

Provođenje mjera minimizacije rizika primjene fluoropirimidina u Republici Hrvatskoj

Koren, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:385346>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Sara Koren

**Provođenje mjera minimizacije rizika primjene
fluoropirimidina u Republici Hrvatskoj**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Centru za primijenjenu farmaciju i Odjelu za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Nikice Mirošević Skvrce i suvoditeljstvom doc. dr. sc. Lane Ganoci.

Zahvaljujem mentoricama doc. dr. sc. Nikici Mirošević Skvrce i doc. dr. sc. Lani Ganoci na pomoći i usmjeravanju u pisanju ovog rada.

Hvala obitelji i prijateljima koji čine ovaj život podnošljivim, a ponekad čak i ugodnim.

Najveće hvala Shu, najboljoj sestri koja je ikad bila i random grupi, najdražim bićima bez kojih mi ne bi bilo ni približno ovako lijepo.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. FLUOROPIRIMIDINI.....	1
1.1.1. 5-FLUOROURACIL.....	1
1.1.2. KAPECITABIN	2
1.1.3. TEGAFUR	3
1.1.4. NUSPOJAVE.....	3
1.2. DPD I <i>DPYD</i>	3
1.2.1. GENOTIPIZACIJA.....	4
1.2.2. FENOTIPIZACIJA	5
1.3. IRINOTEKAN I <i>UGT1A1</i>	6
1.4. SMJERNICE ZA GENOTIPIZACIJU I FENOTIPIZACIJU	6
1.4.1. CPIC SMJERNICE	6
1.4.2. DPWG SMJERNICE	7
1.4.3. HAS/INCa SMJERNICE	9
1.4.4. SPT SMJERNICE	9
1.5. EMA - OCJENA OMJERA KORISTI I RIZIKA PRIMJENE FLUOROPIRIMIDINA I PREPORUČENE MJERE MINIMIZACIJE RIZIKA.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. METODE I MATERIJALI	13
4. REZULTATI I RASPRAVA	14
5. ZAKLJUČCI.....	22
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA	24
7. LITERATURA.....	26
8. SAŽETAK/SUMMARY	30

1. UVOD

1.1. FLUOROPIRIMIDINI

Fluoropirimidini su citotoksični lijekovi iz skupine antimetabolita koji se koriste u terapiji više vrsta solidnih tumora, primjerice kolorektalnog karcinoma, karcinoma gušterače, želuca i dojke te karcinoma glave i vrata.

U ovu skupinu lijekova spadaju 5-fluorouracil (5-FU) i njegovi prolijekovi kapecitabin i tegafur.

1.1.1. 5-FLUOROURACIL

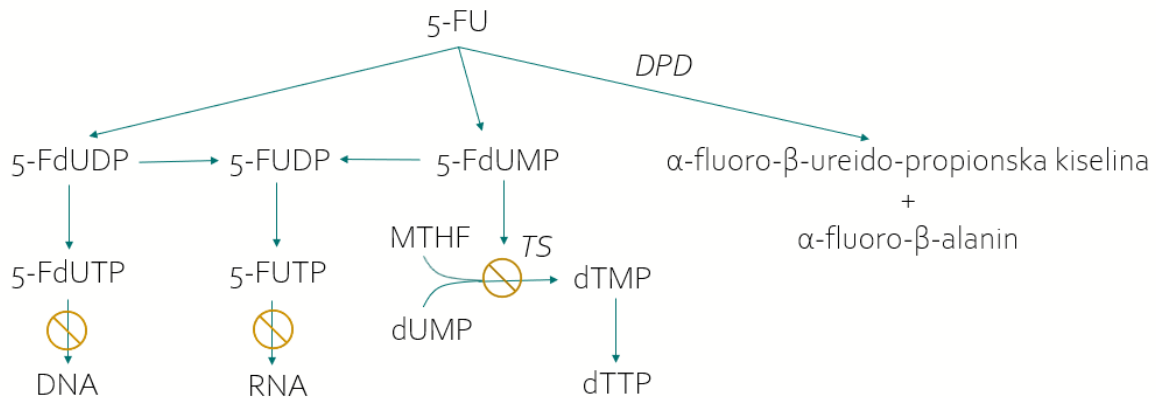
5-fluorouracil je analog uracila s molekulom fluora na C-5 poziciji. Nakon primjene 80-85% lijeka metabolizira se u inaktivne metabolite, dok se samo 1-3% metabolizira u oblike koji uzrokuju citotoksičnost. Ostatak se izlučuje nepromijenjen urinom. Lijek djeluje fazno specifično - na S fazu staničnog ciklusa, tj. na sintezu kopije DNA u jezgri, a njegov učinak posebno je izražen u tkivima koja se brzo dijele, poput koštane srži, kože i sluznica.

Postoji nekoliko puteva anabolizma 5-FU-a:

- 1) nastajanje 5-fluorouridin trifosfata (5-FUTP) koji se integrira u RNA umjesto uridin trifosfata (UTP),
- 2) nastajanje 5-fluorodeoksiuridin trifosfata (5-FdUTP) koji se integrira u DNA umjesto deoksitimidin trifosfata (dTTP) i
- 3) nastajanje 5-fluorodeoksiuridin monofosfata (5-FdUMP) koji stvara stabilni tercijarni kompleks s 5,10-metilen tetrahidrofolatom (MTHF) i timidilat-sintazom (TS). TS uz pomoć koenzima MTHF katalizira reduktivnu metilaciju deoksiuridin monofosfata (dUMP) u deoksitimidin monofosfat (dTMP) potreban za sintezu DNA. Vežanjem 5-FdUMP-a nastalog iz 5-FU-a u tercijarni kompleks, onemogućen je prilazak dUMP-a i nastaje disbalans deoksinukleotida - povišena je koncentracija deoksiuridin trifosfata (dUTP) i snižena koncentracija dTMP-a (koja vodi do snižene koncentracije dTTP-a) što rezultira nemogućnošću sinteze i popravka DNA i oštećenja stanice (Carin i sur., 2019).

Katabolizam 5-FU-a posredovan je dihidropirimidin-dehidrogenazom (DPD), izrazito polimorfnim enzimom koji prevodi lijek u 5,6-dihidro-5-fluorouracil (DHFU), a DHFU se

nadalje razgrađuje u neaktivne metabolite α -fluoro- β -ureido-propionsku kiselinu i α -fluoro- β -alanin (Koh i sur., 2010)



Slika 1. Metabolizam 5-fluorouracila

5-FU primjenjuje se parenteralno u obliku bolusa i kratkotrajne ili kontinuirane infuzije. Najčešće se primjenjuje u kombinaciji s drugim lijekovima, primarno s leukovorinom. Leukovorin je sol folne kiseline i izvor reduciranih folata koji stabiliziraju kompleks TS-e i FdUMP-a i time potpomaže citostatsko djelovanje (Thorn i sur., 2011).

Osim oblika za parenteralnu primjenu, 5-FU na hrvatskom tržištu možemo pronaći u obliku otopine za kožu u kombinaciji sa salicilnom kiselinom (Verrucutan 5mg/g 5-FU i 100 mg/mL salicilne kiseline) indiciran za liječenje običnih i plosnatih juvenilnih bradavica na udovima. Oblik je za kutanu primjenu i sistemska apsorpcija je zanemariva.

1.1.2. KAPECITABIN

Kapecitabin je oralni prolijek 5-FU-a u obliku karbamata.

Aktivira se u 3 koraka potpomognuta enzimima:

- 1) karboksilesteraza pretvara kapecitabin u 5'-deoksi-5-fluorocitidin (5'-DFCR),
- 2) citidin-deaminaza pretvara 5'-DFCR u 5'-deoksi-5-fluorouridin (5'-DFUR) i
- 3) timidin-fosforilaza pretvara 5'-DFUR u 5-FU.

Lokalizacija ovih enzima je značajna jer se kapecitabin prvo metabolizira karboksilesterazom koja je smještena gotovo isključivo u jetri i hepatocitima, dalje djeluje citidin-deaminaza u jetri i solidnim tumorima, a zadnji korak posredovan je timidin-fosforilazom koja je koncentriranija u tumorskim tkivima. Ovaj enzimski put osigurava više koncentracije citostatika u tumorskom tkivu nego u zdravom (Koh i sur., 2010).

1.1.3. TEGAFUR

Tegafur je oralni prolijek 5-FU-a.

Konvertira se u 5-FU i manje toksične metabolite 3-hidroksitegafur, 4-hidroksitegafur i dihidrotegafur najvećim dijelom putem enzima CYP2A6.

Tegafur je odobren u Europskoj uniji u kombinaciji s gimeracilom i oteracilom. Gimeracil je reverzibilni inhibitor DPD-a koji inhibira razgradnju 5-FU-a, dok je oteracil inhibitor orotat-fosforiboziltransferaze (OPRT) koja smanjuje aktivnost 5-FU-a u gastrointestinalnoj sluznici i time smanjuje gastrointestinalnu toksičnost (Koh i sur., 2010)

1.1.4. NUSPOJAVE

Incidencija toksičnosti razlikuje se od studije do studije, no smatra se da 10-30% pacijenata (Laures i sur., 2022.) na terapiji fluoropirimidinima doživi tešku toksičnost klasificiranu kao stadij 3-4 po *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE), a kod 0.1-1% pacijenata (Knikman i sur., 2021) toksičnost vodi do smrti.

Nuspojave ovih lijekova povezane su s jačim citostatskim učinkom u tkivima koja se brzo dijele (koštana srž, sluznice, koža). Tako su najčešće nuspojave hematološke (češće infekcije, mijelosupresija), gastrointestinalne (abdominalna bol, mučnina, proljev, stomatitis) i kožne (sindrom šaka-stopalo) (Del Re i sur., 2010).

Velik broj nuspojava zajednički je svim fluoropirimidinima, no za 5-FU karakteristične su neutropenija i stomatitis, dok je sindrom šaka-stopalo tri puta češći kod kapecitabina. Tegafur u kombinaciji s gimeracilom i oteracilom ispoljava značajno manje gastrointestinalnih nuspojava.

1.2. DPD I *DPYD*

Dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) je enzim koji sudjeluje u metabolizmu dva endogena pirimidina (timina i uracila) te ograničava brzinu katabolizma 5-FU-a i njegovih prolijekova. Zasluzna je za metabolizam 80-85% 5-FU u inaktivne metabolite te promjene u njenoj aktivnosti mogu imati pogubne učinke za pacijenta.

Enzim DPD je kodiran genom *DPYD* koji je vrlo polimorfan te u neke od njegovih varijanti mogu dovesti do smanjene aktivnosti ili potpunog gubitka djelovanja enzima DPD. Zbog njene značajne uloge u metabolizmu fluoropirimidina, deficijencija DPD-a ima velik

utjecaj na ishod liječenja jer može dovesti do teške, pa i letalne, toksičnosti. Smanjena aktivnost DPD-a vodi do povećane intracelularne koncentracije toksičnih metabolita što rezultira jačim citostatskim učinkom i razvojem nuspojava.

Gen *DPYD* sastoji se od 23 eksona različitih duljina na 22. kromosomu (Wei i sur., 1998). Smatra se visoko polimorfnim genom s više od 1200 mutacija krivog smisla i 102 predviđenih varijanti gubitka funkcije (pLoF, engl. *predicted loss-of-function variants*). Najčešći su polimorfizmi jednog nukleotida koji vode do smanjene aktivnosti DPD-a (gnomAD, 2023.).

Što se tiče genotipa i njegove translacije u fenotip, nositelji dva alela divljeg tipa (odnosno oni koji nemaju dokazane varijante koje smanjuju ili dokidaju aktivnost enzima) imaju fenotip normalne funkcije enzima. Heterozigotni nositelji mogu imati jedan alel normalne funkcije i jedan alel smanjene funkcije ili jedan nefunkcionalni alel, dok kod dvostrukih heterozigota nalazimo dva ili više varijantnih alela, ali na različitim lokusima. Homozigoti su rijetki i nose dva ista varijantna alela. Translacija genotipa u fenotip je opisana detaljnije dalje u tekstu, jer postoje razlike ovisno o preporukama stručnih društava.

Kako bi se predvidjela potencijalna toksičnost terapije fluoropirimidinima, razvijeno je nekoliko metoda koje pokušavaju predvidjeti ili mjeriti aktivnost enzima DPD.

1.2.1. GENOTIPIZACIJA

Cilj genotipizacije *DPYD* je otkriti moguće varijante u genomu pacijenta te prema rezultatu genotipa *DPYD* predvidjeti DPD fenotip i odgovor na terapiju. Većina poznatih varijanti *DPYD* nema utjecaj na fenotip pacijenta, dok ostale varijante vode do djelomičnog ili potpunog gubitka aktivnosti DPD-a. Dokazano je da varijante *2A i *13 dovode do potpunog gubitka aktivnosti, a c.2468A>T i c.1236G>A dovode do smanjene aktivnosti DPD-a. Proučavaju se i drugi polimorfizmi, primjerice c.494A>G i c.2194G>A, za koje se pretpostavlja dovode da smanjene aktivnosti DPD enzima (Ganoci i sur., 2023.).

Međunarodni Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (engl. *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, CPIC) osmislio je sustav bodovanja varijanti kako bi se olakšala interpretacija rezultata genotipizacije i njihovo povezivanje s fenotipom. Varijantama *DPYD*-a pridružuje se indeks aktivnosti (engl. *variant activity score*) prema utjecaju na aktivnost DPD-a: 1 za normalnu aktivnost, 0.5 za smanjenu aktivnost i 0 za potpuni prestanak rada enzima. Prema ovim vrijednostima računa se indeks aktivnosti gena (engl. *gene activity score*) u rasponu od 0 (nema aktivnosti DPD-a) do 2 (očuvana aktivnost

DPD-a) koji nam govori da je osoba spori metabolizator fluoropirimidina (za indeks aktivnosti 0), tj. normalan metabolizator (za indeks aktivnosti 2).

Genotipizacija je pouzdana metoda koja daje dosljedne odgovore na pitanje postoji li ispitana varijanta, no njen nedostatak je potencijalno previđanje bitnih varijanti, pogotovo kod različitih etničkih grupa. Prednost je mogućnost automatizacije procesa i široka dostupnost, no problem je niska osjetljivost ovakve vrste testiranja.

Tablica 1. Povezanost indeksa aktivnosti gena i fenotipa

INDEKS AKTIVNOSTI GENA	GENOTIP	FENOTIP
2	2 alela normalne funkcije	normalan metabolizator
1.5	1 alel normalne funkcije i 1 alel smanjene funkcije	intermedijarni metabolizator
1	1 alel normalne funkcije i 1 nefunkcionalni alel ili 2 alela smanjene funkcije	
0.5	1 alel smanjene funkcije i 1 nefunkcionalni alel	spori metabolizator
0	2 nefunkcionalna alela	

1.2.2. FENOTIPIZACIJA

Dok genotipizacija cilja na predviđanje aktivnosti DPD-a, fenotipizacije mjeri stvarnu enzimsku aktivnost DPD-a.

Jedna od metoda fenotipizacije je mjerenje omjera dihidrouracila (DHU) i uracila (U) u plazmi prije terapije fluoropirimidinima budući da se uracil djelovanjem DPD-a pretvara u dihidrouracil. Niske vrijednosti DHU/U omjera ukazuju na smanjenu aktivnost enzima. Problemi ove metode su robusnost i interferencije DHU-a s metodom te nedefinirane vrijednosti DHU/U koje definiraju djelomični, tj. potpuni nedostatak DPD-a.

Druga metoda je mjerenje plazmatskog uracila prije terapije fluoropirimidinima prema kojoj visoke koncentracije uracila ukazuju na smanjenu aktivnost DPD-a. Iako je izbjegnuto

problem robusnosti zbog odsutnost mjerenja DHU-a, i dalje postoji nedostatak smjernica i definiranih vrijednosti koji ukazuju na razinu nedostatka DPD-a. Trenutno postoje jedino smjernice Francuske agencije za zdravstvo i Nacionalnog instituta za rak (za ovu metodu prema kojima razina plazmatskog uracila između 16-150 ng/ml ukazuje na djelomičnu deficijenciju DPD-a, a razina iznad 150ng/ml ukazuje na potpunu deficijenciju. Smatra se da je preterapijska razina plazmatskog uracila bolji pokazatelj toksičnosti fluoropirimidina nego omjer DHU/U (Deac i sur., 2020).

Iako nam ove metode prikazuju pravu aktivnost DPD-a, neovisno o ispitanim varijantama gena *DPYD*, nedostatak fenotipskih testova su strogi predanalitički uvjeti za uzorkovanje (pohrana uzorka i stabilnost analita) i zahtjevna standardizacija i automatizacija testova.

1.3. IRINOTEKAN I *UGT1A1*

Irinotekan je prolijek koji se često koristi u kombinaciji s kontinuiranom infuzijom 5-FU u terapiji kolorektalnog karcinoma. On je inhibitor topoizomerase I, enzima koji sudjeluje u odvijanju zavojnice DNA te rezultira lomljenjem molekule DNA što vodi do stanične smrti. Ovaj lijek se metabolizira uglavnom preko enzima UDP-glukuronoziltransferaze (*UGT1A1*) koji glukuronidira irinotekan u aktivni metabolit SN-38.

UGT1A1 je polimorfni enzim koji metabolizira veliki broj lijekova, a najznačajniji polimorfizam je *UGT1A1**28 koji rezultira smanjenom aktivnosti enzima. S obzirom na ovu varijantu, pacijent može biti divlji tip, heterozigot i homozigot te je kod homozigota primijećen povećan rizik od teške toksičnosti kao posljedice terapije irinotekanom. Neke od nuspojava ovog lijeka uključuju neutropeniju, proljev i mukozitis (Bilić, 2016).

1.4. SMJERNICE ZA GENOTIPIZACIJU I FENOTIPIZACIJU

1.4.1. CPIC SMJERNICE

Konzorcij za implementaciju kliničke farmakogenetike (CPIC) je u prosincu 2013. godine objavio smjernice za interpretaciju rezultata genotipizacije. Prema ovim smjernicama, pacijente je prije terapije 5-fluorouracilom, kapecitabinom i tegafurom potrebno testirati na postojanje 3

varijante: *DYPD*2A*, *DPYD*13* i *DPYD c.2846A>T*. Divlji tip ima normalnu funkciju DPD-a i pacijenti primaju normalnu dozu lijeka; heterozigoti imaju djelomičnu deficijenciju i preporuča se redukcija početne doze za 50%, a nadalje titracije doze prema odgovoru; homozigoti su potpuno deficijentni i preporuča se alternativna terapija (Caudle i sur., 2013).

U listopadu 2017. godine CPIC je objavio revidirane smjernice. Zbog nedostatka podataka, CPIC ne daje nikakve smjernice za terapiju tegafurom, već samo za terapiju 5-FU-om i kapecitabinom. Uz 3 već postojeće varijante za testiranje (**2A*, **13*, *c.2846A>T*), predložena je i varijanta *c.1236G>A*. Otkriveno je da varijante **2A* i **13* rezultiraju potpunim gubitkom aktivnosti DPD-a te im se pridodaje indeks aktivnosti 0, dok varijante *c.2846A>T* i *c.1236G>A* rezultiraju djelomičnom deficijencijom enzima i pridodaje im se indeks aktivnost 0.5. Aleli divljeg tipa (kad nisu nađene ispitivane varijante) dobivaju indeks aktivnosti 1. Prema ovim podacima, možemo izračunati indeks aktivnosti gena kao sumu dva najniža indeksa aktivnosti varijanti. Pacijenti s indeksom aktivnosti gena 2 smiju primiti punu dozu lijeka, za one s indeksom 1.5 preporučuje se redukcija doze za 25%, za indeks 1 preporučuje se redukcija doze za 50%, a za pacijente s indeksom 0 i 0.5 fluoropirimidini su kontraindicirani (Amstutz i sur., 2018).

U ažuriranoj verziji iz 2018. CPIC preporučuje da pacijenti s indeksom aktivnosti gena 1.5 zaprime lijek u dozi smanjenoj za 50%, isto kao i oni s indeksom 1.

Tablica 2. Preporučeno doziranje fluoropirimidina po DPD fenotipu po najnovijim CPIC smjernicama

FENOTIP	PREPORUKA ZA DOZIRANJE
normalni metabolizator	indeks aktivnosti 2: puna doza
intermedijarni metabolizator	indeks aktivnosti 1-1.5: smanjenje doze za 50%
spori metabolizator	indek aktivnosti 0-0.5: izbjegavati fluoropirimidine

1.4.2. DPWG SMJERNICE

Smjernice Nizozemske radne grupe za farmakogenetiku (engl. *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*, DPWG), objavljene prvi put 2011., s nadopunama 2018. i 2019. godine, se velikim dijelom poklapaju s CPIC smjernicama, uz nekoliko bitnih razlika (Bank i sur., 2018).

DPWG koristi isti sistem bodovanja, tj. indeks aktivnosti varijanti i gena i preporučuje testiranje na iste 4 varijante kao i CPIC, no za razliku od njih, daje preporuke i za terapiju tegafurom. Također prepoznaje varijante *2A i *13 kao varijante potpunog gubitka aktivnosti DPD-a, a varijante c.2468A>T i c.1236G>A kao varijante koje rezultiraju djelomičnim gubitkom aktivnosti enzima.

Za 5-FU i kapecitabin, puna doza preporučena je za pacijente s indeksom aktivnosti 2, dok je redukcija doze za 50% preporučena za sve heterozigote s daljnjom titracijom doze prema toksičnosti. Indeks aktivnosti 0.5 zamijenjen je rezultatom PHENO - enzimska aktivnost DPD-a ne može se predvidjeti točno te je potrebna dodatna fenotipizacija. Za homozigote s 2 varijante koje rezultiraju smanjenom aktivnosti enzima predlaže se dodatna fenotipizacija, dok se za homozigote s 2 varijante koje rezultiraju potpunim gubitkom aktivnosti DPD-a predlaže izbjegavanje sistemske i kutane primjene ovih lijekova.

Što se tiče smjernice za tegafur, DPWG predlaže izbjegavanje terapije za pacijente s indeksom aktivnosti 0, 1 i 1.5, a terapiju standardnom dozom predlaže samo za pacijente koji su nositelji alela divljeg tipa, odnosno dva alela normalne funkcije (Lunenburg i sur., 2020).

Tablica 3. Doziranje fluoropirimidina prema najnovijim CPIC smjernicama i DPWG smjernicama

DPYD GENOTIP	PREPORUČENA POČETNA DOZA (% PUNE DOZE)	
	CPIC	DPWG
dva alela normalne funkcije	100	100
jedan alel normalne funkcije i jedan nefunkcionalni alel ili jedan alel normalne funkcije i jedan alel smanjene funkcije	50	50
dva alela smanjene funkcije	50	PHENO
jedan alel smanjene funkcije i jedan nefunkcionalni alel	0	PHENO
dva nefunkcionalna alela	0	0

CPIC - *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, DPWG - *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*, PHENO - nema dovoljno podataka o enzimskoj aktivnosti na temelju genotipizacije pa se preporuča dodatna fenotipizacija

1.4.3. HAS/INCa SMJERNICE

Početkom 2018. godine, Francuska nacionalna agencija za sigurnost lijekova i zdravstvenih proizvoda (*L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé*, ANSM) glasala je za uvođenje rutinskog testiranja DPD deficijencije prije terapije fluoropirimidinima. Zbog nedostatka službene metode testiranja Francuska agencija za zdravstvo (*Haute Autorité de Santé*, HAS) i Nacionalni institut za rak (*Institut National du Cancer*, INCa) udružili su snage i objavili nacionalne smjernice za DPD testiranje.

Njihov odabir bio je fenotipizacija, tj. mjerenje plazmatske koncentracije uracila (uracilemije), a interpretacija rezultata kaže da vrijednosti uracilemije ≥ 150 ng/ml ukazuju na potpuni gubitak aktivnosti DPD-a, a vrijednosti ≥ 16 ng/ml i < 150 ng/ml ukazuju na djelomičnu deficijenciju (<https://www.has-sante.fr>).

1.4.4. SPT SMJERNICE

Švicarska grupa za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju (engl. *The Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy*, SPT) u studenom 2020. godine objavila je smjernice za DPYD genotipizaciju i terapijsko praćenje lijekova (engl. *therapeutic drug monitoring*, TDM) bazirane na CPIC i DPWG smjernicama.

Švicarske smjernice daju preporuke za liječenje 5-FU-om i kapecitabinom te u obzir ne uzimaju tegafur budući da on nije u uporabi u Švicarskoj. Preporučuju testiranje za 4 varijante, *2A i *13 koje prepoznaju kao varijante koje dovode do potpunog gubitka aktivnosti DPD-a i c.2468A>T i c.1236G>A koje vode do djelomičnog gubitka funkcije enzima.

Za heterozigotne nositelje preporučeno je smanjenje doze za 50%, za homozigotne nositelje dve varijante smanjene aktivnosti preporuča se smanjenje doze za 25%, dok se za homozigotne nositelje dve varijante koje vode do potpunog gubitka aktivnosti enzima preporuča izbjegavanje fluoropirimidina.

Za razliku od prijašnjih smjernica, ukoliko je prisutna varijanta *DPYD*, SPT smjernice predlažu početak terapije intravenskim 5-FU-om s odgovarajućom redukcijom doze ukoliko je potrebna te umjesto titracije doze prema toksičnosti, preporuča TDM - praćenje koncentracije lijeka u krvi tijekom kontinuirane infuzije te titriranje prema AUC-u (površini ispod krivulje odnosa koncentracije lijeka u krvi i vremena) čije su ciljne vrijednosti 20-30 mg x h/l. Ako primjena 5-FU-a nije moguća, moguća je terapija kapecitabinom s prilagođenom dozom i titracija doze prema toksičnosti (Hamzic i sur., 2020).

Tablica 4. Doziranje fluoropirimidina prema najnovijim CPIC smjernicama, DPWG i SPT smjernicama

DPYD GENOTIP	PREPORUČENA POČETNA DOZA (% PUNE DOZE)		
	CPIC	DPWG	SPT
dva alela normalne funkcije	100	100	100
jedan alel normalne funkcije i jedan nefunkcionalni alel ili jedan alel normalne funkcije i jedan alel smanjene funkcije	50	50	50*
dva alela smanjene funkcije	50	PHENO	25*
jedan alel smanjene funkcije i jedan nefunkcionalni alel	0	PHENO	0
dva nefunkcionalna alela	0	0	0

CPIC - *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*, DPWG - *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*, SPT – *The Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy*, PHENO - nema dovoljno podataka o enzimskoj aktivnosti na temelju genotipizacije pa se preporuča dodatna fenotipizacija, *preporuke za 5-FU u obliku infuzije uz TDM

1.5. EMA - OCJENA OMJERA KORISTI I RIZIKA PRIMJENE FLUOROPIRIMIDINA I PREPORUČENE MJERE MINIMIZACIJE RIZIKA

U ožujku 2020. godine Povjerenstvo za ocjenu rizika na području farmakovigilancije (PRAC) pri Europskoj agenciji za lijekove (EMA) preporučuje *DPYD* testiranje prije liječenja

5-fluorouracilom u obliku infuzije ili injekcije i njegovim prolijekovima. Testiranje nije potrebno kod topikalne primjene fluoropirimidina budući da je sistemska apsorpcija zanemariva.

PRAC je u preporuci naveo opcije i fenotipizacije i genotipizacije.

Za fenotipsko testiranje, PRAC priznaje francuske smjernice koje govore da vrijednosti uracilemije ≥ 150 ng/ml ukazuju na potpuni gubitak aktivnosti DPD-a, a vrijednosti ≥ 16 ng/ml i < 150 ng/ml ukazuju na djelomičnu deficijenciju.

Za genotipizaciju preporučaju testiranje na 4 varijante gena *DPYD* - *2A, *13, c.2468A>T i c.1236G>A.

Kod bolesnika s potpunim nedostatkom DPD-a kontraindicirana je primjena fluoropirimidina, dok se kod bolesnika s djelomičnom deficijencijom preporuča sniženje početne doze te titriranje doze prema nuspojavama.

Također navode da kliničke ishode može poboljšati TDM kod bolesnika liječenih kontinuiranom infuzijom 5-FU gdje je ciljni AUC 20-30 mg x h/l.

U lipnju 2020. u suradnji s EMA-om i hrvatskom Agencijom za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), nositelji odobrenja Roche Registration GmbH, JGL d.d, Alpha-Medical d.o.o., Sandoz d.o.o., Alvogen Pharma Trading Europe EOOD, Pliva Hrvatska d.o.o., Krka-farma d.o.o., Teva B.V., Accord Healthcare S.L.U. uputili su pismo zdravstvenim radnicima u kojem se preporučuje *DPYD* testiranje prije liječenja fluoropirimidinima s ciljem smanjenja rizika od toksičnosti (<https://halmed.hr>).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Već od ranih dana korištenja fluoropirimidina bilo je poznato da oni imaju razne i brojne nuspojave koje su se jače ispoljavale kod pojedinih pacijenata. Otkriće DPD-a i polimorfizama gena *DPYD* znanstvenicima je omogućilo razumijevanje metabolizma i toksičnosti ovih lijekova, no taj proces bio je težak i spor. Iako se danas zna da varijacije u genu *DPYD* nisu jedine koje utječu na toksičnost fluoropirimidina, stečeno znanje o utjecaju varijanti *DPYD* na ekspresiju enzima i riziku od toksičnosti je dragocjeno.

S obzirom na veliki broj pacijenata koji su svake godine na terapiji fluoropirimidinima u Republici Hrvatskoj, velik je i rizik od nastajanja nuspojava. Ovaj rad prikazuje razvoj *DPYD* testiranja u Hrvatskoj i njegovo trenutno stanje.

Cilj ovog diplomskog rada bio je analizirati podatke *DPYD* genotipskih testiranja u Republici Hrvatskoj te ustanoviti učestalost pojedinih polimorfizama u populaciji radi boljeg razumijevanja stanja pacijenata.

Dodatno, želja je bila analizirati broj testova kroz godine te uvidjeti postoji li rast broja testova te korelira li on vremenski s objavom nacionalnih smjernica drugih europskih država i preporukama EMA-e.

Na kraju, iz dostupnih podataka bilo je vidljivo podrijetlo uputnica za testiranje te je analiziran njihov lokalitet kroz Hrvatsku i pripadnost pojedinim razinama zdravstvene zaštite.

3. METODE I MATERIJALI

Za potrebe ovog diplomskog rada pretraživane su baze podataka PubMed, Wiley Online Library, PharmGKB, ScienceDirect, ASCO Journals, Hrčak, Repozitorij Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, te stranice HALMED-a. Uvelike su pomogli završni specijalistički rad Ane Begić s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu te doktorska disertacija Ivana Bilića s Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Podaci o rezultatima *DPYD* testiranja su iz arhiva Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb, skupljeni u periodu od srpnja 2009. godine i lipnja 2023. godine i obrađeni korištenjem zaokretnih tablica.

U Republici Hrvatskoj *DPYD* testiranje moguće je provesti na teret Hrvatskog zavoda za zdravstveno osiguranje, a trenutno ga jedino provodi laboratorij Odjela za farmakogenomiku i individualizaciju terapije u KBC-u Rebro. Osim uzorkovanja u samom KBC-u, testiranje se provodi i na uzorcima poslanima iz drugih dijelova Hrvatske.

4. REZULTATI I RASPRAVA

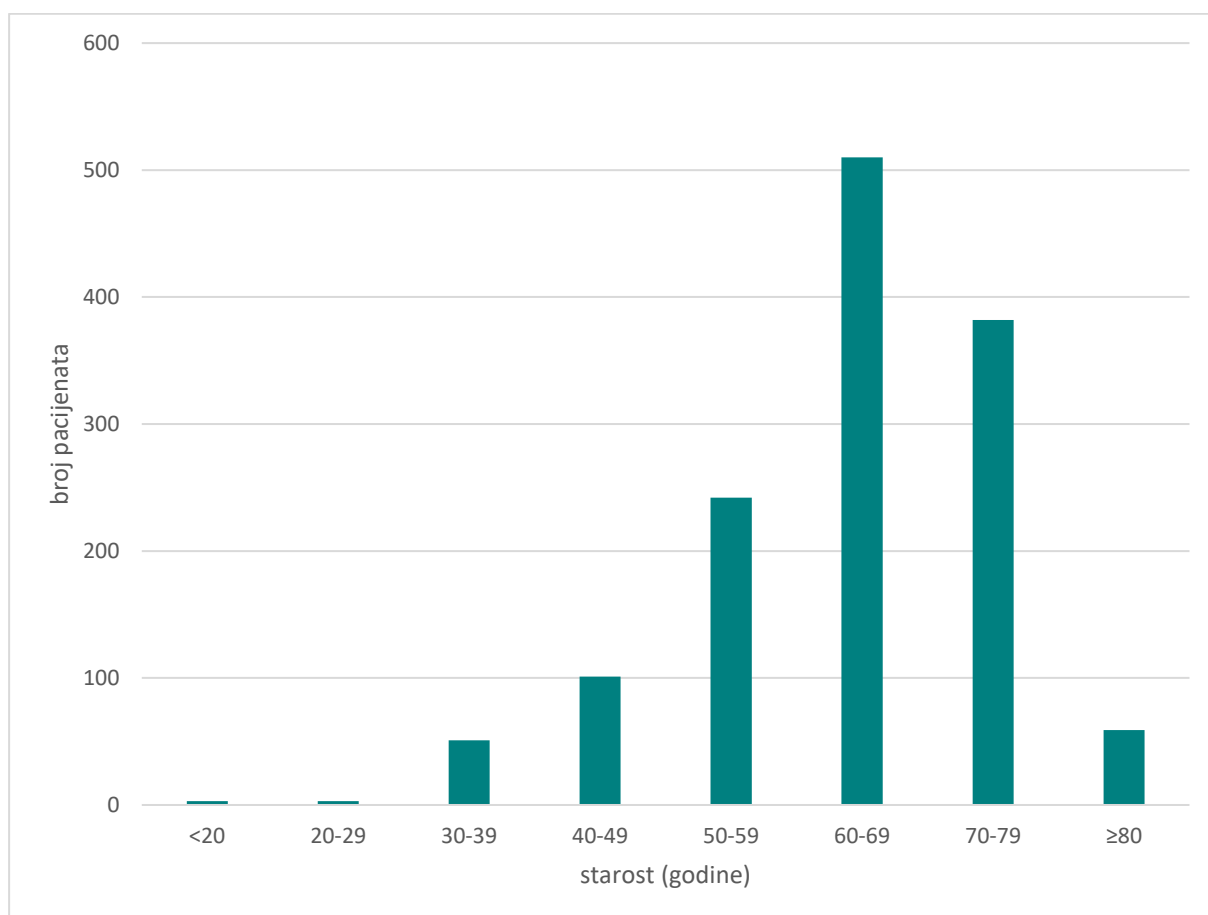
Analizirani su rezultati farmakogenetičkih testiranja na varijante gena *DPYD* 1364 osobe u razdoblju od srpnja 2009. godine do lipnja 2023. godine.

Od 1364 pacijenta, 715 bile su žene, a 649 muškarci. Oba spola zastupljena su podjednako - 52.42% čine žene, a 47.58% muškarci.

U analizu dobi u obzir je uzeta dob ispitanika u trenutku testiranja te su rezultati podložni greškama budući da je bila poznata samo godina rođenja, ne i točan datum.

Najveći broj ispitanika je u dobnoj kategoriji 60-69 godina i čini ~37.5% ukupnog broja. Slijedi kategorija 70-79 godina s ~28% zastupljenosti te kategorija 50-59 godina s ~17.5% ispitanika.

Oba spola su podjednako zastupljena u svim dobnim kategorijama.

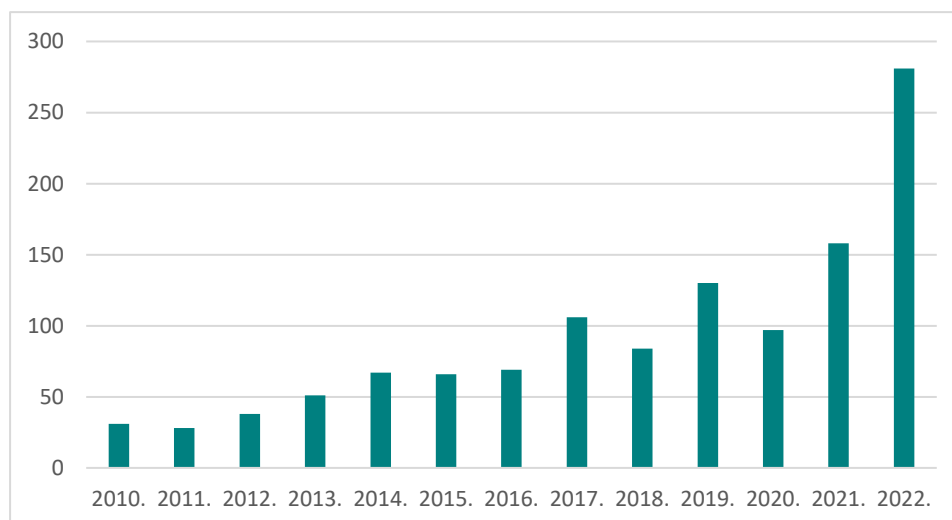


Slika 2. Broj testiranih pacijenata prema dobnim kategorijama

Tablica 5. Broj testiranih pacijenata prema dobnim kategorijama

RASPON GODINA	BROJ PACIJENATA
<20	3
20-29	3
30-39	51
40-49	101
50-59	242
60-69	510
70-79	382
≥80	59
nepoznato	13

Analiza broja provedenih testova kroz godine pokazuje gotovo eksponencijalni rast. Od 2009. godine do 2011. godine zabilježeno je 30-ak testiranja kroz cijelu godinu te taj broj blago raste do 2017. godine kada je broj testova narastao s 69 na 106, što čini porast od gotovo 35%. U 2018. godini je zapažen blagi pad, ali je 2019. godine broj narastao na 130 testova u godini dana, najviše do tada. Pandemija COVID-19 uzrokovala je pad broja testova u 2020. godini što se može objasniti manjom dostupnosti zdravstvene skrbi što je u skladu s podacima iz literature (Rucinska i sur., 2022; Moynihan i sur., 2021). U 2021. godini, u usporedbi sa 2020. godinom, broj testiranja je značajno porastao što se može povezati s dostupnosti cjepiva za COVID-19. U 2022. imamo rekordni porast za čak 45% u odnosu na prijašnju godinu. Kroz prvu polovicu 2023. godine vidimo da je broj testiranja otprilike isti kao u tom periodu prijašnje godine, tj. 142 testa.



Slika 3. Grafički prikaz broja DPYD testova od 2010. do 2022. godine

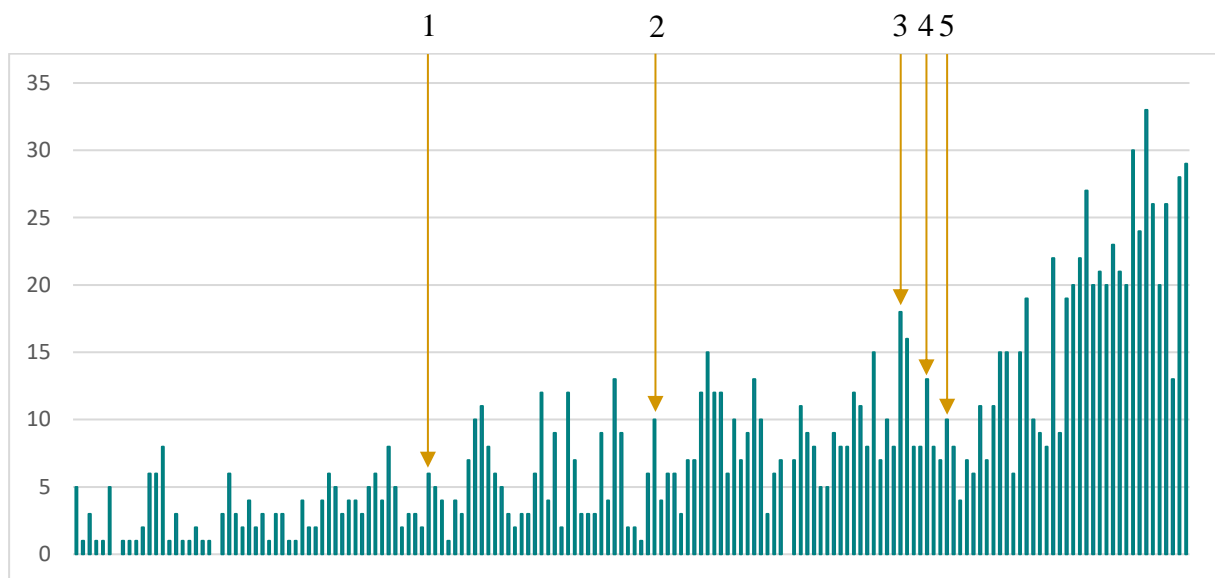
Tablica 6. Broj DPYD testova kroz ispitivani period

VREMENSKI PERIOD	BROJ TESTOVA
srpanj-prosinac 2009.	16
2010.	31
2011.	28
2012.	38
2013.	51
2014.	67
2015.	66
2016.	69
2017.	106
2018.	84
2019.	130
2020.	97
2021.	158
2022.	281
siječanj-lipanj 2023.	142

Iz rezultata možemo primijetiti da CPIC i DPWG smjernice nisu imale veliki utjecaj na porast broja testova. Nakon izvješća EMA-e 2020. godine nema očekivanog porasta broja pacijenata, no to nije čudno s obzirom na COVID-19 pandemiju tijekom koje se smanjila dostupnost zdravstvene skrbi. Nakon početka procjepljivanja populacije i smirenja zaraze korona virusom primjećujemo veliki porast smjernice što je u skladu s rezultatima studija koje su mjerile implementaciju testiranja u kliničku praksu u Europi (de With i sur., 2023; Begré i sur., 2022). Možemo zaključiti da je odluka EMA-e imala ulogu u promjeni mišljenja liječnika na prostoru Hrvatske o važnosti *DPYD* testiranja.

de With i sur. 2022. godine su kontaktirali stručnjake s ciljem procjene stanja *DYPD* testiranja u Europi te su preko obrascu postavljena pitanja o načinu provođenja testiranja, broju provedenih testova prije i poslije objave EMA-e te preprekama pri uvođenju testiranja. Dobili su odgovore od 79 osoba u 23 zemlje Europe, uključujući i Hrvatsku. Rezultati na europskoj razini većinski se poklapaju sa situacijom u Hrvatskoj gdje je također primijećen povećan broj

testova nakon objave EMA-inih preporuka. Neke od zabilježenih prepreka na razini Europe su odsutnog naknade troškova za testiranje što u Hrvatskoj nije problem budući da se genotipizacija može provesti na teret HZZO-a te nedovoljna edukacija medicinskih radnika. Nakon objave EMA-inih smjernica 2020. i njihove implementacije u onkološke smjernice, možemo primijetiti da su počeli pristizati uzorci iz čak 5 novih ustanova u Hrvatskoj.



Slika 4. Broj provedenih testova po mjesecima od srpnja 2009. do lipnja 2023. godine i objava smjernica za *DPYD* testiranje

(1. Prva objava CPIC smjernica, 2. Objava revidiranih CPIC smjernica, 3. Objava DPWG smjernica, 4. Objava EMA-ine ocjene omjera koristi i rizika primjene fluoropirimidina i preporučenih mjera minimizacije rizika, 5. Objava pisma zdravstvenim djelatnicima od strane nositelja odobrenja za fluoropirimidine na području Hrvatske)

U početku *DPYD* testiranja u Hrvatskoj provodili su se testovi samo za varijante *2A i c.496A>G pa tako za 427 pacijenata imamo rezultate samo za ove dvije varijante, dok za 937 pacijenata imamo rezultate za 5 varijanti (*2A, c.496A>G, *13, c.2846A>T i c.1236G>A), od kojih je 818 pojedinaca testirano i za šestu varijantu (*6, c.2194G>A). Dodatno testiranje na varijantu gena za *UGT1A1**28 provedeno je u 367 pacijenata.

Polimorfizam *DPYD**2A pronađen je kod 40 od 1364 ispitana pacijenta. Od ukupnog broja ispitanika, 2.86% pacijenata bili su heterozigoti, a 0.07%, tj. jedan ispitanik, homozigot.

Polimorfizam *DPYD* c.496A>G pronađen je u većem broju pacijenata, njih 341 od ispitanih 1364, tj. u čak 25% ukupnog broja. Od toga 23.39% bili su heterozigoti, a 1.61% homozigoti.

Polimorfizam *DPYD**13 u ispitanoj populaciji je najrjeđi te je zabilježen samo jedan heterozigot u ispitanih 937 pacijenata.

Polimorfizam *DPYD* c.2846A>T također je rijedak te je zabilježeno 9 heterozigota, tj. 0.96% od ukupnog broja ispitanih koji je 937.

Polimorfizam *DPYD* c.1236G>A pronađen je u 48 of 937 pacijenata te su svi heterozigoti i čine 5.12% ispitanika.

Polimorfizam *DPYD**6 ispitan je u 817 pacijenata te je pronađeno 99 heterozigota, tj. 12.10% ispitanih te 3 homozigota, tj. 0.37% ispitanih.

Genotipizacija za polimorfizam gena *UGT1A1**28 provedena je u 367 osoba, od kojih su 44.96% bili heterozigotni nositelji *2/*28, a 19.07% kao homozigotni nositelji *28/*28.

Od 1364 ispitane osobe, 492 bile su nositelji varijante gena *DPYD*. Samo jednu varijantu imali su 444 ispitanika, njih 47 nosilo je dvije varijante, a jedna osoba čak 3 različite varijante gena *DPYD*.

Tablica 7. Rezultati testiranja u Republici Hrvatskoj

POLIMORFIZAM	STATUS	BROJ REZULTATA	UDIO REZULTATA	UKUPAN BROJ ISPITANIH
<i>DPYD</i> *2A	1	1324	97.07%	Σ 1364
	2	39	2.86%	
	3	1	0.07%	
<i>DPYD</i> c.496A>G	1	1023	75.00%	Σ 1364
	2	319	23.39%	
	3	22	1.61%	
<i>DPYD</i> *13	1	936	99.89%	Σ 937
	2	1	0.11%	
	3	0	0.00%	
<i>DPYD</i> c.2846A>T	1	928	99.04%	Σ 937
	2	9	0.96%	
	3	0	0.00%	
<i>DPYD</i> c.1236G>A	1	889	94.88%	Σ 937
	2	48	5.12%	
	3	0	0.00%	
<i>DPYD</i> *6	1	715	87.52%	Σ 817
	2	99	12.10%	
	3	3	0.37%	
UGT1A1 *28	1	132	35.97%	Σ 367
	2	165	44.96%	
	3	70	19.07%	

1 – nositelj divljeg tipa alela, 2 - heterozigot, 3 – homozigotni nositelj varijantnog alela

Tablica 8. Prikaz izvora preporuka za *DPYD* testiranje

UPUĆENO OD STRANE:	BROJ TESTOVA
KBC Zagreb	536
KBC Rijeka	163
KBC Osijek	7
KBC Sestre milosrdnice	6
KBC Split	1
KB Merkur	1
KB Sveti duh	1
OŽB Požega	3
OŽB Vinkovci	2
OB Varaždin	40
OB Pula	34
OB „dr. Josip Benčević“, Slavonski Brod	11
OB Karlovac	8
OB Dubrovnik	4
OB Zadar	4
OB Koprivnica	1
OB Šibenik	1
liječnik primarne zdravstvene zaštite	541

U sklopu analize obrađeni su podaci o izvorima preporuka za *DPYD* testiranje.

Od strane liječnika primarne zdravstvene zaštite zaprimljeno je 541 zahtjev za testiranjem, tj. ~39.7% ukupnog broja testova.

Sekundarna razina zdravstvene zaštite imala je nešto manju ulogu u *DPYD* testiranjima te je iz općih bolnica i općih županijskih bolnica zaprimljeno samo 108 pacijenata, tj. samo ~8%. Najviše uzoraka stiglo je iz OB Varaždin i OB Pula.

Najviše preporuka stiglo je iz ustanova tercijarne zdravstvene zaštite, tj. iz kliničkih bolnica i kliničkih bolničkih centara - više od 50%. Skoro 40% ukupnog broja testova upućeno je od strane KBC-a Zagreb gdje se samo testiranje i odvija, dok je iznenađujuće velik broj uzoraka, čak 163, stigao iz KBC-a Rijeka.

Iz dostupnih podataka možemo vidjeti porast broj uputnica pristiglih iz ustanova izvan Zagreba. Do 2014. godine, svi uzorci stigli su upravo iz Zagreba gdje su i obrađeni, a s 2014. godinom započinje pristizanje uzoraka iz drugih dijelova Hrvatske. Kao i s ukupnim brojem testova, primjećujemo porast testova pristiglih iz drugih regija Hrvatske kroz promatrani period. Zaprmljeno je 279 takvih uzoraka, tj. petina ukupnog broja uzoraka

Tablica 9. Broj uzoraka zaprimljenih iz ustanova izvan Zagreba tijekom promatranog razdoblja

	2014.	2015.	2016.	2017.	2018.	2019.	2020.	2021.	2022.	2023.
KBC Rijeka	3	6	5	2	12	8	14	30	49	34
OB Pula			2			5	6	4	10	7
KBC Osijek					1	1	2	1	1	
OB Karlovac					1	2	1	1	3	
OB Slavonski Brod						2	4	3	3	
OŽB Požega						1			2	
OB Varaždin							1	5	28	6
OB Zadar							1		2	1
KBC Split								1		
OB Šibenik								1		
OŽB Vinkovci									1	1
OB Dubrovnik									4	
OB Koprivnica									1	
Σ	3	6	7	2	14	19	29	46	105	49

5. ZAKLJUČCI

Analizirani su podaci farmakogenetičkog testiranja gena *DPYD* za 1364 osobe u KBC-u Zagreb, prikupljeni u razdoblju od srpnja 2009. i lipnja 2023. godine.

U ukupnom broju pacijenata podjednako su zastupljeni muškarci i žene, od kojih je čak 70% starije životne dobi, tj. stariji od 60 godina u trenutku testiranja.

Analizirani su svi podaci dostupni u KBC-u Zagreb, od kojih najstariji sežu do 2009. Kroz godine se primjećuje porast broja testova, a najveći skok primijećen je 2022. godine kada se gotovo udvostručio broj ispitanika u usporedbi s prethodnom godinom. U 2020. zabilježen je blaži pad broja testiranja što se može objasniti manjom dostupnosti zdravstvene skrbi uzrokovane pandemijom COVID-19. U 2021. godini, u usporedbi sa 2020. godinom, broj testiranja je značajno porastao što se može povezati s dostupnošću cjepiva za COVID-19.

Objave *DPYD* smjernica od strane CPIC-a i DPWG-a imale su mali utjecaj na učestalost testiranja u Hrvatskoj, no možemo primijetiti veliki porast nakon uključivanja preporuka EMA-e u onkološke smjernice što je u skladu s rezultatima studija koje su mjerile implementaciju testiranja u kliničku praksu u Europi.

Studija učinka provedena 2022. godine ispitala je stručnjake u 23 zemlje Europe, s ciljem procjene stanja *DYPD* testiranja u Europi. Rezultati na europskoj razini većinski se poklapaju sa situacijom u Hrvatskoj gdje je također primijećen povećan broj testova nakon objave EMA-inih preporuka. Nakon objave EMA-inih smjernica 2020. i njihove implementacije u onkološke smjernice, možemo primijetiti da su počeli pristizati uzorci iz čak 5 novih ustanova u Hrvatskoj te možemo zaključiti da su one imale velik utjecaj na voljnost stručnjaka za edukaciju o utjecaju DPD deficijencije na terapijski odgovor te upućivanje na *DPYD* testiranje.

Od ukupnog broja pacijenata, 492 osobe, tj. 36% ispitanika bili su nositelji neke od varijanti gena *DPYD* od kojih je 444 pacijenata imalo jednu varijantu, 47 dvije varijante, a jedna osoba čak 3 varijante *DPYD*. U počecima farmakogenetičkog testiranja *DPYD* u Hrvatskoj ono se provodilo nakon početka terapije kao odgovor na nuspojave uzrokovane fluoropirimidinima, a tek je u novije vrijeme započelo pred terapijsko testiranje, no u okvirima ovog rada taj podatak o pojedinim testovima nije poznat. Trend pred terapijskog testiranja možemo primijetiti i u drugim zemljama Europe budući da ono omogućuje najbolje ishode za pacijenta.

Najčešći polimorfizam bio je *DPYD* c.496A>G pronađen u 25% ispitanika, a najrjeđa varijanta *DPYD**13 koja je utvrđena samo kod jedne osobe. Varijanta *DPYD**2A pronađena u 2.9% pacijenta. Varijanta *DPYD* c.2846A>T također je rijetka te je utvrđena u tek 0.96% od

ukupnog broja ispitanih. Polimorfizam *DPYD* c.1236G>A pronađen je u 5.12% ispitanika, a *DPYD**6 12.47% ispitanika.

Najviše preporuka za genotipizaciju stiglo je iz ustanova tercijarne zdravstvene zaštite, od čega je gotovo 40% njih stiglo iz samog KBC-a Zagreb gdje se testiranje i provodi. Gotovo 40% preporuka za testiranje stiglo je i od strane liječnika primarne zdravstvene zaštite, dok je iz ustanove sekundarne zdravstvene zaštite stiglo samo 8% pacijenata. Izvan Zagreba, najviše uzoraka stiglo je iz KBC-a Rijeka, njih čak 12%. Primjećujemo porast broja ustanova iz kojih se šalju uzorci – do 2014. uputnice za testiranje stizale su samo iz Zagreba, no postepeno se uključuju i drugi hrvatski gradovi. Nakon objave EMA-inih preporuka, primjećujemo uključivanje 5 novih ustanova u prikupljanje uzoraka za *DPYD* testiranje.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

5-FU - 5-fluorouracil

5-FdUMP - 5-fluorodeoksiuridin monofosfat

5-FUTP - 5-fluorouridin trifosfat

5-FdUTP - 5-fluorodeoksiuridin trifosfat

5'-DFCR - 5'-deoksi-5-fluorocitidin

5'-DFUR - 5'-deoksi-5-fluorouridin

ANSM - Francuska nacionalna agencija za sigurnost lijekova i zdravstvenih proizvoda, fr.
L'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé

AUC - površina ispod krivulje odnosa koncentracije lijeka u krvnoj plazmi i vremena, engl.
Area under the ROC curve

CPIC - engl. *The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium*

CTCAE - engl. *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

DHFU - 5,6-dihidro-5-fluorouracil

DHU - dihidrouracil

DNA - deoksiribonukleinska kiselina

DPD - dihidropirimidin dehidrogenaza

DPWG - engl. *The Dutch Pharmacogenetics Working Group*

dTMP - deoksitimidin monofosfat

dTTP - deoksitimidin trifosfat

dUMP - deoksiuridin monofosfat

dUTP - deoksiuridin trifosfat

EMA - Europska agencija za lijekove, engl. *European Medicines Agency*

HAS - Francuska agencija za zdravstvo, fr. *Haute Autorité de Santé*

HZZO – Hrvatski zavod za zdravstveno osiguranje

INCa - Nacionalni institut za rak, fr. *Institut National du Cancer*

KB - klinička bolnica

KBC - klinički bolnički centar

MTHF - 5,10-metilen tetrahidrofolat

OB - opća bolnica

OPRT – orotat-fosforiboziltransferaza

OŽB - opća županijska bolnica

PRAC - Povjerenstvo za ocjenu rizika na području farmakovigilancije, engl. *Pharmacovigilance Risk Assessment Committee*

RNA - ribonukelinska kiselina

SPT - Švicarska grupa za farmakogenomiku i personaliziranu terapiju, engl. *Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy*

TDM – terapijsko praćenje lijekova, engl. *therapeutic drug monitoring*

TS – timidilat-sintaza

U - uracil

7. LITERATURA

Amstutz U, Henricks LM, Offer SM, Barbarino J, Schellens JHM, Swen JJ, Klein TE, McLeod HL, Caudle KE, Diasio RB, Schwab M. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) Guideline for Dihydropyrimidine Dehydrogenase Genotype and Fluoropyrimidine Dosing: 2017 Update. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103, 210-216.

Bank PCD, Caudle KE, Swen JJ, Gammal RS, Whirl-Carrillo M, Klein TE, Relling MV, Guchelaar HJ. Comparison of the Guidelines of the Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium and the Dutch Pharmacogenetics Working Group. *Clin Pharmacol Ther*, 2018, 103, 599-618.

Begić A. Implementacija farmakogenetike za 5-fluorouracil i irinotekan u Hrvatskoj. Specijalistički rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2001.

Begré UBM, Jörger M, Aebi S, Amstutz U, Largiadè CR. Clinical Implementation of *DPYD* Pharmacogenetic Testing to Prevent Early-Onset Fluoropyrimidine-Related Toxicity in Cancer Patients in Switzerland. *Front Pharmacol*, 2022, 13.

Bilić I. Uloga polimorfizama gena dihidropirimidin-dehidrogenaze i UDP-glukuronil-transferaze u toksičnosti kemoterapije fluoropirimidinima i irinotekanom. Disertacija, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2016.

Božina N, Bilić I, Ganoci L, et al. *DPYD* polymorphisms c.496A>G, c.2194G>A and c.85T>C and risk of severe adverse drug reactions in patients treated with fluoropyrimidine-based protocols. *Br J Clin Pharmacol*, 2022, 88, 2190-2202.

Caudle KE, Thorn CF, Klein TE, Swen JJ, McLeod HL, Diasio RB, Schwab M. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for dihydropyrimidine dehydrogenase genotype and fluoropyrimidine dosing. *Clin Pharmacol Ther*, 2013, 94, 640-645.

de With M, Sadlon A, Cecchin E, Haufroid V, Thomas F, Joerger M, van Schaik RHN, Mathijssen RHJ, Largiadèr CRL. Implementation of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency testing in Europe. *ESMO Open*, 2023, 8.

Deac AL, Burz CC, Bocşe HF, Bocşan IC, Buzoianu AD. A review on the importance of genotyping and phenotyping in fluoropyrimidine treatment. *Med Pharm Rep*, 2020, 93, 223-230.

Del Re M, Di Paolo A, van Schaik RH, Bocci G, Simi P, Falcone A, Danesi R. Dihydropyrimidine dehydrogenase polymorphisms and fluoropyrimidine toxicity: ready for routine clinical application within personalized medicine? *EPMA J*, 2010, 1, 495-502.

Ganoci L, Bilić I, Božina N. Farmakogenomika u onkologiji. U: Primjena farmakogenomike u kliničkoj praksi – primjer personalizirane medicine. Božina N, urednik. Zagreb, Medicinska naklada, 2023, str. 51-68.

Hamzic S, Aebi S, Joerger M, Montemurro M, Ansari M, Amstutz U, Largiadèr C. Fluoropyrimidine chemotherapy: recommendations for *DPYD* genotyping and therapeutic drug monitoring of the Swiss Group of Pharmacogenomics and Personalised Therapy. *Swiss Med Wkly*, 2020, 150:w20375.

Knikman JE, Gelderblom H, Beijnen JH, Cats A, Guchelaar HJ, Henricks LM. Individualized Dosing of Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy to Prevent Severe Fluoropyrimidine-Related Toxicity: What Are the Options? *Clin Pharmacol Ther*, 2021, 109, 591-604.

Launay M, Ciccolini J, Rodallec A, Fournel C, Dufaud F, Salas S, Lacarelle B. Upfront DPD Deficiency Detection to Secure 5-FU Administration: Part 1 – Where Do We Stand?. *Clin Cancer Drugs*, 2017.

Laures N, Konecki C, Brugel M, Giffard A-L, Abdelli N, Botsen D, Carlier C, Gozalo C, Feliu C, Slimano F, Djerada Z, Bouché O. Impact of Guidelines Regarding Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) Deficiency Screening Using Uracil-Based Phenotyping on the Reduction of Severe Side Effect of 5-Fluorouracil-Based Chemotherapy: A Propension Score Analysis. *Pharmaceutics*, 2022, 14, 2119.

Lešnjaković L, Ganoci L, Bilić I, Šimičević L, Mucalo I, Pleština S, Božina N. *DPYD* genotyping and predicting fluoropyrimidine toxicity: where do we stand? *Pharmacogenomics*, 2023, 24, 93-106.

Lunenburg CATC, van der Wouden CH, Nijenhuis M, Crommentuijn-van Rhenen, MH, de Boer-Veger NJ, Buunk AM, Houwink EJF, Mulder H, Rongen GA, van Shaik RHN, van der Weide J, Wilffert B, Deneer VHM, Swen JJ, Guchelaar HJ. Dutch Pharmacogenetics Working Group (DPWG) guideline for the gene–drug interaction of *DPYD* and fluoropyrimidines. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28, 508–517.

Miura K, Kinouchi M, Ishida K, Fujibuchi W, Naitoh T, Ogawa H, Ando T, Yazaki N, Watanabe K, Haneda S, Shibata C, Sasaki I. 5-FU metabolism in cancer and orally-administrable 5-FU drugs. *Cancers (Basel)*, 2010, 2, 1717-1730.

Moynihan R, Sanders S, Michaleff ZA, Scott AM, Clark J, To EJ, Jones M, Kitchener E, Fox M, Johansson M, Lang E, Duggan A, Scott I, Albarqouni L. Impact of COVID-19 pandemic on utilisation of healthcare services: a systematic review. *BMJ Open*, 2021, 11.

Rucinska M, Nawrocki S. COVID-19 Pandemic: Impact on Cancer Patients. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19.

Thorn CF, Marsh S, Carrillo MW, McLeod HL, Klein TE, Altman RB. PharmGKB summary: fluoropyrimidine pathways. *Pharmacogenet Genomics*, 2011, 21, 237-242.

Wei X, Elizondo G, Sapone A, McLeod HL, Raunio H, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ. Characterization of the human dihydropyrimidine dehydrogenase gene. *Genomics*, 1998, 51, 391-400.

Genome Aggregation Database (gnomAD). *DPYD*—dihydropyrimidine dehydrogenase. 2023., <https://gnomad.broadinstitute.org>, pristupljeno 15.11.2023.

Pismo zdravstvenim radnicima o potrebi testiranja bolesnika prije započinjanja liječenja lijekovima s djelatnim tvarima fluorouracil, kapecitabin ili tegafur radi nedostatka DPD enzima koji bolesnike izlaže povećanom riziku od teške toksičnosti, 2020., <https://www.halmed.hr> , pristupljeno 22.10.2023.

PRAC donio preporuke za testiranje i liječenje lijekovima s djelatnim tvarima fluorouracil, kapecitabin, tegafur i flucitozin, 2020., <https://www.halmed.hr> , pristupljeno 27.10.2023.

Screening for dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency to decrease the risk of severe toxicities related to fluoropyrimidines (5-fluorouracil or capecitabine), 2023., <https://www.has-sante.fr>, pristupljeno 2.11.2023.

8. SAŽETAK/SUMMARY

Fluoropirimidini su skupina kemoterapeutika koji se koriste u liječenju više vrsta raka, a uključuju 5-fluorouracil te njegove oralne prolijeke kapecitabin i tegafur.

U metabolizmu fluoropirimidina veliku ulogu igra enzim dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) kodirana genom *DPYD*. Polimorfizmi i varijante gena *DPYD* povezuju se s nedostatkom aktivnosti enzima DPD povećanim rizikom za razvoj teških nuspojava fluoropirimidina. Stoga je objavljeno je više smjernica koje daju preporuke za farmakogenetičko testiranje ovog gena. Cilj testiranja je otkriti moguće varijante gena *DPYD* prije terapije fluoropirimidinima te smanjiti rizik od nuspojava. Ovaj rad sadrži pregled metoda genotipizacije i fenotipizacije te sažetak najvažnijih nacionalnih smjernica država Europe i Europske agencije za lijekove (EMA).

U sklopu ovog diplomskog rada, obrađeni su podaci farmakogenetičkog testiranja *DPYD* u pacijenata Republike Hrvatske u periodu od srpnja 2009. do lipnja 2023. godine. Prikazane su statistike o spolu i dobi pacijenata te broju testova provedenih svake godine. Obradom rezultata genotipizacije izračunate su frekvencije pojedinih varijanti u ispitivanoj populaciji te je prikazano podrijetlo preporuka za testiranje na razini primarne, sekundarne i tercijarne zdravstvene zaštite.

Fluoropyrimidines are a group of chemotherapeutic drugs used to treat a spectrum of carcinoma. The group includes 5-fluorouracil and its oral prodrugs capecitabine and tegafur.

The enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase, coded by the *DPYD* gene, has a major role in the metabolism of fluoropyrimidines. *DPYD* polymorphisms and variants are associated with lack of DPD enzyme activity and increased risk for development of fluoropyrimidine severe adverse reactions. Therefore, several guidelines for *DPYD* testing have been published. The goal of these tests is to detect possible variants of the *DPYD* gene pre-treatment and to minimise the risk of side effects. This paper includes an overview of different genotyping and phenotyping methods, as well as an overview of the most important national guidelines of European countries and the European Medicines Agency (EMA).

In this master's thesis, the results of more than a decade's worth of pharmacogenetic testing of *DPYD* in patients from the Republic of Croatia are presented. This paper shows the analysis of patients' sex and age and the number of tests performed each year. Included is the calculated frequency of each of the gene variant and the origin of testing recommendations at the primary, secondary and tertiary health care levels.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Centar za primijenjenu farmaciju
Domagojeva 2, 10000, Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Provođenje mjera minimizacije rizika primjene fluoropirimidina u Republici Hrvatskoj

Sara Koren

SAŽETAK

Fluoropirimidini su skupina kemoterapeutika koji se koriste u liječenju više vrsta raka, a uključuju 5-fluorouracil te njegove oralne prolijekeve kapecitabin i tegafur.

U metabolizmu fluoropirimidina glavnu ulogu igra enzim dihidropirimidin-dehidrogenaza (DPD) koju kodira gen *DPYD*. Polimorfizmi i varijante gena *DPYD* povezuju se s nedostatkom aktivnosti enzima DPD te povećanim rizikom za razvoj teških nuspojava fluoropirimidina. Stoga je objavljeno je više smjernica koje daju preporuke za farmakogenetičko testiranje ovog gena. Cilj testiranja je otkriti moguće varijante gena *DPYD* prije terapije fluoropirimidinima te smanjiti rizik od nuspojava. Ovaj rad sadrži pregled metoda genotipizacije i fenotipizacije te sažetak najvažnijih nacionalnih smjernica država Europe i Europske agencije za lijekove (EMA).

U sklopu ovog diplomskog rada, obrađeni su podaci farmakogenetičkog testiranja *DPYD* u pacijenata Republike Hrvatske u periodu od srpnja 2009. do lipnja 2023. godine. Prikazane su statistike o spolu i dobi pacijenata te broju testova provedenih svake godine. Obradom rezultata genotipizacije izračunate su frekvencije pojedinih varijanti u ispitivanoj populaciji te je prikazano podrijetlo preporuka za testiranje na razini primarne, sekundarne i tercijarne zdravstvene zaštite.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 30 stranica, 4 grafičkih prikaza, 9 tablica i 26 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Dihidropirimidin-dehidrogenaza, DPD, *DPYD*, 5-fluorouracil, 5-FU, kapecitabin, tegafur, genotipizacija

Mentor: **Dr. sc. Nikica Mirošević Skvrce**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lana Ganoci, naslovni docent Sveučilišta u Rijeci Fakulteta za biotehnologiju i razvoj lijekova

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nikica Mirošević Skvrce**, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Iva Mucalo, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Lana Ganoci, naslovni docent Sveučilišta u Rijeci Fakulteta za biotehnologiju i razvoj lijekova

Rad prihvaćen: studeni 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Centre for Applied Pharmacy
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Implementation of risk minimization measures for the use of fluoropyrimidines in the Republic of Croatia

Sara Koren

SUMMARY

Fluoropyrimidines are a group of chemotherapeutic drugs used to treat a spectrum of carcinoma. The group includes 5-fluorouracil and its oral prodrugs capecitabine and tegafur.

The enzyme dihydropyrimidine dehydrogenase, coded by the *DPYD* gene, has a major role in the metabolism of fluoropyrimidines. *DPYD* polymorphisms and variants are associated with lack of DPD enzyme activity and increased risk for development of fluoropyrimidine severe adverse reactions. Therefore, several guidelines for *DPYD* testing have been published. The goal of these tests is to detect possible variants of the *DPYD* gene pre-treatment and to minimise the risk of side effects. This paper includes an overview of different genotyping and phenotyping methods, as well as an overview of the most important national guidelines of European countries and the European Medicines Agency (EMA).

In this master's thesis, the results of more than a decade's worth of pharmacogenetic testing of *DPYD* in patients from the Republic of Croatia are presented. This paper shows the analysis of patients' sex and age and the number of tests performed each year. Included is the calculated frequency of each of the gene variant and the origin of testing recommendations at the primary, secondary and tertiary health care levels.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 4 figures, 9 tables and 26 references. Original is in Croatian language.

Keywords: dihydropyrimidine-dehydrogenase, DPD, *DPYD*, 5-fluorouracil, 5-FU, capecitabine, tegafur, genotyping

Mentor: **Nikica Mirošević Skvrce, Ph.D.** /Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lana Ganoci, Ph.D. /Assistant Professor, University of Rijeka Faculty of Biotechnology and Drug Development

Reviewers: **Nikica Mirošević Skvrce, Ph.D.** /Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mucalo Iva, Ph.D. /Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Lana Ganoci, Ph.D. /Assistant Professor, University of Rijeka Faculty of Biotechnology and Drug Development

The thesis was accepted: November 2023.