NM; $i \geq 2,0$ =UM (58,70). Na primjer, ako pojedinac nosi jedan alel normalne funkcije i jedan nefunkcionalni alel, njegov AS=1 i smatra se intermedijarnim metabolizatorom (IM).

Tablica 1. Lijekovi za koje trenutno postoje smjernice za doziranje prema farmakogenetičkoj analizi

LIJEK	GEN	LIJEK	GEN
abakavir	<i>HLA-B</i>	karbamazepin	<i>HLA-A, HLA-B</i>
acenokumarol	<i>CYP2C9, VKORC1</i>	klomipramin	<i>CYP2C19, CYP2D6</i>
alopurinol	<i>HLA-B</i>	klopidogrel	<i>CYP2C19</i>
amitriptilin	<i>CYP2C19, CYP2D6</i>	kodein	<i>CYP2D6</i>
aripirazol	<i>CYP2D6</i>	lansoprazol	<i>CYP2C19</i>
atazanavir	<i>UGT1A1</i>	merkaptopurin	<i>TPMT, NUDT15</i>
atomoksetin	<i>CYP2D6</i>	metoksifluran	<i>CACNA1S, RYR1</i>
atorvastatin	<i>SLCO1B1</i>	metoprolol	<i>CYP2D6</i>
azatioprin	<i>TPMT</i>	nortriptilin	<i>CYP2D6</i>
cisplatina	<i>TPMT</i>	okskarbazepin	<i>HLA-B</i>
citalopram	<i>CYP2C19</i>	omeprazol	<i>CYP2C19</i>
daunorubicin	<i>RARG, SLC28A3, UGT1A6</i>	ondansetron	<i>CYP2D6</i>
dezfluran	<i>CACNA1S, RYR1</i>	pantoprazol	<i>CYP2C19</i>
dezipramin	<i>CYP2D6</i>	paroksetin	<i>CYP2D6</i>
doksepin	<i>CYP2C19, CYP2D6</i>	peginterferon alfa-2a	<i>IFNL3 (IL28B)</i>
doksorubicin	<i>RARG, SLC28A3, UGT1A6</i>	peginterferon alfa-2b	<i>IFNL3 (IL28B)</i>
efavirenz	<i>CYP2B6</i>	pimozid	<i>CYP2D6</i>
eliglustat	<i>CYP2D6</i>	propafenon	<i>CYP2D6</i>
enfluran	<i>CACNA1S, RYR1</i>	razburikaza	<i>G6PD</i>
escitalopram	<i>CYP2C19</i>	ribavirin	<i>IFNL3, HLA-B</i>
esomeprazol	<i>CYP2C19</i>	sertralin	<i>CYP2C19</i>
faktor V	<i>Faktor V Leiden (FVL)</i>	sevofluran	<i>CACNA1S, RYR1</i>
fenitoin	<i>CYP2C9, HLA-B</i>	simvastatin	<i>SLCO1B1</i>
fenprokumon	<i>VKORC1</i>	sukcinilkolin	<i>CACNA1S, RYR1</i>
flekainid	<i>CYP2D6</i>	takrolimus	<i>CYP3A5</i>
flukloksacilin	<i>HLA-B</i>	tamoksifen	<i>CYP2D6</i>
fluorouracil	<i>DPYD</i>	tegafur	<i>DPYD</i>
fluvoksamin	<i>CYP2D6</i>	tiogvanin	<i>TPMT, NUDT15</i>
glimepirid	<i>CYP2C9</i>	tramadol	<i>CYP2D6</i>
haloperidol	<i>CYP2D6</i>	trimipramin	<i>CYP2C19, CYP2D6</i>
halotan	<i>CACNA1S, RYR1</i>	tropisetron	<i>CYP2D6</i>
imipramin	<i>CYP2C19, CYP2D6</i>	varfarin	<i>CYP2C9, VKORC1, CYP4F2</i>
irinotekan	<i>UGT1A1</i>	venlafaksin	<i>CYP2D6</i>
ivakaftor	<i>CFTR</i>	vorikonazol	<i>CYP2C19</i>
izofluran	<i>CACNA1S, RYR1</i>	zuklopentiksol	<i>CYP2D6</i>
kapecitabin	<i>DPYD</i>		

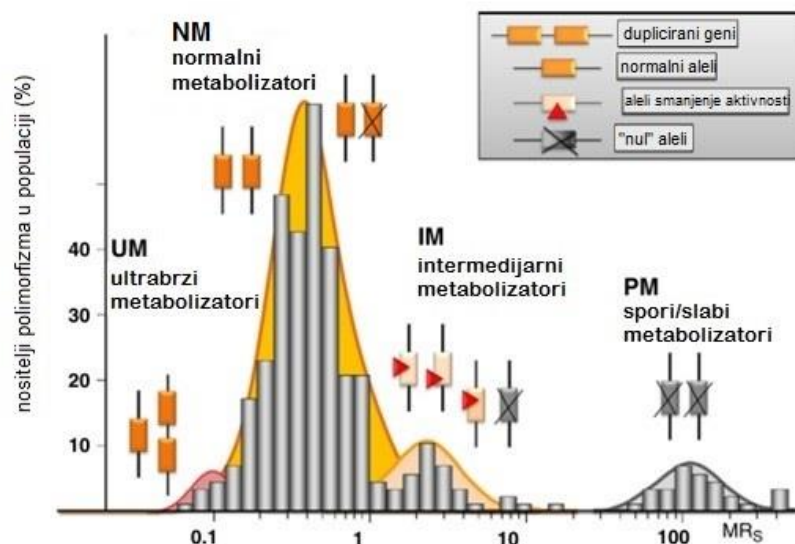
1.2.4. Polimorfizmi citokroma P450 2D6 (CYP2D6)

Citokrom P450 2D6 (CYP2D6) je enzim od velike povijesne važnosti za farmakogenetiku koji sudjeluje u metabolizmu oko 25% lijekova koji se koriste u kliničkoj praksi (71,72). On je jedini enzim CYP koji nije podložan indukciji, pa genetička varijabilnost značajno doprinosi njegovoj interindividualnoj varijabilnosti enzimске aktivnosti. Među lijekove supstrate CYP2D6 ubrajaju se antidepresivi (npr. paroksetin, fluoksetin, venlafaksin), antipsihotici (npr. aripiprazol, risperidon), antiaritmici (npr. flekainid, propafenon), antiemetici (ondansetron), antineoplastici (npr. tamoksifen), blokatori beta-adrenergičkih receptora (npr. karvedilol, metoprolol), opioidni analgetici (npr. kodein, tramadol) i drugi lijekovi (72,73). Enzim CYP2D6 je poznat i kao debrizokin-4-hidroksilaza, po antihipertenzivu koji je bio u primjeni 70-tih i 80-tih godina prošlog stoljeća kada je otkrivena polimorfna hidroksilacija debrizokina ovim enzimom (74), kao i gen koji ga kodira te njegovi pseudogeni (75,76).

Gen *CYP2D6* se nalazi na 22 kromosomu, najmanjem autosomu, na lokaciji 22q13.1 veličine 4383 pb, i sadrži 9 eksona koji kodiraju 497 aminokiselina (77). *CYP2D6* je vrlo polimorfan gen i redovito se otkrivaju njegove nove varijante koje se evidentiraju u repozitoriju PharmVar, bazi Konzorcija za varijacije farmakogena (*The Pharmacogene Variation Consortium*), koji se bavi istraživanjem alelnih varijacija i strukturnih haplotipova farmakogena (78,79). Do danas je identificirano gotovo 140 različitih alela ovog gena poznate i nepoznate funkcionalnosti (79). Varijantni aleli *CYP2D6* vrlo su različiti - SNP, male insercije i delecije, delecije ili duplikacije / multiplikacije cijelog gena (engl. *copy number variation*, CNV), preslagivanje gena i prisustvo hibridnih pseudogena, koji su vrlo karakteristični za ovaj gen. Sve ove genetičke varijacije mogu rezultirati potpunom, smanjenom i dokinutom funkcijom enzima kao i pojačanom funkcijom uslijed CNV potpuno funkcionalnih alela u vrlo brzih metabolizatora (UM).

Postoje velike geografske i međuetničke razlike u učestalosti varijantnih alela *CYP2D6*. Najučestaliji nefunkcionalni alel *CYP2D6* *4 je prisutan u oko 20% Europljana i gotovo je odsutan u Azijata, u kojih je pak znatno zastupljeniji alel smanjene funkcije *10 (~40%) odgovoran za veliku zastupljenost intermedijarnih metabolizatora (IM) u toj populaciji (72). *CYP2D6**5 delecija gena koja ima za posljedicu fenotip sporog metabolizma (PM) ima relativno sličnu učestalost (~3-5%) u europskim, afričkim i azijskim populacijama (80,81). U kliničkoj primjeni genotipiziraju se samo aleli s poznatim funkcionalnim učinkom i dovoljnom zastupljenosti u pojedinoj populaciji. Genotipizacijom devet alela (*3, *4, *5, *6 koji su nefunkcionalni; aleli *10, *17 i *41 aleli smanjene funkcije, i aleli *1 i *2 koji su potpuno funkcionalni) može se predvidjeti 95% fenotipova CYP2D6 (82).

Prevođenje genotipa u fenotip temelji se na sposobnosti metaboliziranja CYP2D6 supstrata i u četiri kategorije fenotipa: slabi/spori, intermedijarni, normalni (izjednačeni s ekstenzivnim) (NM) i vrlobrzi metabolizatori. Za definiranje fenotipova prema genotipu *CYP2D6* koristi se zbroj alelne aktivnosti: $0 = \text{PM}$; $0 < X < 1,25 = \text{IM}$; $1,25 \leq X \leq 2,25 = \text{NM}$; $> 2,25 = \text{UM}$ (83). Općenito translacija genotipa *CYP2D6* u fenotip izvor je dugogodišnjih dilema i prijepora, a uzroka je nekoliko. Jedan je da je gen *CYP2D6* izrazito polimorfan i vrlo kompleksan za genotipizaciju, što zahtjeva brojne resurse za identifikaciju mnogih polimorfizama i strukturnih promjena. To je rezultiralo vrlo različitim pristupima u genotipizaciji ovog gena, pa postoje brojne komercijalne platforme čiji su rezultati u konačnici različiti i ponekad nisu usporedivi. Ako je genotipiziran premali broj polimorfizama može također doći do razlike u definiranju fenotipa. Osim toga fenotip CYP2D6 može biti specifičan za pojedini supstrat pa su tako smjernice CPIC za lijekove kao što su antidepresivi i kodein definirale nositelje jednog funkcionalnog i jednog funkcionalnog alela kao normalne metabolizatore, iako su oni tradicionalno smatrani (od strane mnogih, poput DPWG i nekih referentnih laboratorija) intermedijarnim metabolizatorima (slika 2.). Stoga su ove godine dvije ključne organizacije za implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu, CPIC i DPWG, donijele konsenzus i standardizaciju o translaciji genotipa *CYP2D6* i u fenotip (83). Zbog svega navedenog treba biti vrlo oprezan pri tumačenju nalaza istraživanja i genotipizacije *CYP2D6*.



Slika 2. Raspodjela fenotipa prema genotipu *CYP2D6* (prilagođeno prema Zanger i sur. (68))

CYP2D6 se navodi u više od 70 uputa o lijeku izdanih od strane FDA vezano uz pitanja o sigurnosti i/ili djelotvornosti u osoba s različitim fenotipom odnosno metabolizmom CYP2D6 (84). Također izdane su smjernice za doziranje prema genotipu CYP2D6 za kodein (85,86), tricikličke antidepresive (87,88), inhibitore ponovnog povrata serotonina (89), ondansetron i tropisetron (90), tamoksifen (91) i atomoksetin (92).

Danas postoji sve više dokaza da cerebralni citokromi P450 imaju važnu ulogu u metabolizmu endogenih supstrata u mozgu. Među supstratima različitih izoenzima CYP nalaze se monoamini i neurotransmitori, neurosteroidi, kolesterol, vitamini, arahidonska kiselina (93). Alternativni putevi sinteze dopamina i serotonina posredovani enzimima CYP mogu imati značajnu ulogu u stvaranju neurotransmitera u područjima mozga koja se povezuju s depresijom i shizofrenijom. Alternativna sinteza neurotransmitera u mozgu može biti od velike važnosti, budući da dopamin i serotonin ne prolaze kroz krvno-moždanu barijeru i ne mogu biti dopremljeni iz periferije. Ispitivanja *in vitro* pokazuju da humani CYP2D6 katalizira sintezu dopamina i serotonina, te da je *in vitro* sinteza učinkovitija od one u ispitivanjima izoformi enzima CYP2D u štakora. To sugerira da alternativni putevi mogu imati mnogo veći značaj u ljudskom mozgu (94,95). Stoga je moguća uloga enzima CYP u razvoju mozga, homeostazi, podložnosti mentalnim i neurodegenerativnim bolestima koja bi mogla doprinijeti objašnjenju njihove patofiziološke osnove. Također cerebralni enzimi CYP mogu modificirati terapijske učinke psihoaktivnih lijekova na mjestu njihovog ciljnog djelovanja u mozgu, utječući na metabolizam endogenih supstrata (93). S obzirom da se CNV na kromosomu 22, poput delecije 22q11.2, snažno povezuju s rizikom nastanka shizofrenije i lokaciju gena *CYP2D6* na istom kromosomu, buduća istraživanja svakako bi trebala razjasniti moguću ulogu varijacija *CYP2D6* u patogenezi psihijatrijskih poremećaja.

1.2.5. Polimorfizmi citokroma P450 3A (CYP3A)

Citokrom P450 3A4 (CYP3A4) i citokrom P450 3A5 (CYP3A5) su dominantno eksprimirani citokromi u ljudskoj jetri i crijevima, dok je CYP3A5 izražen i u izvanjetrenim tkivima (96). Enzimi CYP3A sudjeluju u metabolizmu oko 50% lijekova u kliničkoj primjeni, (antibiotici, antidepresivi, antiepileptici, antikoagulansi, antipsihotici, antivirusni lijekovi, antitumorski lijekovi, imunosupresivi, inhibitori tirozin kinaza, statini i dr.) te su važni za metabolizam endogenih steroida (58,68). Teško je razlikovati relativni doprinos enzima CYP3A4 i CYP3A5 u metabolizmu lijekova zbog njihove sličnosti u strukturi, funkciji i supstratima (97). Oba enzima uglavnom dijele supstrate i pokazuju vrlo visoku varijabilnost u aktivnosti (98). Poznato je više od 50 varijanti gena *CYP3A4* i 30 varijanti *CYP3A5*, od kojih većina nije funkcionalno karakterizirana (79,99). Prema postojećim dokazima klinički je korisna primjena prediktivnog fenotipa CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4**22 i *CYP3A5**3 ovisno o populaciji (tablica 2.) (100), a postoje i smjernice za doziranje takrolimusa prema genotipu CYP3A5 (101).

Polimorfizam *CYP3A4**22 (rs35599367) nalazi se u intronskoj regiji (102), s učestalosti ~ 7% u populaciji bijelaca i određuje znatno smanjenu aktivnost enzima (100). Polimorfizam *CYP3A4**1B (-392A>G, rs2740574) nalazi se u promotorskoj regiji i povezuje se s povećanom aktivnosti CYP3A4 (premda nije dokazan utjecaj na metabolizam niza lijekova supstrata) (103). Ovaj polimorfizam je u snažnoj neravnotežnoj vezi (LD, engl. *linkage disequilibrium*) s alelom *CYP3A5**1 te je teško razlučiti njihov pojedinačni doprinos varijabilnosti CYP3A (104). Osim genetičke predispozicije varijabilnost CYP3A pod snažnim je utjecajem okolišnih čimbenika poput hrane, pušenja i drugih istodobno primijenjenih lijekova, poput nekih azolnih spojeva, antibiotika, antiepileptika, ciklosporina. Tako na primjer citrusi, posebno sok od grejpa, imaju znatne inhibitorne učinke već na intestinalnoj razini na CYP3A4, što može rezultirati povećanom bioraspoloživosti lijekova supstrata (58).

Polimorfizam *CYP3A5**3 (rs776746) predstavlja supstituciju 6986A>G u intronu 3. Ovaj SNP zbog preuranjenog zaustavljanja translacije dovodi do sinteze skraćenoga, krnjeg enzima. Homozigotni i heterozigotni nositelji divljeg tipa alela *CYP3A5**1 stvaraju normalne ili neznatno reducirane razine CYP3A5 mRNA, i imaju slične razine funkcionalnog proteina pa se nazivaju ekspresori CYP3A5. Nasuprot njima, homozigotni nositelji varijantnog alela *CYP3A5**3 imaju vrlo niske ili nemjerljive razine funkcionalnog proteina i stoga se nazivaju non-ekspresori CYP3A5 (58,98). Ovaj je polimorfizam specifičan jer učestalost divljeg tipa alela, što znači i prisutnost aktivnog enzima u bjelačkoj populaciji, iznosi svega 3–15%, 30% u

azijskoj populaciji, a 65-85% u afričkoj populaciji (98). Ekspresija CYP3A5 može nadvladati/spriječiti interakcije lijekova na razini CYP3A4. Aditivan učinak farmakogenetike uz interakcije na razini enzima CYP3A može znatno preinačiti učinke lijekova supstrata (58).

Tablica 2. Prediktivni fenotip CYP3A prema kombinaciji genotipova *CYP3A4**22 i *CYP3A5**3 i njihova učestalost u svjetskim populacijama (58)

Fenotip CYP3A	Genotip CYP3A4*22	Genotip CYP3A5*3	Bjelačka populacija*	Azijska populacija*	Afrička populacija*
PM	*1/*22	*3/*3	8	-	-
	*22/*22	*3/*3			
IM	*1/*1	*3/*3	72	50	10
	*1/*22	*1/*3			
	*1/*22	*1/*1			
	*22/*22	*1/*1			
NM	*1/*1	*1/*1	18	50	90
	*1/*1	*1/*3			

PM – slabi metabolizator, IM – intermedijarni metabolizator, NM – normalni metabolizator; *učestalosti CYP3A4*22 i CYP3A5*3 u bijeloj, azijskoj i afričkoj populaciji prema 1000 Genomes database (<http://www.1000genomes.org/>).

1.2.6. Farmakogenetika prijenosnika lijekova

Membranski proteini prijenosnici (transporteri) reguliraju ulazak i izlazak brojnih supstrata u stanicu poput iona, endogenih tvari i nutrijenata u stanicu, izbacuju stanični otpad, toksine, lijekove i ksenobiotike. Stoga su vrlo važni za apsorpciju, distribuciju i eliminaciju lijekova te mogu imati ulogu u moduliranju odgovora na lijek i razvoju štetnih učinaka (105,106).

Dvije glavne natporodice membranskih prijenosnika imaju važnu ulogu u prijenosu lijekova: ABC (engl. *ATP-binding cassette*) i SLC (engl. *solute carrier*) (107). Ovi prijenosnici eksprimirani su u epitelnim stanicama brojnih barijera, poput intestinalne, bubrežne i jetrene membrane te kapilara mozga. Imaju važnu ulogu u homeostazi jer reguliraju transcelularno kretanje otopljenih tvari (malih molekula ksenobiotika poput lijekova i toksina, i endogenih metabolita) između tjelesnih tekućina i tkiva (npr. između krvi i urina, krvi i cerebralne tekućine ili krvi i žuči) (108). Često djeluju u sinergiji s metaboličkim enzimima i stoga bitno određuju koncentracije lijekova i njihovih metabolita u tjelesnim tekućinama i tkivu (109). Ovisno o smjeru prijenosa preko stanične membrane prijenosnici se dijele na prijenosnike koji unose (engl. *influx*) ili iznose/izbacuju (engl. *efflux*) supstrate iz stanice (107). Razlikuju se i prema

načinu prijenosa ovisno o utrošku energije jer mogu prenositi supstrate aktivnim putem (uz utrošak energije) ili olakšanim putem (bez utroška energije) (105,110).

Membranski transportni proteini natporodice ABC su o ATP-u ovisni prijenosnici, ATP hidrolaze, i aktivno prenose svoje supstrate preko membrane iz stanice u izvanstanični medij, često protiv difuzijskog gradijenta (111). Danas je poznato 49 gena koji kodiraju proteine ABC koji mogu biti grupirani u sedam podrazreda i porodica (ABCA do ABCG). Važni membranski prijenosnici u natporodici ABC, za koje postoje dokazi koji pokazuju njihovu ulogu u varijaciji farmakokinetike i farmakodinamike su ABCB1 (P-glikoprotein, ili MDR1), ABCC2 i ABCG2 (112,113). Opisane su bolesti uzrokovane mutacijama u 14 članova natporodice ABC poput cistične fibroze (CFTR, kodiran *ABCC7*), makularne degeneracije (*ABCA4*), bilijarne disfunkcije (*ABCC2*, *ABCB11*), poremećaja masnih kiselina i lipida (*ABCA1*, *ABCG5*, *ABCG8*, *ABCD1*) i poremećaja mokraćne kiseline (*ABCG2*) (111,114).

Prijenosnici natporodice SLC, za razliku od prijenosnika ABC, većinom omogućuju ulazak (engl. *influx*) malih molekula u stanice (108). Najvažniji prijenosnik iz natporodice SLC je organski anionski transportni polipeptid 1B1 (*OATP1B1*), kodiran genom *SLCO1B1* čija genetička varijabilnost može uzrokovati razvoj nuspojava pri primjeni statina. *OATP1B1* je jedini prijenosnik za koji danas postoje kliničke smjernice za doziranje prema genotipu (115). Genetički uvjetovana varijabilnost aktivnosti i funkcije prijenosnika, moduliranjem apsorpcije, raspodjele i izlučivanja lijeka iz organizma može rezultirati varijabilnom bioraspoloživosti i posljedično učinkovitosti lijeka te rizikom razvoja rezistencije ili nuspojava (105,116). Funkcija prijenosnika ovisi i o istodobnoj primjeni drugih lijekova supstrata koji mogu inhibirati, ali i inducirati njihovu aktivnost (105,107,117).

1.2.6.1. Polimorfizmi *ABCB1* (*P-glikoproteina / MDR1*)

P-glikoprotein (P-gp), još poznat kao *ABCB1* i *MDR1*, kodiran genom *ABCB1/MDR1* (engl. *multi-drug resistance 1*) ima funkciju transmembranske izbacivačke (engl. *efflux*) crpke i modulira bioraspoloživost primijenjenih lijekova supstrata (118). Nalazi se u brojnim tkivima i organima poput crijeva, posteljice, bubrega, jetara, gušterače, testisa, krvno-moždane barijere, limfocita i makrofaga, ali i u tumorskim stanicama. U crijevima P-gp kontrolira apsorpciju lijeka nakon ingestije, sudjeluje u bilijarnoj i renalnoj sekreciji supstrata i štiti organizam od ksenobiotika. Pojačana ekspresija P-gp može uzrokovati povećanu eliminaciju i smanjenje unutarstaničnog nakupljanja mnogih onkoloških lijekova, što može dovesti do rezistencije.

Nasuprot tome, smanjena aktivnost P-gp može rezultirati povećanom toksičnošću lijekova (105). P-gp se također pokazao kao važan medijator u interakcijama lijek – lijek (107).

Polimorfizmi *ABCB1* povezuju se s varijabilnom farmakokinetikom i farmakodinamikom brojnih lijekova supstrata *ABCB1*. Najviše su proučavana tri česta polimorfizma gena *ABCB1*: c.1236C>T (rs1128503, p.Gly412=) na eksonu 12, c.2677G>T/A (rs2032582, p.Ser893Ala/Thr) na eksonu 21 i c.3435C>T (rs1045642, p.Ile1145=) na eksonu 26 (119). Ovi su polimorfizmi u jakoj neravnotežnoj vezi (LD, od engl. *linkage disequilibrium*) i stoga se često proučavaju kao haplotip (120). Polimorfizam c.2677G>T/A je nesinonimni SNP i rezultira promjenom jedne aminokiseline u proteinu (121). Nasuprot tome, polimorfizmi c.1236C>T i c.3435C>T sinonimni su SNP-ovi koji nemaju učinka na slijed aminokiselina (122). Iako je c.3435C>T SNP tihi (engl. *silent*) polimorfizam, pokazano je da rezultira smanjenom razinom mRNA, smanjenjem stabilnosti mRNA i stvaranjem proteina s promijenjenom konformacijom i funkcijom (123). Polimorfizmi *ABCB1* 3435C>T i 2677G>T/A utječu na ekspresiju P-gp u duodenumu i mijenjaju apsorpciju i/ili dispoziciju mnogih lijekova (109,124,125). S obzirom da 2677G>T/A polimorfizam rezultira promjenom aminokiseline moguće je da utječe na ekspresiju P-glikoproteina (126).

Postoji znatna razlika u učestalosti varijantnih alela i haplotipova *ABCB1* u različitim populacijama, npr. genotip visoke aktivnosti (3435 CC) učestaliji je u crnoj rasi (i do 83%) i žutoj rasi (oko 35%) u odnosu na bijelu rasu (oko 25%) (127,128). Upravo ovi najčešće istraživani polimorfizmi povezuju se s utjecajem na biorasploživost lijekova supstrata P-gp, a uz varijante gena *CYP3A4* i *CYP3A5* mogu u znatnoj mjeri modificirati izloženost lijekovima koji su njihovi zajednički supstrati (129).

Iako su polimorfizmi i haplotipovi *ABCB1* povezani s promjenama u dispoziciji i odgovoru na lijekove, uključujući nuspojave različitih supstrata *ABCB1* kod različitih etničkih populacija, rezultati su zasada kontradiktorni i imaju ograničenu kliničku važnost (119). Tako su uočene znatno niže koncentracije lijekova u nositelja genotipa 3435 TT u odnosu na genotip CC (105). Polimorfizmi se najčešće povezuju s promjenjivom oralnom biorasploživosti digoksina (124), ciklosporina, takrolimusa (118), s nuspojavama ili rezistencijom na različite lijekove-supstrate P-glikoproteina (antiepileptici) (130,131).

Postoje također dokazi o utjecaju polimorfizama *ABCB1* na farmakokinetičke parametre antidepresiva (132–134) te antipsihotika (134,135) poput klozapina, olanzapina i risperidona. Dvije studije pokazale su povezanost genotipa *ABCB1* s koncentracijama klozapina: nositelji C3435T CC imali su niže koncentracije klozapina ujednačene prema dozi u usporedbi s nositeljima C3435T CT ili TT (136); u drugoj studiji C3435T TT homozigoti imali su 1,6 puta

veću srednju vrijednost koncentracije klopapina u usporedbi s CC homozigotima, a homozigotni nositelji alela divljeg tipa za polimorfizam G2677T/A GG su imali niže koncentracije u usporedbi s nositeljima varijantnih alela (137) što nije potvrđeno u prethodnoj studiji. U studiji Lee i sur. koja je ispitivala povezanost 27 gena kandidata s 127 varijanti s odgovorom na terapiju klopapinom u korejskih pacijenata, pronađene su značajne povezanosti, aleli *ABCB1* rs7787082 G i rs10248420 bili su češći u pacijenata u kojih je izostao odgovor na terapiju (138). Također je istraživana povezanost polimorfizama *ABCB1* s nuspojavama, agranulocitozom klopapina (139).

Studije s olanzapinom također nisu jednoznačne. Dvije manje studije pokazale su povezanost genotipa *ABCB1* C3435T TT i haplotipa *ABCB1* 1236T/2677T/3435T s povećanim koncentracijama lijeka u serumu (140,141), dok jedna veća studija u švedskoj populaciji nije dokazala povezanost C3435T niti G2677T s razinama olanzapina u plazmi (142). Kuzman Rojnić i sur. dokazali su povezanost varijantnih alela *ABCB1* 2677T i 3435T s razvojem metaboličkih nuspojava, odnosno s povećanjem tjelesne težine (143) i većim porastom razine glukoze u krvi nakon primjene olanzapina (109). Također našli su i povezanost *ABCB1* 2677T (graničnu značajnost za alel 3435T) s boljim odgovorom na terapiju, odnosno pozitivnim postotnim promjenama vrijednosti PANSS (144).

Dokazi o utjecaju polimorfizama *ABCB1* na farmakokinetiku i kliničke ishode risperidona su opisani dalje u ovom poglavlju pod naslovom „Farmakogenetika risperidona“.

Polimorfizmi *ABCB1* uz varijante niske aktivnosti gena *CYP3A4* i *CYP3A5* mogu u znatnoj mjeri modificirati izloženost lijekovima koji su njihovi zajednički supstrati.

1.2.6.2. Polimorfizam *ABCG2*

ABCG2 je prepoznat kao vrlo važan prijenosnik čija je aktivnost ovisna o ATP-u. Član je natporodice ABC i porodice *ABCG*, prvotno otkriven u tumorskim stanicama i poznat pod nazivom BCRP (engl. *breast cancer resistance protein*). Najviše je eksprimiran u gastrointestinalnom sustavu, jetri, bubrezima, mozgu, placenti, srcu i testisima (145,146). *ABCG2* transportira endogene i egzogene supstrate, a njegov utjecaj na farmakokinetiku dodatno je potenciran u slučaju supstrata slabe pasivne permeabilnosti (147). Njegova primarna uloga je funkcija izbacivačke pumpe na apikalnoj membrani enterocita, umanjujući intestinalnu apsorpciju slabo permeabilnih tvari, te također aktivni prijenos/izbacivanje supstrata u kanalićima između stanica, transportirajući ih iz hepatocita u žuč. Za razliku od intestinalnog

ABCG2, koji djeluje na razini apsorpcije tvari, prijenos na razini jetra-žuč glavni je čimbenik hepatičkog klirensa lijekova. ABCG2 dodatno sudjeluje kao transporter u endotelnim stanicama moždanih kapilara, u stanicama bubrežnog proksimalnog tubula i sincicotrofoblastima placentе (146). Opisuje se i sve veći broj supstrata ovog prijenosnika koji uključuje ne samo lijekove već i endogene supstrate kao što je mokraćna kiselina (148). Dodatno, ABCG2 se pokazao kao važan medijator u interakcijama lijek-lijek.

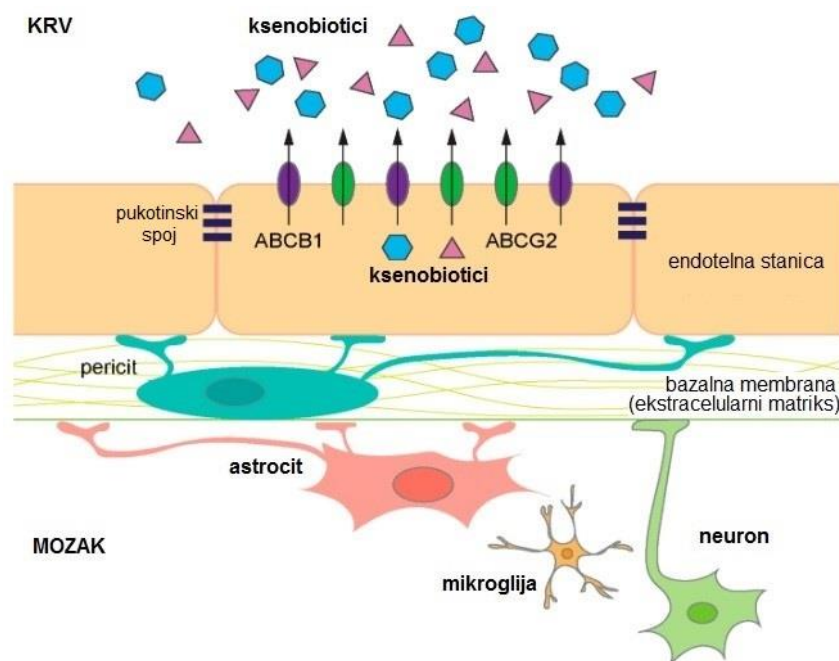
Studije su pokazale da polimorfizam *ABCG2* c.421C>A (rs2231142, p.Gln141Lys) može rezultirati smanjenom transportnom aktivnosti. Nadalje zapažena je značajna varijabilnost u učestalosti varijantnog alela među populacijama i rasama. Tako je zabilježena veća učestalost u Azijata (30% u Japanaca) nego u bijelaca (10%) (149). U studijama *in vitro* je pokazano kako je u nositelja varijantnog oblika gena *BCRP/ABCG2* održana ekspresija mRNA, ali je zbog povećane podložnosti razgradnji u proteasomima uočeno za 50-70% smanjenje ekspresije i funkcije proteina (150). Stoga se varijantni oblici gena *ABCG2*, zbog smanjenog prijenosnog kapaciteta proteina koji djeluje kao izbacivačka crpka na membranama stanica, povezuju s povećanom sistemskom izloženosti lijekova supstrata poput sunitiniba, sulfasalazina, rosuvastatina, atorvastatina (112,146). Također su ispitivani i drugi polimorfizmi *ABCG2* (G406R, F431L, S441N, P408L, F489L, M515R, L525R, A528T i T542A) s obzirom na njihovu ulogu u ekspresiji i funkciji proteina (151). Rezultati su pokazali kako je transmembranska regija ABCG2 osjetljiva na aminokiselinsku supstituciju što u nositelja ovih varijantnih alela može rezultirati značajno promijenjenom farmakokinetikom lijekova koji su supstrati ABCG2.

ABCG2 se pokazao kao važan medijator u interakcijama lijek-lijek, što su prepoznala različita regulatorna tijela poput FDA i EMA (152,153). Identificiran je veliki broj inhibitora transportera ABCG2 s različitom kemijskom strukturom (154), te postoje prilično uvjerljivi dokazi koji ukazuju na važnost ABCG2 transportera kao medijatora u interakcijama lijek-lijek u ljudi (106). Klinički dokazi o inhibiciji ABCG2 kao glavnog mehanizma interakcije lijek-lijek s potencijalnim posljedicama u djelotvornosti i sigurnosti lijekova rezultirali su prepoznavanjem ovog transportera, kao bitnog farmakokinetičkog čimbenika i od strane internacionalnog konzorcija za transportere (engl. *The International Transporter Consortium*) što ne smije biti zanemareno u razvoju novih lijekova (106). Osim konzorcija, EMA i FDA izdale su preporuke za sve lijekove u istraživanju da se provede ispitivanje jesu li supstrati ili inhibitori transportera ABCG2, te utvrdi njihov potencijal stupanja u interakcije na razini ABCG2 (152,153). Ove smjernice bi posebno mogle biti važne u slučajevima kada kandidatni

lijek ima značajnu topljivost ali oslabljenu permeabilnost zbog aktivnosti izbacivanja putem ABCG2 transportera.

Osim interakcija lijekova na razini prijenosa putem ABCG2 koje mogu značajno modulirati farmakokinetiku, istraživanja ukazuju i na važnost interakcija gen-gen koje mogu modulirati farmakokinetičke parametre. To se poglavito odnosi na interakcije gena koji kodiraju enzime uključene u metabolizam (CYP) te prijenos lijekova (transporteri ABC). Ipak treba reći da su procjene o ulozi BCRP/ABCG2 u interakcijama lijek-lijek ograničenog dometa zbog mogućeg preklapanja mehanizma interakcija s drugim transportnim (ABCB1) i metaboličkim putevima poput enzima CYP (147).

Interakcija metaboličkih enzima i transportera na krvno-moždanoj barijeri može dodatno doprinijeti varijabilnim koncentracijama i u konačnici učincima lijekova s djelovanjem u CNS (155). Osim toga interakcija membranskih prijenosnika krvno-moždane barijere, poput ABCB1 i ABCG2, koji se nalaze na luminalnoj strani endotelnih stanica mogu sprječavati ulazak ksenobiotika (zajedničkih supstrata) u mozak (slika 3.) (156).



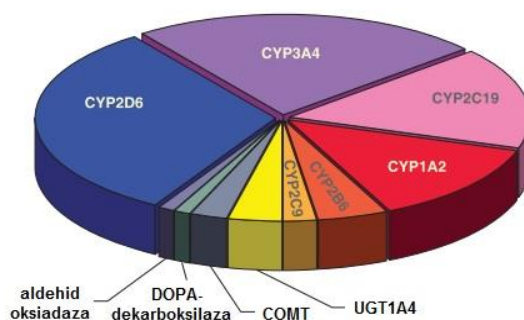
Slika 3. Membranski prijenosnici ABCB1 i ABCG2 krvno-moždane barijere (prilagođeno prema Wijaya i sur. (156))

1.2.7. Farmakogenomika u psihijatriji

1.2.7.1. Farmakogenetički biljezi u psihijatriji

Primjena farmakogenetičkih testova u psihijatriji još nije dio standardne prakse, ali njihova se upotreba sve više povećava i mogu igrati ulogu u unaprjeđenju pristupa preciznoj medicini kroz strategije doziranja i optimizaciju liječenja antipsihoticima. Njihova je klinička korisnost i dalje područje intenzivnih istraživanja (157). Do danas su farmakogenetička istraživanja povezana s liječenjem psihotropnim lijekovima identificirala brojne polimorfizme gena uključenih u njihovu farmakokinetiku i farmakodinamiku, što je rezultiralo s dostupnosti komercijalnih testova. Neki antidepresivi (citalopram, vortiooksetin), antipsihotici (aripiprazol, breksipiprazol, iloperidon, pimozid) i drugi lijekovi (atomoksetin, karbamazepin, valproična kiselina) imaju važne farmakogenetičke informacije navedene u njihovim uputama o lijeku prema kojima treba prilagoditi dozu ili je potrebno testiranje za odabir/isključenje lijeka (65). Međutim, još su uvijek nedostatne smjernice o tome kako najbolje protumačiti i primijeniti te informacije. Udruženja za implementaciju farmakogenetike u kliničku praksu poput *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC)* i *The Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG)* najintenzivnije su uključena u izradu primjenjivih uputa i smjernica. Trenutno je samo nizozemsko društvo (DPWG) izdalo smjernice za antipsihotike (158), dok su DPWG i CPIC objavili smjernice za doziranje antidepresiva. Važno je razumjeti kliničke implikacije i ograničenja farmakogena koji se mogu analizirati u svrhu kliničke primjene, što zahtijeva od kliničara razumijevanje temeljne biologije farmakogenetičkih varijacija, kao i njihove poveznice s ishodima liječenja (159).

Najvažniji enzimi CYP za metabolizam psihotropnih lijekova jesu CYP2C19 i CYP2D6, te se trenutne smjernice za doziranje temelje na njihovu fenotipu. Genetički uvjetovane varijacije aktivnosti enzima CYP mogu rezultirati u varijabilnosti farmakokinetičkih parametara psihotropnih lijekova te je za neke lijekova moguća prilagodba doze prema genotipu/fenotipu CYP2C19 i/ili CYP2D6 (157). Psihotropni lijekovi također se metaboliziraju putem CYP1A2, CYP2C9, CYP2B6 i CYP3A (slika 4.) (93). Ovi se lijekovi nerijetko metaboliziraju preko nekoliko metaboličkih enzima. Iako je uvriježeno stajalište da su za tumačenje varijabilnosti važni enzimi primarnog i najopsežnijeg metaboličkog puta, treba imati na umu da kod promjene brzine metabolizma (bilo genetički uvjetovane, bilo zbog interakcije s okolišem i lijekovima) postaje važna i uloga sekundarnih metaboličkih puteva. Pregled primarnih i sekundarnih metaboličkih puteva za lijekove koji se koriste u psihijatriji nalazi se u tablicama 3. – 5.



Slika 4. Proporcionalna podjela psihotropnih lijekova metaboliziranih pojedinim enzimima (prilagođeno prema Stingl i sur. (93))

CYP2D6 je važan enzim koji služi kao primarni metabolički put za mnoge antipsihotike. Aktivnost CYP2D6 znatno utječe na biotransformaciju lijekova –supstrata; povećana ili smanjena funkcija CYP2D6 utječe na farmakokinetiku lijekova – supstrata i potencijalno utječe na ishode liječenja povezane s dozom lijeka. Opisi važnosti statusa metabolizatora za učinke antipsihotika različiti su, u rasponu od općih komentara do određenih implikacija na doziranje, osobito za novije lijekove. DPWG smjernice također preporučuju promjene doze za aripiprazol, haloperidol, zukloptentisol dok za risperidon navode da nema dovoljno dokaza za prilagodbu doze (158,160)

Mnoga su se istraživanja bavila ispitivanjem odnosa genotipa CYP2D6 i koncentracije antipsihotika u plazmi te ima podataka da su koncentracije i do 4,5 puta veće u PM u odnosu na EM za aripiprazol, risperidon, haloperidol, perfenazin i tioridazin (161). Postoje važna razmatranja koja se odnose na farmakokinetičke implikacije s obzirom na farmakogenetiku metabolizma. Neki antipsihotici imaju aktivne metabolite (npr. aripiprazol, risperidon) i stoga treba uzeti u obzir izloženost izvornom lijeku (engl. *parent drug*) i aktivnom metabolitu kada se razmatraju kliničke implikacije.

Studije povezanosti između polimorfizama CYP2D6 i kliničke učinkovitosti ili sigurnosti dale su proturječne rezultate. Neke studije nisu polučile bitne rezultate s obzirom na odnos između genotipa CYP2D6 i učinkovitosti. Međutim, postoje brojna ograničenja studija koja čine upitnima tumačenja ishoda studija (ograničenja uključuju neproaktivan dizajn studija, mali broj bolesnika, heterogene metode određivanja fenotipa, heterogene populacijske skupine te druge čimbenike, poput interakcija s istodobno primijenjenim lijekovima). Znatno broj studija pokazao je povezanost polimorfizma CYP2D6 s neželjenim učincima, osobito ekstrapiramidnim simptomima poput tardivne diskinezije (TD). Osim toga, dovoljno je dokaza

o povezanosti nuspojava određenih lijekova s fenotipovima; na primjer, osobe s fenotipom CYP2D6 PM (slabi/spori metabolizam) koji uzimaju haloperidol imaju povećan rizik za ekstrapiramidne simptome, a CYP2D6 PM koji uzimaju risperidon imaju povećani rizik za produljenje QT intervala i/ili parkinsonizam (161).

CYP2D6 sudjeluje u metabolizmu brojnih antidepresiva. Dezipramin, doksepin, fluoksetin, paroksetin i venlafaksin primarno se metaboliziraju putem CYP2D6, a amitriptilin, bupropion, duloksetin, imipramin znatno, ali ne isključivo (77). CYP2D6 minimalno sudjeluje u metabolizmu citaloprama, escitaloprama, fluvoksamina i sertralina. Aktualne CPIC smjernice opisuju doziranje atomoksetina i antidepresiva prema genotipu CYP2D6 (87–89,92).

CYP2C19 je prvenstveno važan za farmakogenetiku antidepresiva jer čini primarni metabolički put mnogih antidepresiva kao što su amitriptilin, citalopram, escitalopram, klomipramin. Ovaj enzim znatno sudjeluje (ali ne isključivo) i u metabolizmu doksepina, imipramina, moklobemida, nortriptilina i sertralina, dok minimalno sudjeluje u metabolizmu venlafaksina. Aktualne CPIC smjernice za doziranje antidepresiva prema genotipu CYP2C19 postoje za tricikličke antidepresive i inhibitore ponovne pohrane serotonina (88,89,92). CYP2C19 relativno malo sudjeluje u metabolizmu antipsihotika. Klozapin se dijelom metabolizira putem CYP2C19, dok je uloga ovog enzima u metabolizmu tioridazina minimalna (77).

CYP3A4 uključen je u metabolizam velikog dijela psihotropnih lijekova (slika 4.) te drugih lijekova poput anksiolitika i stabilizatora raspoloženja (93). CYP3A4 i CYP3A5 imaju neka preklapanja u metabolizmu supstrata i najzastupljeniji su CYP3A enzimi u odraslih osoba. Premda je aktivnost enzima CYP3A4 i CYP3A5 vrlo varijabilna u općoj populaciji, većina identificiranih alela *CYP3A4* ima nisku učestalost ili ima minimalne učinke na aktivnost enzima. Osim toga, još ne postoji jednoznačan metabolički fenotip. Sve je to razlog nedovoljnim dokazima o ulozi polimorfizama CYP3A u farmakokinetici i odgovoru na terapiju ovim lijekovima. Također, vrlo je malo podataka o farmakokinetici psihotropnih lijekova i ulozi CYP3A5 te su potrebna daljnja istraživanja o njegovoj mogućoj ulozi u metabolizmu supstrata CYP3A4. Još je manje podataka o polimorfizmima ekspresora CYP3A5 (npr. *1/*3 i *1/*1) koji za posljedicu mogu imati pojačani metabolizam putem alternativnih metaboličkih puteva ovih lijekova (npr. risperidona) (162).

CYP1A2 sudjeluje u metabolizmu nekoliko antidepresiva i antipsihotika. Važnu ulogu ima u metabolizmu antidepresiva fluvoksamina, koji se metabolizira isključivo putem CYP1A2.

Sudjeluje dijelom u metabolizmu duloksetina, imipramina i klomipramina te minimalno amitriptilina, koji se metaboliziraju i drugim metaboličkim putevima (CYP2D6, CYP3A4, CYP2C19 i dr.). Ovaj enzim je također važan za metabolizam antipsihotika klozapina i olanzapina te primarno odgovoran za njihov metabolizam, i dijelom i za metabolizam klorpromazina, iako se ovi lijekovi metaboliziraju i drugim metaboličkim putevima. Haloperidol i tioridazin se također mogu metabolizirati putem CYP1A2 (77).

Učinci genskih polimorfizama CYP1A2 na enzimsku aktivnost u usporedbi s genima koji kodiraju druge enzime CYP (npr. CYP2D6) nisu dobro razjašnjeni. Dodatno, trenutno nema opće prihvaćene metode za definiranje metaboličkih skupina CYP1A2 prema genotipu. Osim toga, aktivnost CYP1A2 može biti pod snažnim utjecajem okolišnih čimbenika (indukcija duhanom, inhibicija oralnim kontraceptivima), što čini razumijevanje učinka genotipa CYP1A2 kompleksnim (163).

CYP2B6 ima ulogu u metabolizmu antidepresiva bupropiona u hidroksi-bupropion. Njegov varijantni alel *CYP2B6*6* se povezuje sa smanjenim metabolizmom bupropiona, a *CYP2B6*4* s pojačanim metabolizmom. Hidroksi- metabolit bupropiona metabolizira se putem CYP2D6 pa su moguću nuspojave u PM CYP2D6 uslijed smanjena eliminacije ovog lijeka (164).

Enzimi uridin-difosfat glukuroniltransferaze (UGT), enzimi faze II biotransformacije također su važni za biotransformaciju antipsihotika poput klozapina, olanzapina i haloperidola. Klozapin prolazi opsežnu biotransformaciju, a jedan od njegovih glukuronida je aktivni metabolit N-desmetilklozapin čije nakupljanje potencijalno može uzrokovati agranulocitozu koja je prisutna u oko 1% pacijenata (165). Metabolizam olanzapina dijelom ovisi o UGT enzimima, a dokazana je uloga UGT1A4 čiji se varijantni alel *3 povezuje sa smanjenom izloženosti olanzapinu zbog pojačane glukuronidacije (166). UGT1A4 i UGT2B10 sudjeluju u metabolizmu tricikličkih antidepresiva. Antiepileptici koji se koriste kao stabilizatori raspoloženja poput lamotrigina i valproične kiseline također se metaboliziraju putem UGT enzima (npr. UGT1A4, UGT2B7) (167,168).

Od farmakodinamičkih biljega koji su istraživani do sada najviše dokaza ima za polimorfizme serotoninskog transportera SERT (*5-HTT*, *SLC6A4*), a klinički su značajna dva polimorfizma s utjecajem na ekspresiju gena *SLC6A4*: *STin2* (169) i trialelni lokus *5-HTTLPR* (*SERTPR*, rs4795541) (170,171). Studije u europskoj populaciji pokazale su da pacijenti koji su nositelji *long* alela *5-HTTLPR*, imaju veću vjerojatnost za bolji odgovor na terapiju SSRI (170,172,173). Polimorfizmi serotoninških receptora *HTR1A*, *HTR2A*, *HTR2C* i *HTR7* mogu objasniti neke

interindividualne razlike u odgovoru na liječenje antidepresivima i antipsihoticima (109,174,175).

Također postoje istraživanja o povezanosti polimorfizama dopaminskog transportera *DAT* (*SLC6A3*) (176) i dopaminskih receptora s učinkovitosti i nuspojavama antipsihotika: *DRD2 Taq1A* (rs1800497) (177,178), *DRD2* -141 Ins/Del (c.-486_-485inC; rs1799732) (179), *DRD3* (Ser9Gly, c.25A>G, rs6280) (179,180) .

Sve više se istražuje polimorfizam *COMT* Val108Met (rs 4680, A158G) koji utječe na aktivnost enzima katehol-O-metiltransferaze (*COMT*) (179). S obzirom na povezanost shizofrenije i smanjene aktivnosti dopamina u prefrontalnom korteksu, Val108Met je jedan od najistraživijih polimorfizama u shizofreniji (181). Međutim dokazi u učincima ovih polimorfizama nisu ujednačeni i dovoljni za kliničku primjenu.

Tablica 3. ANTIPSIHOTICI: enzimi primarnih i sekundarnih metaboličkih puteva

Lijek	Primarni metabolički put	Sekundarni metabolički put
aripiprazol	CYP2D6, CYP3A4	
asenapin	UGT1A4, CYP1A2	CYP2D6, CYP3A4
brekspiprazol	CYP2D6, CYP3A4	
flufenazin	CYP2D6	CYP1A2
haloperidol	CYP2D6	CYP1A2, CYP3A4, UGT1A9
kariprazin	CYP3A4	CYP2D6
klozapin	CYP1A2, CYP3A4	CYP2C19, CYP2D6
klorpromazin	CYP2D6	CYP1A2, CYP3A4
kvetiapin	CYP3A4	CYP2D6
iloperidon	CYP2D6, CYP3A4	
loksapin	CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4	
lurasidon	CYP3A4	
olanzapin	CYP1A2	CYP2D6
perfenazin	CYP2D6	
pimozid	CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4	
risperidon	CYP2D6	CYP3A4
tioridazin	CYP2D6	CYP1A2, CYP2C19
tiotiksen	CYP1A2	
trifluperazin	CYP1A2	
ziprasidon	CYP3A4	CYP1A2, CYP2D6

Tablica 4. ANTIDEPRESIVI: enzimi primarnih i sekundarnih metaboličkih putova

Lijek	Primarni metabolički put	Sekundarni metabolički put
agomelatin	CYP1A2	CYP2C9, CYP2C19
amitriptilin	CYP2C19	CYP2D6, CYP2C9, CYP3A4
bupropion	CYP2B6	CYP3A4, CYP2E1, CYP2C9
buspiron	CYP3A4	
citalopram	CYP2C19	CYP3A4, CYP2D6
desipramin	CYP2D6	
desvenlafaksin	CYP3A4	
doksepin	CYP2D6	CYP2C19
duloksetin	CYP1A2	CYP3A4, CYP2D6
escitalopram	CYP2C19	CYP3A4, CYP2D6
fluoksetin	CYP2D6	CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4
fluvoksamin	CYP1A2	CYP2D6
hiperforin / gospina trava	CYP3A4	
imipramin	CYP2C19	CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2
moklobemid	CYP2C19	CYP2D6
maprotilin	CYP2D6	CYP1A2
klomipramin	CYP2C19	CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6
nefazodon	CYP3A4	CYP2D6
mirtazapin	CYP3A4	CYP2D6, CYP1A2
nortriptilin	CYP2D6	CYP2C19
reboksetin	CYP3A4	
paroksetin	CYP2D6	
sertralin	CYP2B6	CYP2D6, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19
tianeptin	CYP3A4	
trazodon	CYP3A4	CYP2D6
venlafaksin	CYP2D6	CYP2C19
voritoksetin	CYP2D6	CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19

Tablica 5. ANKSIOLITICI I ANTIKONVULZIVI: enzimi primarnih i sekundarnih putova

Lijek	Primarni metabolički put	Sekundarni metabolički put
alprazolam	CYP3A4	CYP2C9
diazepam	CYP2C19	CYP2C9
fenitoin	CYP2C9	CYP2C19
fenobarbiton	CYP2C9	CYP2C19
karbamazepin	CYP3A4	
klonazepam	CYP3A4	
klordiazepoksid	CYP3A4	
lamotrigin	UGT2B7	
valproična kiselina	UGT2B7, UGT1A4	CYP2C9, CYP2C19

1.2.7.2. Interakcije psihofarmaka

Brojne tvari mijenjaju ekspresiju gena enzima CYP450 te posljedično induciraju ili inhibiraju njihovu aktivnost. Takav učinak mogu imati drugi lijekovi te tvari iz duhanskog dima i hrane. Ove su interakcije posljedica farmakokinetičkih obilježja lijeka koja se mogu izmjeriti (koncentracije u plazmi i serumu, sustavna izloženost, klirens te površine ispod krivulje koncentracija-vrijeme). Antipsihotici, u načelu, ne utječu na farmakokinetiku drugih lijekova. Međutim, brojni lijekovi utječu na farmakokinetiku antipsihotika. Neki su antidepresivi inhibitori enzima CYP, a brojni drugi lijekovi utječu na farmakokinetiku antidepresiva (182–184).

S obzirom da su za metabolizam psihofarmaka najvažniji CYP1A2, CYP2D6 i CYP3A4 promjena aktivnosti ovih enzima može dovesti do promjena koncentracija antipsihotika. Razlike u aktivnosti ovih enzima mogu biti uvjetovane genskim polimorfizmima, dobi i drugim tvarima. Dodavanje induktora enzima dovodi do gubitka učinka, a inhibitora enzima do nuspojava te potencijalne toksičnosti, a u teškim slučajevima i simptoma intoksikacije. Uvođenje induktora CYP3A4 karbamazepina može rezultirati gubitkom učinka, odnosno pogoršanjem psihotičnih simptoma (zbog sniženja koncentracije antipsihotika) (182).

Također moguće su interakcije primjenom inhibitora i induktora prijenosnika lijekova poput P-glikoproteina (185) ali i ABCG2 (168).

Flockhart i sur. sa Sveučilišta u Inidiani (SAD) godinama skupljaju i redovito ažuriraju dokaze o interakcijama lijekova i enzima CYP 450 *Drug Interactions Flockhart Table* (186), vodeći evidenciju o supstratima, inhibitorima i induktorima.

Inhibitori se najčešće dijele na tri skupine ovisno o utjecaju na farmakokinetiku (površine ispod krivulje koncentracija-vrijeme (AUC od engl. *area under curve*) i klirens lijeka:

- snažni inhibitori - uzrokuju porast AUC >5 puta ili smanjenje klirensa za 80%
- umjereni inhibitori - uzrokuju porast AUC >2 puta ili smanjenje klirensa za 50-80%
- slabi inhibitori - uzrokuju porast AUC >1,25 puta ili smanjenje klirensa za 50%

U literaturi postoje dokazi o utjecaju drugih lijekova na farmakokinetiku risperidona. Najčešće se radi o inhibitorima CYP2D6 (39,187,188), ili o inhibitorima (189) i induktorima CYP3A4 (najčešće se radi o stabilizatorima raspoloženja poput natrij valproata i karbamazepina) (165,190–192).

1.2.7.3. Farmakogenetika risperidona

Prethodne studije izvijestile su o utjecaju polimorfizama u ADME genima (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija), uključujući *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1*, *ABCG2* na metabolizam risperidona (koncentracije u krvi), klinički učinak i nuspojave.

Potvrđene su povezanosti varijanti *CYP2D6* i koncentracija ujednačenih prema dozi (C/D) za: risperidon i omjer risperidon/9-OH-risperidon (193–196); risperidon, 9-OH-risperidon i ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) (197); omjer risperidon/9-OH-risperidon (198,199); ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) (200–202).

Nekoliko studija u azijskim populacijama pokazalo je značajnu povezanost genotipa *CYP2D6* s razinama risperidona u plazmi, ali ne i s razinama 9-OH-risperidona (196,199,203), dok je jedna studija pokazala utjecaj polimorfizama *CYP2D6* na risperidon i 9-OH-risperidon, ali ne i razine ukupnog aktivnog lijeka (204).

Osim farmakogenetičke predispozicije (*CYP2D6* i *ABCB1*), potvrđena je i važna uloga okolišnih čimbenika poput primjene drugih lijekova (inhibitora i induktora) (39). Čini se da su dodatno ženski spol i dob povezani sa sporijom eliminacijom risperidona, posebno u *CYP2D6* sporih metabolizatora (PM) (205).

U prvoj studiji koja je istraživala učinak genotipa *CYP2D6* u bolesnika liječenih s LAI-RIS, koncentracije ukupnog aktivnog lijeka i omjer risperidon/9-OH-risperidon bili su značajno veći u sporih metabolizatora *CYP2D6* (206). Dvije druge studije izvještavaju o nižim razinama risperidona u vrlo brzih metabolizatora *CYP2D6* (UM) (207) i subterapijskim koncentracijama ukupnog aktivnog lijeka (208).

Podaci o utjecaju polimorfizama gena *CYP3A4/5* na liječenje risperidonom još uvijek nisu toliko uvjerljivi. U istraživanjima u azijskim populacijama, genotip *CYP3A5* utjecao je na razine risperidona, 9-OH-risperidona i ukupnog aktivnog lijeka u plazmi. Non-ekspresori *CYP3A5* su imali veće koncentracije u odnosu na ekspresore (36,204). Studije u europskim populacijama nisu dokazale takve učinke (39,48,193,200,209). Podaci za LAI-RIS nisu pokazali povezanost s varijantama *CYP3A* (207). Studije *in vitro* i *in vivo* u japanskoj populaciji nisu potvrdile povezanost risperidona s aktivnošću *CYP3A* (210).

Podatci o ulozi polimorfizama gena transportera lijekova *ABCB1* i *ABCG2* za liječenje risperidonom prilično su nedosljedni. Brojnije su studije koje su istraživale polimorfizme *ABCB1*. Neke studije su pokazale povezanost alela *ABCB1* niske aktivnosti s povećanim omjerom risperidon/9-OH-risperidon (39), s C/D aktivnim lijekom (197), 9-OH-risperidonom (211). Ostali nisu potvrdili te povezanosti (200,207). Dok su neke studije utvrdile povezanost

između polimorfizama *ABCB1* i učinkovitosti i/ili nuspojava risperidona (197,212–215), druge nisu potvrdile ove nalaze (207,209). Jedno istraživanje s LAI-RIS nije pokazalo značajne učinke varijanti *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T) na liječenje risperidonom (207), dok drugo provedeno u kineskoj populaciji izvještava o statistički graničnoj značajnosti (215). Neki rezultati studija ukazuju na važnost kombiniranog učinka gena metaboličkih enzima i prijenosnika lijekova. Osim značajnog učinka polimorfizama *CYP2D6*, ispitanici homozigotni za haplotip *ABCB1* 3435T / 2677T / 1236T imali su značajno niže razine C/D 9-OH-risperidona ($P=0,026$) i C/D aktivnog lijeka ($P=0,028$) u odnosu na nositelje drugih genotipova *ABCB1* (193). Jedna druga studija je uz varijantne alele *CYP2D6* i *ABCB1*, istakla dob kao važan čimbenik varijabilnosti biorasploživosti risperidona (216). U pacijenata azijskog podrijetla, nositelja genotipa *CYP2D6* *10/*10, genotip *ABCB1* 3435C>T je pokazao značajan utjecaj na C_{max} i AM (217). Procijenjeni doprinos varijanti *CYP2D6**10 i *ABCB1* 3435C>T u populacijskoj kinetici risperidona i 9-OH- risperidona, ukazuje da interakcije gena *CYP2D6* i *ABCB1* mogu značajno modulirati farmakokinetiku lijeka (218).

Podatci o farmakogenetici risperidona povezani s varijantama gena transportera *ABCG2* su malobrojni. Studija s LAI-RIS izvijestila je da istodobna primjena inhibitora *ABCG2* ketokonazola, može povećati okupiranost D2 receptora (47), što indirektno ukazuje na produljenu biorasploživost risperidona i potencijalnu ulogu prijenosa pomoću *ABCG2* na krvno-moždanu barijeru. Nedavno istraživanje u populaciji pedijatrijskih bolesnika testiranih na varijante *CYP3A*, *CYP2D6*, *ABCB1* i *ABCG2* i njihove povezanosti s farmakokinetikom i nuspojavama risperidona, otkrilo je povezanost varijante *ABCG2* c.421 C>A s manjim vrijednostima C/D risperidona i većom vjerojatnosti razvoja poremećaja metabolizma i prehrane (48).

Podatci o ulozi farmakogena na učinkovitost i nuspojave risperidona nisu jednoznačni, ponekad su i kontradiktorni. Ustanovljene su značajne korelacije između *CYP2D6* sporih metabolizatora s: većim kliničkim poboljšanjem vrijednosti PANSS (213), većom učestalosti nuspojava risperidona i prekidom liječenja (219), većom učestalosti neuspješnog ishoda liječenja (također u korelaciji s vrlo brzim metabolizatorima) (202) i propisivanjem različitih prosječnih doza risperidona (202,209). Rezultati također pokazuju da fenotip sporih metabolizatora *CYP2D6*, zajedno s induktorima ili inhibitorima enzima *CYP* (219) i dobi (205) imaju glavnu ulogu u individualizaciji doza risperidona. Također nalazimo i radove u kojima ove korelacije nisu dokazane (213,220).

Na temelju dostupnih rezultata relevantnih studija možemo zaključiti da potencijal farmakogenetike za optimizaciju terapije risperidonom ostaje i dalje nejasan.

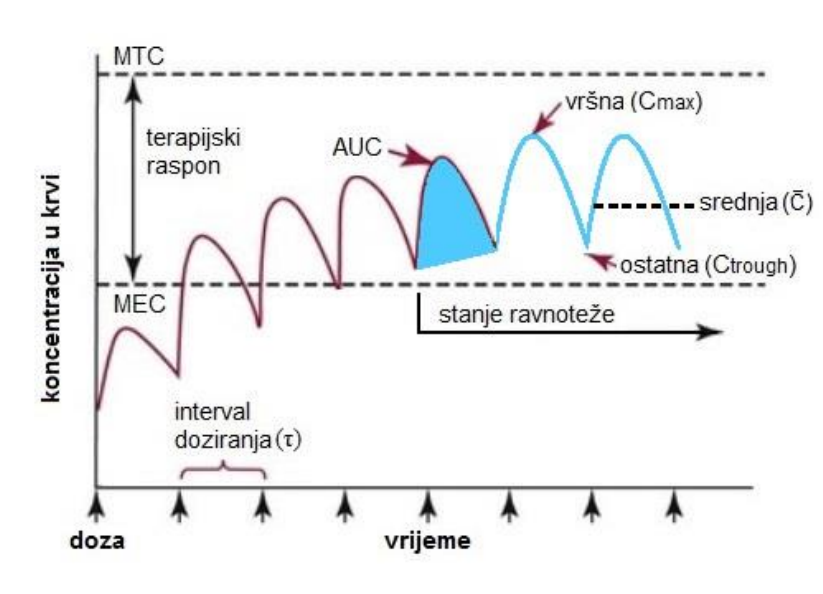
1.3. Terapijsko praćenje lijekova (TDM)

1.3.1. TDM u kliničkoj praksi

Odavno su poznata ograničenja empirijskog doziranja lijeka pa se već 40 godina koristi kvantifikacija lijekova u krvi, odnosno terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM). Primjenjuje se u brojnim kliničkim područjima medicine za lakšu prilagodbu doze i postizanje optimalnog doziranja. Farmakokinetika opisuje put prolaska lijeka kroz organizam, a TDM utvrđuje status farmakokinetike bolesnika u trenutku uzimanja uzorka te omogućuje procjenu terapijske suradljivosti, učinkovitosti i toksičnosti prouzročene lijekom (221). Farmakokinetičke razlike mogu ukazivati na postojanje genetičkih varijacija, interakcija lijek – lijek, lijek – hrana, oštećenja organa ili nesuradljivost bolesnika (222).

U ciklusu doziranja ostatna koncentracija (C_{trough} , od engl. *trough concentration*) je najniža koncentracija prije sljedeće doze, a vršna koncentracija (C_{max}) je najviša dosegnuta koncentracija u intervalu doziranja. Primjenom lijeka svakih $t_{1/2}$ (poluvrijeme eliminacije) višestruko doziranje dovodi do postizanja ravnotežne koncentracije u krvi. Stanje dinamičke ravnoteže (engl. *steady state*) postiže se višestrukim identičnim dozama u intervalima (τ) koji se primjenjuju jednom i svakih $t_{1/2}$ (slika 5.). Za većinu lijekova potrebno je 4-5 $t_{1/2}$ da bi se postiglo stanje ravnoteže, odnosno kada je koncentracija lijeka u tijelu u ravnoteži sa stupnjem primijenjene doze i stupnja izlučivanja. U stanju ravnoteže optimalne vršne i ostatne koncentracije manje su od minimalne toksične koncentracije (MTC) i više od minimalne učinkovite koncentracije (MEC). Raspon vrijednosti između MEC i MTC se prikazuje kao terapijski raspon (223).

Fenotipizacija se najčešće primjenjuje za otkrivanje farmakokinetičkih varijacija u ispitanika u kontroliranim okolnostima i daje nam važne informacije o metabolizmu i izlučivanju lijeka. Najčešći je pristup u fenotipizaciji primjena testnog lijeka koji ima poznati metabolizam putem istih enzima ili metaboličkih puteva kao i lijek u terapiji. Nakon primjene testnog lijeka u točno definiranom vremenu uzimaju se tjelesne tekućine, najčešće mokraća i/ili krv u kojima se mjeri koncentracija izvornog lijeka i jednog ili više njegovih metabolita. Omjeri koncentracija lijeka i metabolita lijeka, ili dvaju metabolita (metabolit A/metabolit B) uspoređuju se i izražavaju kao metabolički omjer (222,223).



Slika 5. Vršna (C_{max}), srednja (\bar{C}) i minimalna (C_{trough}) koncentracija u stanju ravnoteže. AUC označava područje ispod krivulje koncentracija – vrijeme (224)

1.3.2. TDM u psihijatriji

Psihijatrija je kliničko područje u kojem je u velikoj mjeri prihvaćena upotreba TDM. Psihotropni lijekovi zadovoljavaju sve kriterije za terapijsko praćenje: liječenje je obično dugotrajno, učinkovitost se može teško procijeniti samo prema kliničkim parametrima, toksičnost brojnih psihoaktivnih lijekova ovisna je o koncentraciji pa ju je moguće spriječiti. Stupanj suradljivosti obično je niži u bolesnika s psihičkim poremećajima u odnosu na ostale. Nekoliko psihotropnih lijekova pokazuje znatne interakcije lijek-lijek i utječu na aktivnosti metaboličkih enzima, što otežava liječenje i predviđanje serumskih koncentracija u kombiniranoj terapiji. Objavljene smjernice preporučuju TDM za većinu tricikličkih antidepresiva, selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina i venlafaksina na osnovi dobre korelacije između serumske koncentracije i kliničkog učinka. TDM drugih antidepresiva koristan je za procjenu individualne farmakokinetike, procjenu suradljivosti, kod politerapije i kod bolesnika s bolestima bubrega i jetre (37,222,225).

Korisnost praćenja koncentracije lijeka zasniva se na pretpostavci da farmakološki učinak korelira s koncentracijom lijeka na mjestu djelovanja. Nadalje, poznato je da farmakodinamički učinak može varirati među pojedincima iako je koncentracija lijeka ista. Zbog toga je za poboljšanje individualnog odgovora na terapiju poželjno uz TDM koristiti se i drugim odgovarajućim biljezima, poput farmakogenetičkih analiza (222).

1.3.3. TDM risperidona

Prema TDM smjernicama Europske udruge za neuropsihofarmakologiju i farmakopsihijatriju (AGNP) preporučeni referentni raspon za ukupni aktivni lijek (risperidon+9-OH-risperidon) je 50-150 nmol/L (20–60 ng/mL) (37).

Koncentracije ujednačene prema dozi, odnosno omjeri koncentracije prema dozi (C/D) izračunavaju se korištenjem vrijednosti ravnotežnih koncentracija u krvi i primijenjene doze. Osim toga C/D ujedno može služiti kao mjera klirensa lijeka. Omjer C/D veći je u sporih metabolizatora (PM) ili u bolesnika koji u konkomitantnoj terapiji uzimaju i inhibitore, a smanjen je u vrlobrzih metabolizatora (UM) ili u bolesnika koji uzimaju induktore. U bolesnika koji uzimaju oralni pripravak risperidona, omjer C/D izračunava se dijeljenjem koncentracije AM (risperidon+9-OH-risperidon) u krvi na dnevnu dozu. U multicentričnom ispitivanju koje je proveo proizvođač lijeka, srednja vrijednost ukupnog omjera C/D bila je oko 7, a ta je vrijednost ponovljena u velikoj američkoj studiji na bolesnicima koji nisu bili CYP2D6 spori metabolizatori i nisu uzimali induktore ili inhibitore enzima CYP (184).

Metabolički omjer risperidon/9-OH-risperidon (RIS/9-OH-RIS) može poslužiti kao pokazatelj aktivnosti enzima CYP2D6 (37,226). Normalni omjer RIS/9-OH-RIS u plazmi je 1, a invertirani omjer (kada je konc. RIS > konc. 9-OH-RIS) ukazuje na fenotip CYP2D6 PM ili prisutnost inhibitora CYP2D6 (227). To se često događa kod konkomitantne primjene paroksetina, koji se smatra snažnim inhibitorom enzima CYP2D6 (38,228). Također postoje primjeri iz studija o odnos između fenotipa CYP2D6 i omjera RIS/9-OH-RIS gdje medijan omjera RIS/9-OH-RIS postupno raste od UM prema PM fenotipu bolesnika sa ili bez CYP inhibitora, dok su bolesnici s CYP inhibitorima imali veće vrijednosti (39).

Za potrebe terapijskog praćenja koncentracije lijekova/antipsihotika u pacijenata koji primaju pripravke s produljenim oslobađanjem uzorak krvi se uzima neposredno prije sljedeće injekcije. Koncentracija lijeka u krvi ovisi o vrsti formulacije (229), jer o tome ovisi interval doziranja, vrijeme oslobađanja iz depoa/skladišta i eliminacije lijeka. U slučaju neočekivanih nuspojava uzorak za TDM se može uzeti u bilo koje vrijeme. Tada nije potrebno mjeriti ostatnu koncentraciju lijeka, ali se obavezno mora izvjestiti interval doziranja radi tumačenja rezultata. Pripravak risperidona s produljenim oslobađanjem koji ima mikrosfere i interval doziranja svaka 2 tjedna ima srednje prosječno vrijeme vršnih koncentracija u krvi 4 tjedna, dok je njegovo vrijeme poluživota (polueliminacije) 4-6 dana (37,230).

1.4. Svrha rada

S obzirom na značajnu interindividualnu varijabilnost farmakokinetičkih parametara te varijabilnosti u učinkovitosti i riziku razvoja štetnih učinaka u radu smo ispitivali utjecaj farmakogena na farmakokinetiku i farmakodinamiku risperidona s produljenim oslobađanjem. U tu svrhu smo proveli farmakogenetičku analizu enzima glavnog (CYP2D6) i sporednog (CYP3A4/5) metaboličkog puta te prijenosnika (ABCB1 i ABCG2) risperidona.

2. HIPOTEZA

Genetička varijabilnost metaboličkog enzima CYP2D6 i transportnog proteina ABCB1 ima značajan utjecaj na ravnotežne koncentracije risperidona i njegovog aktivnog metabolita 9-OH-risperidona što može rezultirati značajnim interindividualnim razlikama u učinkovitosti i nuspojavama risperidona s produljenim oslobađanjem te potrebom individualnog doziranja.

3. CILJEVI RADA

Cilj rada bio je ispitati utjecaj polimorfizama *CYP2D6* i *ABCB1* na sistemsku izloženost risperidonu i 9-OH-risperidonu te na terapijski učinak i sigurnost pripravka risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) u bolesnika sa shizofrenijom.

Specifični ciljevi istraživanja:

1. Ispitati utjecaj polimorfizama *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1* i *ABCG2* na vršne (C_{max}) i koncentracije na kraju intervala doziranja (C_{trough}) risperidona i 9-OH-risperidona u stanju dinamičke ravnoteže pri primjeni LAI-RIS
2. Ispitati utjecaj ravnotežnih koncentracija risperidona i 9-OH-risperidona na učinkovitost i sigurnost LAI-RIS
3. Ispitati utjecaj polimorfizama *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1* i *ABCG2* na učinkovitost i sigurnost LAI-RIS, te procijeniti u kojoj je mjeri utjecaj posredovan utjecajem na sistemsku izloženost lijeku i aktivnom metabolitu.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Dizajn studije

Istraživanje je bilo dizajnirano kao opservacijska, prospektivna, nerandomizirana studija. Istraživanje je provedeno u razdoblju od 2012-2018 godine.

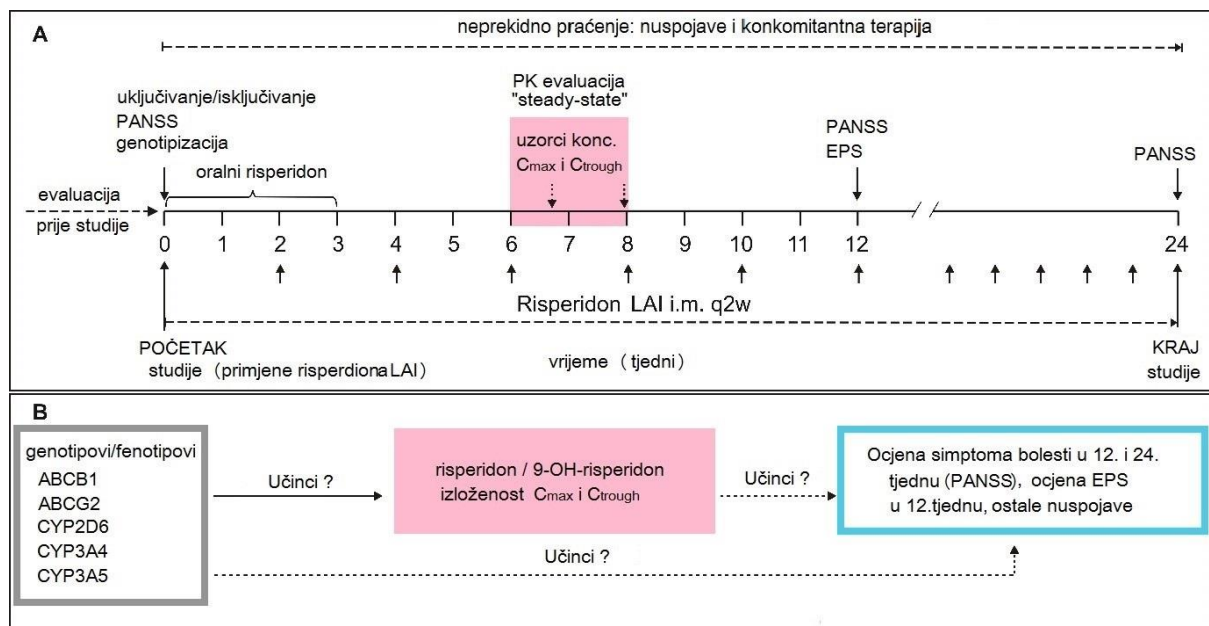
Razdoblje opservacije trajalo je 24 mjeseca.

Regrutacija ispitanika, uzorkovanje biološkog materijala i kliničko praćenje bolesnika odvijalo se u tri medicinska centra:

1. Klinika za psihijatriju Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Zagreb
2. Neuropsihijatrijska bolnica „Dr. Ivan Barbot“, Popovača
3. Klinika za psihijatriju „Vrapče“, Zagreb

Laboratorijske analize i pohrana uzoraka odvijali su se u Kliničkom zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Etička povjerenstva svih navedenih ustanova i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrili su provedbu ovog istraživanja.



Slika 6. Dizajn studije prema medijatorskom modelu. A Opis tijeka studije. (detaljan opis u tekstu) **B Ciljevi studije:** Glavni cilj (puna strelica) bio je ispitati utjecaj polimorfizama *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, i *CYP3A5* na sistemsku izloženost lijeku i aktivnom metabolitu u stanju ravnoteže pri primjeni LAI-RIS. Specifični ciljevi (isprekidana strelica) bili su procijeniti potencijalni učinak *ABCB1*, *ABCG2*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, i *CYP3A5* na kliničke ishode (učinkovitost - PANSS i sigurnost - EPS) pri primjeni LAI-RIS te procijeniti u kojoj je mjeri utjecaj posredovan utjecajem na sistemsku izloženost lijeku i aktivnom metabolitu.

Opis tijeka studije (Slika 6.): Prihvatljivim ispitanicima napravljena je ocjena težine simptoma bolesti (PANSS), te je započelo liječenje pripravkom risperidona s produljenim oslobađanjem (i.m. injekcija svaka 2 tjedna, q2w). Uzeti su uzorci krvi za izdvajanje DNA te je provedena genotipizacija polimorfizama *CYP2D6*, *CYP3A4*, *CYP3A5*, *ABCB1* i *ABCG2*. Uzorci za farmakokinetiku (PK) - određivanje koncentracija risperidona i 9-OH-risperidona uzorkovani su u stanju dinamičke ravnoteže (nakon 4-te injekcije) u dvije vremenske točke: (i) u vrijeme očekivane vršne ekspozicije (C_{max} , 5. dan nakon injekcije, početak 6. tjedna); i (ii) neposredno prije iduće injekcije (C_{trough} , 14. dan, početak 8. tjedna). Za procjenu učinka terapije ispitanicima je ponovo napravljena ocjena težine simptoma bolesti (PANSS) nakon 12 i 24 tjedana liječenja, a procjena prisustva/težine ekstrapiramidnog sindroma (EPS) nakon 12 tjedana.

4.2. Ispitanici

4.2.1. Kriteriji za uključivanje i isključivanje

U ovom istraživanju sudjelovao je 101 ispitanik oboljeli od shizofrenije na terapiji pripravkom risperidona s produljenim oslobađanjem.

Ispitanici su regrutirani u istraživanje metodom prigodnog uzorka. Probir i uključivanje ispitanika u studiju određen je prema kriterijima za uključivanje i isključivanje.

Kriteriji za uključivanje:

1. Oboljeli od shizofrenije prema dijagnostičkim kriterijima Svjetske zdravstvene organizacije ICD-10 (231) i Američkog psihijatrijskog društva DSM-IV (engl. *Diagnostic and Statistic Manual of Mental Disorder, 4th ed.*) (232)
2. dob od 18 do 69 godina
3. ženski ili muški spol
4. indikacija za liječenje s LAI-RIS

Kriteriji za isključivanje:

1. dijagnosticirana ozbiljna organska ili neurološka bolest
2. anamneza o teškoj traumi glave
3. ovisnost bilo koje vrste u 6 zadnjih mjeseci

Prije uključivanja u istraživanje svi ispitanici su dobili na uvid Informirani pristanak te su im detaljno objašnjeni ciljevi istraživanja, moguće koristi i rizici. Nakon dobrovoljnog pristanka i potpisivanja Informiranog pristanka ispitanici su uključeni u istraživanje.

4.2.2. *Analitički uzorci*

Kao analitički uzorci prikupljeni su uzorci krvi ispitanika za:

1. određivanje koncentracija risperidona i 9-OH risperidona iz seruma. Prikupljeni su u dvije vremenske točke, po 5 mL krvi u spremnik bez antikoagulanta (Greiner BIO, Austrija)
2. izdvajanje DNA za genotipizaciju polimorfizma iz pune krvi. Prikupljeno je 5 mL krvi u spremnik s antikoagulantom EDTA (Greiner BIO, Austrija)

4.3. **Praćenje učinkovitosti i nuspojava**

Za procjenu simptoma bolesti i definiranje odgovora na terapiju korištena je standardizirana ocjenska ljestvica PANSS (233). Za ocjenu prisustva/težine ekstrapiramidnih poremećaja korištena je standardizirana ocjenska ljestvica SAS (234). Prisustvo drugih nuspojava bilježilo se na temelju: (i) spontane prijave bolesnika i (ii) strukturiranog intervjua.

4.3.1. *Procjena težine simptoma bolesti (ocjenska ljestvica PANSS)*

Za procjenu težine simptoma korištena je ocjenska ljestvica PANSS (engl., *Positive and Negative Syndrome Scale*) (233), koja je vrlo korišten mjerni instrument za procjenu težine psihopatologije u oboljelih od shizofrenije (17).

Procjena simptoma bolesti i uspješnosti liječenja pomoću ocjenske ljestvice PANSS se provodila u tri vremenske točke: na početku studije za procjenu početne vrijednosti PANSS (engl. *baseline PANSS*) te je ponovljena 12. i 24. tjedan studije. Moguće druge nuspojave, uvođenje konkomitantne terapije i tjelesna težina bilježeni su u dvotjednim intervalima, vezano za ponovljene injekcije lijeka. U svrhu što veće objektivizacije kliničke slike ocjenu PANSS provodila su dva iskusna psihijatra koji nisu znali rezultate genotipizacije prilikom ocjene težine simptoma bolesti.

Ocjenska ljestvica PANSS podijeljena je na tri podljestvice i sastoji se od 30 osnovnih čestica i dizajnirana je tako da procijeni tri glavne domene: podljestvica za pozitivne simptome (7 čestica, P1-P7), podljestvica za negativne simptome (7 čestica, N1-N7) i opća psihopatološka podljestvica (16 čestica, G1-G16). Dodatna podljestvica od 3 čestice odnosi se na profil rizične agresivnosti (17).

Svaka čestica može imati numeričku vrijednost od 1-7 (1- odsutno, 2- minimalno, 3- slabo, 4- umjereno, 5- umjereno jako, 6- jako, 7- ekstremno).

Podljestvica za pozitivne simptome (P):

- P1. Sumanutosti. Vjerovanja koja su neosnovana, nerealna i idiosinkrazijska. Osnova za procjenu: sadržaj misli iskazan tijekom intervjua i njihov utjecaj na socijalne odnose i ponašanje kako je navedeno od medicinskog osoblja i obitelji.
- P2. Konceptualna dezorganizacija. Dezorganizirani proces mišljenja karakteriziran prekidanjem slijeda, npr. opširnost, tangencijalnost, slabe asocijacije, pogrešno zaključivanje, krupne nelogičnosti i blokirano mišljenje. Osnova za procjenu: kognitivno-verbalni procesi primijećeni tijekom intervjua.
- P3. Halucinatorno ponašanje. Verbalni iskazi ili ponašanje koje upućuje na percepciju koja nije posljedica vanjskih podražaja. Ovo se može pojaviti u auditornom, vizualnom, olfaktornom ili somatskom području. Osnova za procjenu: verbalni iskaz i fizičke manifestacije tijekom intervjua te izvještaj medicinskog osoblja i obitelji o bolesnikovom ponašanju.
- P4. Uzbuđenje. Hiperaktivnost koja se očituje kao ubrzano motoričko ponašanje, pojačano reagiranje na podražaje, pojačana budnost ili neumjerena labilnost raspoloženja. Osnova za procjenu: manifestacije ponašanja tijekom intervjua te izvještaji dobiveni od medicinskog osoblja i obitelji.
- P5. Grandioznost. Pretjerano mišljenje o sebi i nerealna uvjerenja o superiornosti, uključujući i deluzije o izuzetnim sposobnostima, bogatstvu, znanju, slavi, moći i moralnim vrijednostima. Osnova za procjenu: sadržaj misli izražen tijekom intervjua i njihov utjecaj na ponašanje prema izvještajima medicinskog osoblja i obitelji.
- P6. Sumnjičavost/ proganjanje. Nerealne i pretjerane ideje proganjanja očituju se u oprezu, nepovjerljivom stavu, sumnjičavom hipervigilitetu ili u otvorenim deluzijama da bolesniku drugi žele nanijeti zlo. Osnova za procjenu: sadržaj misli izražen tijekom intervjua i njihov utjecaj na ponašanje prema izvještajima medicinskog osoblja i obitelji.
- P7. Neprijateljstvo. Verbalne i neverbalne ekspresije ljutnje i odbijanja uključujući sarkazam, pasivno agresivno ponašanje, verbalno zlostavljanje i vrijeđanje. Osnova za procjenu: interpersonalno ponašanje zapaženo tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.

Podljestvica za negativne simptome (N):

- N1. Afekt tuposti. Smanjeno emocionalno odgovaranje karakterizirano redukcijom facijalnih ekspresija, modulacije osjećaja i komunikacijskih gesti. Osnova za procjenu: zamjećivanje fizičkih manifestacija afektivnog tona i emocionalnog odgovora tijekom intervjua.
- N2. Emocionalno povlačenje. Nedostatak interesa, uključivanja i afektivnog odnosa prema životnim zbivanjima. Osnova za ocjenu: izvještaji o funkcioniranju dobiveni od medicinskog osoblja i opservacija interpersonalnog ponašanja tijekom intervjua.
- N3. Siromaštvo odnosa/ loš transfer. Odsutnost interpersonalne empatije, otvorenosti u komunikaciji, interesa, bliskosti i uključivanja u intervju. To se očituje u interpersonalnom distanciranju i smanjenoj verbalnoj i neverbalnoj komunikaciji. Osnova za procjenu: interpersonalno ponašanje tijekom intervjua.
- N4. Pasivnost/ apatično socijalno povlačenje. Smanjen interes i inicijativa u socijalnim interakcijama zbog pasivnosti, apatije, pomanjkanja energije i bezvoljnosti. To dovodi do smanjenog interpersonalnog angažiranja i zanemarivanja svakodnevnih aktivnosti. Osnova za procjenu: izvještaji o socijalnom ponašanju od medicinskog osoblja ili obitelji.
- N5. Teškoće u apstraktnom mišljenju. Smanjena upotreba apstraktno-simboličnog načina mišljenja što se vidi kao teškoća u klasificiranju, formiranju generalizacija i nadilaženju konkretnog i egocentričnog mišljenja pri rješavanju problemnih zadataka. Osnova za procjenu: odgovori na pitanja o sličnostima i interpretacija poslovice, korištenje konkretne nasuprot apstraktnoj formi tijekom intervjua.
- N6. Nedostatak spontanosti i nesmetanog odvijanja konverzacije. Smanjenje normalnog tijeka komunikacije povezano s apatijom, avolicijom, obrambenim stavom i kognitivnim deficitom. To se manifestira kroz smanjenu fluidnost i produktivnost verbalno-interakcijskog procesa. Osnova za procjenu: kognitivno-verbalni procesi zapaženi tijekom intervjua.
- N7. Sterotipno mišljenje. Smanjena fluidnost, spontanost i fleksibilnost razmišljanja vidljiva u rigidnom, siromašnom i ponavljajućem sadržaju misli. Osnova za procjenu: kognitivno-verbalni procesi zamijećeni tijekom intervjua.

Opća psihopatološka ljestvica (G):

- G1. Somatske brige. Fizičke pritužbe ili uvjerenja o tjelesnoj bolesti ili poremećenom funkcioniranju. Ovo može varirati od nejasnog osjećaja bolesti do jasnih deluzija o katastrofičnoj fizičkoj bolesti. Osnova za procjenu: sadržaj misli izražen tijekom intervjua.
- G2. Anksioznost. Subjektivno iskustvo nervoze, brige, bojazni ili nemira koje varira od pretjerane brige za budućnost ili sadašnjost do osjećaja panike. Osnova za procjenu: verbalni izvještaj tijekom intervjua i odgovarajuće fizičke manifestacije.
- G3. Osjećaj krivnje. Grižnja savjesti ili samooptuživanje za realne ili umišljene pogreške u prošlosti. Osnova za procjenu: verbalni izvještaj osjećaja krivnje tijekom intervjua te utjecaj na stavove i misli.
- G4. Tenzija/ napetost. Očite fizičke manifestacije straha, anksioznosti i agitacije kao što su tremor, ukočenost, obilno znojenje i nemir. Osnova procjenu: verbalni izvještaj koji ukazuje na anksioznost i, stoga, ozbiljnost fizičkih manifestacija tenzije zamijećene tijekom intervjua.
- G5. Manirizmi i stav tijela. Neprirodni pokreti ili držanje karakterizirani čudnim, nadmenim, neorganiziranim i bizarnim izgledom. Osnova za procjenu: opservacija fizičkih manifestacija tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.
- G6. Depresija. Osjećaji tuge, obeshrabrenosti, bespomoćnosti i pesimizma. Osnova za procjenu: verbalni izvještaj depresivnog stanja tijekom intervjua te njegov utjecaj na stavove i ponašanje prema izvještajima medicinskog osoblja i obitelji.
- G7. Motorička retardacija. Smanjenje motoričke aktivnosti koja se očituje u usporavanju ili smanjenju pokreta i govora, smanjenom reagiranju na podražaje i reduciranom tonusu mišića. Osnova za procjenu: manifestacije tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.
- G8. Nesuradnja. Aktivno odbijanje povodjenja za tuđom voljom uključujući ispitivača, bolničko osoblje ili obitelj, što može biti povezano s nepovjerenjem, obrambenim stavom, tvrdoglavošću, negativizmom, odbijanjem autoriteta, neprijateljstvom ili ratobornošću. Osnova za procjenu: interpersonalno ponašanje tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.
- G9. Neobičan sadržaj misli. Mišljenje je karakterizirano čudnim, fantastičnim ili bizarnim idejama, a varira od onih koje su atipične do onih koje su poremećene, nelogične i apsurdne. Osnova za procjenu: sadržaj misli zapažen tijekom intervjua.

- G10. Dezorijentacija. Nedostatak svjesnosti za svoj odnos sa okolinom, uključujući osobe, mjesto i vrijeme, a može nastati zbog zbunjenosti i povučenosti. Osnova za procjenu: odgovori na pitanja o orijentaciji tijekom intervjua.
- G11. Slaba pažnja. Nedostatak u fokusiranju budnosti manifestiran kroz slabu koncentraciju, odvlačenje pažnje zbog internih ili eksternih podražaja te poteškoće pri zadržavanju ili prebacivanju fokusa na nove podražaje. Osnova za procjenu: manifestacije tijekom intervjua.
- G12. Nedostatak procjene i uvida. Smanjenje svjesnosti ili razumijevanja vlastitog psihijatrijskog stanja i životne situacije. To se očituje u teškoći prepoznavanja prošle ili sadašnje psihijatrijske bolesti ili simptoma, negiranje potrebe za psihijatrijskom hospitalizacijom ili liječenjem, odluke karakterizira slabo očekivanje posljedica te nerealno kratkotrajno i dugotrajno planiranje. Osnova za procjenu: sadržaj misli izražen tijekom intervjua.
- G13. Poremećaj volje. Poremećaj u voljnoj inicijativi, održavanju i kontroliranju vlastitih misli, ponašanja, pokreta i govora. Osnova za ocjenu: sadržaj misli i ponašanje manifestirano tijekom intervjua
- G14. Slaba kontrola impulsa. Poremećena regulacija i kontrola djelovanja po unutarnjim porivima što dovodi do naglih, nedomuliranih, samovoljnih ili pogrešno usmjerenih izljeva napetosti i emocija bez obzira na posljedice. Osnova za ocjenu: ponašanje tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.
- G15. Zaokupljenost. Preokupiranost interno izazvanim mislima i osjećajima te autističnim doživljajima na štetu orijentiranosti prema stvarnosti i adaptivnog ponašanja. Osnova za ocjenu: interpersonalno ponašanje zamijećeno tijekom intervjua.
- G16. Aktivno socijalno izbjegavanje. Smanjena socijalna angažiranost povezana s nerealnim strahom, neprijateljstvom i nepovjerenjem. Osnova za ocjenu: izvještaj medicinskog osoblja ili obitelji o socijalnom funkcioniranju.

Dopunske čestice za profil rizične agresivnosti:

- S1. Bijes/ ljutnja. Subjektivno stanje neugode i iritacije usmjereno prema drugima. Osnova za ocjenu: verbalni izvještaj o osjećajima ljutnje tijekom intervjua i, zbog toga, neprijateljsko ponašanje tijekom intervjua ili prema izvještajima medicinskog osoblja i obitelji.
- S2. Teškoće u odgađanju zadovoljenja. Zahtjeva i inzistira da se njegove potrebe smjesta zadovolje, a vidljivo je uzrujan kada je ispunjenje njegovih potreba ili želja odgođeno. Osnova za ocjenu: promatranje ponašanja tijekom intervjua te izvještaji medicinskog osoblja i obitelji.
- S3. Afektivna labilnost. Emocionalne ekspresije su nestabilne, fluktuirajuće, neprimjerene i/ili slabo kontrolirane. Osnova za procjenu: afektivno stanje zapaženo tijekom intervjua.

4.3.2. Procjena razvoja akutnih ekstrapiramidnih nuspojava (EPS)

Kod svih ispitanika se promatrao razvoj akutnih EPS od strane dvaju iskusnih psihijatar. U slučaju neslaganja, pozvan je treći psihijatar kako bi što objektivnije procijenio razvoj akutnih EPS. Kada su klinički opažene akutne EPS, njihovu težinu su nezavisno procijenila dva psihijatra koristeći standardiziranu ocjensku ljestvicu SAS (engl. *Simpson-Angus Rating Scale*) (234).

Ocjenska ljestvica SAS sadrži ukupno 10 čestica pri čemu svaka čestica može biti ocijenjena od 0-4. SAS ocjene mogu biti u rasponu od 0 do 40. Procjene simptoma uključuju: držanje, padanje, trešnju, rigidnost lakta, rigidnost ručnog zgloba, okretanje glave, kuckanje po gabeli, tremor, salivaciju i akatiziju. Kriterij za akutne EPS je vrijednost SAS >3.

Nakon dva tjedna liječenja ispitanici su grupirani na temelju SAS zbroja u dvije skupine. Ispitanici koji su razvili akutne EPS imali su vrijednosti SAS > 3 (engl. *EPS group*), dok su drugu skupinu činili ispitanici sa vrijednostima SAS ≤ 3 (engl. *no EPS group*) (20).

4.4. Određivanje koncentracija risperidona i 9-hidroksirisperidona

Mjerenje koncentracija risperidona i 9-hidroksirisperidona provodilo se u Odjelu za multidisciplinarnu primjenu kromatografije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

Mjerna metoda: tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC, od engl. *high performance liquid chromatography*)

Analitički uzorak

Vrsta uzorka: serum (plazma)

Spremnik: 5 mL spremnik bez antikoagulant (Greiner BIO, Austrija)

Stabilnost: uzorak je stabilan najmanje 5 sati na temperaturi 15-30°C, najmanje 1 dan na temperaturi 2-8°C te najmanje 3 mjeseca na temperaturi ispod -18°C.

Uzorkovanje: u stanju dinamičke ravnoteže (nakon 4-te doze) u dvije vremenske točke:

- (i) u vrijeme očekivane vršne ekspozicije (C_{max} , 5. dan nakon injekcije, početak 6. tjedna);
- (ii) neposredno prije iduće injekcije (C_{trough} , 14. dan, početak 8. tjedna).

Potrebna oprema i reagensi

Oprema:

- HPLC sustav: Shimadzu Prominence s DAD detektorom (Shimadzu Corp., Japan)
- kolona: Symmetry C-18 5 μ m, 250 x 4,6 mm, 37°C (Waters, SAD)
- predkolona: Symmetry C-18 Guard Column (Waters, SAD)
- uparivač uzoraka u struji zraka Precitherm PFV-2 (Boehringer, Njemačka)
- sistem za filtriranje mobilne faze (Merck Millipore, SAD)
- vakuum pumpa (Merck Millipore, SAD)
- tresilica za ekstrakciju Promax 1020 (Heidolph Instruments, Njemačka)
- vibracijska miješalica Fisher Vortex Genie 2 (Fisher Scientific, SAD)
- magnetska miješalica Tehnica MM-530 (Tehnica Zelezniki, Slovenija)
- ultrazvučna kupelj Julabo USR (Julabo GmbH, Njemačka)
- centrifuga Rotofix 32 (Hettich, Njemačka)
- sistem za pročišćavanje vode Mili-Q (Merck Millipore, SAD)
- automatske pipete s nastavcima: 100, 200, 1000 i 5000 μ L (Eppendorf, Njemačka)

Reagensi:

- kontrolni uzorak za antipsihotike (Chromsystems GmbH, Gräfelfing, Njemačka)
- interni standard (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, SAD)
- Otapala HPLC čistoće:
 - acetonitril (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - metanol (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - etilacetat (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - heksan (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka)
- voda HPLC čistoće

Opis i uvjeti kromatografske metode

Priprava mobilne faze 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (pH=3.8)

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 6.89 g otopiti u 0,7 L vode.
- pH pufera podesiti fosfatnom kiselinom (85%) na pH=3.8 te nadopuniti u odmjernej tikvici do 1 litre vodom.
- gotovi pufer profiltrirati kroz celulozni (hidrofilni) filter 0,45 μm
- čuvati u tamnoj boci na +4°C

Mobilna faza:

- pumpa A: 0,05 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ pH=3.8
- pumpa B: acetonitril

Priprava internog standarda (IS):

Kao interni standard IS koristi se fluoksetin.

20 μl (matičnice IS - fluoksetina 1 mg/mL) staviti u odmjernu tikvicu od 10 mL te nadopuniti do oznake vodom. Dobivena radna otopina IS sadrži 2 $\mu\text{g/mL}$ fluoksetina.

Ekstrakcija:

1. u toksilab epruvetu za ekstrakciju staviti 1 mL plazme, 50 μl radne otopine IS te 100 μl 0,5 M NaOH,
2. promiješati na vibracijskoj tresilici
3. dodati 5 mL smjese etil-acetat:heksan 1:1
4. dobro začepljene toksilab epruvete staviti u stalak za ekstrakciju
5. ekstrahirati 30 min. na tresilici
6. centrifugirati 15 min. na 3000 rpm

7. 4 mL gornjeg sloja prebaciti staklenom pipetom od 5 mL u kivetu za sušenje od 12 mL
8. upariti u struji zraka na 37°C u vodenoj kupelji
9. suhi ostatak resuspendirati u 150 µl mobilnoj fazi (pufer : acetonitril 70:30)
10. prebaciti u vialicu u kojoj se nalazi insert od 200 µl

Postupak umjeravanja

Analiti su kalibrirani komercijalnim liofiliziranim serumskim kalibratorima (Chromsystems GmbH, Gräfelfing, Njemačka; ili Recipe GmbH, München, Njemačka), koji se pripremaju i analiziraju u duplikatu. Kalibracijske krivulje su bile zadovoljavajuće, a vrijednosti kontrolnih uzoraka su bile u zadanim rasponima.

Priprava matičnice u metanolu (1 mg/mL):

- otopiti 10 mg RIS, u odmjernoj tikvici od 10 mL

Priprava standarda u plazmi:

- 20 µl (RIS 1 mg/mL) + 980 µl plazme

Kalibracijske točke:

1. 1500 µl (200 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (100 ng/mL=244 nmol/L)
2. 1500 µl (100 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (50 ng/mL=122 nmol/L)
3. 1500 µl (50 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (25 ng/mL=61 nmol/L)
4. 1500 µl (25 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (12,5 ng/mL=30,5 nmol/L)
5. 1500 µl (12,5 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (6,25 ng/mL=15,25 nmol/L)
6. 1500 µl (6,25 ng/mL) + 1500 µL plazme = 3000 µL (3,125 ng/mL=15,25 nmol/L)

Analitička metoda je validirana za rutinsko terapijsko praćenje risperidona i 9-OH-risperidona te je uključena u sheme za vanjsku procjenu kontrole kvalitete (DGKL RfB, i UK NEQAS). Za vrijeme trajanja studije sve kalibracijske krivulje su zadovoljavale kriterij linearnosti ($R^2 > 0,99$), raspon linearnosti metode je bio 7,6-244,0 nmol/L za risperidon i 8,0-234,0 nmol/L 9-OH-risperidon. Donja granica detekcije (LOD, engl. *lower limit of detection*) bila je 2,5 nmol/L odnosno 3,2 nmol/L (tablica 6.). Nepreciznost i netočnost bili su stalno <5,0%.

Tablica 6. Osjetljivost kromatografske metode za risperidon i 9-OH-risperidon

analit	f	terapijski raspon (nmol/L)	LOD (nmol/L)	LOQ (nmol/L)
risperidon	2,44	RIS + 9-OH-RIS 50,0 – 150,0	2,5	< 7,61
9-OH-risperidon	2,34		3,2	< 8,0
Kratice: f - faktor konverzije iz ng/mL u nmol/L				

4.5. Metode genotipizacije

Metode genotipizacije provodile su se u Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

4.5.1. Izdvajanje DNA

Za izdvajanje DNA ispitanicima je izvađeno 3-5 mL krvi u epruvete s antikoagulantom K2EDTA. Tijekom trajanja studije koristilo se više postupaka izdvajanja DNA.

Izdvajanje DNA iz pune krvi provodilo se metodom isoljavanja (235). Metoda isoljavanja temelji se na izdvajanju DNA ili leukocita pune krvi: leukociti se odvajaju od krvi djelovanjem osmotskog tlaka (ostavljajući leukocite netaknutima i razarajući eritrocite). DNA se ekstrahira iz leukocita i pročišćava od staničnih proteina, RNA i drugih makromolekula nakon čega slijedi precipitacija DNA u etanolu te otapanje u puferu.

Izdvajanje se također provodilo primjenom komercijalnog reagensa FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Njemačka), prema uputama proizvođača.

4.5.2. Genotipizacija CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 i ABCG2

Genotipizacija većine ispitivanih polimorfizama CYP2D6 (*3, *4, *6, *41), CYP3A4*22, CYP3A5*3, ABCB1 1236C>T, ABCB1 3435C>T, i ABCG2 421C>A provedena je TaqMan[®] metodom za PCR u stvarnom vremenu.

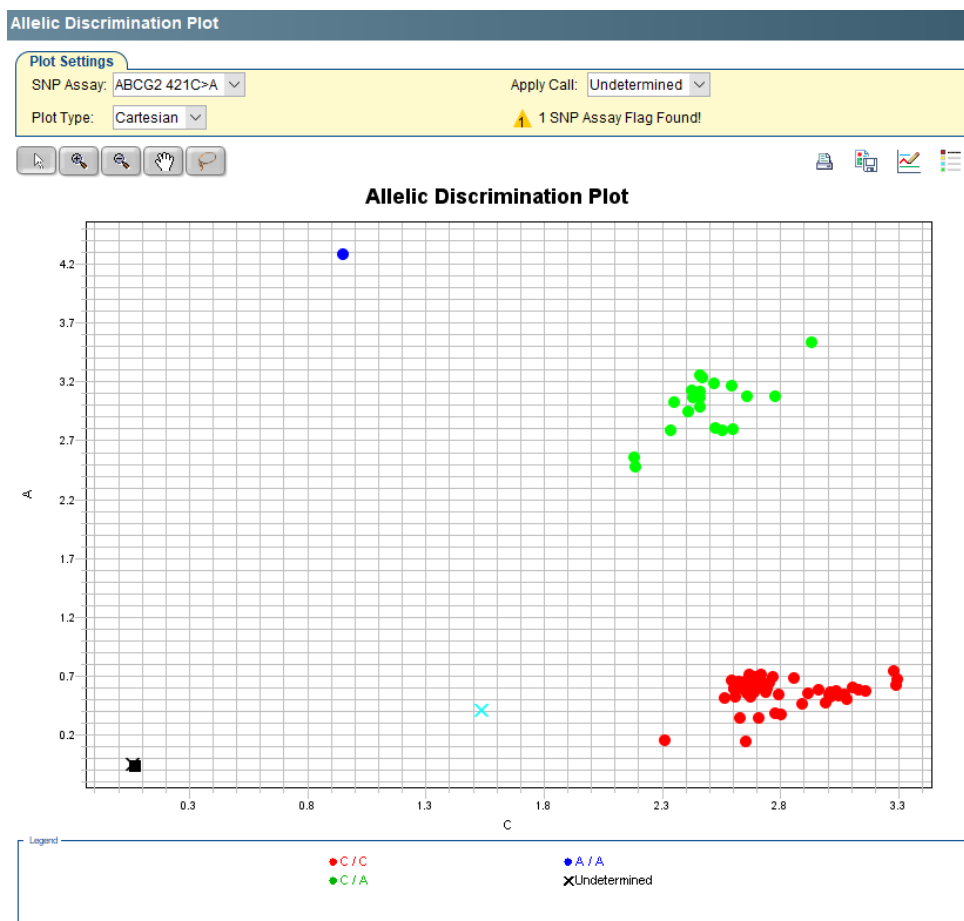
Genotipizacija polimorfizma ABCB1 2677G>T/A provedena je LightCycler[®] metodom za PCR u stvarnom vremenu.

Za analizu duplikacija i delecije gena CYP2D6 korištena je metoda tzv. long-range PCR.

4.5.2.1. TaqMan metoda za PCR u stvarnom vremenu

Korišteni su reagensi TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (ThermoFisher Scientific, SAD), koji sadrže specifične početnice i fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe TaqMan[®] te za detekciju koriste fluorescentni signal koji nastaje zbog 5' nukleazne aktivnosti Taq DNA polimeraze. Fluorescentni signal je detektiran CCD kamerom (engl. charge – coupled device)

i analiziran pomoću računalnog programa 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems, SAD). Analizom alelne diskriminacije koja koristi par fluorescentno obilježenih detektora VIC[®] i FAM[®] (jedan detektor detektira *wt* alel, a drugi detektira varijantni alel) određeno je da li se radi o određeno je da li se radi o homozigotu za alel divljeg tipa, heterozigotu ili homozigotu za varijantni alel. Slika 7. prikazuje analizu alelne diskriminacije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System.



Slika 7. Analiza alelne diskriminacije *TaqMan*[®] metodom PCR u stvarnom vremenu. crvene točke - *wt* homozigoti; zelene točke – heterozigoti; plave točke – *mut* homozigoti

Oprema i pribor:

- uređaj ABI 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, SAD)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za mikrotitrarske pločice Eppendorf 5810R (Eppendorf, Njemačka)
- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 0,5-10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima od 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)

- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- mikrotitarske pločice s pokrovnom folijom (ThermoFisher Scientific, SAD)
- stalak za mikrotitarske pločice ili „strip“ mikroeprovete (Applied Biosystems, SAD)

Reagensi:

- *TaqMan[®] Universal PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific, SAD)
- *TaqMan[®] SNP Genotyping Assay* (ThermoFisher Scientific, SAD)

Za analizu svakog pojedinog polimorfizama korišten je odgovarajući *TaqMan[®] SNP* reagens, *TaqMan[®] SNP Assay ID* (tablica 7.).

Tablica 7. Polimorfizmi analizirani *TaqMan[®]* metodom PCR u stvarnom vremenu

Gen - alel	db SNP* (rs#)	c. DNA	<i>TaqMan[®] SNP Assay ID</i>
<i>CYP2D6*3</i>	rs35742686	2549delA	C__32407232_50
<i>CYP2D6*4</i>	rs3892097	1846G>A	C__27102431_D0
<i>CYP2D6*6</i>	rs5030655	1707delT	C__32407243_20
<i>CYP2D6*41</i>	rs28371725	2988G>A	C__34816116_20
<i>CYP3A4*22</i>	rs35599367	15389C>T	C__59013445_10
<i>CYP3A5*3</i>	rs776746	6986G>A	C__26201809_30
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1128503	1236C>T	C__7586662_10
<i>ABCB1/MDR1</i>	rs1045642	3435C>T	C__7586657_20
<i>ABCG2 421C>A</i>	rs2231142	421C>A	C__15854163_70

* referentni broj SNP iz baze podataka *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*

Postupak

Priprema reakcijske smjese (Tablica 8.) i uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System (Tablica 9.) isti su za genotipizaciju svih polimorfizama, izvedeni su prema uputama proizvođača.

Tablica 8. Sastojci pojedinačne reakcijske smjese za genotipizaciju *TaqMan[®]* metodom

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

*Za analizu svakog polimorfizma koristi se odgovarajući *TaqMan[®] SNP Assay ID*

Priprema reakcijske smjese (tablica 8.):

- izvaditi reagense i uzorke DNA na sobnu temperaturu
- pripremiti reagense (otopiti *SNP Assay* na sobnoj temperaturi zaštićene od svjetlosti)
- pripremiti razrjeđenja DNA za postizanje željene količine u ukupnoj reakcijskoj smjesi
- lagano promiješati reagense na vibracijskoj miješalici
- centrifugirati u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se spustio sadržaj bočica
- pipetirati *TaqMan® Universal PCR Master Mix* i *TaqMan® SNP Assay* u mikroeprevetu, lagano promiješati protresanjem mikroeprevete prstom i centrifugirati 3-5 s
- pipetirati reakcijske smjese u mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroeprevete
- dodati DNA, kontrolne uzorke i negativne kontrole
- zatvoriti mikrotitarsku pločicu pokrovnom folijom ili „strip“ poklopcima
- centrifugirati mikrotitarsku pločicu ili „strip“ mikroeprevete u centrifugi za mikrotitarske pločice 3-5 s pri 3000 rpm
- staviti uzorke u uređaj ABI 7500 i pokrenuti odgovarajući program
- nakon završetka programa očitava se rezultat

Tablica 9. Uvjeti PCR reakcije na uređaju ABI 7500 Real-Time PCR System

Pre-PCR	INICIJACIJA	PCR (50 ciklusa)		Post-PCR
temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje	temperatura / trajanje
60 °C / 60 s	50 °C / 2 min 95 °C / 10 min	92 °C / 15 s	60 °C / 60 s	60 °C / 60 s

4.5.2.2. *LightCycler* metoda za PCR u stvarnom vremenu - genotipizacija *ABCB1 2677G>T/A*

Genotipizacija trialelnog lokusa *ABCB1 2677G>T/A* (rs2032582) provedena je *LightCycler®* metodom za PCR u stvarnom vremenu na uređaju *LightCycler v 2.0* (Roche Diagnostics, Njemačka), prema opisu von Arjomand-Nahad i suradnika (236).

LightCycler® metodom umnaža se DNA ulomak od interesa, koji se detektiraju pomoću fluorescentno obilježenih hibridizacijskih proba prijenosom energije fluorescentnom rezonancijom (engl. *fluorescence resonance energy transfer*, FRET) te analizom temperature taljenja (engl. *temperature melting*) specifične za pojedini alel (slika 8.).

Oprema:

- uređaj LightCycler v 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikropruvete volumena 0,5 i 1.5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)
- kapilare za uređaj LightCycler (Roche Diagnostics, Njemačka)
- hladni blok za kapilare (2-8°C) (Roche Diagnostics, Njemačka)
- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- centrifuga za kapilare LC Carousel Centrifuge 2.0 (Roche Diagnostics, Njemačka)

Reagensi:

- Fast Start DNA Master HybProbe master mix (Roche Diagnostics, Njemačka)
- MgCl₂ (Roche Diagnostics, Njemačka)
- PBS (Merck KGaA, Njemačka)
- DMSO (Merck KGaA, Njemačka)
- početnice (TIB MOLBIOL, Njemačka):
 - f 5'-GCAGGAGTTGTTGAAATGAAAATG-3'
 - r 5'-CGCCTGCTTTAGTTTGA CTCA-3'
- hibridizacijske probe (TIB MOLBIOL, Njemačka):
 - anchor* 5'- LCRed640-CTTTCTTATCTTTCAGTGCTTGTC-3'
 - sensor* 5'- TTCCCAGTACCTTCT-fluorescein

Uvjeti PCR reakcije:

- denaturacija na 94°C 10 min;
- amplifikacija u 45 ciklusa na 94°C, 58°C 10s i 72°C 15s;
- analiza temperature taljenja na 94°C 20s, 32°C 20s, 70°C;
- hlađenje 40°C 30s.

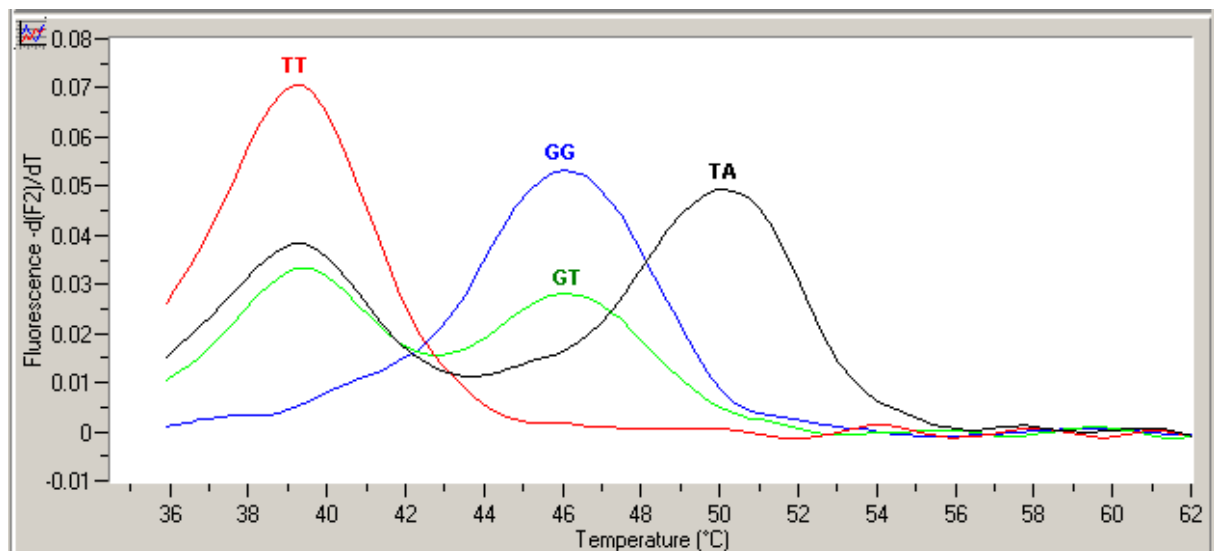
Postupak

- pripremiti uzorke DNA
- pripremiti ili otopiti već pripremljene reagense prema uputi proizvođača
- lagano promiješati reagense na vibracijskoj miješalici

- centrifugirati u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se spustio sadržaj bočica
- pipetirati reagense PCR reakcijske smjese u mikroeprivetu (tablica 10.)
- staviti kapilare u hladan blok (2-8°C)
- pipetirati PCR reakcijsku smjesu i DNA u kapilare (2-8°C)
- zatvoriti kapilare posebnim čepom
- kratko centrifugirati kapilare kako bi se spustio sadržaj
- staviti uzorke u uređaj LightCycler i pokrenuti program *ABCBI 2677G>T/A*

Tablica 10. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju *ABCBI 2677G>T/A*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)
Sterilna destilirana voda za PCR	4,3
FastStart DNA Master Hyb Probe master mix	1
Mg ²⁺ (25mM)	1,2
<i>r</i> - početnica	0,5
<i>f</i> - početnica	0,5
<i>anchor</i> hibridizacijska proba	0,5
<i>sensor</i> hibridizacijska proba	0,5
PBS	0,5
DMSO	0,5
DNA	0,5
volumen reakcijske smjese	10



Slika 8. Analiza trialelnog lokusa *ABCBI 2677G>T/A*.

Temperature taljenja prema genotipu: TT 39°C, GT 39°C i 46°C, GG 46°C, TA 39°C i 51°C.

4.5.2.3. Genotipizacija duplikacija i delecije gena *CYP2D6* metodom PCR

Genotipizacija delecije *CYP2D6**5 i duplikacija *CYP2D6**dupl provedena je metodom amplifikacije dugih ulomaka, tzv. *long-range* PCR na uređaju *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, SAD).

Oprema:

- uređaj GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, SAD);
- sustav za elektroforezu Sub-Cell GT s ispravljačem PowerPac Basic (BioRad, SAD)
- uređaj za snimanje i analizu gelova G:BOX (Syngene, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- mikrocentrifuga Eppendorf MiniSpin (Eppendorf, Njemačka)
- vibracijska miješalica (Clever Scientific Ltd., Ujedinjeno Kraljevstvo)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 0,5 -10 µL (Eppendorf, Njemačka)
- automatska pipeta sa sterilnim nastavcima volumena 10-100 µL (Eppendorf, Njemačka)
- sterilne mikroeprovete volumena 0,2, 0,5 i 1,5-2,0 mL (Eppendorf, Njemačka)

Analiza delecije *CYP2D6**5 provedena je prema opisu Dorado i sur. (237):

Reagensi za analizu *CYP2D6* *5 :

- enzim Expand Long Polymerase, 5 U/µL (Roche Diagnostics, Njemačka)
- set dNTP, 10 Mm (Roche Diagnostics, Njemačka)
- PCR pufer 3 (Roche Diagnostics, Njemačka)
- početnice (TIB MOLBIOL, Njemačka):
*CYP2D6**5 f 5'-ACC GGG CAC CTG TAC TCC TCA -3'
*CYP2D6**5 r 5'-GCA TGA GCT AAG GCA CCC AGA C-3'
- početnice (Invitrogen, SAD):
DPKLow 5'-GCC GAC TGA GCC CTG GGA GGT AGG TA-3'
DPKup 5'-GTT ATC CCA GAA GGC TTT GCA GGC TTC A-3'
- agarozna za pripremu gela za elektroforezu Grade >1000 pb, Merck
- boja za nanošenje PCR umnožaka na gel 6X (Sigma Aldrich, SAD)
- boja za vizualizaciju GelRed Drops (Olerup, Austrija)
- DNA molekularni marker III (Roche Diagnostics, Njemačka)

Postupak

Amplifikacija metodom PCR:

- pripremiti uzorke DNA
- pripremiti ili otopiti već pripremljene reagense prema uputi proizvođača
- lagano promiješati reagense na vibracijskoj miješalici
- centrifugirati u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se spustio sadržaj bočica
- pipetirati reagense PCR reakcijske smjese u mikroepruvetu (tablica 11.)
- lagano promiješati protresanjem mikroepruvete prstom i centrifugirati 3-5 s
- pipetirati PCR reakcijsku smjesu i DNA u mikroepruvete za PCR
- staviti uzorke u uređaj GeneAmp PCR System 9700 i pokrenuti program *CYP2D6*5*

Tablica 11. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju *CYP2D6*5*

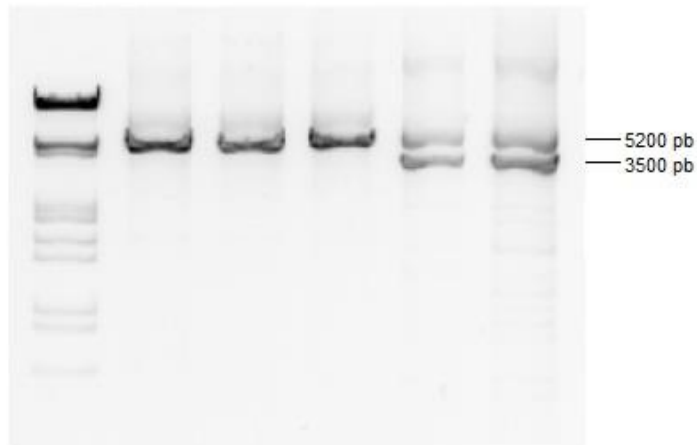
Sastojci reakcijske smjese	Volumen (µL)
sterilna destilirana voda PCR čistoće	37
PCR pufer 3	2
dNTP (10 mM)	2
<i>CYP2D6*5f</i> (20 µM)	0,5
<i>CYP2D6*5r</i> (20 µM)	0,5
DPK _{Low} (20 µM)	1
DPK _{Up} (20 µM)	1
Expand Long Polymerase (5 U/µL)	1
Uzorak DNA	3
volumen reakcijske smjese	50

Uvjeti PCR reakcije za analizu *CYP2D6*5*:

- denaturacija na 93°C 1 min;
- amplifikacija u 37 ciklusa na 93°C 1 min, 66°C 2 min i 68°C 7 min;
- 72°C 10 min;

Detekcija elektroforezom:

Analiza umnožaka PCR provodila se elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Razdvajanje na uređaju za elektroforezu PowerPac Basic je trajalo 45 minuta pri naponu od 100 V. Vizualizacija gelova izvodila se na u uređaju G:BOX pomoću boje za vizualizaciju GelRed Drops, a za analizu duljine umnožaka korišten je molekularni biljeg XIII. Duljina umnoška alela divljeg tipa je 5200 pb, a varijantnog alela *CYP2D6*5* je 3500 pb. Interpretacija dobivenih umnožaka DNA i određivanje pojedinog genotipa prikazana na slici 9.



Slika 9. Analiza *CYP2D6*5* metodom *long range-PCR*

Analiza duplikacije *CYP2D6*dupl* provedena je prema opisu Steijns i sur. (238).

Reagensi za analizu *CYP2D6*dupl* :

- enzim Expand Long Polymerase, 5 U/ μ L (Roche Diagnostics, Njemačka)
- set dNTP, 10 Mm (Roche Diagnostics, Njemačka)
- PCR pufer 3 (Roche Diagnostics, Njemačka)
- početnice (Invitrogen, SAD):
CYP2D6-32r 5'-CAC GTG CAG GGC AC CTA GAT-3'
CYP2D6-17f 5'-TCC CCC ACT GAC CCA ACT CT-3'
- agarozna za pripremu gela za elektroforezu Grade >1000 pb, Merck
- boja za nanošenje PCR umnožaka na gel 6X (Sigma Aldrich, SAD)
- boja za vizualizaciju GelRed Drops (Olerup, Austrija)
- DNA molekularni marker III (Roche Diagnostics, Njemačka)

Postupak

Uvjeti PCR reakcije za analizu *CYP2D6*dupl*:

- denaturacija na 93°C 1 min;
- amplifikacija u 37 ciklusa na 93°C 1 min, 67°C 33 s i 68°C 6 min;
- 72°C 10 min;

Amplifikacija metodom PCR:

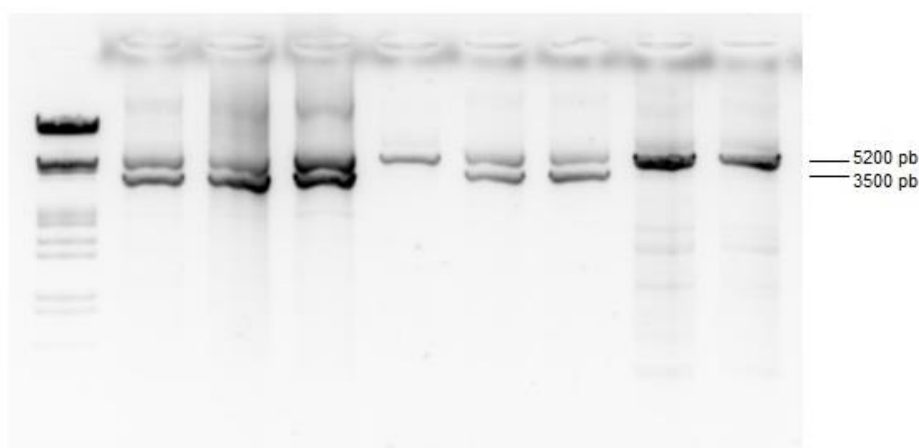
- pripremiti uzorke DNA
- pripremiti ili otopiti već pripremljene reagense prema uputi proizvođača
- lagano promiješati reagense na vibracijskoj miješalici
- centrifugirati u mikrocentrifugi 3-5 s pri 3000 rpm kako bi se spustio sadržaj bočica
- pipetirati reagense PCR reakcijske smjese u mikroepruvetu (tablica 12.)
- lagano promiješati protresanjem mikroepruvete prstom i centrifugirati 3-5 s
- pipetirati PCR reakcijsku smjesu i DNA u mikroepruvete za PCR
- staviti uzorke u uređaj GeneAmp PCR System 9700 i pokrenuti program *CYP2D6*5*

Tablica 12. Sastojci reakcijske smjese za genotipizaciju *CYP2D6*dupl*

Sastojci reakcijske smjese	Volumen (μL)
sterilna destilirana voda PCR čistoće	35
PCR pufer 3	5
dNTP (10 mM)	2
<i>f</i> - početnica (5 μM)	2
<i>r</i> - početnica (5 μM)	2
Expand Long Polymerase (5 U/μL)	1
Uzorak DNA	3
volumen reakcijske smjese	50

Detekcija elektroforezom:

Analiza umnožaka PCR provodila se elektroforezom u 1% agaroznom gelu. Razdvajanje na uređaju za elektroforezu PowerPac Basic je trajalo 45 minuta pri naponu od 100 V. Vizualizacija gelova izvodila se na u uređaju G:BOX, uz molekularni biljeg XIII. Duljina umnoška alela divljeg tipa je 5200 pb, a varijantnog alela *CYP2D6*dupl* je 3500 pb. Interpretacija dobivenih umnožaka DNA i određivanje genotipova prikazana na slici 10.



Slika 10. Analiza *CYP2D6*dupl* metodom *long range*-PCR

4.6. Statističke metode

Prikupljeni podatci analizirani su metodama deskriptivne statistike. Statističke analize su provedene za grešku I vrste $\alpha=0,05$ i grešku II vrste $\beta=0,20$, odnosno snagu testa 0,80 ($1-\beta$). Za analizu podataka korišten je statistički računalni program SAS 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, SAD) za operativni sustav Windows i Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, SAD).

Analiza polimorfizama

Ispitanici su stratificirani sukladno genotipovima na ciljnim lokusima na nositelje “divljih” (*wt*) funkcionalnih alela (*wt/wt*) i nositelje varijantnih alela (*mut*; *wt/mut* ili *mut/mut*).

Neravnoteža povezanosti (engl. *linkage disequilibrium*, LD) (239) dvaju lokusa procijenjena je metodom omjera vjerodostojnosti za lokuse nepoznatih gametskih faza (240), primjenom računalnog programa Arlequin ver. 3.5 (241).

Analiza polimorfizama i koncentracija

Analize ravnotežnih koncentracija risperidona i 9-OH risperidona temeljile su se na:

- a) vrijednostima izmjerenih koncentracija (nmol/L);
- b) vrijednostima izmjerenih koncentracija ujednačenim prema primijenjenoj dozi (*C/D*) (nmol/L po mg doze);
- c) metaboličkom omjeru risperidona i 9-OH risperidona (RIS/9-OHRIS); te su uključivale vrijednosti vršnih i ostatnih koncentracije risperidona, 9-OH risperidona te sume risperidona i aktivnog metabolita 9-OH risperidona (ukupni aktivni lijek, AM), a svaka je skupina analizirana odvojeno.

Za analizu su korišteni prirodni logaritmi (baza *e*) tih vrijednosti, a učinci (engl. *effects*) su iskazani kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio*, GMR) – Podaci su analizirani generalnim linearnim ili generalnim linearnim mješovitim modelima (sukladno kontinuiranoj ili kategorijskoj prirodi zavisnih varijabli).

4.6.1. Veličina uzorka

Veličina uzorka ovog istraživanja je određena prema glavnom cilju (ispitati utjecaj polimorfizama *CYP2D6* i *ABCB1* na sistemsku izloženost risperidonu i 9-OH-risperidonu). Također, veličina uzorka odgovarajuća je i za dodatno provedeno ispitivanje utjecaja polimorfizama *ABCG2* i *ABCB1* na sistemsku izloženost risperidonu i 9-OH risperidonu) i to:

a) temeljem prethodnih istraživanja za polimorfizam *ABCG2 421C>A* očekivala se učestalost varijantnog alela od oko 18% (168), a učestalost alela divljeg tipa za ispitivane polimorfizme *ABCB1* očekivala se učestalost 35-40% (185) gdje je učestalost nositelja CC/GG/CC oko 20% (kada su sva tri lokusa homozigoti alela divljeg tipa što rezultira haplotipom „normalne funkcije“ transportera *ABCB1*);

b) temeljem prethodnih istraživanja očekivana učestalost *CYP2D6* normalnih ili vrlobrzih metabolizatora (NM/UM) je od oko 50% i 5% (242), odnosno sveukupno 55%;

c) vršne i ostatne koncentracije obrađene su zajednički kao ponovljeni podaci (vrijednosti su uparene prema pacijentu) mješovitim linearnim modelom uz prilagodbu prema logaritamski transformiranim vrijednostima koncentracija.

d) smatrali smo da ukupna (prilagođena) srednja razlika (na logaritamskoj skali) od 0.223 ili -0.223 ili veća odgovara omjeru geometrijskih srednjih vrijednosti (engl. *geometric means ratio*, GMR) od 1,25 ili 0,80, između *ABCG2* varijantnog alela u donosu na alel divljeg tipa ili između *ABCB1* haplotipa „normalne funkcije” u odnosu na “ostale” može biti od praktične važnosti;

e) s dva ponovljena mjerenja koncentracija (uz sličnu razliku među grupama) te uz omjer ispitanika u podskupinama od 4:1 (odnosno 80% prema 20%) i uz standardnu devijaciju razlike u svakoj točki koja je 1,5 puta veća od razlike, 72 ispitanika u većoj podskupini i 18 u manjoj (ukupno 90) daje snagu testa od 80% da se otkrije unaprijed određena najmanja razlika u dvostranoj alfa 0,05.

4.6.2. Osnovna analiza

Analiza utjecaja polimorfizama na sistemsku izloženost risperidonu

Za ostvarenje glavnog cilja ovog istraživanja provedene su dvije analize – glavni model i tri dodatna modela:

a) model „glavnog učinka“ uključivao je istovremeno fenotip CYP2D6 dihotomiziran kao NM/UM ili „ostali“, genotip *ABCG2* 421C>A dihotomiziran kao nositelji „divljeg“ ili varijantnog alela, genotip tri polimorfizma *ABCB1* dihotomiziran kao haplotip „normalne funkcije“ CC/GG/CC ili „ostali“, vrijeme uzorkovanja (vršne ili ostatne koncentracije), dob ispitanika kao zamjenu za procjenu bubrežne funkcije (pacijenti s kroničnim bubrežnim zatajenjem su isključeni, ali procjene GFR nisu bile dostupne), i ovisno o podacima konkomitantna primjena relevantnih induktora ili inhibitora CYP enzima ili transportera.

b) tri dodatna modela s istim nezavisnim varijablama, zasebno su testirala interakcije koncentracija (vršnih i ostatnih) i polimorfizama: interakcija vrijeme uzorkovanja*fenotip CYP2D6, interakcija vrijeme uzorkovanja*genotip *ABCG2*, interakcija vrijeme uzorkovanja*haplotip *ABCB1* – kako bi se procijenilo da li je „ukupni učinak“ reproducibilan (ponovljiv) za vršne i ostatne koncentracije te opravdalo korištenje podataka ponovljenih mjerenja.

Za analizu, tri modela s istim nezavisnim varijablama su prilagođena kako bi ispitala potencijalne interakcije (model po interakciji) između dva genotipa transportera i između svakog od dva genotipa transportera i fenotipa CYP2D6.

Analiza utjecaja polimorfizama na težinu simptoma i nuspojave

Što se tiče specifičnih ciljeva analizirani su pokazatelji težine simptoma i praćenje nuspojava:

a) ukupni zbroj na ocjenskoj ljestvici PANSS; b) rezultat podljestvice pozitivnih simptoma; c) rezultat podljestvice negativnih simptoma; d) rezultat opće psihopatološke podljestvice; e) rezultat dodatne podljestvice za agresivnost; f) ocjenska ljestvica SAS za procjenu akutnih EPS; g) primjena antimuskarinskih lijekova (što ukazuje na postojanje EPS). Za procjenu učinka CYP2D6 fenotipa (NM/UM ili „ostali“), polimorfizma *ABCG2* 421C>A (nositelji „divljeg“ ili varijantnog alela) i haplotipa *ABCB1* (CC/GG/CC ili „ostali“) na težinu simptoma korištena su tri mješovita generalizirana linearna modela prilagođena razlikama u vrijednostima nakon 3. i 6. mjeseci u odnosu na početnu vrijednost svakog pokazatelja težine simptoma: interakcija vrijeme uzorkovanja*fenotip CYP2D6, interakcija vrijeme uzorkovanja*genotip *ABCG2*, interakcija vrijeme uzorkovanja*haplotip *ABCB1*.

Prilagodbe su uključivale početnu vrijednost, dob, spol, istodobnu primjenu drugih lijekova, doze risperidona i vrste genotipova (fenotipova) koje nisu uključene u interakcije.

4.6.3. Analiza moderirane medijacije

Pacijenti su podijeljeni prema fenotipu CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), genotipu *ABCG2* *421C>A* (nositelji varijantnog alela ili nositelji *wt* alela) i ukupnom genotipu *ABCB1* (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili alela divljeg tipa na tri lokusa: „*wt* - normalna aktivnost“ (CC/GG/CC + do dva varijantna alela (jedan heterozigotni lokus ili jedan varijantni homozigotni lokus) ili „ostali genotipovi – smanjena aktivnost“).

Osmišljena su dva modela:

- (i) Tip 1 – fenotip CYP26 i genotip *ABCG2* se alternativno smatraju prediktorom ili moderatorom (a) učinka prediktora na medijator (razina ukupnog aktivnog lijeka – logaritamski transformirane vrijednosti vršnih i ostalih koncentracija ujednačenih prema dozi za risperidon+9-OH-risperidon 6. i 8. tjedan) (b) izravnog učinka (tj. onog učinka koji nije povezan s njegovim učinkom na medijator) na klinički ishod (udio pacijenata s smanjenjem vrijednosti PANSS \geq 30% u 12. tjednu liječenja, odnosno 4-5 tjedana i dvije doze nakon farmakokinetičkih podataka); medijator utječe na ishod; prediktor može i ne mora imati izravni ili/i neizravni učinak (preko medijatora) na ishod. Svi izravni i neizravni učinci podešeni su po dobi, spolu i ukupnom genotipu *ABCB1*;
- (ii) Tip 2 – isto kao Tip 1 gdje se genotip *ABCB1* smatra moderatorom učinka medijatora na ishod (dob i spol ostaju kovarijate).

5. REZULTATI

5.1. Osobine ispitanika

5.1.1. Demografski i klinički podatci

U istraživanje je bilo uključen 101 ispitanik čije su karakteristike opisane u tablici 13.

Tablica 13. Demografski podatci ispitanika, genotipovi/fenotipovi i farmakokinetički podatci u stanju ravnoteže. Podatci su prikazani kao medijani (raspon) ili brojevi (postoci).

Demografski podatci i geno(feno)tipovi	
N	101
Dob (godine)	38 (20-69)
Muškarci	57 (56.4)
ABCG2 421C>A	
CC	83 (82.1)
CA	18 (17.8)
AA	0
ABCB1 1236C>T	
CC	38 (37.6)
CT	40 (39.6)
TT	23 (22.8)
ABCB1 2677G>T/A	
GG	37 (36.6)
GT	40 (39.6)
GA	3 (3.0)
TT	21 (20.8)
AA	0
ABCB1 3435C>T	
CC	35 (34.6)
CT	33 (32.7)
TT	33 (32.7)
ABCB1 ukupni genotip	
CC/CC/CC (<i>wt</i> homozigot)	25 (24.8)
TT/TT/TT (<i>mut</i> homozigot)	20 (19.8)
CYP2D6 genotip	
*1/*1	42 (41.6)
*1/*1 xN	4 (4.0)
*1/*3	3 (3.0)
*1/*4	23 (22.8)
*1/*4 xN	4 (4.0)
*1/*41	12 (11.9)
*1/*41 xN	1 (1.0)
*3/*4	1 (1.0)
*4/*4	2 (2.0)
*4/*41	5 (4.9)
*41/*41	3 (3.0)
*5/*41	1 (1.0)
CYP2D6 ukupni fenotip	
Normalni metabolizatori (NM)	54 (53.5)
Intermedijarni metabolizatori (IM)	35 (34.7)
Slabi/spori metabolizatori (PM)	3 (3.0)
Vrlobrzi metabolizatori (UM)	4 (4.0)
xN	5 (4.9)
Normalni + vrlobrzi (NM+UM)	58 (57.5)
CYP3A4 genotip	
*1/*1	94 (93.1)
*1/*22	7 (6.9)
CYP3A5 genotip	
*1/*3	8 (7.9)
*3/*3	93 (92.1)
CYP3A ukupni fenotip	
Normalni metabolizatori (NM)	7 (6.9)
Intermedijarni metabolizatori (IM)	88 (87.1)
Slabi/spori metabolizatori (PM)	6 (5.9)
Farmakokinetička evaluacija	
Broj lijekova u terapiji	3 (1-7)
Relevantni CYP inhibitori	21 (20.8)
Relevantni CYP2D6 inhibitori	4 (4.0)
Relevantni CYP3A4 inhibitori	18 (17.8)
Relevantni CYP3A4 induktori	2 (2.0)
Relevantni ABCB1 inhibitori	4 (4.0)
Relevantni ABCB1 induktori	2 (2.0)
Doza i.m. risperidona 25/37.5/50 mg	3 /48/50
Vršne konc. (C_{max}, nmol/L), n=99	
Risperidon	25.5 (0-384)
9-OH-risperidon	45.3 (15-168)
Risperidon+9-OH-risperidon	76.5 (15-442)
Risperidon C/D	0.62 (0-10.2)
9-OH-risperidon C/D	1.17 (0.3-4.48)
Risperidon + 9-OH-risperidon C/D	1.78 (0.30-11.8)
Omjer risperidon/9-OH-risperidon	0.49 (0-7.60)
Ostatne konc. (C_{trough}, nmol/L)n=91	
Risperidon	13.7 (0-217)
9-OH-risperidon	31.8 (0-140)
Risperidon+9-OH-risperidon	46.6 (0-264)
Risperidon C/D	0.32 (0-5.78)
9-OH-risperidon C/D	0.75 (0-2.97)
Risperidon + 9-OH-risperidon C/D	1.07 (0-7.03)
Omjer risperidon/9-OH-risperidon	0.40 (0-4.63)

Doze i.m. pripravka risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) od 37.5 mg i 50 mg bile su jednako zastupljene u ispitanika dok je svega 3 ispitanika primilo dozu od 25 mg (tablica 13.). Doze LAI-RIS bile su jednake za svaki interval doziranja i ostale su nepromijenjene tijekom promatranog razdoblja.

Za vrijeme farmakokinetičke procjene osim LAI-RIS, svi ispitanici su bili liječeni barem još jednim lijekom (u rasponu od 1 do 7 lijekova). Konkomitantnu terapiju uglavnom su činili psihijatrijski lijekovi, jer su samo tri pacijenta liječena blokatorima beta-adrenergičkih receptora, tri s inhibitorima angiotenzin-konvertirajućega enzima, jedan s amlodipinom (hipertenzija), a jedan s metforminom (dijabetes), levotiroksinom (hipotireoza), salmeterolom + flutikazonpropionatom (astma) i noretisteronom + etinil estradiolom (nepravilno vaginalno krvarenje). 21 ispitanik uzimao je neki od lijekova koji se smatraju relevantnim inhibitorima enzima CYP2D6 i CYP3A4, a uporaba induktora CYP3A4 (karbamazepin) i inhibitora/induktora transportnih proteina ABCB1 i ABCB2 je bila sporadična (tablica 13.). Relevantnim inhibitorima i induktorima CYP bili su smatrani: (i) za inhibiciju CYP2D6: paroksetin (jedan pacijent), duloksetin (jedan pacijent), sertralin (dva pacijenta); (ii) za inhibiciju CYP3A4: paroksetin (jedan pacijent), natrijev valproat (18 pacijenata); (iii) za indukciju CYP3A4: karbamazepin (dva pacijenta); (iv) za inhibiciju ABCB1: paroksetin (jedan pacijent), sertralin (dva pacijenta), pantoprazol (jedan pacijent); (v) za indukciju ABCB1: karbamazepin (dva pacijenta). Barbiturati nisu korišteni.

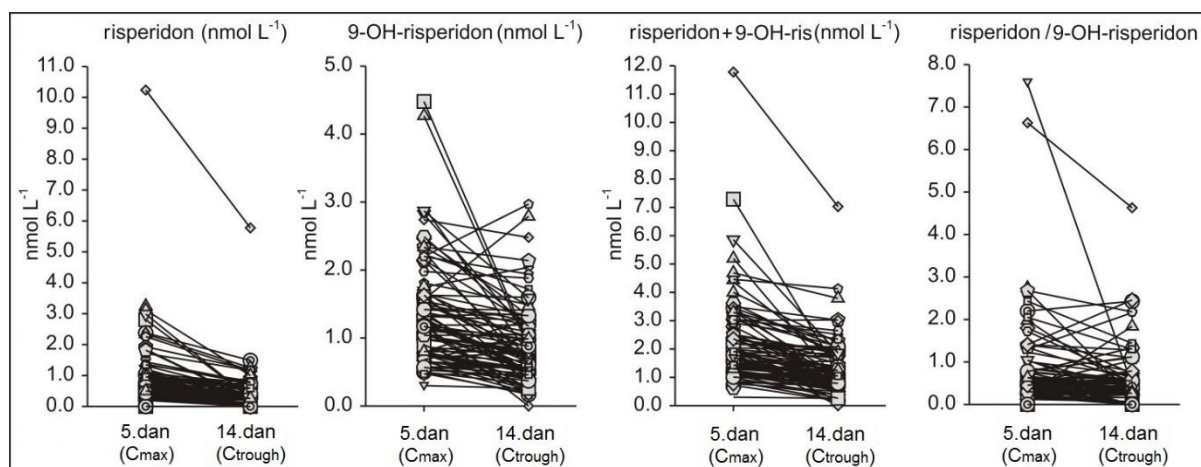
5.1.2. *Koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona*

Rezultati ravnotežnih koncentracija izmjerenih koncentracija i koncentracija prilagođenih prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon+9-OH-risperidon) i za omjer risperidon/9-OH-risperidon prikazani su u tablici 13.

Interindividualne varijabilnosti za sve analite bile su velike, kako kod vršnih koncentracija ($C_{max,5.dan}$) tako i kod ostatnih koncentracija ($C_{trough, 14. dan}$) u stanju ravnoteže (nakon četvrte injekcije). Jasno je vidljivo da su izmjerene ostatne koncentracije (na kraju intervala doziranja, prije sljedeće doze) za sve analite manje od vršnih koncentracija te od terapijskog raspona (50-150 nmol/L) (tablica 13.).

Razine risperidona i ukupnog aktivnog lijeka (risperidon + 9-OH-risperidon) razlikovale su se ovisno o vremenu uzorkovanja u svih ispitanika te su se vrijednosti smanjivale od vršnih

koncentracija prema ostatnim koncentracijama u svih ispitanika. Razine 9-OH-risperidona i omjer risperidon/9-OH-risperidon su se mijenjali različito (slika 11.).



Slika 11. Pojedinačni podaci pacijenata o koncentracijama prilagođenim prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i omjer risperidon/9-OH-risperidon u stanju ravnoteže – vršne koncentracije 5.dan (C_{max}) i na kraju intervala doziranja 14.dan (C_{trough}).

5.1.3. Učestalost polimorfizama CYP2D6, CYP3A4, CYP3A5, ABCB1 i ABCG2

Učestalosti varijantnih alela ispitivanih polimorfizama prikazane su u tablici 13.

Genotipovi/fenotipovi *CYP2D6* temeljeni na kombinaciji alela *dupl**, 3, *4, *5, *6, *41 bili su: 54 (53,5%) nositelja *CYP2D6*1/*1* ili *CYP2D6*1/*41* klasificiranih kao NM; 35 (34,7%) nositelja *CYP2D6*1/*3*, *CYP2D6*1/*4*, *CYP2D6*41/*41*, *CYP2D6*4/*41* ili *CYP2D6*5/*41*, klasificiranih kao IM; 3 (3,0%) nositelja *CYP2D6*4/*4* ili *CYP2D6*3/*4* klasificiranih kao PM; 4 (4,0%) nositelja *CYP2D6*1/*1* xN klasificirani kao UM; 5 (4,9%) nositelja duplikacije varijantnog alela: 4 (4,0%) *CYP2D6*1/*4* xN i 1(1,0%) nositelj *CYP2D6*1/*41* xN s nedefiniranim fenotipom. Ukupna zastupljenost nositelja fenotipova NM/UM je bila 58 (57,5%).

Najviše je bilo zastupljeno ispitanika nositelja *CYP2D6*1/*1*, 42 (41,6%). Alel *CYP2D6*4* je bio najzastupljeniji nefunkcionalni alel: 23 (22,8%) nositelja *CYP2D6*1/*4* i 2 (2,0%) nositelja *CYP2D6*4/*4*. Od nefunkcionalnih alela detektiran je još *CYP2D6*3*: 3 (3,0%) nositelja *CYP2D6*1/*3* i 1 (1,0%) nositelj *CYP2D6*3/*4*; alel *CYP2D6*6* nije bio prisutan.

Učestalost alela *CYP3A4*22* bila je: 94 (93,1%) nositelja *CYP3A4*1/*1*, 7 (6,9%) nositelja *CYP3A4*1/*22*, nije bilo nositelja *CYP3A4*22/*22*.

Učestalost alela *CYP3A5*3* bila je: 93 (92,1%) nositelja *CYP3A5*3/*3*, 8 (7,9%) nositelja *CYP3A5*1/*3*, nije bilo nositelja *CYP3A5*1/*1*.

Učestalost fenotipa *CYP3A* bila je: 6 (5,9%) nositelja *CYP3A4*1/*22* i *CYP3A5*3/*3* (PM), 88 (97,1%) nositelja *CYP3A4*1/*1* i *CYP3A5*3/*3* (IM), 7 (6,9%) nositelja *CYP3A4*1/*1* i *CYP3A5*1/*3* (NM), dok nije bilo nositelja *CYP3A5*1/*1*.

S obzirom da su polimorfizmi *CYP3A4*22* i *CYP3A5*3* nađeni u malom broju ispitanika – s učestalošću alela od oko 4% (7 ispitanika bili su nositelji *CYP3A4*22*, a 8 ispitanika *CYP3A5*3*), nije mogao zadovoljiti uvjet od „najmanje 10 ispitanika u podskupinama po genotipu“ pa ovi polimorfizmi nisu uzeti u obzir u daljnjim analizama.

Učestalost alela *ABCB1* 1236 C>T bila je: CC 38 (37,6%), CT 40 (39,6%), TT 23 (22,8%).

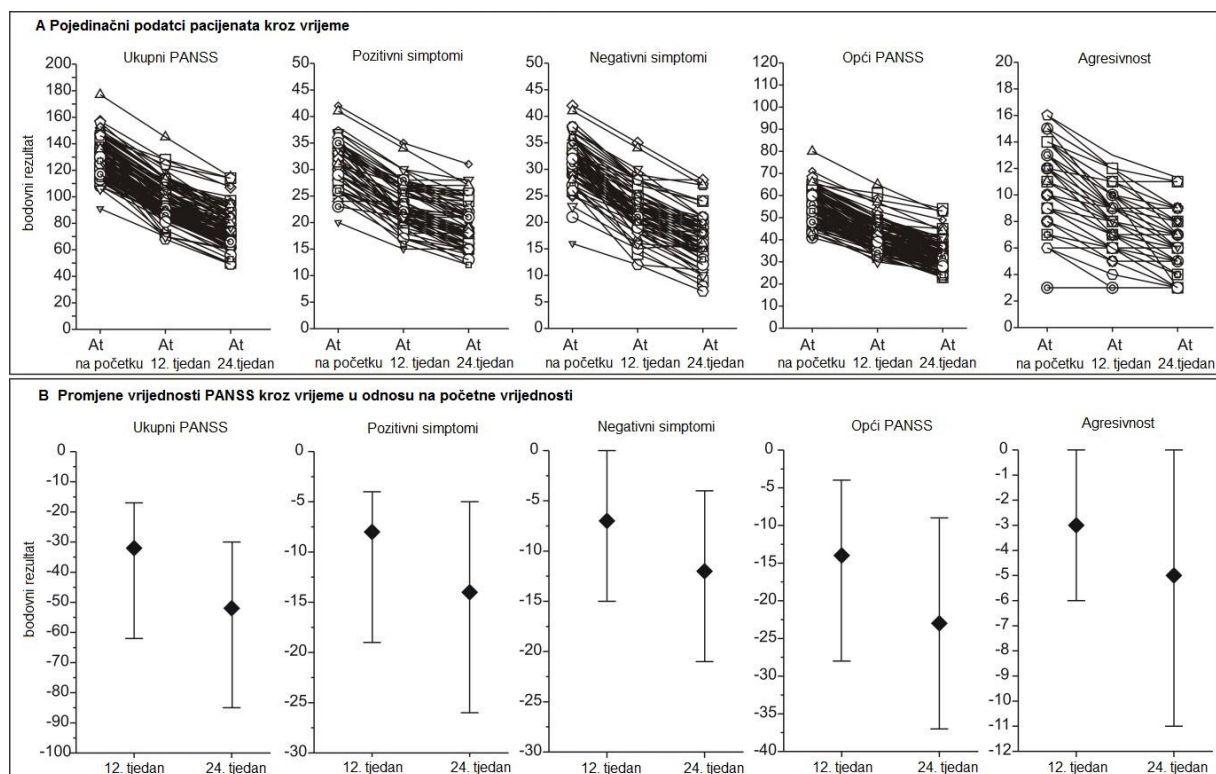
Učestalost alela *ABCB1* 2677G>T/A bila je: GG 37 (36,6%), GT 40 (39,6%), TT 21 (20,8%), GA 3 (3,0%), dok nije bilo nositelja alela AA.

Učestalost alela *ABCB1* 3435 C>T bila je: CC 35 (34,6%), CT 33 (32,7%), TT 33 (32,7%).

Učestalost alela *ABCG2* 421C>A bila je: 83 (82,1%) nositelja *ABCG2* 421CC, 18 (17,8%) nositelja *ABCG2* 421CA, nije bilo nositelja *ABCG2* 421AA.

Nije uočeno odstupanje od Hardy-Weinberg ravnoteže niti na jednom lokusu, niti sveukupno, niti u podskupinama.

5.1.4. Ocjena težine simptoma bolesti (PANSS)



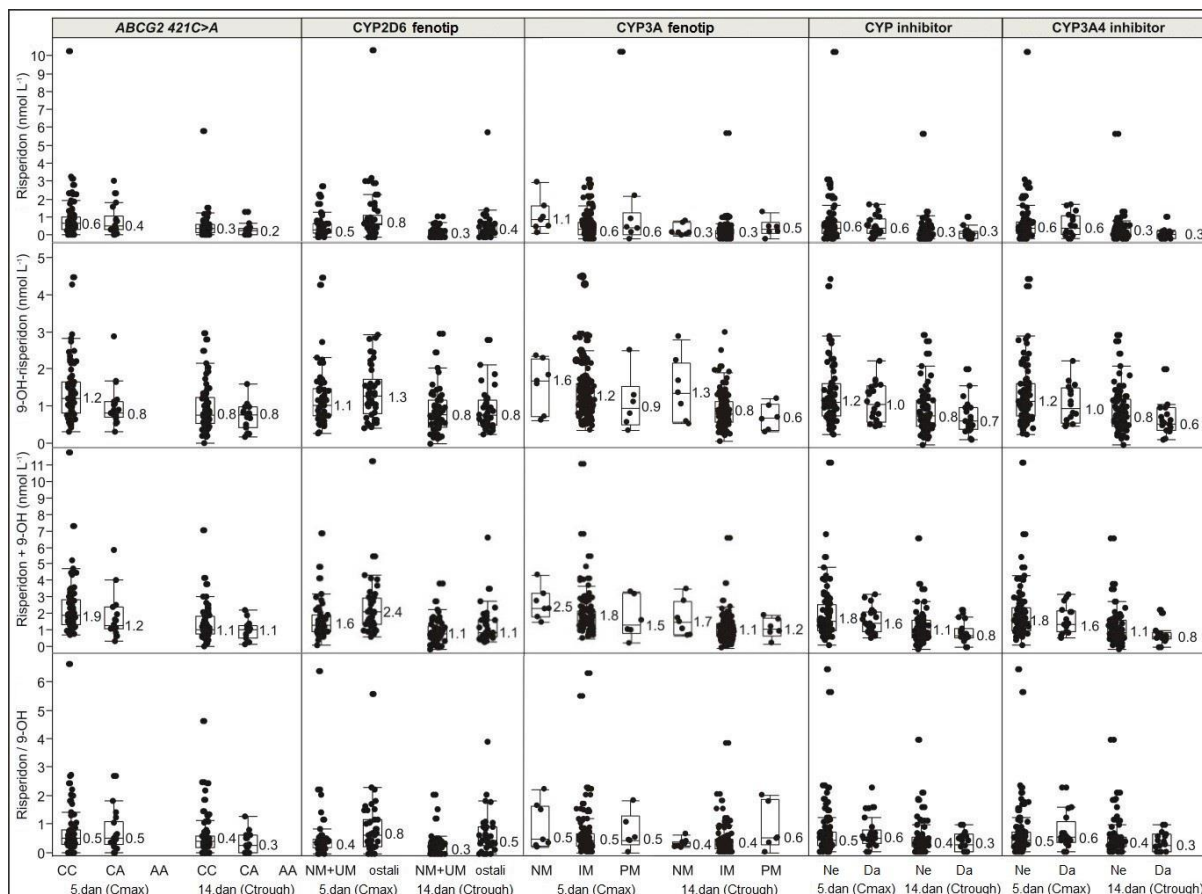
Slika 12. A. Pojedinačni podatci pacijenata za vrijednosti ukupnog PANSS i vrijednosti PANSS podljestvica tijekom posjeta. **B.** Apsolutna promjena vrijednosti ukupnog PANSS i vrijednosti PANSS podljestvica kroz vrijeme. Rombovi su medijani, a vertikalne crte rasponi.

5.2. Utjecaj polimorfizama *CYP2D6*, *ABCB1* i *ABCG2* na koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona u stanju dinamičke ravnoteže

5.2.1. Izvorni farmakokinetički podatci

Izvorni izmjereni farmakokinetički podatci prema genotipovima i fenotipovima od interesa i primjeni inhibitora citokroma P450 (CYP) prikazani su na slici 13., slici 14. i slici 15.

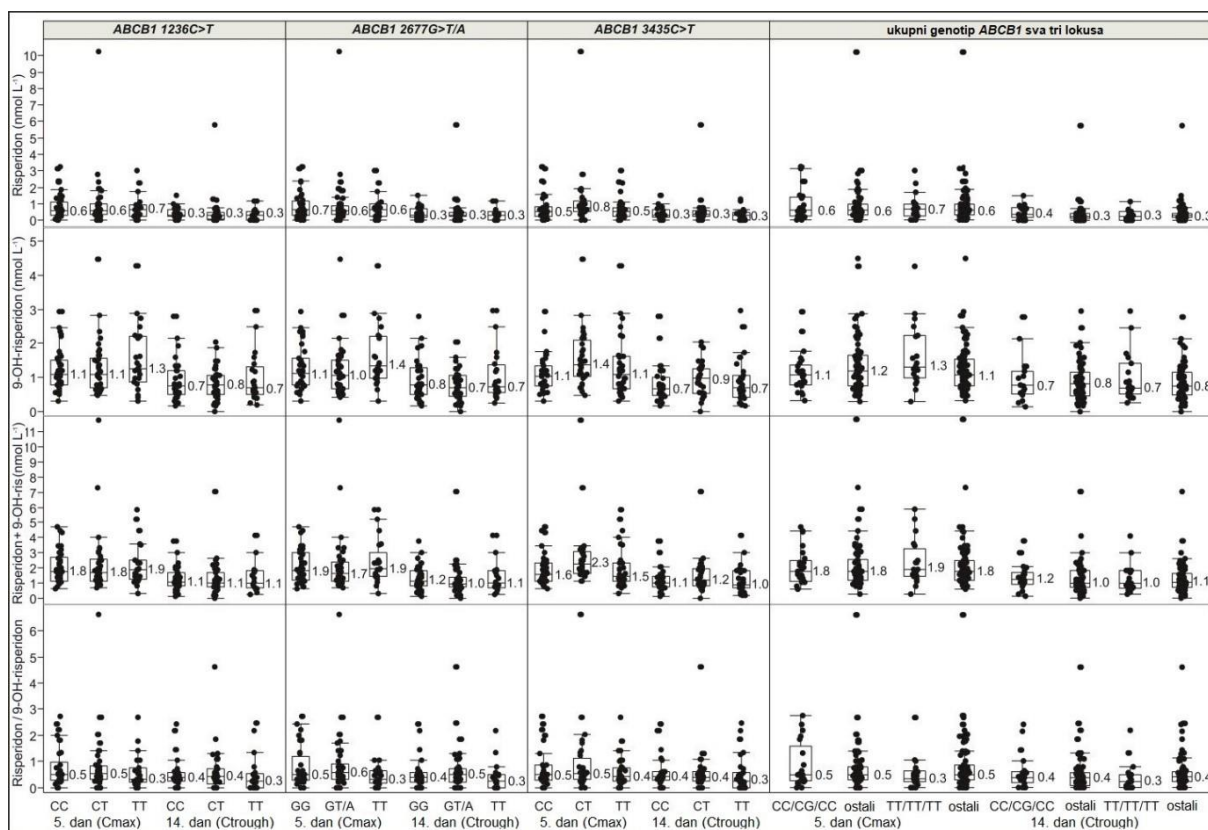
Prikazane su pojedine vrijednosti analita/koncentracija ovisno o fenotipu *CYP2D6* i genotipu *ABCG2 421C>A* (slika 13.), kao i kroz različite podskupine prema ukupnom genotipu *ABCB1* temeljenom na genotipu tri različita lokusa (slika 14., slika 15.).



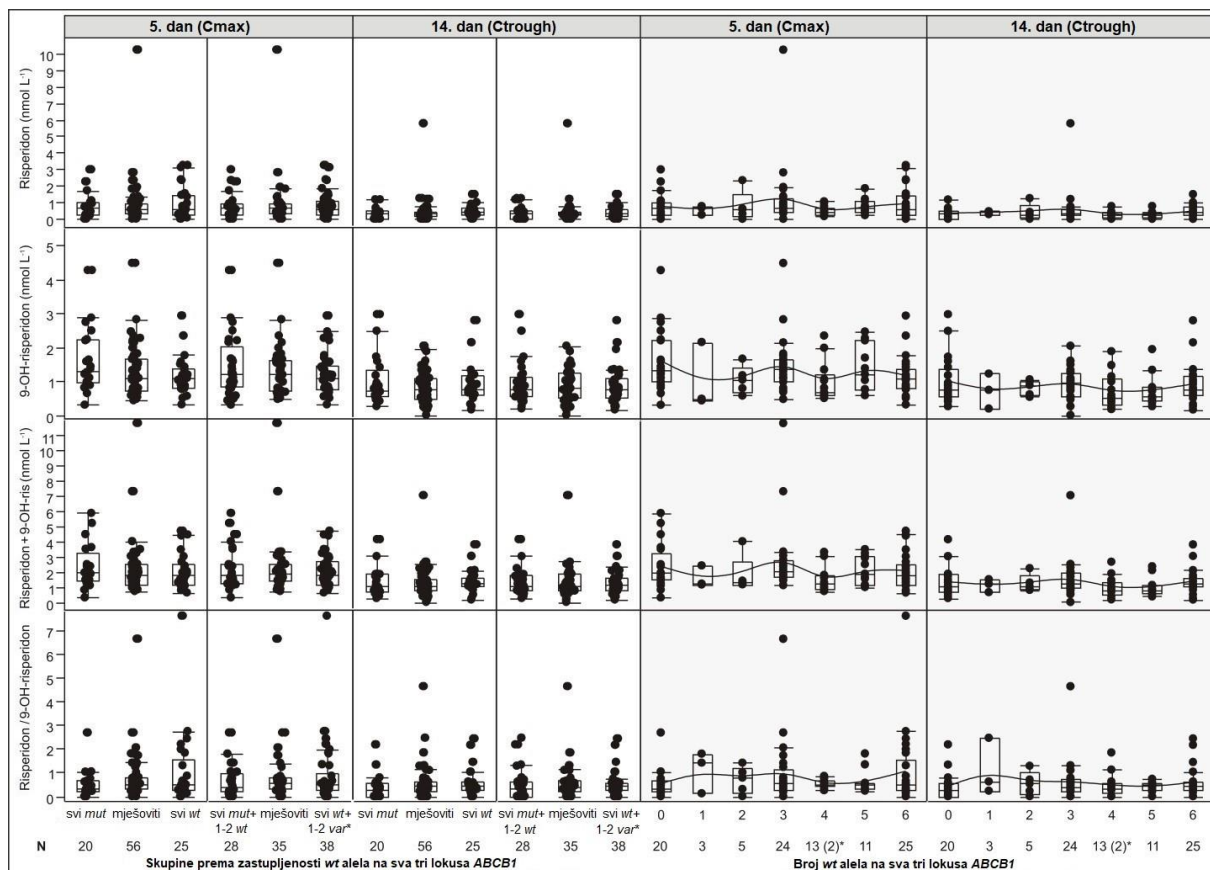
Slika 13. Pojedinačni „sirovi“ podatci pacijenata o koncentracijama ujednačenim prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i omjer risperidon/9-OH-risperidon u stanju ravnoteže – vršne koncentracije 5.dan (C_{max}) i na kraju intervala doziranja 14.dan (C_{trough}). Krugovi prikazuju pojedinačne vrijednosti, horizontalne crte s bročanim vrijednostima medijane, kvadrati označavaju kvartile, a vertikalne crte unutarnju ograda. Točke izvan ograda su netipične vrijednosti (engl. *outlier*).

Na slici 13. prikazani su rezultati: prema genotipu *ABCG2 421 C>A* – nositelji *wt* alela (CC, n=83) u usporedbi s nositeljima varijantnog alela (isključivo heterozigoti CA, n=18); prema fenotipu CYP2D6 normalni i vrlorbrzi metabolizatori (NM+UM, n=58) u usporedbi s „ostali“ (n=43); prema fenotipu CYP3A normalni metabolizatori (NM, n=7), intermedijarni metabolizatori (IM, n=88) i spori metabolizatori (PM, n=6); primjena CYP inhibitora kategorizirana kao Ne (n=80) ili Da (n=21); i primjena inhibitora CYP3A4 (isključivo valproat) kategorizirana kao Ne (N=83) ili Da (n=18).

Na slici 14. prikazani su rezultati: prema genotipu *ABCB1* za tri lokusa: *ABCB1* 1236C>T (CC, n=38; CT, n=40; TT, n=23), *ABCB1* 2677G>T/A (GG, n=37; GT ili GA, n=43; TT, n=21), *ABCB1* 3435C>T (CC, n=35; CT, n=33; TT, n=33); i ukupni genotip *ABCB1* kada je na sva tri lokusa *wt* alel (CC/GG/CC, n=25 ili „ostali“, n=76) ili varijantni alel (TT/TT/TT, n=20 ili „ostali“, n=81).



Slika 14. Pojedinačni „sirovi“ podatci pacijenata o koncentracijama ujednačenim prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i omjer risperidon/9-OH-risperidon u stanju ravnoteže – vršne koncentracije 5.dan (C_{max}) i na kraju intervala doziranja 14.dan (C_{trough}). Krugovi prikazuju pojedinačne vrijednosti, horizontalne crte s brojevanim vrijednostima medijane, kvadrati označavaju kvartile, a vertikalne crte unutarnju ogradu. Točke izvan ograda su netipične vrijednosti (engl. *outlier*).



Slika 15. Pojedinačni „sirovi“ podatci pacijenata o koncentracijama ujednačenima prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i omjer risperidon/9-OH-risperidon u stanju ravnoteže (vršne koncentracije 5.dan (C_{max}) i na kraju intervala doziranja 14.dan (C_{trough})) prema genotipu *ABCB1* po kategorijama temeljenim na prisutnosti *wt* alela na tri lokusa (lijevo) i broja *wt* alela (desno, svjetlo-zasjenjeno, s prugom). Krugovi prikazuju pojedinačne vrijednosti, horizontalne crte s brojčanim vrijednostima medijane, kvadrati označavaju kvartile, a vertikalne crte unutarnju ogradu. Točke izvan ograda su netipične vrijednosti (engl. *outlier*).

Na slici 15. pacijenti su klasificirani na dva različita načina:

- 1.) kao (i) TT/TT/TT (svi varijantni aleli; povezuju se sa slabijom funkcijom transportera), (ii) CC/GG/CC (svi *wt* aleli ; povezuju se s normalnom funkcijom transportera) ili (iii) „mješovito“, tj. svi ostali ukupni genotipovi;
- 2.) kao (i) svi varijantni aleli + 1-2 *wt* alela (2 varijantna homozigotna lokusa i 1 heterozigotni lokus; 2 varijantna homozigotna lokusa i 1 *wt* homozigotni lokus; ili 1 varijantni homozigotni lokus i 2 heterozigotna lokusa), (ii) svi *wt* aleli + 1-2 varijantna alela (2 *wt* homozigotna lokusa i 1 heterozigotni lokus; 2 *wt* homozigotna lokusa i 1 varijantni homozigotni lokus), ili (iii) „ostali“, uključujući one s 4 *wt* alela, ali na 1 *wt* homozigotnom lokusu i 2 heterozigotna lokusa.

*Ukupni genotipovi s 4 *wt* alela na 2 *wt* homozigotna i 1 varijantnim homozigotnim lokusom klasificirani su kao „svi *wt* + 1-2 varijantna alela" (2 ispitanika), dok su ukupni genotipovi s 4 *wt* alela na 1 *wt* homozigotnom lokusu i 2 heterozigotna lokusa klasificirani kao „ostali" (11 pacijenata).

5.2.2. Farmakokinetički podatci ovisno o fenotipovima i genotipovima

U tablici 14. prikazani su farmakokinetički podatci ovisno o fenotipovima i genotipovima od interesa: fenotipovi CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), genotip *ABCG2 421C>A* (nositelji *wt* alela ili nositelji varijantnog alela) i ukupni genotip *ABCB1* (homozigoti *wt* alela na sva tri lokusa (CC/GG/CC) ili „ostali“).

U modelu glavnih učinaka (tablica 15.) fenotip CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) bio je statistički značajno povezan s 29% manjim koncentracijama ujednačenim prema dozi risperidona (GMR=0,71; 95%CI 0,56-0,89; P=0,004), 24% manjim razinama aktivnog lijeka (risperidon + 9-OH-risperidon) (GMR=0,76; 95%CI 0,62-0,93; P=0,010), i 28% manjim omjerom risperidon/9-OH-risperidon (GMR=0,72; 95%CI 0,56-0,92; P=0,009), dok za 9-OH-risperidon nije bilo značajne povezanosti (GMR=0,92; 95%CI 0,76-1,13; P=0,438).

Varijantni alel *ABCG2* (vs. *wt* alel) povezan je s 23% manjim razinama aktivnog lijeka (risperidon + 9-OH-risperidon) (GMR=0,77; 95%CI 0,59-1,01; P=0,059), s tendencijom prema manjim razinama risperidona i 9-OH-risperidona (tablica 15.). Učinak ukupnog genotipa *ABCB1* se nije pokazao relevantnim (tablica 15.).

Tablica 14. Ključni podatci o genotipovima/fenotipovima i farmakokinetički podatci u stanju ravnoteže prikazani ovisno o fenotipu CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), genotipu *ABCG2 421C>A* (nositelji *wt* alela ili nositelji varijantnog alela) i ukupnom genotipu *ABCB1* (homozigoti *wt* alela na sva tri lokusa (CC/GG/CC) ili „ostali“). Podatci su prikazani kao medijani (raspon) ili brojevi (postotci).

	Fenotip CYP2D6		Genotip <i>ABCG2 421C>A</i>		Ukupni genotip <i>ABCB1</i>	
	NM ili UM	Ostali	<i>Wt</i> alel	Varijantni alel	CC/GG/CC	Ostali
N	58	43	83	18	25	76
Dob (godine)	38 (20-69)	40 (20-67)	38 (20-69)	41 (21-69)	37 (20-56)	39,5 (20-69)
Muškarci	31 (53,5)	26 (60,5)	48 (57,8)	9 (50,0)	14 (56,0)	43 (56,6)
CYP2D6 EM ili UM fenotip	---	---	46 (55,4)	12 (66,7)	16 (64,0)	42 (55,3)
<i>ABCG2 421C>A</i> varijantni alel	12 (20,7)	6 (13,9)	---	---	6 (24,0)	12 (15,8)
<i>ABCB1 wt</i> alel (CC/GG/CC)	16 (27,6)	9 (20,9)	19 (22,9)	6 (33,3)	---	---
CYP3A4 EM/IM/PM fenotip	4/ 51 (87,9) /3	3/ 37 (86,1) /3	6/ 73 (88,0) /4	1/ 15 (83,3) /2	2/ 19 (76,0) /4	5/ 69 (90,8) /2
Primjena CYP inhibitora	13 (22,4)	8 (18,6)	16 (19,3)	5 (27,8)	3 (12,0)	18 (23,7)
Vršne konc. (C_{max} , nmol/L)						
Risperidon C/D	0,47 (0,0-2,81)	0,77 (0,0-10,2)	0,65 (0,0-10,2)	0,38 (0,0-2,99)	0,59 (0,0-3,25)	0,63 (0,0-10,2)
9-OH-risperidon C/D	1,06 (0,30-4,48)	1,32 (0,43-2,93)	1,20 (0,31-4,48)	0,82 (0,30-2,87)	1,09 (0,31-2,93)	1,19 (0,30-4,48)
Risperidon+9-OH-risperidon C/D	1,56 (0,30-7,29)	2,36 (0,78-11,8)	1,87 (0,72-11,8)	1,24 (0,30-5,86)	1,78 (0,62-4,69)	1,82 (0,30-11,8)
Omjer risperidon/9-OH-risperidon	0,44 (0,0-7,60)	0,75 (0,0-6,63)	0,49 (0,0-7,60)	0,50 (0,0-2,68)	0,49 (0,0-7,60)	0,49 (0,0-6,63)
Ostatne konc. (C_{trough} , nmol/L)						
Risperidon C/D	0,28 (0,0-1,17)	0,35 (0,0-5,78)	0,35 (0,0-5,78)	0,25 (0,0-1,25)	0,39 (0,0-1,49)	0,30 (0,0-5,78)
9-OH-risperidon C/D	0,75 (0,0-2,97)	0,75 (0,26-2,79)	0,75 (0,0-2,97)	0,76 (0,16-1,59)	0,77 (0,16-2,79)	0,75 (0,0-2,97)
Risperidon+9-OH-risperidon C/D	1,07 (0,0-4,13)	1,06 (0,50-7,03)	1,06 (0,0-7,03)	1,07 (0,16-2,23)	1,19 (0,16-3,79)	1,03 (0,0-7,03)
Omjer risperidon/9-OH-risperidon	0,29 (0,0-2,46)	0,54 (0,0-4,63)	0,42 (0,0-4,63)	0,28 (0,0-1,28)	0,42 (0,0-2,43)	0,40 (0,0-4,63)

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; IM – intermedijarni metabolizatori; PM – spori metabolizatori; C/D – konc. ujednačena prema dozi.

Tablica 15. Učinci fenotipa CYP2D6 (NM/UM u usporedbi s „ostali“), genotipa *ABCG2 421C>A* (nositelji varijantnog alela u usporedbi s nositeljima *wt* alela) i ukupnog genotipa *ABCB1* (homozigoti *wt* alela na sva tri lokusa (CC/GG/CC) u usporedbi s „ostali“) - na koncentracije ujednačene prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i na omjer risperidon/9-OH-risperidon: sažetak glavnih učinaka*. Logaritamski transformirane vrijednosti analizirane su u generalnim linearnim mješovitim modelima (GLIMM), a učinci su izraženi kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR).

	Risperidon		9-OH-risperidon		Risperidon + 9-OH-risperidon		Risperidon/9-OH-risperidon	
	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>
<i>Učinci od primarnog interesa</i>								
CYP2D6 NM/UM vs. „ostali“	0,71 (0,56-0,89)	0,004	0,92 (0,76-1,13)	0,438	0,76 (0,62-0,93)	0,010	0,72 (0,56-0,92)	0,009
<i>ABCB1</i> CC/GG/CC vs. „ostali“	1,09 (0,83-1,42)	0,528	0,97 (0,77-1,22)	0,767	1,06 (0,83-1,34)	0,638	1,14 (0,86-1,51)	0,356
<i>ABCG2</i> varijantni vs. <i>wt</i> alel	0,84 (0,62-1,13)	0,244	0,81 (0,62-1,05)	0,108	0,77 (0,59-1,01)	0,059	0,93 (0,68-1,27)	0,647
<i>Podšavanje</i>								
Vrijeme uzorka: C _{max} vs. C _{trough}	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,52 (1,37-1,68)	<0,001	1,71 (1,55-1,89)	<0,001	1,10 (1,05-1,16)	<0,001
Dob	1,00 (0,99-1,01)	0,928	1,00 (0,99-1,01)	0,955	1,00 (0,99-1,01)	0,888	1,00 (0,99-1,01)	0,644
Primjena CYP inhibitora	1,06 (0,80-1,39)	0,695	0,86 (0,67-1,10)	0,217	0,85 (0,66-1,09)	0,202	1,19 (0,88-1,60)	0,246

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlo brzi metabolizatori; C_{max} – vršne konc.; C_{trough} – konc. na kraju intervala doziranja.

* U ovim modelima, genotipovi i fenotipovi od primarnog interesa tretirani su kao fiksni efekti (engl. *random intercept models*). Podatci su analizirani u tri dodatna modela u kojima su, jedan po jedan, fenotip CYP2D6, genotip *ABCG2* i ukupni genotip *ABCB1* tretirani kao slučajni efekti (engl. *random intercept and random slopes models*)

Tablica 16. Testiranje interakcije između genotipova/fenotipova, primjene CYP inhibitora i vremena uzorkovanja krvi (C_{max} i C_{trough}).

Model	Risperidon		9-OH-risperidon		Risperidon + 9-OH-risperidon		Risperidon/9-OH-risperidon	
	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>
<i>CYP2D6 (NM+UM vs. „ostali“) podešavanje: dob</i>								
CYP2D6 vrijeme uzorkovanja	---	0,247	---	0,424	---	0,362	---	0,340
NM/UM - učinak kod C_{max}	0,58 (0,44-0,77)	---	0,87 (0,69-1,09)	---	0,71 (0,56-0,90)	---	0,67 (0,50-0,90)	---
NM/UM - učinak kod C_{trough}	0,74 (0,54-1,02)	---	0,94 (0,75-1,18)	---	0,78 (0,62-0,98)	---	0,78 (0,58-1,05)	---
<i>ABCG2 (Varijantni alel vs. Wt) podešavanje: dob, CYP2D6 fenotip</i>								
ABCG2 vrijeme uzorkovanja	---	0,610	---	0,404	---	0,858	---	0,162
Varijantni alel - učinak kod C_{max}	0,90 (0,63-1,29)	---	0,75 (0,56-1,01)	---	0,76 (0,56-1,02)	---	1,11 (0,76-1,62)	---
Varijantni alel - učinak kod C_{trough}	0,81 (0,56-1,16)	---	0,84 (0,63-1,13)	---	0,78 (0,58-1,04)	---	0,82 (0,56-1,21)	---
<i>ABCB1 (CC/GG/CC vs. „ostali“) podešavanje: dob, CYP2D6 fenotip</i>								
ABCB1 vrijeme uzorkovanja	---	0,560	---	0,149	---	0,265	---	0,618
CC/GG/CC - učinak kod C_{max}	1,01 (0,73-1,39)	---	0,89 (0,68-1,15)	---	0,99 (0,76-1,29)	---	1,16 (0,83-1,63)	---
CC/GG/CC - učinak kod C_{trough}	1,12 (0,81-1,55)	---	1,05 (0,81-1,37)	---	1,12 (0,86-1,47)	---	1,06 (0,75-1,48)	---
<i>CYP inhibitor (Da vs. Ne) podešavanje: dob, CYP2D6 fenotip</i>								
CYP inhibitor vrijeme uzorkovanja	---	0,522	---	0,934	---	0,317	---	0,791
CYP inhibitor - učinak kod C_{max}	0,97 (0,69-1,36)	---	0,85 (0,65-1,12)	---	0,88 (0,66-1,16)	---	1,19 (0,84-1,71)	---
CYP inhibitor - učinak kod C_{trough}	1,10 (0,78-1,54)	---	0,84 (0,64-1,11)	---	0,78 (0,59-1,03)	---	1,13 (0,79-1,62)	---

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlobrzi metabolizatori; C_{max} – vršne konc.; C_{trough} – konc. na kraju intervala doziranja.

5.2.3. Interakcija između genotipova/fenotipova, primjene CYP inhibitora i vremena uzorkovanja

Nije bilo nezavisne povezanosti između fenotipa CYP2D6, genotipa *ABCG2* ili *ABCB1* sa primjenom CYP inhibitora i vremena uzorkovanja i vremena uzorkovanja krvi (C_{max} i C_{trough}) (tablica 16.)

Podatci na slici 16. i tablici 17. pokazuju:

a) da je multivarijatan model glavnih učinaka koji uključuje fenotip CYP2D6 (dihotomiziran), ukupni genotip *ABCB1* (dihotomiziran), genotip *ABCG2 421C>A* (dihotomiziran) i primjenu CYP inhibitora izvediv s obzirom da je distribucija pacijenti/farmakokinetički uzorci (dva uzorka po pacijentu) takva da omogućuje razumno međusobno podešavanje između pojedinih čimbenika;

b) za modele testiranja uvjeta interakcije između genotipova transportera (ukupni genotip *ABCB1*, genotip *ABCG2*) i fenotipa CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), podešavanje za genotip transportera koji nije uključen u naziv interakcije i za primjenu CYP inhibitora još uvijek dopušta da je barem jedan subjekt (dvije vrijednosti koncentracije) – čimbenik podešavanja uključen u svaku kontrastnu razinu izvedenu iz naziva interakcije. Složeniji uvjeti interakcije rezultirali bi brojnim praznim poljima.

CYP2D6	NM/UM (58/116)								ostali (43/86)							
<i>ABCB1</i>	CC/GG/CC 16/32				ostali 42/84				CC/GG/CC 9/18				ostali 34/68			
CYP inhibitor	DA 2/4		NE 14/28		DA 11/22		NE 31/62		DA 1/2		NE 8/16		DA 7/14		NE 27/54	
<i>ABCG2</i>	Variant 2/4	Wt 0	Variant 3/6	Wt 11/22	Variant 2/4	Wt 9/18	Variant 5/10	Wt 26/52	Variant 1/2	Wt 0	Variant 0	Wt 8/16	Variant 0	Wt 7/14	Variant 5/10	Wt 22/44

Slika 16. Unakrsni tablični prikaz (engl. *cross-tabulation*) pacijenti/broj uzoraka krvi (za svakog pacijenta dva uzorka krvi) prema čimbenicima (učinaka) od primarnog interesa (fenotip CYP2D6, genotipovi *ABCB1* i *ABCG2*) i primjene CYP inhibitora koje je potrebno uzeti u obzir radi moguće prilagodbe u multivarijatanj analizi. Redovi (učinci) raspoređeni su prema broju subjekata prema učinku (od višeg do nižeg).

Tablica 17. Sažeta "struktura" usporedbi od primarnog značaja (fenotip CYP2D6, genotipovi transportera) i potencijalna podešavanja (primjena CYP inhibitora) koja se uzimaju u obzir u multivarijantnoj analizi farmakokinetičkih podataka. Brojevi u zagradama su broj subjekata / farmakokinetičkih uzoraka na svakoj razini popisanih čimbenika i njihovih učinaka.

CYP2D6 NM/UM (58/116)	vs.	CYP2D6 „ostali“ (43/86)
ABCB1 CC/GG/CC (16/32), „ostali“ (42/84); CYP inhibitor Da (13/26), Ne (45/90); ABCG2 varijantni alel (12/24), wt alel (46/92)		ABCB1 CC/GG/CC (9/18), „ostali“ (34/68); CYP inhibitor Da (8/16), Ne (35/70); ABCG2 varijantni alel (6/12), wt alel (37/74)
ABCB1 CC/GG/CC (25/50)	vs.	ABCB1 „ostali“ (76/152)
CYP2D6 NM/UM (16/32), „ostali“ (9/18); CYP inhibitor Da (3/6), Ne (22/44); ABCG2 varijantni alel (6/12), wt alel (19/38)		CYP2D6 NM/UM (42/84), „ostali“ (34/68); CYP inhibitor Da (18/36), Ne (58/116); ABCG2 varijantni alel (12/24), wt alel (64/128)
ABCG2 varijantni alel (18/36)	vs.	ABCG2 wt alel (83/166)
CYP2D6 NM/UM (12/24), „ostali“ (6/12); ABCB1 CC/GG/CC (6/12), „ostali“ (12/24); CYP inhibitor Da (5/10), Ne (13/26)		CYP2D6 NM/UM (46/92), „ostali“ (37/74); ABCB1 CC/GG/CC (19/38), „ostali“ (64/128); CYP inhibitor Da (16/32), Ne (67/134)
CYP inhibitor Da (21/42)	vs.	CYP inhibitor Ne (80/160)
CYP2D6 NM/UM (13/26), „ostali“ (8/16); ABCB1 CC/GG/CC (3/6), „ostali“ (18/36); ABCG2 varijantni alel (5/10), wt alel (16/32)		CYP2D6 NM/UM (45/90), „ostali“ (35/70); ABCB1 CC/GG/CC (22/44), „ostali“ (58/116); ABCG2 varijantni alel (13/26), wt alel (5/10)

Kratice: wt - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlo brzi metabolizatori;

5.2.4. Dodatna analiza farmakokinetičkih podataka – glavni model slučajnih efekata

Generalni linearni mješoviti model podešen je za koncentracije ujednačene prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i omjer risperidon/9-OH-risperidon:

- modeli fiksnih efekata (engl. *random intercept model*) za sve učinke i model slučajnih efekata (engl. *random intercept - random slopes model*) za fenotip CYP2D6 (NM/UM vs. „ostali“)
- modeli fiksnih efekata za sve učinke i model slučajnih efekata za ukupni genotip ABCB1 (homozigoti wt alela na sva tri lokusa (CC/GG/CC) vs. „ostali“)
- modeli fiksnih efekata za sve učinke i model slučajnih efekata za ukupni genotip ABCG2 (nositelji wt alela vs. nositelji varijantnog alela)

Svi su modeli uključivali podešavanja za dob, vrijeme uzorkovanja (C_{max} , C_{trough}) i primjenu CYP inhibitora. Podaci su sažeti u tablici 18. gdje su prikazani samo učinci genotipova/fenotipova. Svi učinci genotipova/fenotipova bili su vrlo slični kao u modelima fiksnih efekata (tablica 18.).

Tablica 18. Sažetak modela slučajnih efekata za farmakokinetičke podatke

	Risperidon		9-OH-risperidon		Risperidon + 9-OH-risperidon		Risperidon/9-OH-risperidon	
	GMR (95%CI)	P	GMR (95%CI)	P	GMR (95%CI)	P	GMR (95%CI)	P
Model slučajnog efekta za fenotip CYP2D6								
CYP2D6 NM/UM	0,71 (0,56-0,89)	0,004	0,92 (0,75-1,12)	0,396	0,76 (0,62-0,93)	0,009	0,72 (0,56-0,92)	0,009
<i>ABCB1 wt</i>	1,08 (0,83-1,41)	0,568	0,96 (0,76-1,21)	0,741	1,06 (0,83-1,34)	0,640	1,13 (0,85-1,50)	0,384
<i>ABCG2</i> varijanta	0,83 (0,62-1,11)	0,213	0,84 (0,64-1,11)	0,229	0,78 (0,59-1,04)	0,094	0,93 (0,68-1,27)	0,633
Model slučajnog efekta za ukupni genotip ABCB1								
CYP2D6 NM/UM	0,71 (0,56-0,90)	0,004	0,92 (0,76-1,13)	0,430	0,76 (0,62-0,93)	0,009	0,72 (0,56-0,92)	0,010
<i>ABCB1 wt</i>	1,09 (0,84-1,42)	0,523	0,97 (0,77-1,21)	0,768	1,06 (0,84-1,34)	0,616	1,14 (0,85-1,52)	0,377
<i>ABCG2</i> varijanta	0,84 (0,62-1,13)	0,249	0,80 (0,62-1,04)	0,096	0,76 (0,58-0,99)	0,048	0,94 (0,68-1,29)	0,692
Model slučajnog efekta za genotip ABCG2								
CYP2D6 NM/UM	0,71 (0,56-0,89)	0,004	0,91 (0,75-1,12)	0,375	0,77 (0,62-0,95)	0,016	0,71 (0,56-0,92)	0,008
<i>ABCB1 wt</i>	1,08 (0,83-1,42)	0,549	0,96 (0,76-1,21)	0,735	1,06 (0,83-1,36)	0,610	1,13 (0,86-1,50)	0,375
<i>ABCG2</i> varijanta	0,84 (0,63-1,12)	0,239	0,81 (0,63-1,04)	0,097	0,77 (0,58-1,02)	0,066	0,93 (0,68-1,26)	0,637

S istim podešavanjima pojavila se relevantna interakcija između fenotipa CYP2D6 i genotipa *ABCG2* povezana s izloženosti risperidonu, 9-OH-risperidonu i ukupnom aktivnom lijeku (risperidon + 9-OH-risperidon) (tablica 19.):

a) varijantni alel *ABCG2*, u skupini fenotipa CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“), bio je statistički značajno povezan s 31% do 37% manjim vrijednostima za tri analita: risperidon (GMR=0,69; 95% CI 0,48-0,99), 9-OH-risperidon (GMR=0,65; 95% CI 0,48-0,90), ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) (GMR=0,63; 95% CI 0,45-0,87), dok za omjer risperidon/9-OH-risperidon nije bilo značajne povezanosti. Za ostale fenotipove CYP2D6 nije bilo relevantnog učinka.

b) obrnuto, fenotip CYP2D6 NM/UM bio je značajno povezan u nositelja varijantnog alela *ABCG2* u usporedbi s nositeljima *wt* alela *ABCG2* s manjim vrijednostima za: risperidon 55% (GMR=0,45; 95% CI 0,26-0,79), 9-OH-risperidon 44% (GMR=0,56; 95% CI 0,35-0,92), risperidon + 9-OH-risperidon 53% (GMR=0,47; 95% CI 0,28-0,77), s tendencijom za manji omjer risperidon/9-OH-risperidon (GMR=0,63; 95% CI 0,34-1,15). U nositelja *wt* alela *ABCG2* učinak fenotipova CYP2D6 NM/UM je bio slabiji (oko 20% za vrijednosti risperidona i ukupnog aktivnog lijeka).

U sličnom modelu interakcije između fenotipa CYP2D6 i genotipa *ABCB1*, ukupni genotip *ABCB1 CC/GG/CC* (vs. „ostali“) nije imao značajan utjecaj na razinu risperidona u pacijenata s CYP2D6 NM/UM, ali je bio povezan s većim razinama u pacijenata s ostalim fenotipovima CYP2D6 (*P*-vrijednost za interakciju 0,053), dok nije bilo naznaka relevantnih interakcija u pogledu ostalih vrijednosti (tablica 20.).

Tablica 19. Interakcija između fenotipa CYP2D6 (NM/UM u usporedbi s „ostali“) i genotipa *ABCG2 421C>A* (nositelji varijantnog alela u usporedbi s nositeljima *wt* alela) u njihovim učincima na koncentracije ujednačene prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i na omjer risperidon/9-OH-risperidon*. Logaritamski transformirani podatci su analizirani u generalnom linearnom mješovitom modelu u kojem je CYP2D6|*ABCG2* interakcija tretirana kao slučajni efekt (engl. *random intercept - random slope*). Učinci su izraženi kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR).

	Risperidon		9-OH-risperidon		Risperidon +9-OH-risperidon		Risperidon/9-OH-risperidon	
	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>
Model fiksnog efekta								
CYP2D6 <i>ABCG2</i> interakcija	---	0,083	---	0,029	---	0,039	---	0,629
<i>ABCG2</i> varijanta u CYP2D6 NM/UM	0,69 (0,48-0,99)	---	0,65 (0,48-0,90)	---	0,63 (0,45-0,87)	---	0,88 (0,59-1,30)	---
<i>ABCG2</i> varijanta u CYP2D6 „ostali“	1,18 (0,73-1,92)	---	1,17 (0,77-1,79)	---	1,12 (0,72-1,73)	---	1,03 (0,61-1,74)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2</i> varijanti	0,45 (0,26-0,79)	---	0,56 (0,35-0,92)	---	0,47 (0,28-0,77)	---	0,63 (0,34-1,15)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2 wt</i>	0,77 (0,61-0,99)	---	1,02 (0,82-1,26)	---	0,83 (0,67-1,04)	---	0,74 (0,56-0,96)	---
<i>ABCB1</i> CC/GG/CC vs. „ostali“	1,12 (0,86-1,45)	0,454	0,99 (0,79-1,25)	0,950	1,09 (0,86-1,38)	0,482	1,15 (0,86-1,53)	0,332
Vrijeme uzorka: C_{max} vs. C_{trough}	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,52 (1,37-1,68)	<0,001	1,71 (1,55-1,89)	<0,001	1,03 (0,87-1,21)	0,723
Dob	1,00 (0,99-1,01)	0,907	1,00 (0,99-1,01)	0,970	1,00 (0,99-1,01)	0,860	1,00 (0,99-1,01)	0,638
Primjena CYP inhibitora	1,08 (0,82-1,42)	0,584	0,88 (0,69-1,12)	0,284	0,87 (0,68-1,11)	0,263	1,20 (0,89-1,61)	0,231
Model slučajnog efekta za interakciju CYP2D6 <i>ABCG2</i>								
CYP2D6 <i>ABCG2</i> interakcija	---	0,082	---	0,032	---	0,039	---	0,633
<i>ABCG2</i> varijanta u CYP2D6 NM/UM	0,69 (0,49-0,98)	---	0,66 (0,48-0,91)	---	0,63 (0,45-0,87)	---	0,88 (0,60-1,28)	---
<i>ABCG2</i> varijanta u CYP2D6 „ostali“	1,18 (0,72-1,92)	---	1,17 (0,77-1,80)	---	1,12 (0,72-1,73)	---	1,03 (0,61-1,74)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2</i> varijanti	0,45 (0,26-0,79)	---	0,56 (0,35-0,92)	---	0,47 (0,28-0,78)	---	0,63 (0,35-1,14)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2 wt</i>	0,77 (0,60-0,99)	---	1,01 (0,82-1,25)	---	0,83 (0,67-1,04)	---	0,74 (0,56-0,97)	---
<i>ABCB1</i> CC/GG/CC vs. „ostali“	1,10 (0,85-1,42)	0,477	0,99 (0,79-1,25)	0,949	1,09 (0,86-1,38)	0,481	1,13 (0,85-1,50)	0,383
Vrijeme uzorka: C_{max} vs. C_{trough}	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,52 (1,37-1,68)	<0,001	1,71 (1,55-1,89)	<0,001	1,03 (0,88-1,21)	0,721
Dob	1,00 (0,99-1,01)	0,820	1,00 (0,99-1,01)	0,957	1,00 (0,99-1,01)	0,860	1,00 (0,99-1,01)	0,634
Primjena CYP inhibitora	1,09 (0,83-1,43)	0,553	0,87 (0,69-1,11)	0,270	0,87 (0,68-1,11)	0,265	1,19 (0,89-1,60)	0,238

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlobrzi metabolizatori; C_{max} – vršne konc.; C_{trough} – konc. na kraju intervala doziranja.

* Broj subjekata / uzoraka krvi u podskupini fenotip CYP2D6 po genotipu *ABCG2* su: a) CYP2D6 EM ili UM i nositelji varijantnog alela *ABCG2 12/24*; b) CYP2D6 EM ili UM i nositelji alela divljeg tipa *ABCG2 46/92*; c) CYP2D6 „ostali“ i varijantnog alela *ABCG2 6/12*; d) CYP2D6 „ostali“ i nositelji alela divljeg tipa *ABCG2 37/74*.

Tablica 20. Interakcije između fenotipa CYP2D6 (NM/UM u usporedbi s „ostali“) i ukupnog genotipa *ABCB1* (*wt* aleli (CC/GG/CC) na tri lokusa u usporedbi s „ostali“) u njihovim učincima na koncentracije ujednačenim prema dozi za risperidon, 9-OH-risperidon, ukupni aktivni lijek (risperidon + 9-OH-risperidon) i na omjer risperidon/9-OH-risperidon. Logaritamski transformirani podatci su analizirani u generalnom linearnom mješovitom modelu u kojem je CYP2D6|*ABCB1* interakcija tretirana kao slučajni efekt (engl. *random intercept - random slope*). Učinci su izraženi kao omjeri geometrijskih srednjih vrijednosti (GMR).

	Risperidon		9-OH-risperidon		Risperidon +9-OH-risperidon		Risperidon/9-OH-risperidon	
	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>	GMR (95%CI)	<i>P</i>
Model fiksnog efekta								
CYP2D6 <i>ABCB1</i> interakcija	---	0,053	---	0,709	---	0,551	---	0,245
<i>ABCB1 wt</i> u CYP2D6 NM/UM	0,89 (0,64-1,24)	---	0,93 (0,69-1,25)	---	1,00 (0,74-1,36)	---	1,00 (0,70-1,43)	---
<i>ABCB1 wt</i> u CYP2D6 „ostali“	1,49 (0,99-2,26)	---	1,02 (0,71-1,47)	---	1,16 (0,79-1,69)	---	1,40 (0,90-2,19)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1 wt</i>	0,47 (0,30-0,75)	---	0,86 (0,57-1,31)	---	0,68 (0,44-1,04)	---	0,55 (0,34-0,92)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1</i> „ostali“	0,80 (0,62-1,03)	---	0,94 (0,75-1,18)	---	0,79 (0,62-0,99)	---	0,78 (0,59-1,02)	---
<i>ABCG2</i> varijanta vs. <i>wt</i>	0,86 (0,65-1,16)	0,333	0,81 (0,63-1,05)	0,118	0,78 (0,59-1,02)	0,069	0,95 (0,69-1,30)	0,685
Vrijeme uzorka: <i>C_{max}</i> vs. <i>C_{trough}</i>	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,52 (1,37-1,68)	<0,001	1,71 (1,55-1,89)	<0,001	1,03 (0,88-1,21)	0,723
Dob	1,00 (0,99-1,01)	0,992	1,00 (0,99-1,01)	0,990	1,00 (0,99-1,01)	0,912	1,00 (0,99-1,01)	0,686
Primjena CYP inhibitora	1,05 (0,80-1,37)	0,736	0,86 (0,67-1,09)	0,212	0,85 (0,66-1,09)	0,195	1,18 (0,88-1,59)	0,258
Model slučajnog efekta za interakciju CYP2D6 <i>ABCB1</i>								
CYP2D6 <i>ABCB1</i> interakcija	---	0,054	---	0,689	---	0,542	---	0,243
<i>ABCB1 wt</i> u CYP2D6 NM/UM	0,89 (0,65-1,23)	---	0,92 (0,68-1,25)	---	0,99 (0,72-1,35)	---	1,00 (0,71-1,42)	---
<i>ABCB1 wt</i> u CYP2D6 „ostali“	1,49 (0,99-2,27)	---	1,02 (0,69-1,49)	---	1,15 (0,78-1,70)	---	1,40 (0,89-2,19)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1 wt</i>	0,48 (0,30-0,76)	---	0,85 (0,55-1,32)	---	0,67 (0,43-1,05)	---	0,56 (0,34-0,91)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1</i> „ostali“	0,80 (0,62-1,04)	---	0,94 (0,75-1,17)	---	0,78 (0,62-0,99)	---	0,78 (0,59-1,03)	---
<i>ABCG2</i> varijanta vs. <i>wt</i>	0,85 (0,63-1,13)	0,263	0,84 (0,64-1,10)	0,207	0,80 (0,61-1,05)	0,114	0,94 (0,69-1,29)	0,699
Vrijeme uzorka: <i>C_{max}</i> vs. <i>C_{trough}</i>	1,37 (1,17-1,61)	<0,001	1,52 (1,37-1,68)	<0,001	1,71 (1,55-1,89)	<0,001	1,03 (0,88-1,21)	0,721
Dob	1,00 (0,99-1,01)	0,893	1,00 (0,99-1,01)	0,761	1,00 (0,99-1,01)	0,922	1,00 (0,99-1,01)	0,676
Primjena CYP inhibitora	1,05 (0,80-1,39)	0,696	0,84 (0,66-1,07)	0,158	0,83 (0,65-1,07)	0,156	1,18 (0,88-1,58)	0,270

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlobrzi metabolizatori; *C_{max}* – vršne konc.; *C_{trough}* – konc. na kraju intervala doziranja.

5.3. Utjecaj polimorfizama *CYP2D6*, *ABCB1* i *ABCG2* na djelotvornost i sigurnost risperidona s produljenim oslobađanjem

5.3.1. Povezanost fenotipa *CYP2D6* i genotipova *ABCB1* i *ABCG2* s kliničkim ishodima (PANSS)

Ukupne vrijednosti PANSS i vrijednosti PANSS podljestvica smanjivale su se u svih pacijenata, ali se opseg smanjenja uvelike razlikovao u promatranom razdoblju (slika 12.).

Postotak smanjenja vrijednosti PANSS nakon 12. i 24. tjedana liječenja bio je sličan u podskupinama pacijenata ovisno o genotipovima/fenotipovima od primarnog značaja, dok se učestalost relevantnog odgovora donekle razlikovala (tablica 21.):

a) bila je nešto manja u *CYP2D6* NM/UM (12. tjedan 17%, 24. tjedan 27,6%) u usporedbi s drugim fenotipovima (12. tjedan 23,3%, 24. tjedan 30,2%) (NM/UM bio je povezan s manjom izloženošću ukupnom aktivnom lijeku);

b) bila je veća u nositelja varijantnog alela *ABCG2 421C>A* (12. tjedan 44%, 24. tjedan 38,9%) u usporedbi s nositeljima alela divljeg tipa (12. tjedan 14,5%, 24. tjedan 26,5%) (varijantni alel povezan je s manjom izloženošću aktivnom lijeku);

c) proporcije su se smanjivale u tri podskupine temeljene na ukupnom genotipu *ABCB1*, prema zastupljenosti varijantnog ili alela divljeg tipa: „varijantni – niska aktivnost“ (12. tjedan 25%, 24. tjedan 46,4%), „mješoviti - smanjena aktivnost“ (12. tjedan 20%, 24. tjedan 25,7%) i „*wt* aleli - normalna aktivnost“ (12. tjedan 15,8%, 24. tjedan 18,4%).

U multivarijatnoj analizi fenotipovi *CYP2D6* NM/UM pokazali su tendenciju prema manjim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS, konzistentno u podskupinama genotipova *ABCG2* i *ABCB1*, međutim procjene su bile neprecizne (tablica 22.). Varijantni alel *ABCG2* snažno je povezan s većim izgledima (OR 4,61; 95% CI 1,16-18,3; P=0,030), konzistentno u svim podskupinama fenotipa *CYP2D6*. Ukupni genotip *ABCB1*, predominantno alela divljeg tipa, povezan je s manjim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS (OR 0,24, 95% CI 0,06-0,91; P=0,036), konzistentno u svim podskupinama fenotipa *CYP2D6* (tablica 6.). Izgledi za relevantan odgovor bili su manji u muškaraca (OR 0,18; 95% CI 0,05-0,64; P=0,011), i nešto veći 24. tjedan u usporedbi s 12. tjednom (OR 2,03; 95% CI 0,91-4,50; P=0,082) (tablica 22.).

Tablica 21. Osobine ispitanika i klinički ishodi: prema fenotipu CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), genotipu *ABCG2 421C>A* (nositelji *wt* alela ili nositelji varijantnog alela) i ukupnom genotipu *ABCB1** (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili *wt* alela na tri lokusa te pretpostavljene aktivnosti transportera). Podatci su prikazani kao medijani (raspon) ili brojevi (postotci).

	Fenotip CYP2D6		Genotip <i>ABCG2 421C>A</i>		Genotip <i>ABCB1</i> – predominantni alel (aktivnost)		
	NM/UM	Ostali	<i>Wt</i> alel	Varijantni alel	Varijantni (niska)	Mješoviti (srednja)	<i>Wt</i> (normalna)
N	58	43	83	18	28	35	38
Dob (godine)	38 (20-69)	40 (20-67)	38 (20-69)	41 (21-69)			
Muškarci	31 (53,5)	26 (60,5)	48 (57,8)	9 (50,0)			
CYP2D6 EM ili UM fenotip	---	---	46 (55,4)	12 (66,7)	15 (53,6)	17 (48,6)	26 (68,4)
<i>ABCG2 421C>A</i> varijanta	12 (20,7)	6 (13,9)	---	---	4 (14,3)	5 (14,3)	9 (23,7)
<i>ABCB1</i> varijantni/mješoviti/ <i>wt</i>	15/17/26 (44,8)	13/18/12 (27,9)	24/30/29 (34,9)	4/5/9 (50,0)	---	---	---
Dodatni antipsihotik	33 (56,9)	28 (65,1)	50 (60,2)	11 (61,1)	16 (57,1)	24 (68,6)	21 (55,3)
Dodatni benzodiazepin	37 (63,8)	30 (69,8)	55 (66,3)	12 (66,7)	17 (60,7)	27 (77,1)	23 (60,5)
Dodatni stabilizator raspoloženja	14 (24,1)	9 (20,9)	17 (20,5)	6 (33,3)	8 (28,6)	8 (22,9)	7 (18,4)
Dodatni antidepresiv	5 (8,6)	1 (2,3)	4 (4,8)	2 (11,1)	3 (10,7)	2 (5,7)	1 (2,6)
Doza (mg) (25/37.5/50)	2 / 24 / 32	1 / 24 / 18	3 / 41 / 39	0 / 7 / 11	0 / 12 / 16	1 / 20 / 14	2 / 16 / 20
C_{max} RIS+9-OH-RIS (nmol/L) ^H	1,56 (0,30-7,29)	2,36 (0,78-11,8)	1,87 (0,72-11,8)	1,24 (0,30-5,86)	1,75 (0,30-5,86)	1,85 (0,72-11,8)	1,78 (0,62-4,69)
C_{trough} RIS+9-OH-RIS (nmol/L) ^H	1,07 (0,0-4,13)	1,06 (0,50-7,03)	1,06 (0,0-7,03)	1,07 (0,16-2,23)	1,05 (0,26-4,13)	1,05 (0,0-7,03)	1,12 (0,16-3,79)
Medijan (C_{max} , C_{trough}): RIS + 9-OH-RIS (nmol/L) ^H	1,32 (0,28-4,30)	1,61 (0,64-9,41)	1,48 (0,44-9,41)	1,08 (0,28-3,86)	1,45 (0,28-4,30)	1,50 (0,44-9,41)	1,39 (0,64-4,24)
Početna vrijednost PANSS	129 (91-177)	128 (106-157)	129 (108-177)	126 (91-150)	125 (106-153)	127 (112-177)	131 (91-157)
Učinak 12 tjedan terapije							
Postotak promjene vs. početni	-24,5 (-12, -46)	-25 (-18,5, -47)	-24,8 (-17, -42)	-25,3 (-12, -47)	-25,2 (-19, -46)	-25,0 (-15, -47)	-24,3 (-12, -38)
Smanjenje ≥30%	10 (17,2)	10 (23,3)	12 (14,5)	8 (44,4)	7 (25,0)	7 (20,0)	6 (15,8)
Učinak 24 tjedan terapije							
Postotak promjene vs. početni	-42 (-21, -61)	-41 (-28, -62)	-41 (27, -60)	-42,6 (-21, -62)	-43,5 (-27, -61)	-41,0 (-22, -62)	-40,0 (-21, -57)
Smanjenje ≥45%	16 (27,6)	13 (30,2)	22 (26,5)	7 (38,9)	13 (46,4)	9 (25,7)	7 (18,4)
Primjena antimuskarinika	23 (39,7)	15 (34,9)	33 (39,8)	5 (27,8)	11 (39,3)	10 (28,6)	17 (44,7)
SAS vrijednost nakon 3 mjeseca	0 (0-15)	0 (0-11)	0 (0-12)	0 (0-15)	0 (0-13)	0 (0-10)	0 (0-15)
SAS vrijednost >3	17 (29,3)	12 (27,9)	24 (28,9)	5 (27,8)	9 (32,1)	9 (25,7)	11 (29,0)

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; PANSS – ocjenska ljestvica pozitivnih i negativnih psihotičnih simptoma; SAS – ocjenska ljestvica „Simpson-Angus Rating Scale“; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlo brzi metabolizatori; C_{max} – vršne konc.; C_{trough} – konc. na kraju intervala doziranja.

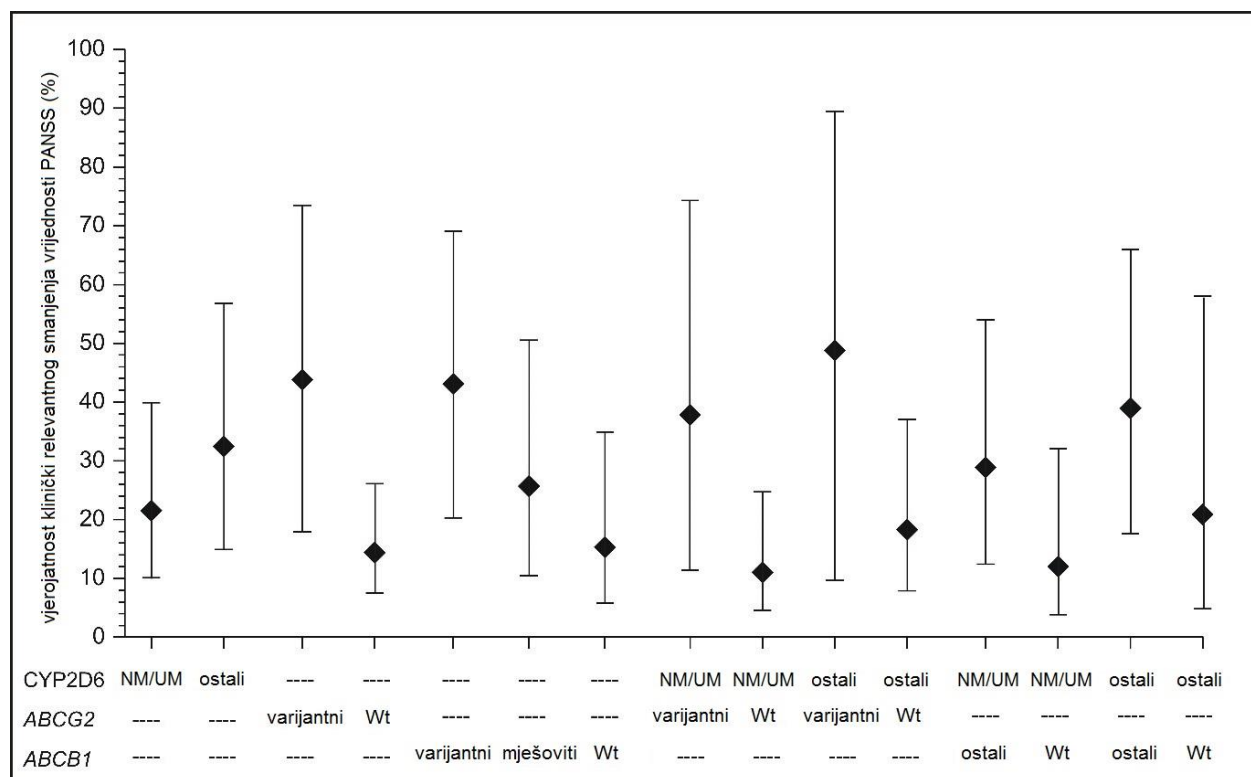
Tablica 22. Učinci fenotipa CYP2D6 (NM/UM u usporedbi s „ostali“), genotipa *ABCG2 421C>A* (nositelji varijantnog alela u usporedbi s nositeljima *wt* alela) i ukupnog genotipa *ABCB1** (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili alela divljeg tipa na tri lokusa te pretpostavljene aktivnosti transportera) – na vjerojatnost relevantnog smanjenja vrijednosti PANSS ($\geq 30\%$ 12. tjedan, $\geq 45\%$ 24. tjedan liječenja). Tri generalna linearna mješovita modela podešena su za proporcije pacijenata s relevantnim smanjenjem PANSS: model glavnih efekata i dva modela koji su testirali interakcije. Za interakciju CYP2D6|*ABCB1*, *ABCB1* je smatran dvostupanjskom varijablom (*wt* aleli (normalna aktivnost) u usporedbi s „svi ostali“). Učinci podešavanja bili su slični u modelima glavnih učinaka i interakcija, stoga su za interakcije prikazani samo učinci od primarnog značaja. Učinci su izraženi kao omjeri izgleda (OR).

	OR (95%CI)	P
CYP2D6 NM/UM vs. „ostali“	0,57 (0,19-1,70)	0,308
<i>ABCG2</i> varijantni alel vs. <i>wt</i>	4,61 (1,16-18,3)	0,030
<i>ABCB1</i> kontrasti		
<i>Wt</i> (normalna aktivnost) vs. varijantni alel (niska aktivnost)	0,24 (0,06-0,91)	0,036
<i>Wt</i> (normalna aktivnost) vs. „svi ostali“	0,35 (0,11-1,11)	0,075
<i>Daljnja podešavanja</i>		
Početni PANSS	0,99 (0,95-1,04)	0,709
Stabilizatori raspoloženja	0,49 (0,13-1,93)	0,307
Dob (godine)	0,95 (0,90-1,01)	0,109
Muškarci	0,18 (0,05-0,67)	0,011
24 vs. 12 tjedana	2,03 (0,91-4,50)	0,082
<i>CYP2D6 ABCG2</i> interakcija		
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2 wt</i> alela	0,55 (0,16-1,88)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCG2</i> varijantnog alela	0,64 (0,04-9,42)	---
<i>ABCG2</i> varijantni alel u CYP2D6 „ostali“	4,25 (0,43-42,3)	---
<i>ABCG2</i> varijantni alel u CYP2D6	4,91 (0,80-30,0)	---
<i>ABCB1 wt</i> alel (normalna aktivnost) vs. „svi ostali“	0,35 (0,11-1,15)	0,084
<i>CYP2D6 ABCB1</i> interakcija		
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1</i> „svi ostali“	0,64 (0,17-2,33)	---
CYP2D6 NM/UM u <i>ABCB1 wt</i> alela (normalna aktivnost)	0,52 (0,07-3,55)	---
<i>ABCB1 wt</i> (normalna aktivnost) u CYP2D6 „ostali“	0,41 (0,07-2,40)	---
<i>ABCB1 wt</i> (normalna aktivnost) u CYP2D6 NM/UM	0,33 (0,07-1,50)	---
<i>ABCG2</i> varijantni alel vs. <i>wt</i>	4,61 (1,13-18,7)	0,033

Kratice: *wt* - alel divljeg tipa; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlibrzi metabolizatori;

* Varijanti (niska aktivnost): TT/TT/TT + do dva alela divljeg tipa (jedan ili dva heterozigotna ili jedan *wt* homozigotni lokus); *Wt* (normalna aktivnost): CC/GG/CC + do dva varijantna alela (jedan heterozigotni lokus ili jedan varijantni homozigotni lokus); Mješoviti (srednja aktivnost): svi ostali genotipovi.

Procijenjene podešene vjerojatnosti relevantne promjene vrijednosti PANSS tijekom liječenja od 12. do 24. tjedna liječenja prikazane su na slici 17.



Slika 17. Procijenjene podešene vjerojatnosti klinički relevantnog smanjenja vrijednosti PANSS (12. - 24. tjedan) prema fenotipovima i genotipovima od primarnog značaja (izvedenih iz modela u tablici 22.) – fenotip CYP2D6 (NM/UM u usporedbi s „ostali“), genotip *ABCG2* 421C>A (nositelji varijantnog alela u usporedbi s nositeljima *wt* alela) i ukupni genotip *ABCB1* (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili alela divljeg tipa na tri lokusa: varijanti aleli (niska aktivnost) - TT/TT/TT + do dva alela divljeg tipa (jedan ili dva heterozigotna ili jedan *wt* homozigotni lokus); *Wt* aleli (normalna aktivnost) - CC/GG/CC + do dva varijantna alela (jedan heterozigotni lokus ili jedan varijantni homozigotni lokus); mješoviti aleli – svi ostali genotipovi (smanjena funkcija)). Za analizu interakcije CYP2D6|*ABCB1*, *ABCB1* je dihotomiziran (*wt* aleli (normalna aktivnost) ili „ostali“). Rombovi prikazuju bodovne procjene (postotci), vertikalne crte su 95% granice pouzdanosti (95% CI).

PANSS – ocjenska ljestvica pozitivnih i negativnih psihotičnih simptoma.

5.3.2. Dodatna analiza kliničkih ishoda (PANSS) - interakcija genotip/fenotip/vrijeme

Svi učinci genotipa/fenotipa bili su konzistentni u 12. i 24. tjednu bez naznaka interakcije s vremenom (tablica 23).

Tri generalna linearna mješovita modela podešena su prema omjerima pacijenata s relativnim smanjenjem vrijednosti PANSS u usporedbi s početnim vrijednostima PANSS, koje su procijenjene 12. i 24. tjedan liječenja ($\geq 30\%$ smanjenje vrijednosti PANSS 12. tjedan, $\geq 45\%$ smanjenje vrijednosti PANSS 24. tjedan liječenja), kako bi se testirala interakcija između genotipova/fenotipova od primarnog značaja i vremena: fenotip CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“); genotip *ABCG2* (nositelji *wt* alela vs. nositelji varijantnog alela); ukupni genotip *ABCB1* (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili *wt* alela na tri lokusa te pretpostavljene aktivnosti transportera: (i) varijantni (niska aktivnost): TT/TT/TT + do dva *wt* alela (jedan ili dva heterozigotna ili jedan *wt* homozigotni lokus); (ii) *wt* (normalna aktivnost): CC/GG/CC + do dva varijantna alela (1 heterozigotni lokus ili 1 varijantni lokus); (iii) mješoviti (srednja aktivnost): svi ostali ukupni genotipovi).

Podešavanja su ista kao u tablici 22., s tim što je početna vrijednost PANSS izostavljena jer je prikaz nevažan. *P*-vrijednosti za sve interakcije bile su >0.15 , a svi efekti genotipova/fenotipova bili su konzistentni u obje vremenske točke, što ukazuje da nema kvalitativnih ili relevantnih kvantitativnih interakcija (tablica 23.).

Tablica 23. Testiranje interakcije između genotipova/fenotipova i vremena u njihovom učinku na vjerojatnost relevantne promjene vrijednosti PANSS u 12. i 24. tjednu.

Model	OR (95%CI)	<i>P</i>
CYP2D6 fenotip		
CYP2D6 vrijeme	---	0,676
NM/UM vs. „ostali“ 12. tjedan	0,47 (0,11-1,95)	---
NM/UM vs. „ostali“ 24. tjedan	0,66 (0,18-2,40)	---
ABCG2 421C>A		
ABCG2 vrijeme	---	0,174
Varijantni alel vs. <i>wt</i> alel 12. tjedan	9,77 (1,73-55,2)	---
Varijantni alel vs. <i>wt</i> alel 24. tjedan	2,42 (0,45-13,0)	---
ABCB1 ukupni genotip		
ABCB1 vrijeme	---	0,479
<i>Wt</i> alel (normalna aktivnost) vs. varijantni alel (niska aktivnost) 12. tjedan	0,44 (0,08-2,44)	---
<i>Wt</i> alel (normalna aktivnost) vs. „svi ostali“ at 12. tjedan	0,51 (0,12-2,21)	---
<i>Wt</i> alel (normalna aktivnost) vs. varijantni alel (niska aktivnost) 24. tjedan	0,14 (0,03-0,69)	---
<i>Wt</i> alel (normalna aktivnost) vs. „svi ostali“ 24. tjedan	0,26 (0,06-1,02)	---

Sve podskupine s većim udjelom pacijenata s relevantnim smanjenjem vrijednosti PANSS također su imale nešto veći udio pacijenata liječenih stabilizatorima raspoloženja (tablica 21.). Sveukupno su 23 pacijenta liječena stabilizatorima raspoloženja, 18 s natrijevim valproatom (inhibitorom CYP3A4), 2 s karbamazepinom (induktor CPY3A4 i ABCB1) i 3 s lamotriginom: relevantno smanjenje vrijednosti PANSS postignuto je u 4/23 (17,4%) u 12. tjednu liječenja i 5/23 (21,7%) u 24. tjednu, u odnosu na 20,5% i 30,8% kod pacijenata koji nisu primali stabilizatore raspoloženja.

5.3.3. Utjecaj polimorfizama CYP2D6, ABCB1 i ABCG2 na vrijednosti SAS

Multivarijatna analiza ishoda koji ukazuju na ekstrapiramidne nuspojave uključivala je: rezultate SAS ocjenske ljestvice i vjerojatnost propisivanja antimuskarinskih lijekova (za liječenje ekstrapiramidnog sindroma). Nije bilo nezavisne povezanosti između fenotipa CYP2D6, genotipa ABCG2 ili ABCB1 sa SAS rezultatima ili primjenom antimuskarinskih lijekova tijekom promatranog razdoblja.

Udio pacijenata kojima je bilo potrebno uvođenje antimuskarinika u terapiju i udio pacijenata s vrijednostima SAS \geq 3 varirao je u podskupinama pacijenata (tablica 21.), ali nisu zabilježeni neovisni učinci genotipa/fenotipa od interesa kao ni ukupnog aktivnog lijeka (nisu prikazani).

5.4. Odnos fenotipa CYP2D6 i genotipa ABCG2 i ABCB1 prema izloženosti risperidonu i kliničkim ishodima

5.4.1. Odnos fenotipa CYP2D6 i genotipa ABCG2 i ABCB1 prema izloženosti risperidonu i vjerojatnosti relevantne promjene PANSS: analiza moderirane medijacije

Za ispitivanje odnosa/povezanosti između fenotipa CYP2D6, genotipa ABCG2 i ABCB1 i kliničkih ishoda (vjerojatnosti relevantne promjene PANSS) uzimajući u obzir izloženost ukupnom aktivnom lijeku (koncentracije ujednačene prema dozi za risperidon+9-OH-risperidon) u 6. tjednu (vršne konc., C_{max}) i 8. tjednu (ostatne konc., tj. na kraju intervala doziranja, C_{trough}), na koju također utječu genotipovi/fenotipovi od primarnog interesa, osmišljena su dva modela analize moderirane medijacije u kojima razina ukupnog aktivnog lijeka medijatora, a klinički relevantno smanjenje vrijednosti PANSS u 12. tjednu liječenja ($\geq 30\%$) ishod (slika 18.).

Modeli se temelje na biološkoj vjerodostojnosti i učincima CYP2D6 i transportera na izloženost ukupnom aktivnom lijeku (interakcija CYP2D6|ABCG2 odražava izloženost aktivnom lijeku; a aktivni lijek ima posljedične učinke; učinci ABCG2 na klinički ishod ne mogu djelovati posredno samo kroz utjecaj na bioraspoloživost; ABCB1 možda nije bitan za sistemsku izloženost, ali može utjecati na raspoloživost u središnjem živčanom sustavu).

Osmišljena su dva tipa modela:

(iii) (i) Tip 1 - fenotip CYP26 i genotip ABCG2 se alternativno smatraju prediktorom ili moderatorom (a) učinka prediktora na medijator (razina ukupnog aktivnog lijeka), i (b) izravnog učinka (tj. učinka koji nije povezan s njegovim učinkom na medijator) na klinički ishod (smanjenje vrijednosti PANSS $\geq 30\%$); medijator utječe na ishod; prediktor može i ne mora imati izravni ili/i neizravni (preko medijatora) učinak na ishod. Svi izravni i neizravni učinci podešeni su po dobi, spolu i ukupnom genotipu ABCB1;

(iv) Tip 2 (isto kao Tip 1) -genotip ABCB1 genotipa smatra se moderatorom učinka medijatora na ishod (dob i spol ostaju kovarijate). Početne vrijednosti PANSS nisu uključene u prikaz jer ne utječu na ishod (tablica 22.). Korištenje stabilizatora raspoloženja također je izostavljeno jer je smanjenje vrijednosti PANSS $\geq 30\%$ 12. tjednu bilo slično među pacijentima koji su koristili stabilizatore raspoloženja ($n=23$) i onima koji nisu ($n=78$) (17,4% u odnosu na 20,5%).

Točne procjene učinaka (geometrijski omjeri srednjih vrijednosti, GMR; omjeri izgleda, OR) prikazane su za izravne i neizravne učinke prikazane su s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (izostavljeno zbog jasnoće prikaza) potpuno ispod ili iznad jedinstva (engl. *entirely below or above unity*;) u suprotnom navedeno je „bez učinka“ (engl. *no effect*) ili je dan kratki opis rezultata (slika 18).

Što se tiče CYP2D6, ispitanici su klasificirani kao normalni ili vrlobrzi metabolizatori (NM/UM) (n=58) u usporedbi s ostalim fenotipovima (n=43); u vezi s genotipa *ABCG2 421C>A* kao nositelji varijantnog alela (n=18) u usporedbi s nositeljima wt alela (n=83); a što se tiče genotipa *ABCB1*, klasifikacija se temelji na ukupnom genotipu za tri ispitivana lokusa uzimajući u obzir predominantni alela (varijantni ili wt alel) na tri lokusa i pretpostavljenu aktivnost transportera kao „wt aleli –normalna/visoka aktivnost transportera”(n=38) [CC/GG/CC (n=25) + ukupni genotipa s do dva varijantna alela (jedan heterozigotni lokus ili jedan varijantni homozigotni lokus) (n=13)], ili kao „svi ostali ukupni genotipovi“ (n=63) (tablica 14.).

U tablici 24. i navedeni su svi izravni, neizravni i kovarijatni učinci iz analize po modelu tip 1., a u tablici 25. navedeni su svi izravni, neizravni i kovarijatni učinci iz analize po modelu tip 2. Svi učinci (geometrijski omjeri srednjih vrijednosti, GMR; omjeri izgleda, OR) prikazani su s 95%-tnim intervalom pouzdanosti.

5.4.2. Odnos fenotipa CYP2D6 i genotipa ABCG2 i ABCB1 prema izloženosti risperidonu i vjerojatnosti relevantne promjene PANSS: analiza osjetljivosti

U analizi osjetljivosti, isti modeli analize moderirane medijacije su ocijenjeni korištenjem postotkom smanjenja PANSS 12. tjedan liječenja (kontinuirana varijabla s pozitivnim predznakom znakom: veća vrijednost = veće smanjenje) kao ishodom i daljnjim podešavanjem za početne vrijednosti PANSS.

U tablici 26. prikazani su rezultati analize osjetljivosti. Učinci na medijator (aktivni lijek) su isti kao u tablici 24. (model Tip 1) i tablici 25. (model Tip 2). Učinci su izraženi kao koeficijenti (β).

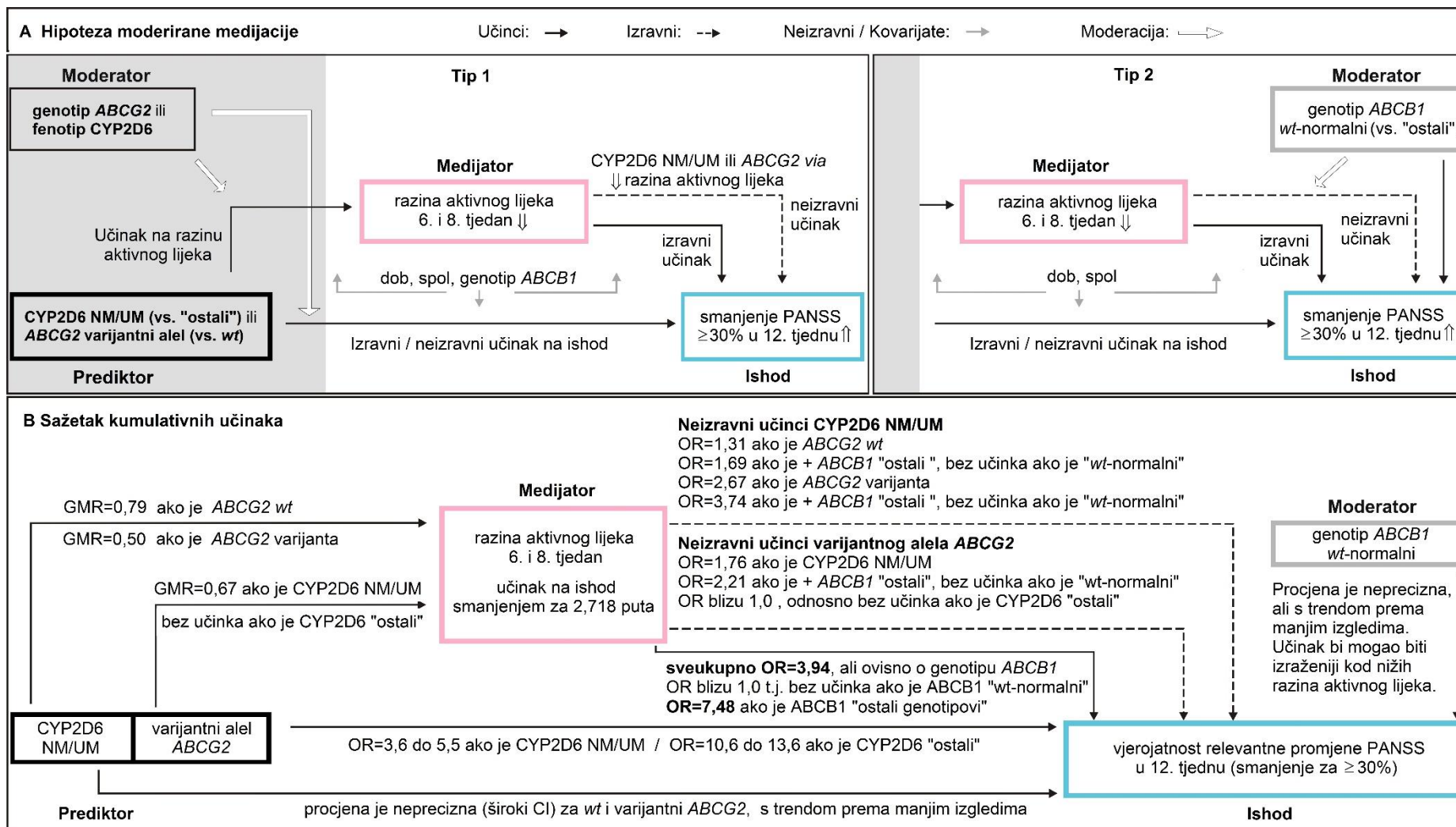
Uočeni su gotovo identični odnosi kao i u analizi moderirane medijacije za oba modela.

Razlika u utjecaju na vršne i ostatne koncentracije aktivnog lijeka bila je izraženija u nositelja ukupnog genotipa „wt-normalna aktivnost“ (tablica 26.).

Kumulativni rezultati analize moderirane medijacije i analize osjetljivosti (slika 18., tablica 24., tablica 25. i tablica 26., prikazuju sve izravne, neizravne i kovarijatne učinke) ukazuju sljedeće:

- a) fenotipovi CYP2D6 NM/UM su povezani s nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka, i to jače u prisutnosti varijantnog alela *ABCG2* (50% u usporedbi s 21% u *wt* genotipom; GMR=0,50; 95% CI 0,35-0,72; v.s. GMR=0,79; 95% CI 0,67-0,93) (tablica 24., tablica 25.);
- b) varijantni alel *ABCG2* je povezan s nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka u pacijenata s fenotipovima CYP2D6 NM/UM (za 33%; GMR=0,67; 95% CI 0,54-0,85), dok nema učinka u pacijenata s ostalim fenotipovima CYP2D6 (tablica 24., tablica 25.);
- c) genotip *ABCB1* ne utječe na izloženost ukupnom aktivnom lijeku (tablica 24., konzistentno s rezultatima u tablici 15. i 19.);
- d) fenotipovi CYP2D6 NM/UM pokazali su izravnu tendenciju prema manjim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS (neovisno o alelu *ABCG2*), ali su procjene neprecizne (široki CI) (tablica 24., tablica 25.);
- e) varijantni alel *ABCG2* je izravno snažno povezan s većim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS (neovisno o fenotipu CYP2D6), izravno (OR=10,6; 95% CI 1,26-88,8), i neizravno (OR=5,52; 95% CI 0,77-39,5) (tablica 24., tablica 25.);
- f) niže razine ukupnog aktivnog lijeka snažno su povezane s većim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS (OR=3,94; 95% CI 1,09-14,3) (tablica 24.), ali samo u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „ostali-smanjena aktivnost“ (OR=7,48; 95% CI 1,51-37,2), dok u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „*wt*-normalna aktivnost“ nije bilo učinka (OR=0,78; 95% CI 0,08-7,46) (tablica 25.);
- g) ukupni genotip *ABCB1* „*wt* -normalna aktivnost“ u usporedbi s „ostali ukupni genotipovi“, ima tendenciju prema manjim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS, ali su procjene neprecizne (široki CI) (OR=0,62; 95% CI 0,17-2,16) (tablica 24.), a taj učinak bi mogao biti izraženiji pri nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka (OR=0,38; 95% CI 0,08-1,69) (tablica 25.); To je pokazano u analizi osjetljivosti, gdje je ukupni genotip *ABCB1* „*wt*-normalna aktivnost“ u usporedbi s „ostali ukupni genotipovi“ povezan manjim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS kad je razina ukupnog aktivnog lijeka bila 0.5 nmol/L (β = -6,60; 95% CI -11,9 , -1,26), ali nije imao učinak pri razini ukupnog aktivnog lijeka 2.0 nmol/L (β = -0,40; 95% CI -2,88 , 2,08) (tablica 26.);

- h) fenotipovi CYP2D6 NM/UM pokazali su, preko učinka na razinu ukupnog aktivnog lijeka, neizravnu povezanost s većim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS, nešto veću u prisutnosti varijantnog alela *ABCG2* (OR=2,67; 95% CI 1,07-9,14), u usporedbi s *wt* alelom (OR=1,31; 95% CI 1,01-2,19) (tablica 24.), ali samo u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „ostali-smanjena aktivnost“ (OR=3,74; 95% CI 1,29-18,7), dok u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „*wt*-normalna aktivnost“ nije bilo učinka (OR=1,18; 95% CI 0,23-6,25) (tablica 25.); Praktično identični odnosi opaženi su u analizi osjetljivosti gdje su fenotipovi CYP2D6 NM/UM pokazali neizravni učinak na postotak smanjenja vrijednosti PANSS u prisutnosti varijantnog alela *ABCG2*, ali samo u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „ostali-smanjena aktivnost“ (β =2,28; 95% CI 0,70 , 5,29), (tablica 226.).
- i) varijantni alel *ABCG2* pokazao je neizravnu povezanost s većim izgledima relevantne promjene vrijednosti PANSS u skupini pacijenata s fenotipovima CYP2D6 NM/UM (OR=1,76; 95% CI 1,04-3,69) (tablica 24.), ali samo u podskupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „ostali-smanjena aktivnost“ (OR=2,21; 95% CI 1,13-5,61) (tablica 25.), u skupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „*wt*-normalna aktivnost“ nema povezanosti (OR=1,10; 95% CI 0,42-2,94) (tablica 25.), kao niti u skupini pacijenata s ostalim fenotipovima CYP2D6 (tablica 24., tablica 25.);
- j) Praktično identični odnosi opaženi su u analizi osjetljivosti gdje je varijantni alel *ABCG2* pokazao neizravni učinak na postotak smanjenja vrijednosti PANSS u skupini pacijenata s fenotipovima CYP2D6 NM/UM, ali samo u podskupini nositelja ukupnog genotipa *ABCB1* „ostali-smanjena aktivnost“ (β =1,29; 95% CI 0,32 , 3,32), (tablica 26.).



Slika 18. Analiza moderirane medijacije. Pacijenti su podijeljeni prema fenotipu CYP2D6 (NM/UM ili „ostali“), genotipu *ABCG2* 421C>A (nositelji varijantnog alela ili nositelji *wt* alela) i ukupnom genotipu *ABCB1* (klasificiran na temelju prevladavanja varijantnog ili *wt* alela na tri lokusa: „*wt* - normalna aktivnost“ (CC/GG/CC + do dva varijantna alela (jedan heterozigotni lokus ili jedan varijantni homozigotni lokus) ili „ostali genotipovi – smanjena aktivnost“).

Tablica 24. Sažetak analize moderirane medijacije – Model Tip 1 (CYP2D6 ili *ABCG2* kao prediktor ili kao moderator učinka prediktora na medijator (razina ukupnog aktivnog lijeka) i izravan učinak na klinički ishod ($\geq 30\%$ smanjenje PANSS-a u 12. tjednu). Utjecaj prediktora na ishod je izravan ili/i neizravan (preko učinka na razinu ukupnog aktivnog lijeka). Svi su učinci prilagođeni prema dobi, spolu i ukupnom genotipu *ABCB1* (vidjeti gornju metodu).

CYP2D6 prediktor, <i>ABCG2</i> moderator	Učinak	<i>ABCG2</i> prediktor, CYP2D6 moderator	Učinak
Učinak prediktora (CYP2D6) na medijator (AM)	GMR (95% CI)	Učinak prediktora (<i>ABCG2</i>) na medijator (AM)	GMR (95% CI)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	0,79 (0,67-0,93)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	1,07 (0,78-1,47)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	0,49 (0,34-0,70)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	0,66 (0,52-0,84)
<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena“)	1,06 (0,91-1,24)	<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena“)	1,06 (0,91-1,24)
Dob	1,00 (0,99-1,01)	Dob	1,00 (0,99-1,01)
Muškarci	0,88 (0,75-1,03)	Muškarci	0,88 (0,75-1,03)
Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	OR (95% CI)	Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	OR (95% CI)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	0,38 (0,09-1,62)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	10,6 (1,26-88,8)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	0,13 (0,01-1,80)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	3,62 (0,61-21,4)
AM ↓ za 2,718 puta	3,94 (1,09-14,3)	AM ↓ za 2,718 puta	3,94 (1,09-14,3)
<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena“)	0,62 (0,17-2,16)	<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena“)	0,62 (0,17-2,16)
Dob	0,96 (0,90-1,02)	Dob	0,96 (0,90-1,02)
Muškarci	0,16 (0,04-0,68)	Muškarci	0,16 (0,04-0,68)
Neizravni učinak CYP2D6 NM/UM na ishod	OR (95% CI)	Neizravni učinak <i>ABCG2</i> varijantnog alela na ishod	OR (95% CI)
Ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	1,31 (1,01-2,19)	Ako je CYP2D6 „ostali“	0,91 (0,53-1,49)
Ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	2,67 (1,07-9,14)	Ako je CYP2D6 NM/UM	1,76 (1,04-3,69)

Kratice: AM – ukupni aktivni lijek (od engl. *active moiety*) ; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlibrzi metabolizatori; *wt* - alel divljeg tipa.

Tablica 25. Sažetak analize moderirane medijacije – Modeli Tipa 2: kao Tip 1 (tablica 24.), ali *ABCB1* kao moderator utjecaja medijatora (razina ukupnog aktivnog lijeka) na ishod (vidi gornju metodu).

CYP2D6 prediktor, <i>ABCG2</i> moderator		<i>ABCG2</i> prediktor, CYP2D6 moderator	
	Učinak		Učinak
Učinak prediktora (CYP2D6) na medijator (AM)		Učinak prediktora (<i>ABCG2</i>) na medijator (AM)	
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	GMR (95%CI) 0,79 (0,67-0,93)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	GMR (95%CI) 1,06 (0,78-1,45)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	0,50 (0,35-0,72)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	0,67 (0,54-0,85)
Dob	1,00 (0,99-1,01)	Dob	1,00 (0,99-1,01)
Muškarci	0,87 (0,74-1,02)	Muškarci	0,87 (0,74-1,02)
Utjecaj prediktora i medijatora na ishod		Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	OR (95% CI) 0,34 (0,08-1,55)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	OR (95% CI) 13,6 (1,56-118)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	0,14 (0,01-2,09)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	5,52 (0,77-39,5)
AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	0,78 (0,08-7,46)	AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	0,78 (0,08-7,46)
AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1 „ostali“</i>	7,48 (1,51-37,2)	AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1 „ostali“</i>	7,48 (1,51-37,2)
<i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i> ako je AM=0,5 nmol/L	0,38 (0,08-1,69)	<i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i> ako je AM=0,5 nmol/L	0,38 (0,08-1,69)
<i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i> ako je AM=2,0 nmol/L	1,38 (0,30-6,33)	<i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i> ako je AM=2,0 nmol/L	1,38 (0,30-6,33)
Dob	0,95 (0,89-1,01)	Dob	0,95 (0,89-1,01)
Muškarci	0,14 (0,03-0,63)	Muškarci	0,14 (0,03-0,63)
Neizravni učinak CYP2D6 NM/UM na ishod		Neizravni učinak <i>ABCG2</i> varijantnog alela na ishod	
Ako je <i>ABCG2 wt</i> & <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	OR (95% CI) 0,94 (0,51-1,66)	Ako je CYP2D6 „ostali“ & <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	OR (95% CI) 1,01 (0,67-1,59)
Ako je <i>ABCG2 wt</i> & <i>ABCB1 „ostali-smanjena aktivnost“</i>	1,69 (1,06-2,91)	Ako je CYP2D6 „ostali“ & <i>ABCB1 „ostali-smanjena aktivnost“</i>	0,88 (0,41-1,81)
Ako je <i>ABCG2</i> varijanta & <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	1,18 (0,23-6,25)	Ako je CYP2D6 NM/UM & <i>ABCB1 „wt-normalna aktivnost“</i>	1,10 (0,42-2,94)
Ako je <i>ABCG2</i> varijanta & <i>ABCB1 „ostali-smanjena aktivnost“</i>	3,74 (1,29-18,7)	Ako je CYP2D6 NM/UM & <i>ABCB1 „ostali-smanjena aktivnost“</i>	2,21 (1,13-5,61)

Kratice: AM – ukupni aktivni lijek (od engl. *active moiety*) ; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlorzi metabolizatori; *wt* - alel divljeg tipa.

Tablica 26. Analiza osjetljivosti (ishod: postotak smanjenja PANSS-a s pozitivnim predznakom - veća vrijednost = veće smanjenje).

Učinci na medijator (aktivni lijek) su isti kao u tablici 24. (model Tip 1) i tablici 25. (Tip 2). Učinci su izraženi kao koeficijenti (β).

Model Tip 1			
CYP2D6 prediktor, <i>ABCG2</i> moderator	Učinak	<i>ABCG2</i> prediktor, CYP2D6 moderator	Učinak
Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	β (95% CI)	Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	β (95% CI)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	-1,32 (-3,85, 1,21)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	4,22 (-0,45, 8,89)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	-5,34 (-11,2, 0,48)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	0,19 (-3,38, 3,76)
AM ↓ za 2,718 puta	2,17 (0,07, 4,27)	AM ↓ za 2,718 puta	2,17 (0,07, 4,27)
<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena aktivnost“)	-1,59 (-3,83, 0,65)	<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ (vs. „ostali-smanjena aktivnost“)	-1,59 (-3,83, 0,65)
Početna vrijednost PANSS	-0,11 (-0,19, -0,02)	Početna vrijednost PANSS	-0,11 (-0,19, -0,02)
Dob	-0,07 (-0,18, 0,03)	Dob	-0,07 (-0,18, 0,03)
Muškarci	-3,93 (-6,47, -1,40)	Muškarci	-3,93 (-6,47, -1,40)
Neizravni učinak CYP2D6 NM/UM na ishod		Neizravni učinak <i>ABCG2</i> varijantnog alela na ishod	OR (95% CI)
Ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	0,51 (0,00, 1,69)	Ako je CYP2D6 „ostali“	-0,17 (-1,87, 0,57)
Ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	1,57 (0,20, 4,23)	Ako je CYP2D6 NM/UM	0,89 (0,09, 2,54)
Model Tip 2			
CYP2D6 prediktor, <i>ABCG2</i> moderator	Učinak	<i>ABCG2</i> prediktor, CYP2D6 moderator	Učinak
Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	β (95% CI)	Utjecaj prediktora i medijatora na ishod	β (95% CI)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2 wt</i> alel	-1,11 (-3,62, 1,39)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 „ostali“	4,60 (0,02, 9,19)
CYP2D6 NM/UM (vs. „ostali“) ako je <i>ABCG2</i> varijantni alel	-4,80 (-10,6, 0,98)	<i>ABCG2</i> varijantni alel (vs. <i>wt</i>) ako je CYP2D6 NM/UM	0,92 (-2,65, 4,49)
AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	-1,19 (-5,05, 2,67)	AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	-1,19 (-5,05, 2,67)
AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1</i> „ostali“	3,29 (0,96, 5,61)	AM ↓ za 2,718 puta ako je <i>ABCB1</i> „ostali“	3,29 (0,96, 5,61)
<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ ako je AM=0,5 nmol/L	-6,60 (-11,9, -1,26)	<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ ako je AM=0,5 nmol/L	-6,60 (-11,9, -1,26)
<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ ako je AM=2,0 nmol/L	-0,40 (-2,88, 2,08)	<i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“ ako je AM=2,0 nmol/L	-0,40 (-2,88, 2,08)
Početna vrijednost PANSS	-0,11 (-0,19, -0,02)	Početna vrijednost PANSS	-0,11 (-0,19, -0,02)
Dob	-0,08 (-0,19, 0,02)	Dob	-0,08 (-0,19, 0,02)
Muškarci	-3,89 (-6,38, -1,41)	Muškarci	-3,89 (-6,38, -1,41)
Neizravni učinak CYP2D6 NM/UM na ishod	β (95% CI)	Neizravni učinak <i>ABCG2</i> varijantnog alela na ishod	β (95% CI)
Ako je <i>ABCG2 wt</i> & <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	-0,28 (-2,45, 0,46)	Ako je CYP2D6 „ostali“ & <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	0,08 (-0,44, 3,00)
Ako je <i>ABCG2 wt</i> & <i>ABCB1</i> „ostali-smanjena aktivnost“	0,76 (0,08-1,97)	Ako je CYP2D6 „ostali“ & <i>ABCB1</i> „ostali-smanjena aktivnost“	-0,23 (-2,55, 1,03)
Ako je <i>ABCG2</i> varijanta & <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	-0,83 (-6,08, 1,62)	Ako je CYP2D6 NM/UM & <i>ABCB1</i> „ <i>wt</i> -normalna aktivnost“	-0,47 (-3,71, 0,97)
Ako je <i>ABCG2</i> varijanta & <i>ABCB1</i> „ostali-smanjena aktivnost“	2,28 (0,70, 5,29)	Ako je CYP2D6 NM/UM & <i>ABCB1</i> „ostali-smanjena aktivnost“	1,29 (0,32, 3,32)

Kratice: AM – ukupni aktivni lijek (od engl. *active moiety*) ; NM – normalni metabolizatori; UM – vrlobrzi metabolizatori; *wt* - alel divljeg tip

6. RASPRAVA

U opisanom radu ispitali smo važnost multigenске varijabilnosti prijenosnika lijekova ABCB1 i ABCG2 i metaboličkih enzima CYP2D6, CYP3A4/5 na bioraspoloživost risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) te procijenili utjecaj farmakogenetičke i farmakokinetičke varijabilnosti na učinkovitost i sigurnost primjene lijeka u pacijenata sa shizofrenijom.

6.1. Utjecaj polimorfizama enzima CYP i transportera ABC na ravnotežne koncentracije risperidona i 9-hidroksirisperidona

Prvi i glavni metabolički korak u metabolizmu risperidona je 9-hidroksilacija, katalizirana enzimom CYP2D6, dok je manje značajna N-dealkilacija putem CYP3A4/5. U prijenosu risperidona preko membrana u gastrointestinalnom sustavu, krvno-mozgovnoj brani te bubrežima značajnu ulogu imaju transporteri ABCB1 i ABCG2.

Glavni farmakokinetički nalaz ovog istraživanja je značajna interakcija između alelne varijante *ABCG2 421C>A* i fenotipa CYP2D6, normalnih i vrlo brzih metabolizatora (NM/UM) u učincima na izloženost ravnotežnim koncentracijama (ujednačenima prema dozi) risperidona, 9-OH-risperidona i risperidona + 9-OH-risperidon (ukupnog aktivnog lijeka) u bolesnika sa shizofrenijom liječenih pripravcima LAI-RIS. Učinak varijantnog alela *ABCG2* u skupini svih ispitanika je umjeren/blag, uočene su za oko 20% niže koncentracije ukupnog aktivnog lijeka (RIS+9-OH-RIS) u odnosu na koncentracije u homozigotnih nositelja alela divljeg tipa *ABCG2*. Međutim u skupini bolesnika s fenotipom CYP2D6 NM/UM učinak varijantnog alela *ABCG2* rezultirao je s 31% do 37% nižim koncentracijama sva tri analita, dok nije pokazan učinak u bolesnika s drugim fenotipovima CYP2D6. Vrlo sličan metabolički omjer RIS/9-OH-RIS u nositelja varijantnih alela i homozigota divljeg tipa na obje razine fenotipa CYP2D6 ukazuje da je utjecaj na aktivne komponente podjednak. Još jedna strana ove interakcije mogla bi biti značajna: u homozigotnih nositelja alela divljeg tipa *ABCG2*, učinak fenotipa CYP2D6 NM/UM je blag (za 20% niže razine risperidona i RIS+9-OH-RIS) ali je kombinacija s varijantnim alelom *ABCG2* rezultirala s 55% nižim koncentracijama risperidona, 44% nižim koncentracijama 9-OH-risperidona i 53% nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka (RIS+9-OH-RIS), što znači da je „reducirajući učinak“ NM/UM fenotipa na izloženost lijeku za 42%, 45% i 43% veći, uz održani odnos metaboličkog omjera. Glede mehanizma, interakcija se čini uvjerljivom (aditivni učinci različitih mehanizama), iako mjesto učinka varijantnog alela *ABCG2* ostaje nepoznato (gastrointestinalni sustav se zaobilazi intramuskularnom primjenom).

Ograničavajući čimbenik u ovom zaključku je relativno malen broj nositelja kombinacije CYP2D6 NM/UM + ABCG2 varijantnog alela. Ipak bilo je 12 uzoraka ispitanika s dosljednim učincima u pogledu vršne i najniže izloženosti. Štoviše, procjene su dobivene kontrolom genotipa ABCB1, primjene inhibitora CYP, dobi (statističkim prilagođavanjem), bubrežne i jetrene funkcije (prema isključnim kriterijima), ukupnog fenotipa CYP3A (udio intermedijarnih metabolizatora bio je 85% - 88% u četiri podskupine pacijenta) i primjene induktora ili inhibitora transportera ABCG2, ABCB1 i CYP (svega nekoliko pacijenata).

Ispitivani uzorak bio je premalen za detaljno istraživanje potencijalnih učinaka složenih polimorfizama ABCB1. Međutim, korišteni pristup (tri lokusa koja se razmatraju pojedinačno ili u različitim kombinacijama) podržava stajalište da genotip ABCB1 nema snažan učinak na sistemsku izloženost aktivnim komponentama risperidona u bolesnika liječenih LAI-RIS (potencijalna uloga apsorpcije na razini gastrointestinalnog sustava je premoštena parenteralnom primjenom).

Naše podatke o interakciji polimorfizama gena CYP2D6, ABCB1 i ABCG2 i njihovom učinku na PK i/ili PD risperidona, nismo mogli usporediti s podacima u literaturi jer prema dostupnim izvorima do sada nije opisan ovakav pristup u studijama koje su se bavile farmakogenetikom risperidona, poglavito formulacijom lijeka s produljenim oslobađanjem. Mogu se naći podaci o pojedinačnim genima ili nekim drugim kombinacijama gena.

Prethodne studije koje su se bavile farmakogenetikom risperidona također ukazuju na značaj polimorfizma CYP2D6. Dokazana je bitno smanjena 9-hidroksilacija risperidona u homozigotnih nositelja varijantnih nefunkcionalnih alela CYP2D6 (spori metabolizatori - PM). Također je pokazano da koncentracije risperidona i metabolički omjer RIS/9-OH-RIS u ravnotežnom stanju ovise o genotipu CYP2D6 (195,202,203). Ti su podaci dobiveni za pacijente na oralnim pripravcima risperidona.

U istraživanju velikog broja odraslih bolesnika s nekim oblikom psihoze u norveškoj populaciji, bilo je moguće povezati/objasniti samo oko polovice varijabilnosti u metabolizmu risperidona s različitim genotipovima CYP2D6. Iako se podskupine ispitanika, definirane na temelju genotipova CYP2D6, značajno razlikuju u farmakokinetskim parametrima risperidona, pokazalo se da sam genotip CYP2D6 nije dostatan da predvidi sve aspekte ove varijabilnosti (202). Naša studija ukazuje da bi važan dodatan čimbenik mogao biti upravo varijabilnost prijenosa lijekova putem transportera ABCG2.

S obzirom na farmakogenetička ispitivanja pripravaka LAI-RIS, objavljene su samo dvije studije. Istraživanja Handseta i suradnika su pokazala da je u koncentracija ukupnog aktivnog lijeka RIS+9-OH-RIS bila 80% veća ($P < 0,03$), dok je omjer RIS/9-OH-RIS bio 6,3 puta veći

($P < 0,01$) u podskupini homozigotnih nositelja varijantnih nefunkcionalnih alela *CYP2D6*, tj. *CYP2D6* *3, *4, *5 ili *6, koji određuju spori metabolički fenotip (PM). U istoj studiji autori navode da su vrijednosti RIS+9-OH-RIS za nositelje nefunkcionalnih alela *CYP2D6* koji uzimaju oralnu formulaciju, bile 32% ($P < 0,03$), a RIS/9-OH-RIS 12,5 puta veće ($P < 0,01$). Rezultati i zaključci autora ukazuju na značajnu ulogu genotipa *CYP2D6* u moduliranju farmakokinetičkih parametara oralnih i LAI-RIS formulacija risperidona (206).

Naši podaci su u suglasju s drugim publiciranim rezultatima za LAI-RIS (207), koji također izvještavaju o nižim razinama risperidona u nositelja fenotipa vrlobrzih metabolizatora (UM). Osim utjecaja polimorfizma *CYP2D6* autori ističu i ulogu varijantnih oblika gena nuklearnog receptora *NRI/2* kao mogućih modulatora plazmatskih koncentracija risperidona ali i pojavnosti neželjenih štetnih učinaka lijeka.

6.2 Utjecaj polimorfizama enzima CYP i transportera ABC na kliničke ishode (PANSS)

Zaključci glede kliničkih ishoda su također limitirani brojem uključenih ispitanika i posljedično snagom farmakokinetičkih (PK) analiza. Prvi dojam je da djeluju kontroverzno i stoga ih treba promatrati zajedničkim razmatranjem glavne analize (tablica 22.) i eksplorativne analize koja je također uzela u obzir farmakokinetičke podatke. Na složenost upućuje sljedeće: a) u svim analizama fenotip *CYP2D6* NM/UM (manja izloženost ukupnom aktivnom lijeku) je konzistentno bio usmjeren prema slabijem terapijskom učinku, ali su sve procjene bile neprecizne sa širokim CI; b) s druge strane, prisustvo varijantnog alela *ABCG2*, koji je također povezan s manjom sistemskom izloženosti ukupnom aktivnom lijeku, bio je dosljedno snažno povezan s boljim kliničkim ishodom; c) genotipovi *ABCB1* povezani s normalnom funkcijom transportera nisu imali učinka na izloženost ukupnom aktivnom lijeku, ali su bili povezani s manjim terapijskim učinkom; d) konfuzija nastaje kad se uzmu u obzir koncentracije ukupnog aktivnog lijeka, jer su niže razine u razdoblju od 6. do 8. tjedna povezane s boljim kliničkim ishodom u 12. tjednu, a učinak je uvjetovan genotipom (i obrnuto); e) naznačena je neizravna veza između fenotipa *CYP2D6* NM/UM i boljih kliničkih ishoda posredovanih učincima na razinu ukupnog aktivnog lijeka.

Jaka povezanost između nižih razina ukupnog aktivnog lijeka (6-8 tjedan) i boljeg kliničkog ishoda nakon 12. tjedna djeluje kontraintuitivno. To bi se moglo promatrati i kao artefakt, jer koncentracije i klinički učinak nisu istovremeno određeni. Ipak, čini se malo vjerojatnim da će

do 12. tjedna promatrane farmakokinetičke vrijednosti biti bitno različite: uzimane su u stanju ravnoteže, bolesnici su bili na fiksnim dozama tijekom promatranog razdoblja i koncentracije su prilagođene prema dozi. Važnije je, međutim, da se uočene povezanosti ne smiju promatrati s obzirom na uzročno-posljedičnu vezu: niže systemske razine ukupnog aktivnog lijeka mogu biti posljedica boljeg odgovora koji je evaluiran u 12. tjednu, ali njegov je početak mogao biti nekoliko tjedana ranije - primjerice zbog veće dostupnosti lijeka u središnjem živčanom sustavu. Neizravno, takvo stajalište potkrijepljeno je sljedećim: a) razina ukupnog aktivnog lijeka utječe na klinički ishod u skupini ispitanika s ukupnim genotipom *ABCB1* koji je povezan sa smanjenom aktivnosti transportera, a nema učinka u ispitanika s genotipom „normalne aktivnosti“. *ABCB1/MDR1/P-gp* je glavni izbacivački (engl. *efflux*) protein za koji se zna da ograničava bioraspoloživost lijekova-supstrata u CNS (46), stoga u ovom slučaju smanjena aktivnost na krvno-moždanoj barijeri, tj. smanjeno izbacivanje u systemsku cirkulaciju rezultira većom dostupnosti risperidona u CNS; b) genotip *ABCB1* „normalne aktivnosti“ nema učinka na systemski aktivni dio risperidona, ali je povezan sa slabijim kliničkim odgovorom: stoga se čini vjerojatnim da se učinak manifestira na razini dostupnosti u CNS; c) nadalje, genotip *ABCB1* „normalne aktivnosti“ (nasuprot genotipu smanjene aktivnosti) povezan je sa slabijim kliničkim odgovorom u rasponu nižih ukupnih koncentracija (npr. 0,5 nmol/L), ali ne i u rasponu viših koncentracija (npr. 2 nmol/L) (tablica 26.), što ukazuje da je u slučaju viših koncentracija lijeka nadvladana aktivnost izbacivanja putem *ABCB1* na krvno-moždanoj barijeri.

Zbirno, podaci sugeriraju da veza između systemske izloženosti ukupnom aktivnom lijeku i kliničkih učinaka nije jednostavna kao što se najčešće očekuje. U tom kontekstu, prikazani rezultati ne podržavaju opće prihvaćeno stajalište u kojem fenotip CYP2D6 NM/UM rezultira nižom izloženošću i posljedično manjim učinkom. Čini se da nema drugog mehanizma kliničkih učinaka u ispitanika s fenotipom NM/UM osim utjecaja na bioraspoloživost risperidona, ali u ovom istraživanju veza između NM/UM i ukupne aktivne komponente lijeka zapravo je rezultirala boljim kliničkim odgovorom (neizravni učinak fenotipa NM/UM u bolesnika s genotipom *ABCB1* „smanjene aktivnosti“). Prikazani rezultati upozoravaju da veza između fenotipova CYP2D6 NM/UM i kliničkih ishoda može ovisiti o brojnim čimbenicima, uključujući aktivnost transportera *ABCB1* i *ABCG2* koja nije isključivo povezana sa systemskom bioraspoloživošću. Čini se da učinak *ABCG2 421C>A* na kliničke ishode nije posljedica utjecaja na bioraspoloživost - varijanta alela bila je povezana s nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka, ali s boljim kliničkim odgovorom neovisno o koncentracijama. To je u skladu s činjenicom da ovaj varijantni alel (*ABCG2 421A*) smanjuje ekspresiju proteina

ABCG2 za koji se zna da ograničava biodostupnost lijekova supstrata, u koje spada i risperidon, u CNS (243). Stoga niža ekspresija ABCG2 rezultira većom biodostupnošću ukupnog aktivnog lijeka u CNS i posljedično većim učinkom.

S farmakokinetičkog stajališta, aditivni učinak alelne varijante *ABCG2 421C>A* i fenotipa CYP2D6 NM/UM na izloženost ukupnom aktivnom risperidonu čini se relevantnim za kliničku praksu: prilično blagi učinak fenotipa CYP2D6 NM/UM u homozigotnih nositelja alela divljeg tipa *ABCG2*, pretvara se u oko 50% nižu sistemsku bioraspoloživost u nositelja varijantnih alela niske aktivnosti *ABCG2*, identificirajući dvije podskupine među CYP2D6 NM/UM pacijentima u kojih bi prema literaturi predloženom prilagođavanju doze (202) rezultiralo različitim razinama bioraspoloživosti. Međutim, uvođenje kliničkih rezultata u ovu „jednadžbu“ zakompliciralo je cjelokupnu sliku. Ipak, ako se gleda odnos između fenotipa CYP2D6 i kliničkih rezultata/učinaka ne uzimajući u obzir interpolirane PK podatke, tada NM/UM fenotip ima za 50% manje izgleda za klinički relevantno smanjenje vrijednosti PANSS. Činjenica da su sve procjene bile neprecizne (široki CI) onemogućuje bilo kakve zaključke. Nepreciznost je dijelom posljedica ograničenog uzorka. Ipak u glavnoj analizi (tablica 22.) procjene su se temeljile na 116 opažanja za NM/UM ispitanike i 86 opažanja za ispitanike s drugim fenotipovima, što sugerira da je nepreciznost također posljedica varijabilnosti NM/UM učinka. U modelu u kojem je učinak fenotipa CYP2D6 tretiran kao nasumični efekt, intervali pouzdanosti procjene bili su još i širi.

Za razliku od rezultata PK, klinički učinak fenotipa NM/UM bio je konzistentan za genotipove *ABCG2* i *ABCB1*. To je također vidljivo iz vrlo sličnih vrijednosti procijenjenih vjerojatnosti klinički relevantnog smanjenja PANSS u podskupinama fenotipa prema genotipu (Slika 17.). Za farmakokinetiku risperidona čini se da je varijantni alel *ABCG2* zanimljiv kao pokretač učinka CYP2D6 NM/UM, dok se genotip *ABCB1* čini nevažnim. Varijantni oblik *ABCG2* je dosljedno povezan s boljim klinički relevantnim učinkom (oko 4,5 puta veći izgledi) (suprotno očekivanju i neovisno o farmakokinetičkom učinku), dok je *ABCB1* dosljedno povezan s nižim klinički relevantnim učinkom (oko 60-65% manji izgledi).

Iako omjer izgleda možda nije vrlo intuitivan za tumačenje, prilagođene procijenjene vjerojatnosti klinički relevantnog učinka (12. tjedan - 24. tjedan) (Slika 17.) ukazuju na vjerojatnost od 43,8% za nositelje varijantnog alela *ABCG2* u odnosu na 14,4% za homozigote divljeg tipa (apsolutna razlika od 29,4%; 95% CI=1,0-59,9) i vjerojatnost od 15,3% u ispitanika s ukupnim genotipom „normalne aktivnosti“ u odnosu na 43,1% za sve bolesnike s genotipom *ABCB1*, koji se vjerojatno odnose na alele smanjene aktivnosti (apsolutna razlika od 27,8%; 95% CI= -55-2,2). Čini se da su to za kliničku praksu značajne razlike, ali njihov mehanizam

ostaje nejasan. Prikazana zapažanja ukazuju na mogući utjecaj ovih polimorfizama na dostupnost risperidona u središnjem živčanom sustavu, ali ovo je za sada samo hipoteza. Također, u ovom trenutku je još uvijek nedorečeno koliko su saznanja o genotipu *ABCG2/ABCB1* relevantna za optimizaciju liječenja risperidonom. Stoga je nužno provesti replikacijske studije te testiranja i u drugim etničkim skupinama i rasama zbog velike varijabilnosti u učestalosti varijantnih oblika ovih gena.

6.3 Usporedba rezultata s podacima u literaturi

6.3.1 *ABCG2*

Najznačajniji rezultat prikazanog istraživanja ukazuje na bitnu uloga prijenosnika *ABCG2/BCRP* u moduliranju ukupnog učinka fenotipa *CYP2D6*. *ABCG2* je eksprimiran u različitim tkivima i organima uključujući tanko crijevo, jetra, krvno-moždanu barijeru i bubrege (244), ograničavajući organsku i sistemska izloženost važnim supstratima. Primarna uloga *ABCG2* kao izbacivačke pumpe na apikalnoj membrani enterocita, aktivnog prijenosa supstrata iz hepatocita u žuč te prijenosa u stanicama bubrežnog proksimalnog tubula doprinosi apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijekova i endogenih tvari te zaštiti stanica od izloženosti egzogenim tvarima- ksenobiotičima (146). *ABCG2* dobiva sve više pozornosti kao ključni prijenosnik koji ograničava propusnost velikog broja terapijskih sredstava kroz krvno-moždanu barijeru. Utvrđeno je da je ekspresija *ABCG2* mRNA veća u mozgu u usporedbi s onom u jetri (245). Ekspresija *ABCG2* na luminalnoj strani endotelne stanice krvno-moždane barijere i krvno-kralježnične barijere nesumnjivo ograničava ulazak širokog spektra terapeutika u CNS, što potencijalno doprinosi terapijskom neuspjehu lijekova koji djeluju na CNS (246).

Naše istraživanje upravo ističe i potvrđuje važnost uloge *ABCG2* prijenosnika u primjeni risperidona zbog snažnog modulirajućeg učinka na krvno-moždanu barijeru. Rezultati ukazuju da sistemska izloženost lijeku odnosno razine koncentracija u krvi ne moraju direktno korelirati s razinom lijeka u CNS-u i u konačnici s učinkovitosti lijeka. Nositelji varijantnog alela *ABCG2* zbog veće propusnosti na krvno-moždanu barijeru imali su niže razine sistemske izloženosti risperidonu, ali veće izgleda za bolji odgovor na terapiju. Taj je učinak dodatno naglašen u kombinaciji s fenotipom *CYP2D6* NM/UM.

Vrlo je malo objavljenih rezultata koji opisuju farmakogenetiku risperidona s obzirom na polimorfizme *ABCG2*. U studiji provedenoj u pedijatrijskoj populaciji bolesnika na oralnoj

primjeni risperidona testirane su varijante gena *CYP3A*, *CYP2D6*, *ABCB1* i *ABCG2*. Rezultati izvještavaju o povezanost varijante *ABCG2 c.421 C>A* s nižim C/D risperidona i većom vjerojatnošću razvoja poremećaja metabolizma i prehrane (48).

Važnost funkcije proteina BCRP/ABCG2 kao mogućeg modulatora djelotvornosti i sigurnosti primjene lijekova njegovih supstrata prepoznala su i regulatorna tijela poput FDA te EMA-e koja su izdala i smjernice za nove lijekove koji moraju biti ispitani kao potencijalni supstrati ili inhibitori BCRP/ABCG2 (152,153).

Polimorfizam *ABCG2 c.421 C>A* (rs2231142) rezultira smanjenom aktivnošću transportera (112). Prema podacima dobivenima iz studija *in vitro*, polimorfizam *ABCG2 c.421 C>A* zadržava ekspresiju mRNA, ali je ekspresija proteina i posljedično njihova funkcija smanjena za 50-70% zbog pojačane degradacije u proteasomu (247,248). U nositelja ovog polimorfizma uočena je povećana izloženost lijekovima supstratima (112) što može dovesti i do razvoja neželjenih štetnih učinaka. Tako su dokumentirane nuspojave fluvastatina (249), atorvastatina (250), gefitiniba (251) i afatiniba (252).

Naše ranije objavljeno istraživanje sugerira da varijantni alel *ABCG2 c.421C>A* značajno modulira interakciju lamotrigina i valproata pojačavajući učinke valproata na izloženost lamotriginu (168). U podskupini bolesnika nositelja varijantnog alela smanjene aktivnosti *ABCG2*, koji su u konkomitantnoj terapiji uzimali i valproat, zabilježene su za 60–70% veće ostatne koncentracije lamotrigina (razine lijeka prije slijedeće doze) u odnosu na koncentracije u homozigotnih nositelja alela divljeg tipa. Opisano istraživanje također potvrđuje klinički značaj transportera *ABCG2*.

6.3.2 *ABCB1*

Nismo ustanovili neovisne učinke polimorfizama *ABCB1* na dispoziciju LAI-RIS, što je u skladu s objavljenim podacima, koji također ne pokazuju povezanost varijanti *ABCB1* s izloženosti i nuspojavama risperidona (207). PK i PD ispitivanja risperidona u korelaciji s farmakogenetičkom predispozicijom u skupini od 150 psihijatrijskih bolesnika nisu pronašli korelacije s varijantama *NRI/2*, *POR*, *PPAR α* , *ABCB1*, *CYP2D6* i *CYP3A* (200).

U prikazanom istraživanju genotip *ABCB1* „normalne/visoke aktivnosti“ nije pokazao učinak na sistemsku izloženost zbirnim koncentracijama aktivnog lijeka, ali je povezan sa slabijim kliničkim odgovorom, što opet ukazuje na ulogu i ovog transportera na razini krvno-moždane barijere i ograničavanju dostupnosti lijeka u CNS, posebno u rasponu nižih ukupnih

koncentracija. Analiza u modelu interakcija između fenotipa CYP2D6 i genotipa *ABCB1* pokazala je da ukupni genotip *ABCB1* CC/GG/CC (visoka aktivnost vs. „ostali“) nije imao značajan utjecaj na razinu risperidona u pacijenata s CYP2D6 NM/UM, ali je bio povezan s većim razinama u pacijenata s ostalim fenotipovima CYP2D6. I ovaj nalaz ukazuje na važnost analize više farmakogena koji mogu mijenjati utjecaj, odnosno modulirati PK risperidona. Ovi nalazi su u skladu s publiciranim radovima. Na animalnim modelima je pokazano da su ukupne koncentracije aktivnog lijeka u mozgu bile 10 puta veće u „*knockout*“ u odnosu na životinje s izraženim P-glikoproteinom/*ABCB1*. Varijante *ABCB1* također su utjecale na antipsihotičko djelovanje risperidona u pacijenata koji su primali lijekove - supstrate *ABCB1* (253,254).

6.3.3 CYP3A4/5

Nismo uspjeli otkriti bilo koji relevantan utjecaj polimorfizama *CYP3A4**22 i *CYP3A5**3 na metabolizam risperidona jer je učestalost minornih alela (engl. *minor allele frequency* – MAF) bila premala za bilo kakvu smislenu analizu. Ranija istraživanja za oralnu formulaciju risperidona (39,48,193,200,209,210) kao i za LAI-RIS (207) također nisu ustanovili značajne asocijacije s varijantama gena *CYP3A*. Pozitivne asocijacije zabilježene su za *CYP3A5* pretežno u azijskoj populaciji u kojoj je učestalost minornog alela (*1) veća (29%) u usporedbi s bjelačkom populacijom (6%). *CYP3A* je sporedni metabolički put risperidona. S obzirom da enzim *CYP3A4* zajedno s transporterom P-glikoproteinom /*ABCB1* ima značajnu aktivnost u enterocitima, teško je procijeniti opseg varijabilnog utjecaja svakog od njih pojedinačno. Nadalje, za LAI-RIS ovaj dio varijabilnosti na razini apsorpcije i metabolizma (učinak prvog prolaza) u crijevima je zaobiđen, što bi moglo u određenoj mjeri objasniti niži, statistički nevažan ukupni utjecaj varijanti *ABCB1* i *CYP3A* na bioraspoloživost LAI-RIS dobiven u ovom istraživanju u odnosu na podatke dobivene u studijama koje su ispitivale oralne formulacije risperidona.

6.3.4 Farmakogenetika učinkovitosti i sigurnosti primjene risperidona

6.3.4.1 CYP2D6

Iako postoje neki uvjerljivi farmakogenetički podaci, još uvijek nije jasno u kojoj mjeri geni ADME (apsorpcija, distribucija, metabolizam, ekskrecija) utječu na učinkovitost i sigurnost terapije risperidonom. Nismo našli neovisnu povezanost između ispitivanih genotipova i nuspojava LAI-RIS. Uglavnom su publicirani podaci za oralne formulacije risperidona. Studija koja je uključivala značajan broj ispitanika s fenotipom sporih metabolizatora za CYP2D6, izvijestila je da su CYP2D6 PM povezani s većom stopom nuspojava risperidona i prekidom liječenja (219). Rezultati su također pokazali da genotip *CYP2D6* sporih metabolizatora zajedno s induktorima i inhibitorima enzima CYP može imati glavnu ulogu u individualiziranju doze risperidona (255). Studija provedena na 76 bolesnika sa shizofrenijom izvijestila je da je fenotip CYP2D6 PM bio povezan s većim kliničkim poboljšanjem PANSS-a (vjerojatno zbog produžene izloženosti lijeku), ali ne i s razvojem nuspojava (213,214). Stariji pacijenti, zbog smanjene funkcije bubrega, nakupljaju 9-OH-risperidon, pri čemu su pacijenti starije dobi, koji su ujedno i spori metabolizatori putem CYP2D6 (i drugi sa smanjenom bubrežnom funkcijom) naročito izloženi riziku razvoja nuspojava risperidona (205).

U studiji na 1288 bolesnika liječenih risperidonom pokazana je veća učestalost neuspješnog liječenja među pacijentima sa sporim i vrlobrzim metaboličkim fenotipom (202). Postoje dokazi o povezanosti genotipa *CYP2D6* i doziranja risperidona na način da su spori metabolizatori primali manje doze (202,209), a vrlobrzi metabolizatori veće doze u usporedbi s dozama za normalne metabolizatore (209). Povezanost genotipa/fenotipa CYP2D6 s nuspojavama risperidona nije ustanovljena u ispitivanjima provedenima u malim skupinama ispitanika (214,220).

6.3.4.2 ABCB1

Neke studije su otkrile povezanost između polimorfizama *ABCB1* i učinkovitosti i/ili nuspojava risperidona (207,209,212). Jedno istraživanje s LAI-RIS nije pokazalo značajne učinke *ABCB1* (*1236C>T*, *2677G>T*, *3435C>T*) na liječenje risperidonom (207), dok je drugo pokazalo granično značajne asocijacije, u kineskoj Han populaciji (215). Pacijenti s genotipom *ABCB1 1236TT* u odnosu na druge genotipove imali su bolje ishode prema BPRS (engl. *brief psychiatric rating scale - BPRF*) ($F=3,967$, $p=0,021$), dok ostale varijante, uključujući

rs13233308, *G2677T/A* i *C3435T*, nisu pokazale povezanost (212). Alel *ABCB1 3435T* te haplotip *ABCB1 2667T-3435T* imao je veću učestalost među ispitanicima bez ekstrapiramidnih sindroma (197). U drugoj studiji nisu dokazane značajne korelacije između polimorfizama *ABCB1* i primijenjenih doza risperidona (209). Nositelji haplotipa *ABCB1 TC* (rs2235048-rs1045642) imali su veće izgleda za smanjenje vrijednosti PANSS, dok su nositelji genotipa *ABCB1 3435TT* imali bolji klinički odgovor (215).

6.4 Utjecaj primjene inhibitora i induktora enzima CYP i transportera ABC na PK/PD risperidona

U provedenom ispitivanju nije ustanovljena značajna uloga inhibitora/induktora ispitivanih enzima (CYP2D6, CYP3A4/5) i transportera ABC (*ABCB1*, *ABCG2*) na biorasploživost i učinkovitost niti na pojavnost neželjenih učinaka LAI-RIS. Konkomitantnu terapiju uglavnom su činili psihijatrijski lijekovi. Napominjemo da je ukupno 21 ispitanik uzimao je neki od lijekova koji se smatraju relevantnim inhibitorima enzima CYP2D6 i CYP3A4, a uporaba induktora CYP3A4 (karbamazepin) i inhibitora/induktora transportnih proteina *ABCB1* i *ABCG2* je bila sporadična.

Literaturni podaci o ispitivanjima genetičkih i okolišnih varijabli koje mogu utjecati na razine risperidona u plazmi, ukazuju da je fenotip sporih metabolizatora putem CYP2D6 bio snažno povezan s omjerom $C/D > 14$ (OR = 8,2, 95% CI = 2,0-32,7), što ukazuje na smanjenu eliminaciju risperidona (39). Uz to, primjena inhibitora CYP također je bila značajno povezana s $C/D > 14$ (OR = 3,8; CI = 1,7-8,7) i omjerom RIS/9-OH-RIS. Primjena induktora značajno je bila povezana s $C/D < 3,5$ (OR = 41,8; CI = 12,7-138), što ukazuje na povećavanje eliminacije risperidona. U istoj studiji autori također ističu da su ženski spol i dob bili povezani sa sporijim uklanjanjem risperidona. Autori su zaključili da je fenotip sporih metabolizatora zajedno s CYP induktorima i inhibitorima relevantan za doziranje risperidona.

Premda je CYP2D6 glavni biotransformacijski put risperidona, u publiciranoj literaturi, pokazano je da istodobna primjena karbamazepina (induktor CYP3A4) s oralnim pripravcima risperidona može smanjiti razinu risperidona i 9-OH-risperidona do 50% (256,257). Uz to, postoje dokazi da karbamazepin može ubrzati klirens drugog LAI pripravka, haloperidol-dekanoata (258), i vjerojatno ubrzati uklanjanje svih lijekova u formulaciji LAI koji se djelomično metaboliziraju pomoću CYP3A4. Autori nadalje sugeriraju da karbamazepin

može imati povoljnu ulogu u liječenju bolesnika koji uzimaju LAI pripravke i koji razvijaju dugotrajne ekstrapiramidne simptome ili druge sindrome, poput katatonije, pogoršane antagonistima dopaminskih D2 receptora (192).

6.5 Značaj za kliničku primjenu i preporuke za buduća istraživanja

Kako se i dalje vjeruje da su učinci varijabilnosti farmakogena na doze risperidona manji od učinaka normalnih bioloških varijacija, farmakogenetički konzorciji još nisu izdali nikakve preporuke ili smjernice za doziranje risperidona prema genotipu (158,160). Do sada nalazimo smjernice za individualizirani pristup prema analizi farmakogena za tricikličke antidepresive (87,88,158,160), inhibitore ponovne pohrane serotonina (89,158,160), atomoksetin (92), aripiprazol, haloperidol i ziklopentiksol (158,160).

Naše istraživanje upućuje na moguće nove pristupe u nadilaženju ovih nedostataka. S obzirom na ubrzani razvoj farmakogenetike/farmakogenomike te nastojanja implementacije genskih analiza prije propisivanja terapije opisano istraživanje ukazuje na važnost multigenskog pristupa u personaliziranom propisivanju lijekova na temelju farmakogenetičke predispozicije. Za bolju procjenu farmakokinetike ali i učinaka risperidona svakako je uz analizu statusa enzima uključenih u biotransformaciju lijeka nužno analizirati i funkciju relevantnih transportera poglavito ABC.

Nadalje, osim ispitivanih gena postoje dokazi da na učinkovitost i nuspojave risperidona utjecaj imaju i polimorfizmi drugih gena koji kodiraju za DRD2, DRD3, 5HTR2A, 5-HTTLPR i COMT (55). Stoga bi buduća istraživanja trebala uz ADME gene uključivati i gene važne za farmakodinamiku risperidona prvenstveno gene povezane uz dopaminergički i serotoninergički sustav i testirati njihove interakcije po uzoru na ovo istraživanje. Razvoj novih metodologija poput naprednog paralelnog sekvenciranja ili sekvenciranja sljedeće generacije (NGS) omogućuje ovakav pristup, uporabom panela koji će sadržavati veći broj gena, te uz česte polimorfizme treba svakako uključivati i rijetke varijante gena s još nepoznatom funkcijom (62).

6.6 Ograničenja studije

Glavno ograničenje studije je broj ispitanika uključenih u istraživanje (n=101). Nadalje, proveli smo analizu glavnih varijanti uključenih farmakogena enzima i prijenosnika lijekova. Postoji vjerojatnost, premda vrlo mala, da je neki od ispitanika nositelj rijetkih varijanti gena koje su mogle utjecati na njegov fenotip.

7. ZAKLJUČCI

Provedeno istraživanje u bolesnika sa shizofrenijom liječenih pripravkom risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) većim je dijelom potvrdilo postavljenu hipotezu te je rezultiralo nekim novim do sada neopisanim znanstvenim spoznajama.

1. Dokazan je učinak polimorfizama *CYP2D6* i *ABCG2* ali ne i polimorfizama *ABCB1*, na koncentracije risperidona i 9-OH-risperidona.
2. Glavni farmakokinetički nalaz ovog istraživanja je značajna interakcija između alelne varijante *ABCG2* (c.421C>A) i fenotipa *CYP2D6*, normalnih i vrlo brzih metabolizatora (NM/UM), u učincima na izloženost ravnotežnim koncentracijama (ujednačenim prema dozi) risperidona, 9-OH-risperidona i risperidon+9-OH-risperidona (ukupnog aktivnog lijeka).
3. Učinak varijantnog alela *ABCG2* u skupini svih ispitanika je skroman, uočene su za oko 20% niže koncentracije ukupnog aktivnog lijeka (risperidon+9-OH-risperidon) u odnosu na koncentracije u homozigotnih nositelja „divljeg” tipa alela *ABCG2*. Međutim u skupini bolesnika s fenotipom *CYP2D6* NM/UM učinak varijantnog alela *ABCG2* rezultirao je s 31% do 37% nižim koncentracijama sva tri analita, dok nema učinka u bolesnika s drugim fenotipovima *CYP2D6*.
4. Učinak fenotipa *CYP2D6* NM/UM je skroman (za 20% niže razine risperidona i risperidona+9-OH-risperidon) ali kombinacija s alelnom varijantom *ABCG2* rezultira 55% nižim koncentracijama risperidona, 44% nižim razinama 9-OH-risperidona i 53% nižim razinama ukupnog aktivnog lijeka (risperidon + 9-OH-risperidon), što znači da je „reducirajući učinak” NM/UM fenotipa na izloženost lijeku za 42%, 45% i 43% veći, uz održani odnos metaboličkog omjera.
5. Fenotip *CYP2D6* NM/UM (manja izloženost ukupnom aktivnom lijeku) konzistentno je bio usmjeren prema slabijem terapijskom učinku.
6. Prisustvo varijantnog alela *ABCG2* 421C>A koji je povezan sa slabijom funkcijom transportera i manjom sistemskom izloženosti ukupnom aktivnom lijeku, bio je dosljedno snažno povezan s boljim kliničkim ishodom u odnosu na nositelje alela normalne funkcije, zbog lakšeg prijenosa lijeka u CNS.

7. Genotipovi ABCB1 (*c.1236C>T*, *c.2677G>T/A*, *c.3435C>T*) povezani s normalnom funkcijom transportera nisu imali učinka na sistemsku izloženost ukupnom aktivnom lijeku, ali su bili povezani s manjim terapijskim učinkom (otežan prijenos lijeka u CNS).
8. Nije dokazan učinak polimorfizama *CYP3A4*22* i *CYP3A5*3*, niti ukupnog fenotipa CYP3A na koncentracije i učinkovitost LAI-RIS zbog nedovoljne zastupljenosti minornih alela u ispitivanoj populaciji.
9. Nije dokazana povezanost polimorfizama *CYP2D6*, *CYP3A4/5*, *ABCB1* i *ABCG2* s pojavnosti akutnih ekstrapiramidnih simptoma.
10. Nije ustanovljena značajna uloga inhibitora/induktora ispitivanih enzima CYP i transportera ABC na bioraspoloživost i učinkovitost niti na pojavnost neželjenih učinaka LAI-RIS.

8. SAŽETAK

Važnost polimorfizama proteina višestruke rezistencije, ABCB1 i ABCG2, za liječenje pripravkom risperidona s produljenim oslobađanjem (LAI-RIS) uglavnom nije poznata. Ispitali smo odnos između ovih polimorfizama i fenotipova citokroma P450 (CYP) 2D6 u njihovim učincima na bioraspoloživost lijeka i kliničke ishode u odraslih pacijenata sa shizofrenijom.

U 24-tjednoj opservacijskoj studiji, pacijenti liječeni s LAI-RIS (n=101) bili su genotipizirani [enzimi (*CYP2D6**3,*4,*5, *6,*41, *dupl*; *CYP3A4**22,*CYP3A5**3), transporteri (*ABCG2* 421C>A; *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T)]. Ispitane su povezanosti ravnotežnih koncentracija risperidona (6. i 8. tjedan) ujednačenih prema dozi, risperidona, 9-OH-risperidona, risperidona + 9-OH-risperidon (ukupni aktivni lijek) s težinom simptoma bolesti (ocjenska ljestvica PANSS, početna vrijednost, 12. i 24. tjedan).

Fenotip CYP2D6 normalni/vrlobrzi metabolizatori (NM/UM) (u uspoređi s ostalima) povezan je sa 17-23% manjom izloženošću u homozigotnih nositelja divljeg tipa alela *ABCG2* i sa 43-55% manjom izloženošću u nositelja varijantnog alela *ABCG2* (smanjena funkcija transportera). Polimorfizmi *ABCB1* nisu imali učinka. Za fenotip NM/UM uočena je tendencija manjeg smanjenja PANSS-a. Varijantni alel *ABCG2* bio je povezan s 4-5 puta većim izgledima za relevantno smanjenje PANSS-a, dok je *ABCB1* pretežno divlji tip genotipa (normalna funkcija transportera) (nasuprot svim ostalim) povezan s 60-65% nižim izgledima (učinci su neovisni o fenotipu CYP2D6). U osoba s *ABCB1* pretežno „divljim“ genotipom, razina ukupne aktivnosti lijeka nije utjecala na klinički odgovor; u suprotnom, niža razina bila je povezana s većim smanjenjem simptoma.

Učinak fenotipa CYP2D6 na izloženost LAI-RIS bitno je uvjetovan polimorfizmom *ABCG2* 421C>A. Učinci polimorfizma *ABCG2* 421C>A i *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T) klinički su relevantni i nisu povezani sa sistemskom izloženosti lijeku.

Ključne riječi: pripravak risperidona s produljenim oslobađanjem, CYP2D6, ABCB1, ABCG2, shizofrenija, farmakogenetika, farmakokinetika, farmakodinamika

9. SUMMARY

Doctoral thesis:

Impact of pharmacogenetic variations of *CYP2D6* and *ABCB1* on the long-acting risperidone treatment

Lana Ganoci, 2019

The practical relevance of polymorphisms of multidrug resistance protein (*ABCB1*) and breast cancer resistance protein (*ABCG2*) for treatment with long-acting intramuscular (LAI) risperidone is largely unknown. We explored the relationship between these polymorphisms and cytochrome P450 (CYP) 2D6 phenotype in their effects on drug disposition and clinical outcomes in adults with schizophrenia. In a 24-week observational study, patients initiated on LAI-risperidone (n=101) were genotyped [enzymes (*CYP2D6**3,*4,*5,*6,*41,*dupl*; *CYP3A4**22,*CYP3A5**3), transporters (*ABCG2* 421C>A; *ABCB1* 1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T)] and evaluated for steady-state (weeks 6-8) plasma levels of dose-corrected risperidone, 9-OH-risperidone, risperidone+9-OH-risperidone (active moiety) and for symptom severity (Positive and Negative Syndrome Scale, PANSS, baseline, weeks 12 and 24).

CYP2D6 normal/ultrarapid metabolizer (NM/UM) phenotype (vs. all others) was associated with 17-23% lower exposure in *ABCG2* wild-type homozygotes, and with 43-55% lower exposure in *ABCG2* variant allele carriers (reduced transporter function). *ABCB1* polymorphisms had no effect. NM/UM phenotype tended to less PANSS reduction. *ABCG2* variant allele was associated with 4-5-times higher odds of a relevant PANSS reduction, while *ABCB1* predominantly wild-type genotype (normal transporter function) (vs. all others) was associated with 60-65% lower odds (effects unconditional on *CYP2D6* phenotype). With *ABCB1* predominantly wild-type genotype, active moiety level had no effect on clinical response; otherwise, the lower level was associated with a greater symptoms reduction.

CYP2D6 phenotype effect on exposure to LAI-risperidone is relevantly conditional on *ABCG2* 421C>A polymorphism. *ABCG2* and *ABCB1* (1236C>T, 2677G>T/A, 3435C>T) polymorphisms effects on risperidone efficacy are clinically relevant and not related to systemic disposition.

Key words: long-acting risperidone, *CYP2D6*, *ABCB1*, *ABCG2*, schizophrenia, pharmacogenetics, pharmacokinetics, pharmacodynamics

10. POPIS LITERATURE

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5). 5. izd. American Psychiatric Association, ur. Arlington: American Psychiatric Association; 2013.
2. World Health Organisation. Shizofrenia - fact sheets. [Internet]. 2019 [pristupljeno 03. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
3. van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet*. 2009.;374(9690):635–45.
4. Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. *Lancet*. 2016.;388(10039):86–97.
5. Laursen TM, Munk-Olsen T, Vestergaard M. Life expectancy and cardiovascular mortality in persons with schizophrenia. *Curr Opin Psychiatry*. 2012.;25(2):83–8.
6. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Carter A, Casey DC ZL. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016.;388:1459–544.
7. Stahl SM. Antipsychotic agents. U: Stahl SM, ur. Stahl's Essential Psychopharmacology. 4th izd. Cambridge: Cambridge University Press; 2013. str. 129–236.
8. Mihaljević-Peješ A, Šagud M. Klinička obilježja i dijagnoza psihotičnih poremećaja. U: Mihaljević-Peješ, Alma; Šagud M, ur. Antipsihotici u kliničkoj praksi. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 9–18.
9. Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, i sur. Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2016.;15(7):485–515.
10. DeBattista C. Antipsihotici i litij. U: Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ, ur. Temeljna i klinička farmakologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011. str. 487–508.
11. Smoller JW, Andreassen OA, Edenberg HJ, Faraone S V, Glatt SJ, Kendler KS. Psychiatric genetics and the structure of psychopathology. *Mol Psychiatry*. 2019.;24(3):409–20.
12. Ripke S, Neale BM, Corvin A, Walters JTR, Farh KH, Holmans PA, i sur. Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. 2014.;511:421–7.
13. Malhotra D, Sebat J. CNVs: Harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. *Cell*. 2012.;148(6):1223–41.
14. Bergen SE, Ploner A, Howrigan D, O'Donovan MC, Smoller JW, Sullivan PF, i sur. Joint contributions of rare copy number variants and common SNPs to risk for schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2019.;176(1):29–35.

15. Landek-Salgado MA, Faust TE, Sawa A. Molecular substrates of schizophrenia: Homeostatic signaling to connectivity. *Mol Psychiatry*. 2016.;21(1):10–28.
16. Jakovljević M. Kako odabrati najdjelotvorniju antipsihotičnu terapiju u liječenju shizofrenije? U: Mihaljević-Peješ A, Šagud M, ur. *Antipsihotici u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 61–70.
17. Živković M, Jevtović S, Mihaljević-Peješ A, Šagud M. Pozitivna i negativna sindromska skala - PANSS. U: Mihaljević-Peješ A, Šagud M, ur. *Antipsihotici u kliničkoj praksi*. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. str. 91–8.
18. Kay SR, Fiszbein A, Opler LA. The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1987.;13(2):261–76.
19. Kay SR, Opler LA, Lindenmayer JP. Reliability and validity of the positive and negative syndrome scale for schizophrenics. *Psychiatry Res*. 1988.;23(1):99–110.
20. McDonagh M, Peterson K, Carson S, Fu R, Thakurta S. Drug Class Review: Atypical Antipsychotic Drugs. Update 3. 3. izd. Williams L, ur. Portland: Oregon Health & Science University; 2010.
21. Bell M, Milstein R, Beam-Goulet J, Lysaker P, Cicchetti D. The Positive and Negative Syndrome Scale and the Brief Psychiatric Rating Scale. Reliability, comparability, and predictive validity. *J Nerv Ment Dis*. 1992.;180(11):723–8.
22. Muller MJ, Rossbach W, Dannigkeit P, Muller-Siecheneder F, Szegedi A, Wetzel H. Evaluation of standardized rater training for the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS). *Schizophr Res*. 1998.;32(3):151–60.
23. Meltzer HY. Update on typical and atypical antipsychotic drugs. *Annu Rev Med*. 2013.;64:393–406.
24. Huhn M, Nikolakopoulou A, Schneider-Thoma J, Krause M, Samara M, Peter N, i sur. Comparative efficacy and tolerability of 32 oral antipsychotics for the acute treatment of adults with multi-episode schizophrenia: a systematic review and network meta-analysis. *Lancet*. 2019.;394:939–51.
25. Jann MW, Penzak SR. Long-Acting Injectable Second-Generation Antipsychotics: An Update and Comparison Between Agents. *CNS Drugs*. 2018.;32(3):241–57.
26. Gentile S. Discontinuation rates during long-term, second-generation antipsychotic long-acting injection treatment: A systematic review. *Psychiatry Clin Neurosci*. 2019.;73:216–30.

27. Leucht C, Heres S, Kane JM, Kissling W, Davis JM, Leucht S. Oral versus depot antipsychotic drugs for schizophrenia--a critical systematic review and meta-analysis of randomised long-term trials. *Schizophr Res.* 2011.;127(1–3):83–92.
28. Gentile S. Adverse effects associated with second-generation antipsychotic long-acting injection treatment: a comprehensive systematic review. *Pharmacotherapy.* 2013.;33(10):1087–106.
29. Gentile S. Safety concerns associated with second-generation antipsychotic long-acting injection treatment. A systematic update. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2017.;36(2).
30. HALMED. Izvješće o nuspojavama u 2014. godini [Internet]. 2015 [pristupljeno 10. ožujka 2016.]. Dostupno na: <http://www.halmed.hr/Novosti-i-edukacije/Publikacije-i-izvjesca/Izvjesca-o-nuspojavama/Izvjesca-o-nuspojavama/>
31. Leucht S, Cipriani A, Spineli L, Mavridis D, Orey D, Richter F, i sur. Comparative efficacy and tolerability of 15 antipsychotic drugs in schizophrenia: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet.* 2013.;382(9896):951–62.
32. Janssen Pharmaceutical. Risperdal [Internet]. European Medicines Agency. 2008 [pristupljeno 01. rujna 2019.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/risperdal-article-30-referral-annex-i-ii-iii-iv_en-0.pdf
33. Janssen Pharmaceutical. Risperdal Consta [Internet]. European Medicines Agency. 2008 [pristupljeno 01. rujna 2019.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/risperdal-consta-article-30-referral-annex-i-ii-iii_en.pdf
34. Mannens G, Huang ML, Meuldermans W, Hendrickx J, Woestenborghs R, Heykants J. Absorption, metabolism, and excretion of risperidone in humans. *Drug Metab Dispos.* 1993.;21(6):1134–41.
35. Yasui-Furukori N, Hidestrand M, Spina E, Facciola G, Scordo MG, Tybring G. Different enantioselective 9-hydroxylation of risperidone by the two human CYP2D6 and CYP3A4 enzymes. *Drug Metab Dispos.* 2001.;29(10):1263–8.
36. Xiang Q, Zhao X, Zhou Y, Duan JL, Cui YM. Effect of CYP2D6, CYP3A5, and MDR1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone and its active moiety. *J Clin Pharmacol.* 2010.;50(6):659–66.
37. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, Conca A, Deckert J, Domschke K, i sur. Consensus Guidelines for Therapeutic Drug Monitoring in Neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry.* 2018.;51(1–02):9–62.

38. Bork J, Rogers T, Wedlund PJ, de Leon J. A pilot study on risperidone metabolism: the role of cytochromes P450 2D6 and 3A. *J Clin Psychiatry*. 1999.;60(7):469–76.
39. De Leon J, Susce M, Pan R-M, Wedlund P j, Orrego M, Diaz F. A study of genetic (CYP2D6 and ABCB1) and environmental (drug inhibitors and inducers) variables that may influence plasma risperidone levels. *Pharmacopsychiatry*. 2007.;40(3):93–102.
40. Fang J, Bourin M, Baker GB. Metabolism of risperidone to 9-hydroxyrisperidone by human cytochromes P450 2D6 and 3A4. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999.;359(2):147–51.
41. Patteet L, Haufroid V, Maudens K, Sabbe B, Morrens M, Neels H. Erratum to: Genotype and co-medication dependent CYP2D6 metabolic activity: effects on serum concentrations of aripiprazole, haloperidol, risperidone, paliperidone and zuclopenthixol. *Eur J Clin Pharmacol*. 2017.;73(1):127.
42. Janssen Pharmaceutical. Trevicta [Internet]. European Medicines Agency. 2014 [pristupljeno 01. rujna 2019.]. Dostupno na: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/trevicta-epar-product-information_en.pdf
43. Millefiori S, Alparone A. Physicochemical characterization of neuroleptics. Relative stability of 7- and 9-hydroxyrisperidones and their protonated forms in gas phase and in solution. *Eur J Med Chem*. 2010.;45(4):1367–73.
44. Boulton DW, DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. In vitro P-glycoprotein affinity for atypical and conventional antipsychotics. *Life Sci*. 2002.;71(2):163–9.
45. Nakagami T, Yasui-Furukori N, Saito M, Tateishi T, Kaneo S. Effect of verapamil on pharmacokinetics and pharmacodynamics of risperidone: in vivo evidence of involvement of P-glycoprotein in risperidone disposition. *Clin Pharmacol Ther*. 2005.;78(1):43–51.
46. Wang J-S, Ruan Y, Taylor RM, Donovan JL, Markowitz JS, DeVane CL. The brain entry of risperidone and 9-hydroxyrisperidone is greatly limited by P-glycoprotein. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2004.;7(4):415–9.
47. Reist C, Wu JC, Lilja Y, Mukherjee J, Gripeos D, Constantinescu C, i sur. Ketoconazole-associated preferential increase in dopamine D2 receptor occupancy in striatum compared to pituitary in vivo: role for drug transporters? *J Clin Psychopharmacol*. 2012.;32(1):110–3.
48. Rafaniello C, Sessa M, Bernardi FF, Pozzi M, Cheli S, Cattaneo D, i sur. The predictive value of ABCB1, ABCG2, CYP3A4/5 and CYP2D6 polymorphisms for risperidone and

- aripiprazole plasma concentrations and the occurrence of adverse drug reactions. *Pharmacogenomics J.* 2018.;18(3):422–30.
49. Wang J-S, Zhu H-J, Markowitz JS, Donovan JL, Yuan H-J, Devane CL. Antipsychotic drugs inhibit the function of breast cancer resistance protein. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008.;103(4):336–41.
 50. Dean L. Risperidone Therapy and CYP2D6 Genotype. *Medical Genetics Summaries* [Internet]. 2012.–2017. izd. Pratt, V; McLeod, H; Rubinstein, W; Dean, L; Kattman, B; Malheiro A, ur. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information; 2017.
 51. Hendset M, Haslemo T, Rudberg I, Refsum H, Molden E. The complexity of active metabolites in therapeutic drug monitoring of psychotropic drugs. *Pharmacopsychiatry.* 2006.;39(4):121–7.
 52. Loryan I, Melander E, Svensson M, Payan M, Konig F, Jansson B, i sur. In-depth neuropharmacokinetic analysis of antipsychotics based on a novel approach to estimate unbound target-site concentration in CNS regions: link to spatial receptor occupancy. *Mol Psychiatry.* 2016.;21(11):1527–36.
 53. Aravagiri M, Marder SR, Nuechterlein KH, Gitlin MJ. Intra- and interindividual variations in steady-state plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in schizophrenic patients treated chronically with various doses of risperidone. *Ther Drug Monit.* 2003.;25(6):657–64.
 54. Ravina T, Ravina P, Gutierrez J. Acquired long QT syndrome: risperidone-facilitated triggered activity and Torsades de Pointes during complete AV block. *I. Int J Cardiol.* 2007.;116(3):416–20.
 55. Llerena A, Berecz R, Penas-Lledo E, Suveges A, Farinas H. Pharmacogenetics of clinical response to risperidone. *Pharmacogenomics.* 2013.;14(2):177–94.
 56. Pirmohamed M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br J Clin Pharmacol.* 2001.;52(4):345–7.
 57. Daly AK. Pharmacogenetics: a general review on progress to date. *Br Med Bull.* 2017.;124(1):65–79.
 58. Božina N, Ganoci L, Šimičević L. Farmakogenetika/farmakogenomika u personaliziranoj medicini. U: Božina N, ur. *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini.* Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 1–34.
 59. Vogel F. Moderne probleme der humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheilkd.* 1959.;(12):52–62.

60. Relling M V, Evans WE. Pharmacogenomics in the clinic. *Nature*. 2015.;526(7573):343–50.
61. Bush WS, Crosslin DR, Owusu-Obeng A, Wallace J, Almoguera B, Basford MA, i sur. Genetic variation among 82 pharmacogenes: The PGRNseq data from the eMERGE network. *Clin Pharmacol Ther*. 2016.;100(2):160–9.
62. Ingelman-Sundberg M, Mkrтчian S, Zhou Y, Lauschke VM. Integrating rare genetic variants into pharmacogenetic drug response predictions. *Hum Genomics*. 2018.;12(1):26.
63. Wiltshire T, Dong OM. Clinical pharmacogenetics: how do we ensure a favorable future for patients? *Pharmacogenomics*. 2018.;19(6):553–62.
64. Chenoweth MJ, Giacomini KM, Pirmohamed M, Hill SL, van Schaik RHN, Schwab M, i sur. Global Pharmacogenomics Within Precision Medicine: Challenges and Opportunities. *Clin Pharmacol Ther*. 2019.;doi:10.1002/cpt.1664.
65. PharmGKB. Drug Label Annotations [Internet]. 2019 [pristupljeno 03. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/labelAnnotations>
66. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, i sur. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012.;92(4):414–7.
67. PharmGKB. Clinical Guideline Annotations [Internet]. [pristupljeno 03. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/guidelineAnnotations>
68. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther*. 2013.;138(1):103–41.
69. Caudle KE, Dunnenberger HM, Freimuth RR, Peterson JF, Burlison JD, Whirl-Carrillo M, i sur. Standardizing terms for clinical pharmacogenetic test results: Consensus terms from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC). *Genet Med*. 2017.;19:215–23.
70. Kirchheiner J, Nickchen K, Bauer M, Wong ML, Licinio J, Roots I, i sur. Pharmacogenetics of antidepressants and antipsychotics: the contribution of allelic variations to the phenotype of drug response. *Mol Psychiatry*. 2004.;9:442–73.
71. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J*. 2005.;5(1):6–13.

72. PharmGKB. Very Important Pharmacogene: CYP2D6 [Internet]. 2019 [pristupljeno 03. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/vip/PA166170264>
73. Nofziger C, Turner AJ, Sangkuhl K, Whirl-Carrillo M, Agundez JAG, Black JL, i sur. PharmVar GeneReview: CYP2D6. *Clin Pharmacol Ther.* 2019.;10.1002/cpt.1643.
74. Mahgoub A, Idle JR, Dring LG, Lancaster R, Smith RL. Polymorphic hydroxylation of Debrisoquine in man. *Lancet.* 1977.;2(8038):584–6.
75. Kimura S, Umeno M, Skoda RC, Meyer UA, Gonzalez FJ. The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene, and a pseudogene. *Am J Hum Genet.* 1989.;45(6):889–904.
76. Eichelbaum M, Spannbrucker N, Steincke B, Dengler HJ. Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979.;16(3):183–7.
77. Mrazek DA. *Psychiatric Pharmacogenomics.* 1st ed. Mrazek DA, ur. New York: Oxford University Press; 2010.
78. Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE, i sur. The Pharmacogene Variation (PharmVar) Consortium: Incorporation of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Database. *Clin Pharmacol Ther.* 2018.;103(3):399–401.
79. PharmVar. Pharmacogene Variation Consortium [Internet]. 2019 [pristupljeno 03. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.pharmvar.org/>
80. Gaedigk A, Simon SD, Pearce RE, Bradford LD, Kennedy MJ, Leeder JS. The CYP2D6 activity score: translating genotype information into a qualitative measure of phenotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2008.;83(2):234–42.
81. LLerena A, Naranjo MEG, Rodrigues-Soares F, Penas-LLedo EM, Farinas H, Tarazona-Santos E. Interethnic variability of CYP2D6 alleles and of predicted and measured metabolic phenotypes across world populations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014.;10(11):1569–83.
82. Gaedigk A, Dinh JC, Jeong H, Prasad B, Leeder JS. Ten Years' Experience with the CYP2D6 Activity Score: A Perspective on Future Investigations to Improve Clinical Predictions for Precision Therapeutics. *J Pers Med.* 2018.;8(2).
83. Caudle KE, Sangkuhl K, Whirl-carrillo M, Swen JJ, Haidar CE, Klein TE, i sur. Standardizing CYP2D6 Genotype to Phenotype Translation : Consensus Recommendations from the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and Dutch Pharmacogenetics Working Group. 2019.; doi:10.1111/cts.12692.

84. Teh LK, Bertilsson L. Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012.;27(1):55–67.
85. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Klein TE, Shen DD, Callaghan JT, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guidelines for codeine therapy in the context of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6) genotype. *Clin Pharmacol Ther.* 2012.;91:321–6.
86. Crews KR, Gaedigk A, Dunnenberger HM, Leeder JS, Klein TE, Caudle KE, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450 2D6 genotype and codeine therapy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2014.;95:376–82.
87. Hicks JK, Sangkuhl K, Swen JJ, Ellingrod VL, Muller DJ, Shimoda K, i sur. Clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline (CPIC) for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants: 2016 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2016.;102:37–44.
88. Hicks JK, Swen JJ, Thorn CF, Sangkuhl K, Kharasch ED, Ellingrod VL, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guideline for CYP2D6 and CYP2C19 genotypes and dosing of tricyclic antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2013.;93:402–8.
89. Hicks JK, Bishop JR, Sangkuhl K, Müller DJ, Ji Y, Leckband SG, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and CYP2C19 Genotypes and Dosing of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Clin Pharmacol Ther.* 2015.;98:127.
90. Bell GC, Caudle KE, Whirl-Carrillo M, Gordon RJ, Hikino K, Prows CA, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) guideline for CYP2D6 genotype and use of ondansetron and tropisetron. *Clin Pharmacol Ther.* 2017.;102:213–8.
91. Goetz MP, Sangkuhl K, Guchelaar HJ, Schwab M, Province M, Whirl-Carrillo M, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 and Tamoxifen Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2018.;103(5):770–7.
92. Brown JT, Bishop JR, Sangkuhl K, Nurmi EL, Mueller DJ, Dinh JC, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for CYP2D6 Genotype and Atomoxetine Therapy. *Clin Pharmacol Ther.* 2019.;106(1):94–102.
93. Stingl JC, Brockmoller J, Viviani R. Genetic variability of drug-metabolizing enzymes: the dual impact on psychiatric therapy and regulation of brain function. *Mol Psychiatry.* 2013.;18(3):273–87.

94. Haduch A, Daniel WA. The engagement of brain cytochrome P450 in the metabolism of endogenous neuroactive substrates: a possible role in mental disorders. *Drug Metab Rev.* 2018.;50(4):415–29.
95. Haduch A, Bromek E, Sadakierska-Chudy A, Wójcikowski J, Daniel WA. The catalytic competence of cytochrome P450 in the synthesis of serotonin from 5-methoxytryptamine in the brain: An in vitro study. *Pharmacol Res.* 2013.;67(1):53–9.
96. Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics.* 2012.;22(7):555–8.
97. Xie H-G, Wood AJJ, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. *Pharmacogenomics.* 2004.;5(3):243–72.
98. Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, i sur. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet.* 2001.;27(4):383–91.
99. Werk AN, Cascorbi I. Functional gene variants of CYP3A4. *Clin Pharmacol Ther.* 2014.;4:1–9.
100. Elens L, van Gelder T, Hesselink DA, Haufroid V, van Schaik RHN. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics.* 2013.;14(1):47–62.
101. Birdwell KA, Decker B, Barbarino JM, Peterson JF, Stein CM, Sadee W, i sur. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guidelines for CYP3A5 Genotype and Tacrolimus Dosing. *Clin Pharmacol Ther.* 2015.;98:19–24.
102. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic polymorphism in CYP3A4 affects hepatic expression and response to statin drugs. *Pharmacogenomics J.* 2011.;11(4):274–86.
103. Amirmani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen.* 2003.;42(4):299–305.
104. Elens L, Becker ML, Haufroid V, Hofman A, Visser LE, Uitterlinden AG, i sur. Novel CYP3A4 intron 6 single nucleotide polymorphism is associated with simvastatin-mediated cholesterol reduction in the Rotterdam Study. *Pharmacogenet Genomics.* 2011.;21(12):861–6.
105. Božina T. Farmakogenomika prijenosnika lijekova. U: Božina N, ur. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 49–58.

106. Giacomini KM, Huang SM. Transporters in drug development and clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 2013.;94(1):3–9.
107. Pang KS, Rodrigues AD, Peter RM. *Transporter-Based Drug-Drug Interactions.* 1st izd. Pang, K Sandy; Rodrigues, A David; Peter MR, ur. New York: Springer; 2010.
108. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov.* 2014.;14:29–44.
109. Kuzman MR, Medved V, Bozina N, Grubišin J, Jovanovic N, Sertic J. Association study of MDR1 and 5-HT_{2C} genetic polymorphisms and antipsychotic-induced metabolic disturbances in female patients with schizophrenia. *Pharmacogenomics J.* 2011.;11(1):35–44.
110. Dobson PD, Kell DB. Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule? *Nat Rev Drug Discov.* 2008.;7(3):205–20.
111. Borst P, Elferink RO. Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem.* 2002.;71:537–92.
112. Giacomini KM, Balimane P V, Cho SK, Eadon M, Edeki T, Hillgren KM, i sur. International Transporter Consortium commentary on clinically important transporter polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2013.;94(1):23–6.
113. Yee SW, Brackman DJ, Ennis EA, Sugiyama Y, Kamdem LK, Blanchard R, i sur. Influence of Transporter Polymorphisms on Drug Disposition and Response: A Perspective From the International Transporter Consortium. *Clin Pharmacol Ther.* 2018.;104(5):803–17.
114. Woodward OM, Kottgen A, Kottgen M. ABCG transporters and disease. *FEBS J.* 2011.;278(18):3215–25.
115. Ramsey LB, Johnson SG, Caudle KE, Haidar CE, Voora D, Wilke RA, i sur. The clinical pharmacogenetics implementation consortium guideline for SLCO1B1 and simvastatin-induced myopathy: 2014 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2014.;96:423–8.
116. Ambudkar S V, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene.* 2003.;22(47):7468–85.
117. Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug transporters ABCB1, ABCG2, ABCC2 and ABCC3 and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014.;10(10):1337–54.
118. Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, i sur. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics.* 2011.;21(3):152–61.

119. Wolking S, Schaeffeler E, Lerche H, Schwab M, Nies AT. Impact of Genetic Polymorphisms of ABCB1 (MDR1, P-Glycoprotein) on Drug Disposition and Potential Clinical Implications: Update of the Literature. *Clin Pharmacokinet.* 2015.;54:709–35.
120. Leschziner G, Zabaneh D, Pirmohamed M, Owen A, Rogers J, Coffey AJ, i sur. Exon sequencing and high resolution haplotype analysis of ABC transporter genes implicated in drug resistance. *Pharmacogenet Genomics.* 2006.;16(6):439–50.
121. Zhou SF. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica.* 2008.;38(7–8):802–32.
122. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim IW, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar S V., i sur. A „silent“ polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science.* 2007.;315(5811):525–8.
123. Fung KL, Gottesman MM. A synonymous polymorphism in a common MDR1 (ABCB1) haplotype shapes protein function. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2009.;1794(5):860–71.
124. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, i sur. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000.;97(7):3473–8.
125. Nakamura T, Sakaeda T, Horinouchi M, Tamura T, Aoyama N, Shirakawa T, i sur. Effect of the mutation (C3435T) at 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(4):297–303.
126. Tanabe M, Ieiri I, Nagata N, Inoue K, Ito S, Kanamori Y, i sur. Expression of P-glycoprotein in human placenta: relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001.;297(3):1137–43.
127. Kimchi-Sarfaty C, Marple AH, Shinar S, Kimchi AM, Scavo D, Roma MI, i sur. Ethnicity-related polymorphisms and haplotypes in the human ABCB1 gene. *Pharmacogenomics.* 2007.;8(1):29–39.
128. Cascorbi I, Gerloff T, John A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, i sur. Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2001.;69(3):169–74.
129. Chowbay B, Kumaraswamy S, Cheung YB, Zhou Q, Lee EJD. Genetic polymorphisms in MDR1 and CYP3A4 genes in Asians and the influence of MDR1 haplotypes on

- cyclosporin disposition in heart transplant recipients. *Pharmacogenetics*. 2003.;13(2):89–95.
130. Li H, Wang B, Chang C, Wu M, Xu Y, Jiang Y. The roles of variants in human Multidrug Resistance (MDR1) gene and their haplotypes on antiepileptic drugs response: A meta-analysis of 57 studies. *PLoS One*. 2015.;10(3):1–16.
131. Loscher W, Klotz U, Zimprich F, Schmidt D. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia*. 2009.;50(1):1–23.
132. Breitenstein B, Bruckl TM, Ising M, Muller-Myhsok B, Holsboer F, Czamara D. ABCB1 gene variants and antidepressant treatment outcome: A meta-analysis. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2015.;168B(4):274–83.
133. Bruckl TM, Uhr M. ABCB1 genotyping in the treatment of depression. *Pharmacogenomics*. 2016.;17(18):2039–69.
134. Saiz-Rodríguez M, Belmonte C, Román M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, i sur. Effect of ABCB1 C3435T Polymorphism on Pharmacokinetics of Antipsychotics and Antidepressants. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018.;123(4):474–85.
135. Moons T, de Roo M, Claes S, Dom G. Relationship between P-glycoprotein and second-generation antipsychotics. *Pharmacogenomics*. 2011.;12(8):1193–211.
136. Consoli G, Lastella M, Ciapparelli A, Catena Dell’Osso M, Ciofi L, Guidotti E, i sur. ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients. *Pharmacogenomics*. 2009.;10(8):1267–76.
137. Jaquenoud Sirot E, Knezevic B, Morena GP, Harenberg S, Oneda B, Crettol S, i sur. ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms: clinical pharmacogenetics of clozapine. *J Clin Psychopharmacol*. 2009.;29(4):319–26.
138. Lee S-T, Ryu S, Kim S-R, Kim M-J, Kim S, Kim J-W, i sur. Association study of 27 annotated genes for clozapine pharmacogenetics: validation of preexisting studies and identification of a new candidate gene, ABCB1, for treatment response. *J Clin Psychopharmacol*. 2012.;32(4):441–8.
139. van der Weide K, Loovers H, Pondman K, Bogers J, van der Straaten T, Langemeijer E, i sur. Genetic risk factors for clozapine-induced neutropenia and agranulocytosis in a Dutch psychiatric population. *Pharmacogenomics J*. 2017.;17(5):471–8.
140. Markowitz JS, DeVane CL, Malcolm RJ, Gefroh HA, Wang J-S, Zhu H-J, i sur. Pharmacokinetics of olanzapine after single-dose oral administration of standard tablet versus normal and sublingual administration of an orally disintegrating tablet in normal volunteers. *J Clin Pharmacol*. 2006.;46(2):164–71.

141. Skogh E, Sjodin I, Josefsson M, Dahl M-L. High correlation between serum and cerebrospinal fluid olanzapine concentrations in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder medicating with oral olanzapine as the only antipsychotic drug. *J Clin Psychopharmacol.* 2011.;31(1):4–9.
142. Ghotbi R, Mannheimer B, Aklillu E, Suda A, Bertilsson L, Eliasson E, i sur. Carriers of the UGT1A4 142T>G gene variant are predisposed to reduced olanzapine exposure--an impact similar to male gender or smoking in schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010.;66(5):465–74.
143. Kuzman MR, Medved V, Bozina N, Hotujac L, Sain I, Bilusic H. The influence of 5-HT(2C) and MDR1 genetic polymorphisms on antipsychotic-induced weight gain in female schizophrenic patients. *Psychiatry Res.* 2008.;160(3):308–15.
144. Bozina N, Kuzman MR, Medved V, Jovanovic N, Sertic J, Hotujac L. Associations between MDR1 gene polymorphisms and schizophrenia and therapeutic response to olanzapine in female schizophrenic patients. *J Psychiatr Res.* 2008.;42(2):89–97.
145. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, i sur. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* 2001.;61(8):3458–64.
146. Fohner AE, Brackman DJ, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary : very important pharmacogene information for ABCG2. *Pharmacogenet Genomics.* 2017.;27(11):420–7.
147. Poirier A, Portmann R, Cascais A-C, Bader U, Walter I, Ullah M, i sur. The need for human breast cancer resistance protein substrate and inhibition evaluation in drug discovery and development: why, when, and how? *Drug Metab Dispos.* 2014.;42(9):1466–77.
148. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab.* 2010.;11(7):603–17.
149. Deenen MJ, Cats A, Beijnen JH, Schellens JHM. Part 2: pharmacogenetic variability in drug transport and phase I anticancer drug metabolism. *Oncologist.* 2011.;16(6):820–34.
150. Lee CA, O'Connor MA, Ritchie TK, Galetin A, Cook JA, Ragueneau-Majlessi I, i sur. Breast cancer resistance protein (ABCG2) in clinical pharmacokinetics and drug interactions: practical recommendations for clinical victim and perpetrator drug-drug interaction study design. *Drug Metab Dispos.* 2015.;43(4):490–509.

151. Sjostedt N, van den Heuvel JJMW, Koenderink JB, Kidron H. Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2. *Pharm Res.* 2017.;34(8):1626–36.
152. US Food and Drug Administration. Clinical Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, and Clinical Implications [Internet]. Guidance for Industry. 2017 [pristupljeno 30. srpnja 2019.]. Dostupno na: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-drug-interaction-studies-study-design-data-analysis-and-clinical-implications-guidance>
153. European Medicines Agency. Guideline on the investigation of drug interactions CPMP/EWP/560/95/rev. 1 Corr. 2** [Internet]. Committee for Human Medicinal Products (CHMP). 2012 [pristupljeno 30. srpnja 2019.]. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/%0AWC500129606.pdf
154. Mao Q, Unadkat JD. Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* 2015.;17(1):65–82.
155. Decleves X, Jacob A, Yousif S, Shawahna R, Potin S, Scherrmann J-M. Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. *Curr Drug Metab.* 2011.;12(8):732–41.
156. Wijaya J, Fukuda Y, Schuetz JD. Obstacles to Brain Tumor Therapy: Key ABC Transporters. *Int J Mol Sci.* 2017.;18(12): 2544.
157. Ganoci L, Božina N. Farmakogenomika u psihijatriji. U: Božina N, ur. Farmakogenomika u personaliziranoj medicini. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 85–114.
158. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee a H, Mulder H, i sur. Pharmacogenetics: from bench to byte-an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011.;89:662–73.
159. Bousman C, Maruf A Al, Muller DJ. Towards the integration of pharmacogenetics in psychiatry: a minimum, evidence-based genetic testing panel. *Curr Opin Psychiatry.* 2019.;32(1):7–15.
160. Dutch Pharmacogenetics Working Group. Pharmacogenetic Recommendations [Internet]. 2019 [pristupljeno 01. rujna 2019.]. Dostupno na: <https://www.knmp.nl/downloads/pharmacogenetic-recommendations-august-2019.pdf/view>

161. Ravyn D, Ravyn V, Lowney R, Nasrallah HA. CYP450 pharmacogenetic treatment strategies for antipsychotics: a review of the evidence. *Schizophr Res.* 2013.;149(1–3):1–14.
162. Ragia G, Dahl M-L, Manolopoulos VG. Influence of CYP3A5 polymorphism on the pharmacokinetics of psychiatric drugs. *Curr Drug Metab.* 2016.;17(3):227–36.
163. Gunes A, Dahl M-L. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. *Pharmacogenomics.* 2008.;9(5):625–37.
164. Kharasch ED, Crafford A. Common Polymorphisms of CYP2B6 Influence Stereoselective Bupropion Disposition. *Clin Pharmacol Ther.* 2019.;105(1):142–52.
165. Arranz MJ, de Leon J. Pharmacogenetics and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research. *Mol Psychiatry.* 2007.;12(8):707–47.
166. Haslemo T, Loryan I, Ueda N, Mannheimer B, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, i sur. UGT1A4*3 encodes significantly increased glucuronidation of olanzapine in patients on maintenance treatment and in recombinant systems. *Clin Pharmacol Ther.* 2012.;92(2):221–7.
167. de Leon J. Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2003.;6(1):57–72.
168. Klarica Domjanovic I, Lovric M, Trkulja V, Petelin-Gadze Z, Ganoci L, Cajic I, i sur. Interaction between ABCG2 421C>A polymorphism and valproate in their effects on steady-state disposition of lamotrigine in adults with epilepsy. *Br J Clin Pharmacol.* 2018.;84(9):2106–19.
169. Ogilvie AD, Battersby S, Bubb VJ, Fink G, Harmar AJ, Goodwim GM, i sur. Polymorphism in serotonin transporter gene associated with susceptibility to major depression. *Lancet.* 1996.;347:731–3.
170. Fanelli G, Serretti A. The influence of the serotonin transporter gene 5-HTTLPR polymorphism on suicidal behaviors: a meta-analysis. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2019.;88:375–87.
171. Murphy DL, Lerner A, Rudnick G, Lesch K-P. Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics. *Mol Interv.* 2004.;4(2):109–23.
172. Serretti A, Kato M, Ronchi D De, Kinoshita T. Meta-analysis of serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) association with selective serotonin reuptake inhibitor efficacy in depressed patients. 2007.;247–57.

173. Bozina N, Peles AM, Sagud M, Bilusic H, Jakovljevic M. Association study of paroxetine therapeutic response with SERT gene polymorphisms in patients with major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry*. 2008.;9(3):190–7.
174. PharmGKB. HTR1A gene [Internet]. 2019 [pristupljeno 07. ožujka 2019.]. Dostupno na: <https://www.pharmgkb.org/gene/PA192/guidelineAnnotation>
175. Bin Wei Y, McCarthy M, Ren H, Carrillo-Roa T, Shekhtman T, DeModena A, i sur. A functional variant in the serotonin receptor 7 gene (HTR7), rs7905446, is associated with good response to SSRIs in bipolar and unipolar depression. *Mol Psychiatry*. 2019.; On line ahead of print; doi:10.1038/s41380-019-039.
176. Zivkovic M, Mihaljevic-Peles A, Bozina N, Sagud M, Nikolac-Perkovic M, Vuksan-Cusa B, i sur. The association study of polymorphisms in DAT, DRD2, and COMT genes and acute extrapyramidal adverse effects in male schizophrenic patients treated with haloperidol. *J Clin Psychopharmacol*. 2013.;33(5):593–9.
177. Zhang J-P, Malhotra AK. Pharmacogenetics and antipsychotics: therapeutic efficacy and side effects prediction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2010.;7(1):9–37.
178. Fukui N, Suzuki Y, Sugai T, Watanabe J, Ono S, Tsuneyama N, i sur. Exploring functional polymorphisms in the dopamine receptor D2 gene using prolactin concentration in healthy subjects. *Mol Psychiatry*. 2011.;16(4):356–8.
179. Lam Y-WF, Someya T. Pharmacogenomics in Psychiatric Disorders. U: Lam Y-WF, Scott S, ur. *Pharmacogenomics - Challenges and Opportunities in Therapeutic Implementation*. 2nd ed. London: Academic Press; 2019. str. 181–225.
180. Lerer B, Segman RH, Tan E-C, Basile VS, Cavallaro R, Aschauer HN, i sur. Combined analysis of 635 patients confirms an age-related association of the serotonin 2A receptor gene with tardive dyskinesia and specificity for the non-orofacial subtype. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2005.;8(3):411–25.
181. Sagud M, Muck-Seler D, Mihaljevic-Peles A, Vuksan-Cusa B, Zivkovic M, Jakovljevic M, i sur. Catechol-O-methyl transferase and schizophrenia. *Psychiatr Danub*. 2010.;22(2):270–4.
182. Šagud M. Interakcije psihofarmaka. U: Božina N, ur. *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini*. Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 73–84.
183. de Leon J. Personalizing dosing of risperidone, paliperidone and clozapine using therapeutic drug monitoring and pharmacogenetics. *Neuropharmacology*. 2019.;10.1016/j.neuropharm.2019.05.033.

184. de Leon J, Sandson NB, Cozza KL. A preliminary attempt to personalize risperidone dosing using drug-drug interactions and genetics: part II. *Psychosomatics*. 2008.;49(4):347–61.
185. Lovric M, Bozina N, Hajsek S, Kuzman MR, Sporis D, Lalic Z, i sur. Association between lamotrigine concentrations and ABCB1 polymorphisms in patients with epilepsy. *Ther Drug Monit*. 2012.;34(5):518–25.
186. Flockhart D. Drug Interactions: Cytochrome P450 Drug Interaction Table [Internet]. Indiana University School of Medicine. 2007 [pristupljeno 01. ožujka 2019.]. Dostupno na: <https://drug-interactions.medicine.iu.edu/Main-Table.aspx>
187. Hovancakova J, Schoretsanitis G, Grozinger M, Grunder G, Paulzen M. Interaction Between Risperidone, Venlafaxine, and Metronidazole: An Unknown Thread. *J Clin Psychopharmacol*. 2016.;36(6):730–3.
188. Schoretsanitis G, Stegmann B, Hiemke C, Grunder G, Schruers KRJ, Walther S, i sur. Pharmacokinetic patterns of risperidone-associated adverse drug reactions. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016.;72(9):1091–8.
189. Paulzen M, Haen E, Hiemke C, Stegmann B, Lammertz SE, Grunder G, i sur. Cytochrome P450-mediated interaction between perazine and risperidone: implications for antipsychotic polypharmacy. *Br J Clin Pharmacol*. 2017.;83(8):1668–75.
190. Schoretsanitis G, Haen E, Grunder G, Stegmann B, Schruers KRJ, Hiemke C, i sur. Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions of Mood Stabilizers and Risperidone in Patients Under Combined Treatment. *J Clin Psychopharmacol*. 2016.;36(6):554–61.
191. Spina E, Avenoso A, Facciola G, Salemi M, Scordo MG, Giacobello T, i sur. Plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone: effect of comedication with carbamazepine or valproate. *Ther Drug Monit*. 2000.;22(4):481–5.
192. Fuchs PA, Miller L, Schiff M. The Use of Carbamazepine to Expedite Metabolism of Risperidone Long-Acting Injection Through Induction of CYP3A4 in a Patient With Extrapiramidal Symptoms. *Am J Psychiatry*. 2018.;175(6):579–80.
193. Gunes A, Spina E, Dahl M-L, Scordo MG. ABCB1 polymorphisms influence steady-state plasma levels of 9-hydroxyrisperidone and risperidone active moiety. *Ther Drug Monit*. 2008.;30(5):628–33.
194. Mihara K, Kondo T, Yasui-Furukori N, Suzuki A, Ishida M, Ono S, i sur. Effects of various CYP2D6 genotypes on the steady-state plasma concentrations of risperidone and its active metabolite, 9-hydroxyrisperidone, in Japanese patients with schizophrenia. *Ther Drug Monit*. 2003.;25(3):287–93.

195. Scordo MG, Spina E, Facciola G, Avenoso A, Johansson I, Dahl ML. Cytochrome P450 2D6 genotype and steady state plasma levels of risperidone and 9-hydroxyrisperidone. *Psychopharmacology (Berl)*. 1999.;147(3):300–5.
196. Suzuki Y, Fukui N, Tsuneyama N, Watanabe J, Ono S, Sugai T, i sur. Effect of the cytochrome P450 2D6*10 allele on risperidone metabolism in Japanese psychiatric patients. *Hum Psychopharmacol*. 2012.;27(1):43–6.
197. Jovanovic N, Bozina N, Lovric M, Medved V, Jakovljevic M, Peles AM. The role of CYP2D6 and ABCB1 pharmacogenetics in drug-naive patients with first-episode schizophrenia treated with risperidone. *Eur J Clin Pharmacol*. 2010.;66(11):1109–17.
198. Yagihashi T, Mizuno M, Chino B, Sato Y, Sakuma K, Takebayashi T, i sur. Effects of the CYP2D6*10 alleles and co-medication with CYP2D6-dependent drugs on risperidone metabolism in patients with schizophrenia. *Hum Psychopharmacol*. 2009.;24(4):301–8.
199. Yasui-Furukori N, Mihara K, Kondo T, Kubota T, Iga T, Takarada Y, i sur. Effects of CYP2D6 genotypes on plasma concentrations of risperidone and enantiomers of 9-hydroxyrisperidone in Japanese patients with schizophrenia. *J Clin Pharmacol*. 2003.;43(2):122–7.
200. Vandenberghe F, Guidi M, Choong E, von Gunten A, Conus P, Csajka C, i sur. Genetics-Based Population Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Risperidone in a Psychiatric Cohort. *Clin Pharmacokinet*. 2015.;54(12):1259–72.
201. Locatelli I, Kastelic M, Koprivsek J, Kores-Plesnicar B, Mrhar A, Dolzan V, i sur. A population pharmacokinetic evaluation of the influence of CYP2D6 genotype on risperidone metabolism in patients with acute episode of schizophrenia. *Eur J Pharm Sci*. 2010.;41(2):289–98.
202. Jukic MM, Smith RL, Haslemo T, Molden E, Ingelman-Sundberg M. Effect of CYP2D6 genotype on exposure and efficacy of risperidone and aripiprazole: a retrospective, cohort study. *The Lancet Psychiatry*. 2019.;6(5):418–26.
203. Roh H-K, Kim C-E, Chung W-G, Park C-S, Svensson J-O, Bertilsson L. Risperidone metabolism in relation to CYP2D6*10 allele in Korean schizophrenic patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2001.;57(9):671–5.
204. Kang R-H, Jung S-M, Kim K-A, Lee D-K, Cho H-K, Jung B-J, i sur. Effects of CYP2D6 and CYP3A5 genotypes on the plasma concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in Korean schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol*. 2009.;29(3):272–7.

205. Molden E, Waade RB, Hoff M, Haslemo T. Impact of Ageing on Serum Concentrations of Risperidone and Its Active Metabolite in Patients with Known CYP2D6 Genotype. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2016.;119(5):470–5.
206. Hendset M, Molden E, Refsum H, Hermann M. Impact of CYP2D6 genotype on steady-state serum concentrations of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in patients using long-acting injectable risperidone. *J Clin Psychopharmacol*. 2009.;29(6):537–41.
207. Choong E, Polari A, Kamdem RH, Gervasoni N, Spisla C, Sirot EJ, i sur. Pharmacogenetic study on risperidone long-acting injection: Influence of cytochrome P450 2D6 and pregnane X receptor on risperidone exposure and drug-induced side-effects. *J Clin Psychopharmacol*. 2013.;33(3):289–98.
208. Ganoci L, Lovric M, Zivkovic M, Sagud M, Klarica Domjanovic I, Bozina N. The role Of CYP2D6, CYP3A4/5, and ABCB1 polymorphisms in patients using long-acting injectable risperidone. *Clin Ther*. 2016.;38(10S):e10–1.
209. Mas S, Gasso P, Alvarez S, Parellada E, Bernardo M, Lafuente A. Intuitive pharmacogenetics: spontaneous risperidone dosage is related to CYP2D6, CYP3A5 and ABCB1 genotypes. *Pharmacogenomics J*. 2012.;12(3):255–9.
210. Okubo M, Morita S, Murayama N, Akimoto Y, Goto A, Yamazaki H. Individual differences in in vitro and in vivo metabolic clearances of antipsychotic risperidone from Japanese subjects genotyped for cytochrome P450 2D6 and 3A5. *Hum Psychopharmacol*. 2016.;31(2):93–102.
211. Saiz-Rodriguez M, Belmonte C, Roman M, Ochoa D, Jiang-Zheng C, Koller D, i sur. Effect of ABCB1 C3435T Polymorphism on Pharmacokinetics of Antipsychotics and Antidepressants. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2018.;123(4):474–85.
212. Xing Q, Gao R, Li H, Feng G, Xu M, Duan S, i sur. Polymorphisms of the ABCB1 gene are associated with the therapeutic response to risperidone in Chinese schizophrenia patients. *Pharmacogenomics*. 2006.;7(7):987–93.
213. Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Castroman J, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Fernandez-Piqueras J, i sur. CYP2D6 poor metabolizer status might be associated with better response to risperidone treatment. *Pharmacogenet Genomics*. 2013.;23(11):627–30.
214. Almoguera B, Riveiro-Alvarez R, Lopez-Castroman J, Dorado P, Vaquero-Lorenzo C, Fernandez-Piqueras J, i sur. Association of common genetic variants with risperidone adverse events in a Spanish schizophrenic population. *Pharmacogenomics J*. 2013.;13(2):197–204.

215. Mi W, Liu F, Liu Y, Du B, Xiao W, Li L, i sur. Association of ABCB1 Gene Polymorphisms with Efficacy and Adverse Reaction to Risperidone or Paliperidone in Han Chinese Schizophrenic Patients. *Neurosci Bull.* 2016.;32(6):547–9.
216. Suzuki Y, Tsuneyama N, Fukui N, Sugai T, Watanabe J, Ono S, i sur. Impact of the ABCB1 gene polymorphism on plasma 9-hydroxyrisperidone and active moiety levels in Japanese patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol.* 2013.;33(3):411–4.
217. Yoo H-D, Lee S-N, Kang H-A, Cho H-Y, Lee I-K, Lee Y-B. Influence of ABCB1 genetic polymorphisms on the pharmacokinetics of risperidone in healthy subjects with CYP2D6*10/*10. *Br J Pharmacol.* 2011.;164(2b):433–43.
218. Yoo H-D, Cho H-Y, Lee S-N, Yoon H, Lee Y-B. Population pharmacokinetic analysis of risperidone and 9-hydroxyrisperidone with genetic polymorphisms of CYP2D6 and ABCB1. *J Pharmacokinet Pharmacodyn.* 2012.;39(4):329–41.
219. de Leon J, Susce MT, Pan R-M, Fairchild M, Koch WH, Wedlund PJ. The CYP2D6 poor metabolizer phenotype may be associated with risperidone adverse drug reactions and discontinuation. *J Clin Psychiatry.* 2005.;66(1):15–27.
220. Kakihara S, Yoshimura R, Shinkai K, Matsumoto C, Goto M, Kaji K, i sur. Prediction of response to risperidone treatment with respect to plasma concentrations of risperidone, catecholamine metabolites, and polymorphism of cytochrome P450 2D6. *Int Clin Psychopharmacol.* 2005.;20(2):71–8.
221. Milone MC, Shaw LM. *Therapeutic Drugs and Their Management.* U: Rifai N, Horvath AR, Wittwer CT, ur. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 6. izd. St. Louis: Elsevier Inc; 2018. str. 800–31.
222. Lovrić M. Terapijsko praćenje lijeka i korelacija metaboličkog fenotipa i fenotipa. U: Božina N, ur. *Farmakogenomika u personaliziranoj medicini.* Zagreb: Medicinska naklada; 2019. str. 35–48.
223. Snozek CL, McMillin GA, Moyer TP. *Therapeutic Drugs and Their Management.* U: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, ur. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics.* 5. izd. St. Louis: Saunders Elsevier; 2013. str. 1057–108.
224. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 12. izd. Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC, ur. New York: McGraw-Hil Companies; 2011.
225. Schoretsanitis G, Paulzen M, Unterecker S, Schwarz M, Conca A, Zernig G, i sur. TDM in psychiatry and neurology: A comprehensive summary of the consensus guidelines for

- therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology, update 2017; a tool for clinicians. *World J Biol Psychiatry*. 2018.;19(3):162–74.
226. Mannheimer B, Haslemo T, Lindh JD. Risperidone and Venlafaxine Metabolic Ratios Strongly Predict a CYP2D6 Poor Metabolizing Genotype. 2016.;38(1):127–34.
227. Ereshefsky L. Pharmacokinetics and drug interactions: update for new antipsychotics. *J Clin Psychiatry*. 1996.;57 Suppl 1:12–25.
228. 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(3):223–7.
229. Schoretsanitis G, Spina E, Hiemke C, Leon J De, Schoretsanitis G, Spina E, i sur. A systematic review and combined analysis of therapeutic drug monitoring studies for long- acting risperidone. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2017.;10(9):965–81.
230. Taylor D. Psychopharmacology and adverse effects of antipsychotic long-acting injections: a review. *Br J Psychiatry Suppl*. 2009.;52:S13-9.
231. Organization WH. The ICD-10 Classification of Mental and Behavioural Disorders : Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. Geneva: World Health Organization; 1992.
232. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-IV. 4. izd. Association. AP, ur. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
233. Kay SR. Positive and negative syndrome scale (PANSS) : technical manual. North Tonawanda, N.Y.: Multi-Health systems; 2006.
234. Simpson GM, Angus JW. A rating scale for extrapyramidal side effects. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1970.;212:11–9.
235. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988.;16(3):1215.
236. Arjomand-Nahad F, Diefenbach K, Landt O, Gaikovitch E, Roots I. Genotyping of the triallelic variant G2677T/A in MDR1 using LightCycler with locked-nucleic-acid-modified hybridization probes. *Anal Biochem*. 2004.;334(1):201–3.
237. Dorado P, Cáceres M, Pozo-Guisado E, Wong M-L, Licinio J, Llerena A. Development of a PCR-based strategy for CYP2D6 genotyping including gene multiplication of worldwide potential use. *Biotechniques*. 2005.;39(10 Suppl):S571-4.
238. Steijns LSW, Van Der Weide J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem*. 1998.;44(5):914–7.

239. Zhou JJ, Lange K, Papp JC, Sinsheimer JS. A heterozygote–homozygote test of Hardy–Weinberg equilibrium. *Eur J Hum Genet.* 2009.;17(11):1495–500.
240. Slatkin M, Excoffier L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity (Edinb).* 1996.;76:377–83.
241. Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010.;10(3):564–7.
242. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther.* 2017.;32(1):11–21.
243. Hira D, Terada T. BCRP/ABCG2 and high-alert medications: Biochemical, pharmacokinetic, pharmacogenetic, and clinical implications. *Biochem Pharmacol.* 2018.;147:201–10.
244. Endres CJ, Hsiao P, Chung FS, Unadkat JD. The role of transporters in drug interactions. *Eur J Pharm Sci.* 2006.;27(5):501–17.
245. Dutheil F, Dauchy S, Diry M, Cloarec O, Bie I, Ingelman-sundberg M, i sur. Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Transporters in the Normal Human Brain : Regional and Cellular Mapping as a Basis for Putative Roles in Cerebral Function. 2009.;1528–38.
246. Goncalves J, Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A. Relevance of Breast Cancer Resistance Protein to Brain Distribution and Central Acting Drugs: A Pharmacokinetic Perspective. *Curr Drug Metab.* 2018.;19(12):1021–41.
247. Kondo C, Suzuki H, Itoda M, Ozawa S, Sawada J, Kobayashi D, i sur. Functional analysis of SNPs variants of BCRP/ABCG2. *Pharm Res.* 2004.;21(10):1895–903.
248. Furukawa T, Wakabayashi K, Tamura A, Nakagawa H, Morishima Y, Osawa Y, i sur. Major SNP (Q141K) variant of human ABC transporter ABCG2 undergoes lysosomal and proteasomal degradations. *Pharm Res.* 2009.;26(2):469–79.
249. Skvrce NM, Božina N, Zibar L, Barisic I, Pejnovic L, Sarinic VM. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics.* 2013.;14(12):1419–31.
250. Mirošević Skvrce N, Macolic Sarinic V, Simic I, Ganoci L, Muacevic Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics.* 2015.;16(8):803–15.

251. Cusatis G, Gregorc V, Li J, Spreafico A, Ingersoll RG, Verweij J, i sur. Pharmacogenetics of ABCG2 and adverse reactions to gefitinib. *J Natl Cancer Inst.* 2006.;98(23):1739–42.
252. Hayashi H, Iihara H, Hirose C, Fukuda Y, Kitahora M, Kaito D, i sur. Effects of pharmacokinetics-related genetic polymorphisms on the side effect profile of afatinib in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2019.;134:1–6.
253. Kirschbaum KM, Henken S, Hiemke C, Schmitt U. Pharmacodynamic consequences of P-glycoprotein-dependent pharmacokinetics of risperidone and haloperidol in mice. *Behav Brain Res.* 2008.;188(2):298–303.
254. Uhr M, Tontsch A, Namendorf C, Ripke S, Lucae S, Ising M, i sur. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron.* 2008.;57(2):203–9.
255. de Leon J, Armstrong SC, Cozza KL. The dosing of atypical antipsychotics. *Psychosomatics.* 2005.;46(3):262–73.
256. Ono S, Mihara K, Suzuki A, Kondo T, Yasui-Furukori N, Furukori H, i sur. Significant pharmacokinetic interaction between risperidone and carbamazepine: its relationship with CYP2D6 genotypes. *Psychopharmacology (Berl).* 2002.;162(1):50–4.
257. Janssen Pharmaceutical. Risperdal Consta [Internet]. US Food and Drug Administration. 2010 [pristupljeno 23. srpnja 2019.]. Dostupno na: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/021346_s31_s35_s38_s39b1.pdf
258. Papeschi G, Agenet C, Levron JC, Barges-Bertocchio MH. Do enzyme inducers modify haloperidol decanoate rate of release? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1994.;18(8):1323–32.

11. ŽIVOTOPIS

Lana Ganoci (r. Pejnović) rođena je 7. listopada 1980. godine u Zagrebu gdje je završila osnovnu školu. Gimnaziju i Farmaceutski fakultet pri I. Moskovskoj Medicinskoj akademiji „I.M. Sečenov“ pohađa u Moskvi. Školovanje nastavlja na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta Zagrebu gdje je 2004. diplomirala na smjeru Medicinska biokemija, i dobila Rektorovu nagradu. 2005. godine upisuje poslijediplomski znanstveni studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Molekularna i stanična biologija. 2011. godine upisuje poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom doktorskog studija pohađala je dvije ljetne škole farmakogenomike i precizne medicine u organizaciji *European Society of Pharmacogenomics and Personalised Therapy (ESPT)* te je boravila na *Karolinska Institutet*. Od 2005. godine aktivno radi u struci kao medicinski biokemičar te je bila zaposlenik Klinike za infektivne bolesti „dr. Fran Mihaljević“ i Klinike za dječje bolesti Zagreb. 2011. godine zapošljava se na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i 2015. godine završava specijalizaciju iz Analitičke toksikologije te je do danas zaposlenik Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije.

Objavila je više znanstvenih radova citiranih u bazama Current Contents, SCI Expanded i Scopus. Koautor je poglavlja u priručnicima za trajno usavršavanje Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je na međunarodnim i domaćim znanstvenim skupovima s posterskim i usmenim izlaganjima. Sudjelovala je u znanstvenim projektima „Biomarkeri u shizofreniji – integracija komplementarnih pristupa u praćenju osoba s prvom psihotičnom epizodom“ (HRZZ), i „Farmakogenomika i farmakovigilancija - sprječavanje nuspojava u individualizaciji terapije“ (projekt Kliničkog bolničkog centra Zagreb, Medicinskog fakultet Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatske agencija za lijekove i medicinske proizvode HALMED).

Objavljeni znanstveni radovi:

1. Zivkovic M, Mihaljevic-Peles A, Muck-Seler D, Sagud M, Ganoci L, Vlatkovic S, Nikolac Perkovic M, Tudor L, Bozina N, Pivac N. The lack of association between COMT rs4680 polymorphism and symptomatic remission to olanzapine monotherapy in male schizophrenic patients: A longitudinal study. *Psychiatry Res.* 2019;279:389-390.
2. Rojnic Kuzman M, Bosnjak Kuharic D, Ganoci L, Makaric P, Kekin I, Rossini Gajsak L, Prpic N, Bozina T, Bajic Z, Bozina N. Association of CNR1 genotypes with changes in

- neurocognitive performance after eighteen-month treatment in patients with first-episode psychosis. *Eur Psychiatry*. 2019;61:88-96.
3. Rojnic Kuzman M, Makaric P, Bosnjak Kuharic D, Kekin I, Rossini Gajsak L, Boban M, Bozina N, Bozina T, Celic Ruzic M, Darmopil S, Filipcic I, Ganoci L, Hladnik A, Madzarac Z, Malojcic B, Mihaljevic Peles A, Mueller DJ, Ostojic D, Petanjek Z, Petrovic R, Vogrinc Z, Savic A, Silic A, Sagud M, Zivkovic M, Bajic Z. Integration of complementary biomarkers in patients with first episode psychosis: research protocol of a prospective follow up study. *Psychiatr Danub*. 2019;31(2):162-171.
 4. Klarica Domjanović I, Lovrić M, Trkulja V, Petelin-Gadže Ž, Ganoci L, Čajić I, Božina N. Interaction between ABCG2 421C>A polymorphism and valproate in their effects on steady-state disposition of lamotrigine in adults with epilepsy. *Br J Clin Pharmacol*. 2018;84(9):2106-2119.
 5. Potočnjak I, Likić R, Šimić I, Juričić Nahal D, Čegec I, Ganoci L, Božina N. Dapsone-induced agranulocytosis-possible involvement of low-activity N-acetyltransferase 2. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017;31(5):580-586.
 6. Kudlek Mikulic S, Mihaljevic-Peles A, Sagud M, Bajc Janovic M, Ganoci L, Grubisin J, Kuzman Rojnic M, Vuksan Cusa B, Bradaš Z, Božina N. Brain-derived neurotrophic factor serum and plasma levels in the treatment of acute schizophrenia with olanzapine or risperidone: 6-week prospective study. *Nord J Psychiatry*. 2017;71(7):513-520.
 7. Knezovic A, Loncar A, Homolak J, Smailovic U, Osmanovic Barilar J, Ganoci L, Bozina N, Riederer P, Salkovic-Petrisic M. Rat brain glucose transporter-2, insulin receptor and glial expression are acute targets of intracerebroventricular streptozotocin: risk factors for sporadic Alzheimer's disease? *J Neural Transm (Vienna)*. 2017;124(6):695-708.
 8. Ganoci L, Božina T, Mirošević Skvrce N, Lovrić M, Mas P, Božina N. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 enzymes: CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4, and CYP3A5 in the Croatian population. *Drug Metab Pers Ther*. 2017;32(1):11-21.
 9. Šimić I, Potočnjak I, Kraljičković I, Stanić Benić M, Čegec I, Juričić Nahal D, Ganoci L, Božina N. CYP2D6 *6/*6 genotype and drug interactions as cause of haloperidol-induced extrapyramidal symptoms. *Pharmacogenomics*. 2016;17(13):1385-9.
 10. Mirošević Skvrce N, Macolić Šarinić V, Šimić I, Ganoci L, Muačević Katanec D, Božina N. ABCG2 gene polymorphisms as risk factors for atorvastatin adverse reactions: a case-control study. *Pharmacogenomics*. 2015;16(8):803-15.
 11. Samardzic J, Bozina N, Skoric B, Ganoci L, Petricevic M, Krpan M, Pasalic M, Milicic D. CYP2C19*2 genotype influence in acute coronary syndrome patients undergoing serial

- clopidogrel dose tailoring based on platelet function testing: Analysis from randomized controlled trial NCT02096419. *Int J Cardiol.* 2015;186:282-5.
12. Božina N, Pejnović L. Pharmacogenetics in clinical practice - recommendations and guidelines. *Paediatr Croat.* 2013;57(4):318-30.
 13. Mirošević Skvrce N, Božina N, Zibar L, Barišić I, Pejnović L, Macolic Šarinic V. CYP2C9 and ABCG2 polymorphisms as risk factors for developing adverse drug reactions in renal transplant patients taking fluvastatin: a case-control study. *Pharmacogenomics.* 2013;14(12):1419-31.
 14. Linarić I, Obuljen J, Žižić V, Nakić M, Leniček-Krleža J, Pejnović L, Grzunov A. The importance of biochemistry analyses in supportive care. *Paediatr Croat.* 2009; 53 (4):215-218.
 15. Žižić V, Linarić I, Obuljen J, Brumen V, Pejnović L, Grzunov A. Laboratory diagnostics of malignant tumors. *Paediatr Croat.* 2007; 51 (suppl2):49-54.
 16. Marjanović M, Zorc B, Pejnović L, Zovko M, Kralj M. Fenoprofen and ketoprofen amides as potential antitumor agents. *Chem Biol Drug Des.* 2007;69(3):222-6.