

Od genomike do metabolomike analgetika u djece

From Genomics to Metabolomics of Analgesics in Children

† JASMINKA JAKOBOVIĆ

SAŽETAK Personalizirana medicina, odnosno individualizirana terapija lijekovima prema bolesnikovoj genetici očekivano se trebala razviti iz projekta humanoga genoma. Farmakogenomika proučava interakciju između ljudskoga genoma i kliničkog odgovora na lijek. Međutim, složenost interakcija između lijeka i pacijenta ne ovisi samo o bolesnikovu genomu već i o mnogima drugim čimbenicima, kao okolišnim faktorima, interakcijama lijek – lijek, polimorfizmu u transporterima i receptorima. U djece je situacija još složenija jer u obzir treba uzeti ontogenomiku, gdje je razvoj ključnih tjelesnih enzima vezan uz kronološku dob djeteta, koja stvara varijabilnost i u farmakokinetici i u farmakodinamici.

KLJUČNE RIJEČI: personalizirana medicina, farmakogenomika, metabolomika, bol, djeca, analgetici, ontogenomika

SUMMARY Personalised medicine or individualised medicamentous treatment based on patient's genetics was expected to develop from the human genome project. Pharmacogenomics is a science investigating interactions between human genome and clinical drug response. However, the complexity of drug-patient interactions is not only patient genome dependent, but it also depends on many other factors like environmental, drug to drug interactions, and transporter and receptor polymorphism. The situation in children is even more complex given ontogenomics and the development of functional enzymes related to the chronological age of the child, which in turn creates variability in pharmacokinetics and pharmacodynamics.

KEY WORDS: personalized medicine, pharmacogenomics, metabolomics, pain, children, analgesics, ontogenomics

Uvod



Početak 21. stoljeća završen je Projekt humanoga genoma i kliničari su se ponadali da će individualizirana terapija lijekovima, odnosno takozvana personalizirana medicina biti brzo moguća, već u prvoj dekadi stoljeća. To se za sada nije dogodilo, barem ne u znatnijem kliničkom opsegu (1). Individualiziranom terapijom smatra se određivanje pravog lijeka u ispravnoj dozi cijelo vrijeme liječenja, a bazirano na bolesnikovoj genetici. Činjenica je da farmakogenomičko predviđanje učinkovitosti i sigurnosti lijeka nije za sada postalo realnost zbog složenosti interakcije između lijeka i pacijenta, koja se ne može objasniti samo bolesnikovim genomom. Čak i kada poznamo pacijentovu gensku sposobnost metaboliziranja lijekova, interakcije tipa lijek – lijek, utjecaj okolišnih čimbenika i polimorfizam u ciljevima farmakodinamskog djelovanja lijeka, transporterima i receptorima, ograničavaju našu sposobnost predviđanja odgovora na lijek u individualnog bolesnika (2).

Nove metode proteomike, transkriptomike i metabolomike nude istraživačima mogućnosti povećanja učinkovitosti i smanjenja toksičnosti lijekova, odnosno individualizacije terapije. Kad su istodobno promijenjeni genska ekspresija

i profil metabolita, otvara se prostor za pronalaženje zajedničkih metaboličkih putova (3). Osim jasnog interesa liječnika i pacijenata postoji određen broj biotehnoških, farmaceutskih i dijagnostičkih kompanija povezanih u klaster, koje su prihvatile koncept personalizirane medicine. Povećanje broja ovakvih kompanija pripomoglo bi modernom unaprjeđenju zdravlja.

Zbog velike količine podataka koje generiraju metode molekularne biologije i medicinske biokemije, uporabom modernih testova i tehnologije tijekom raznih „-omika“, nuždan je bio razvoj bioinformatike i biostatistike, koje mogu obraditi dobivene podatke. U novije vrijeme pristup razumijevanju varijabilnosti u odgovoru na liječenje rabi kombinaciju multivarijatne statistike (tzv. *chemometrics*) i metaboličkog profiliranja da se unaprijed predvide metabolizam i toksičnost određene doze pojedinog lijeka – a ovo bazirano samo na analizi i modeliranju – to je tzv. farmakometabolomika i osjetljiv je pristup i na genske i na mijenjajuće okolišne utjecaje (4).

Potrebe da moderni i kvalitetni lijekovi budu na raspolaganju i za pedijatrijsku populaciju mijenjaju polako legislativu i praksu u farmaceutici. U posljednjih 15-ak godina objav-

ljeno je 249 kliničkih pokusa na djeci. U većini pokusa bilo je uključeno do 40-ero djece. U djece promatranje odnosa genotip – fenotip mora uzeti u obzir ontogenomiku, razvoj ključnih tjelesnih enzima vezan uz kronološku dob djeteta, koja stvara varijabilnost i u farmakokinetici i u farmakodinamici (5).

Genomika

GENOM je cjelokupni genski materijal i genska informacija jednog organizma. Farmakogenomika proučava interakciju između ljudskoga genoma i kliničkog odgovora na lijek.

Jedan od dugoročnih ciljeva farmakogenomičkog pristupa jest razumijevanje genske podloge različitog pojedinca (njegov genski polimorfizam) i njegove promjene u sposobnosti metaboliziranja lijekova i za korisni terapijski učinak i za toksične nuspojave.

Polimorfizam gena koji kodiraju enzime što metaboliziraju lijekove utječe na odgovor na terapiju, kao i na toksičnost raznih ksenobiotika. Za prvu fazu metabolizma lijekova u tijelu važno je nekoliko CYP enzima: 1A2, 2E1, 3A4, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, pomalo 3A5. Od toga na primjer enzimi 1A2, 2E1 i 3A4 pokazuju u populaciji vrlo visok stupanj konzervativne genske očuvanosti pa tako imaju malen broj funkcionalnih polimorfizama. Geni koji kodiraju enzime 2C9, 2C19 i 2D6 pokazuju veći stupanj polimorfizama.

Yang i suradnici određivali su aktivnost CYP enzima metodom tekućinske kromatografije/masene spektrometrije (krat. LC/MS) preko nastalih metabolita. Koristili su se komercijalnim setom markera polimorfizma jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* – SNP), a uzimali su u obzir samo one SNP koji imaju frekvenciju minornog alela veću od 4%. Fenotipizaciju su radili probnim lijekovima. Kad su ispitivali učinak dobi na aktivnost 8 najčešćih relevantnih CYP enzima, otkrili su da dob utječe na CYP 2C9. Našli su da je aktivnost slabija u osoba mlađih od 20 godina nego u starijih. Manji učinak ima dob na aktivnost 2C8, 3A4, dok kod ostalih enzima nisu našli učinak dobi. Kombinirajući, međutim, podatke po drugim statističkim grupama, u dijelu studije našli su da u dobi iznad 10 god. (pubertet) djevojčice imaju višu aktivnost, ali i razinu ekspresije CYP enzima. U diskusiji pak priznaju da bi dob mogla utjecati na aktivnost 2C19, 2D6, 3A4, 1A2, 2C8 (6).

Aktivnost različitih CYP enzima visoko je međusobno pozitivno korelirana. Formirali su klaster aktivnosti kojima su jače prikazali vezu među CYP enzimima. Klasteru s 3A4 pridružen je supklaster 1A2, 2C8 i 2C9. Sljedeću razinu klastera čini 2C19. Supklasteru kojem pripada 2E1 pripadaju i neki drugi (npr. 2A6, 2B6). Konačno, 2D6 je udaljeniji od ostalih ispitivanih enzima. Važno je da enzimi klasterirani na razini aktivnosti slično klasteriraju i na razini ekspresije, ali postoje iznimke. Glavna su iznimka 2C19 i 2E1 – bliži su na razini ekspresije nego na razini aktivnosti. Međusobne veze izme-

đu CYP enzima nisu uvijek uvjetovane njihovom sekvencijskom sličnošću. Na primjer, 2C8 i 2C9 bliski su 2E1 prema sekvenciji, dok je prema sekvenciji 3D4 od njih udaljen. No na razini i ekspresije i aktivnosti 2C8 i 9 sličniji su 3A4 nego 2E1. CYP enzimi značajno su korelirani i s drugim genima osim svojih kodirajućih gena. Ispitivali su regulaciju CYP enzima. Na razini transkripcije identificirali su module koji sadržavaju značajno međupovezane ekspresije i tako načini koekspresijske mreže i podmreže. Definirali su interakcije visokog reda odnosno hijerarhije. Pokazali su da osim glavnoga gena postoji velik broj drugih gena koji također utječu na aktivnost određenog CYP enzima; to su geni regulatori. Jedino 2E1 ima relativno nizak intenzitet regulacije prema nizu drugih gena. Osim 2E1 i 2D6 je relativno niskim intenzitetom kontroliran od udaljenih, različitih gena regulatora. CYP 2E1 najviše je povezan s genima akutne faze upale. Moduli koji su jako povezani s CYP enzimima sadržavaju gene za oksidativni stres i apoptozu (superoksid dismutaza 2 – SOD2, katalaza – CAT, kaspaza 4 – CASP 4), gene za odgovor akutne faze (serumski amiloidni proteini SAA1, SAA2, SAA3P, CRP).

Razni ključni geni zovu se i središnji (engl. *hub*) geni i regulatorni su geni za CYP. Nakon navedenoga ispitivali su najrazličitije SNP na aktivnost i ekspresiju CYP gena. Primijetili su da pojedini SNP ne mora u jednakom smislu i opsegu djelovati i na aktivnost i na ekspresiju CYP gena. U tom je smislu 2D6 najjednostavniji – pojedini SNP na samom 2D6 genu podjednako utječe i na aktivnost i na ekspresiju. Zaključuju da je 2D6 predmet genske samoregulacije i na razini transkripcije i na razini aktivnosti. Važni otprije poznati regulatori CYP-a jesu geni: NROB2, PGRMC1, NR1I3, HNF4A. Glavni su ključni, središnji geni u modulu: oksidoreduktaze uključene u oksidaciju masnih kiselina: HAO1 (hidroksiacid oksidaza 1), enol-koenzim A hidrataza-3-hidroacil-koenzim A dehidrogenaza (EHHADH) i katalaza koja smanjuje apoptozu i prihvaća slobodne radikale. U ostalim modulima koje su ovi autori formirali glavni regulatorni središnji geni jesu geni odgovora akutne faze, kao i oni koji su uključeni u translaciju, to jest stvaranje proteina. Još neki regulatorni geni jesu: SLC10A1 (to je tekući nositelj iz porodice 10, i to član 1, a funkcija mu je da je nosač žučnih kiselina ovisan o Na – uključen u put koji obuhvaća inhibiciju RXR-a induciranu LPS-om IL-1, hepatičnu kolestazu i aktivaciju FXR RXR-a i zato je važan za koordiniranu regulaciju homeostaze žučnih kiselina i metabolizam lijekova); AKR1D1 (aldo-ketoreduktaza iz porodice 1 član 1 – ima ulogu u sintezi žučnih kiselina i metabolizmu steroida) (6).

Farmakogenomika i bol

Genomske varijacije koje utječu na odgovor na farmakoterapiju boli također se ispituju. Enzimi koji metaboliziraju analgetike istražuju se u svrhu otkrivanja povezanosti iz-

među individualnog odgovora na lijek i genskog profila. Polimorfizam CYP2D6 utječe, uz ostale lijekove, i na metabolizam kodeina, tramadola, hidrokodona i oksikodona. Genske varijacije CYP 2C8 i 2C9 utječu na koncentraciju NSAID-a u krvi, kao i na profil popratnih učinaka ovih lijekova. Isto su tako važni geni koji kodiraju opioidne receptore i transportere. No, kako uz genske varijante na uspješnost farmakoterapije utječu i okolišni čimbenici u najširem smislu, što uključuje dob, razne popratne bolesti, primjenu ostalih lijekova, trenutnu funkciju ključnih organa i drugo, za poboljšanje terapije potrebne su dobro dizajnirane studije (7). Samer i suradnici u uvodu citiraju svoju referenciju da se u posljednjih 10 god. mnogo saznalo o modulatorima boli i antinocicepcije, pa je tako bliže realnosti preemtivna terapija boli individualizirana prema pacijentovu genskom zaleđu (8).

Kodein, tramadol i oksikodon aktiviraju se s CYP2D6 u svoje aktivne tvari, morfin, O-desmetil-tramadol i oksimorfon. Kod pacijenata s reduciranom ili odsutnom aktivnošću CYP2D6 – *poor metabolizers* (PM) (7 – 10% bijelaca) javlja se reducirani analgetski efekt (9).

Nakon velikih abdominalnih operacija učestalosti onih koji ne odgovaraju na primijenjenu terapiju na analgeziju tramadolom bile su četiri puta veće kod PM-a nego kod pacijenata s ostalim 2D6 genotipovima (10). Obrnuto, ultrabrzi metabolizatori (UM) za CYP2D6, koji imaju povišenu enzimatsku aktivnost, analgeziju postižu brže, ali imaju i veću opasnost od μ -opioidne toksičnosti nakon primjene tramadola ili oksikodona (11).

Za NSAID, CYP2C9 je važan metabolički put koji utječe na terapijski ishod. Studije u zdravih volontera i *case*-kontrolirane studije u pacijenata demonstrirale su da PM za CYP2C9 imaju reducirani klirens različitih NSAID-a, a to je povezano s povećanom incidencijom gastrointestinalnih komplikacija (7, 12).

Farmakogenomika i bol u djece

Ontogenomika je razvoj metabolizirajućih enzima u tijeku rasta i razvoja djeteta. Posljednjih godina prikupljeno je dosta podataka u studijama o ontogenomici analgetika (13).

Kohortna studija demonstrirala je da djeca koja u bolnoj krizi anemije srpastih stanica imaju neučinkovitu analgeziju kodeinom, s većom vjerojatnošću imaju reduciranu aktivnost CYP2D6 (14).

Proteomika i transkriptomika

PROTEOM je kompletan profil proteina eksprimiran u stanici, tkivu ili biološkom sustavu u određeno vrijeme. Proteom nije fiksna, nego individualna.

Skupina autora ispitala je može li ekspresijski profil P450 reflektirati metabolizam lijekova u jetri. Komparirane su razine P450 mRNA u jetri i u perifernim leukocitima s ko-

respondirajućom P450 jetrenom aktivnošću. Prvo je učinjena genotipizacija za najčešće polimorfizme u bijelaca (CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*3, CYP2D6*4, CYP2D6*6 i CYP3A5*3), a potom P450 fenotipizacija. Isključeni su ispitanici koji su imali nefunkcionalne alele za CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6, kao i oni koji su imali funkcionalni alel za CYP3A5*1 iz korelacijske analize. Jetrene razine mRNA za CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4 pokazale su jaku vezu s P450 aktivnošću u samoj jetri. Međutim, ekspresija CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 i CYP3A4 u leukocitima dokazano reflektira jetrenu aktivnost ovih vrsta P450. Leukociti, prema mišljenju autora, manje su adekvatne stanice za procjenu jetrene aktivnosti CYP2B6 i CYP2D6. Zaključno, studija je pokazala da se kombiniranjem nalaza P450 genotipizacije i fenotipske analize može procijeniti kapacitet metaboliziranja lijekova na temelju P450 u jetri, a u leukocitima s nekim ograničenjima (15).

Metabolomika

METABOLIT je svaka organska molekula, tvar u tijelu koja ima molekularnu masu, $M_r < 1000$ Da (peptidi, oligonukleotidi, šećeri, nukleozidi, organske kiseline, ketoni, aldehidi, amini, aminokiseline, lipidi, steroidi, alkaloidi i lijekovi-ksenobiotici), a ima koncentraciju > 1 mikroM; određuje se iz tjelesnih tekućina (krv, urin, mlijeko, suze, žuč...).

METABOLOM je cjelokupan set metabolita u stanici, tkivu, organu, organizmu i vrsti; čine ga ukupni metaboliti nekoga biološkog sustava. METABOTIP je metabolički fenotip.

METABOLOMIKA je kvantitativna mjera metaboličkih profila modelnih organizama kako bi se karakterizirao fenotip ili fenotipski odgovor na genske ili okolišne promjene. Metabolomika je identifikacija, kvalitativna i kvantitativna mjera metabolita koji sudjeluju u biokemijskim putovima. To je „-omika“ malih molekula.

Metabolomika stvara metaboličke potpise, prati i mjeri fluks (protok) metabolita, prati enzimsku kinetiku, identificira fenotip, prati interakcije gena i okoliša, identificira funkcije nepoznatih gena te bilježi učinke lijekova. Vrijednost primjene metabolomike leži u mogućnosti otkrivanja i određivanja bioloških markera kao indikatora na primjer razvoja bolesti ili učinka lijeka (16).

Smatra se da se geni i okolišni faktori različitih populacija toliko razlikuju da će metabolomika pomoći i u epidemiološkim studijama (17).

FDA/NIH definirala je 1999. pojam „biomarker“: to je karakteristika koja se objektivno mjeri i validira kao indikator normalnih bioloških procesa, patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapijske intervencije. Definiciju su 2001. godine prihvatili stručnjaci udruženi u „Biomarker Definition Working Group“. Biomarkeri pomažu dijagnozi, prognozi, procjeni odgovora na liječenje, a također su vrlo korisni u racionalizaciji razvoja novih lijekova. Da bi se ne-

što proglasilo biomarkerom, mora biti senzitivno, specifično i ponovljivo.

Osnovni principi u metabolomici jesu analiza cilja – kvantitativna analiza supstrata i/ili nastalih metabolita ciljnog proteina; metaboličko profiliranje – kvantitativna analiza serije metabolita koji pripadaju nekoj skupini spojeva ili sudjeluju u određenim metaboličkim putovima (šećeri, lipidi, organske kiseline). Metaboličkim profiliranjem dobivamo metabolički *fingerprinting* – analizu endometabolita i metabolički *footprinting* – analizu egzometabolita.

Karakterizacija bolesti na molekularnoj razini u središtu je interesa mnogih područja moderne medicine, jer daje pogled na razvoj individualno prilagođenoga terapijskog pristupa. Metabolomika je novo područje, koje obećava karakterizaciju fenotipa različitih bolesti i pronalaženje jedinstvenog osobnog metabolita, koji će predvidjeti odgovor na terapiju. Analitičke metode bolesnikova uzorka, kao masena spektrometrija ili NMR spektroskopija podloga su za metabolomički pristup. Taj se pristup sastoji u opsežnu pregledu metabolita, čime dobivamo „otisak poput jagodice prsta (potpis)“ za pojedini uzorak. Metabolomički pristup u dječjoj dobi zanimljiv je jer se za vrijedne i informativne rezultate mogu rabiti uzorci koji se prikupljaju neinvazivno (na primjer urin ili kondenzat zra-ka izdahnutog iz pluća). Mnoge multifaktorske bolesti mogu imati slične kliničke simptome, no svejedno su heterogene na molekularnoj razini, iz čega proizlazi da je svaka bolest jedinstvena – ovisno o individualnom pacijentu. Poželjno bi bilo liječiti individualiziranom terapijom. Za razvoj personalizirane terapije bolesti se moraju definirati i karakterizirati na molekularnoj razini (18).

Postupci analize metabolita jesu: HPLC (visokorazlučna tekućinska kromatografija), plinska kromatografija, tekućinska kromatografija, masena spektroskopija (19, 20), kapilarna elektroforeza (CE) povezana s MS-om, NMR spektroskopija (4, 17). Masena spektrometrija i NMR spektroskopija brze su moderne laboratorijske metode koje omogućuju identifikaciju i profil biomarkera koji obilježava potfenotipove bolesti, što je podloga za razvoj novih, ciljanih lijekova, kojima bismo imali pravu terapiju za pojedinog bolesnika. Pojam metabolomika najviše se približava pojmu fenotip i opisuje poput „otiska prsta, potpisa“ interakciju pacijentova genotipa i okoliša u najširem smislu. Masena spektrometrija, najčešće kombinirana s kromatografskim separacijskim metodama, omogućuje da se različite molekule u uzorku razdvoje na temelju svoga odnosa mase prema naboju i onda prezentiraju u spektru, dok 1H (proton)-NMR spektroskopija omogućuje detekciju gotovo svih metabolita u uzorku koji sadržavaju proton, jer različite molekule produciraju različite signale u NMR spektru. NMR spektroskopija ne zahtijeva prethodnu pripremu uzorka.

Metabolomika i bol

Cilj pronalaženja farmakoloških biomarkera tijekom primjene analgetika za liječenje kronične boli mora biti razvijanje

modela na podlozi mehanizama farmakokinetike i farmakodinamike, koji mogu karakterizirati i predvidjeti odgovor središnjega živčanog sustava na analgetike, i to i u akutnim fiziološkim i u kroničnim patološkim stanjima.

Autori su rabili nespecifičnu metabolomiku, pokazali su da je metabolizam sfingomijelina-ceramida promijenjen u stražnjem rogu (štakori) kod neuropatske boli i da je endogeni metabolit N,N-dimetilsfingozin povišen (engl. *upregulated*), što je uzrokovalo hipersenzitivnost odnosno hiperalgeziju. Autori tvrde da su otkrili jedan endogeni lipidni metabolit kao biomarker u neuropatskoj boli (21, 22).

Metabolomika analgetika iz urina omogućuje detekciju osoba koje prakticiraju samoterapiju boli ili analgetike uzimaju iz navike (23).

Zaključno o metabolomici

Pogrešno je očekivati jedan jedinstveni biomarker ili analit za svaku dijagnozu. Bolesti su kompleksne i zato treba shvatiti da učinak nekog lijeka zapravo mijenja kombinaciju više metabolita (24 - 29).

Autori priželjkuju u budućnosti laboratorijsku opremu koja bi mogla brzo otkriti novi specifični metabolit-biomarker čim se biološka tekućina stavi u uređaj i odmah usporediti pronađeni biomarker s bioinformatikom i statistikom (30, 31). Slično priželjkuju Westhof i suradnici. Isto tako, smatraju da u budućnosti metode NRM i MS trebaju otkrivati metabolite koji su pojedini specifični optički stereoizomeri tvari (27).

Povezanost „-omika“

Bolesnici s istim genotipom ne moraju imati istu metaboličku aktivnost, zbog promijenjene genske ekspresije, što je uvjetovano okolišnim faktorima (dob, spol, prehrana, navike, akutna bolest, primjena drugih lijekova).

Epigenetske modifikacije kao DNA metilacija, modifikacija histona i ekspresija nekodirajuće RNA koja pridonosi ekspresiji DNA gena također mogu utjecati na učinkovitost istraživanog lijeka.

Kao pokušaj da se na dobrobit bolesnika ipak u kliničku praksu uvede neprestano nove spoznaje iz isprepletenih „-omika“ javlja se pristup koji integrira ciljane metaboličke pretrage sa specifičnim genotipskim testovima da bi se poboljšalo predviđanje učinkovitosti odgovora na lijek. Nove metode dopuštaju kvantitativna mjerenja u serumu probnih lijekova za najvažnije jetrene enzime i njihovih metabolita nakon primjene „mikrodoza“ poznatih probnih lijekova. Ovaj način fenotipizacije naziva se ciljane metabolomika. Prednost joj je što se dobiva metabolička krivulja s jasno određenim terapijskim prozorom između željene terapijske korisnosti i prihvatljive eventualne toksičnosti potrebnog lijeka za pojedinog bolesnika, i to nakon nekoliko sati. Puno dugotrajniji je pristup metodom urinarnog klirensa kreatinina (glomerularna filtracija, ml/min), koji označava varijabilnost u eliminaciji među bolesnicima. Ta-

kvim pristupom dobivamo predviđanja koja se odnose na metabolički kapacitet, afinitet receptora i površinu ispod krivulje za aktivne metabolite. Iako se od ovoga kliničkog pristupa ne može očekivati da jednoznačno identificira specifičnu toksičnost ili čak determinira potrebnu dozu za individualnog bolesnika, i to zato što u obzir ne uzima ekspresiju receptora za lijek niti unutarstanične razlike u prijenosu signala, ipak dopušta sigurnije i efikasnije titriranje lijeka u individualnog bolesnika. Ovaj novi pristup zove se *BIOLOGIC SYSTEM PANEL*.

Osim što podatci dobiveni različitim „-omikama“ mogu pridonijeti učinkovitosti lijeka u pojedinca, vrlo je važno što se na taj način može smanjiti vjerojatnost nastanka nuspojava i toksičnosti lijekova (25, 26, 28).

Varijabilnost na razini transportera i receptora za lijekove

Učinkovitost analgezije u ovisnosti o genomu dalje komplicira genski polimorfizam na farmakodinamskoj razini, odnosno kodiranje receptora za lijekove. Na primjer, ABCB1 je polimorfni gen koji kodira P-glikoprotein (P-gp), a češće su poznata dva tipa SNP-a za ABCB1 (C3435T i G2677T/A). μ -opioidni receptor kodirani je genom OPRM1, a A118G SNP prisutan je u 10 – 15% bijelaca.

Odgovor na lijek pod utjecajem je i polimorfizma u farmakodinamici, što znači polimorfizma ciljnih točaka lijeka u organizmu. Poznato je da su varijante opijatnih receptora povezane sa smanjenim staničnim signalnim putovima koji određuju samu percepciju boli. Fenotip bolesnika jedino kod monogenskih bolesti može biti predviđen samo genotipom. Primjer takve monogenske bolesti jest Gaucherova bolest.

Tzv. etki i suradnici ispitivali su jesu li tramadol ili njegov aktivni metabolit O-desmetiltramadol supstrati za transporter organskih kationa – OCT1, a također utječe li polimorfizam gena za OCT1 na farmakokinetiku tramadola i O-desmetiltramadola. Tramadol nije promijenio ulaz u hepatocite kod pretjerane ekspresije OCT1. Koncentracija tramadola u plazmi dobrovoljaca nije dakle ovisna o njihovom OCT1 genotipu. Međutim, O-desmetiltramadol je pokazao nisku permeabilnost kroz membrane i pretjerana ekspresija OCT1 (engl. *overexpression*) povisila je preuzimanje u hepatocite O-desmetiltramadola 2,4 puta. Osobe s polimorfizmom OCT1 bez funkcije imale su znatno više plazmatske koncentracije O-desmetiltramadola i produženu miozu kao surogat opioidnog učinka. Studijom su pokazali da polimorfizam OCT1 mijenja terapijski učinak indirektno, mijenjajući ulazak u stanicu njegova metabolita (29).

Bolesnici koji imaju mutacije gena za melanokortin 1 receptor (MC1R) imaju veće potrebe za desfluranom tijekom anestezije nego osobe s normalnim genotipom.

Enzimi

Enzimi faze I metabolizma lijekova (enzimi P450, CYP enzimi)

Klasifikacija i nomenklatura CYP enzima standardno je do-

govorena. Na primjer: CYP3A4*15 A-B: 3 je porodica s > 40% homologije ovisne o sekvenciji; A je potporodica s > 55% homologije ovisne o sekvenciji; 4 je izoenzim; *15 A-B je alel.

U istraživanju je određena učestalost genskih polimorfizama za najvažnije enzime koji sudjeluju u metaboliziranju lijekova (CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 i CYP3A4) u hrvatskoj populaciji odraslih osoba. Za 2D6 raspodjela učestalosti ispitivanih alela slična je vrijednostima za druge europske bijele populacije. Ustanovljene su vrijednosti od 3,1% za mutirane homozigote i 4,1% za genske duplikacije. Učestalost polimorfnih alela i genotipova CYP2C9 u hrvatskoj populaciji također je slična onoj u drugim srednjoeuropskim populacijama (približno 3,5% sporih metabolizatora). Učestalost pak alela CYP3A4*1B u hrvatskoj populaciji (2,8%) nešto je niža od vrijednosti koje se navode za neke europske populacije (oko 7%) (30).

Premda samo određivanje sekvencije kodirajućih gena za enzime koji metaboliziraju analgetike, kao uostalom i druge lijekove, nije ispunilo očekivanja kliničara da će dobiti jasnu pomoć u personaliziranom doziranju lijekova, nova studija koju su proveli Sistonen i suradnici pokazala je kako se, kombinirajući polimorfizme metabolizirajućih enzima i polimorfizam farmakodinamskoga ciljnog mjesta djelovanja lijeka, a udruženo s kliničkim znakovima, mogu dobiti vrijedni podatci koji u blizu 90% pacijenata mogu predvidjeti rizične individuuze za nuspojave kodeina. Genotipovi CYP2D6 i ABCB1, kad se kombiniraju s kliničkim simptomima nuspojava kodeina, predviđaju vrlo senzitivno i specifično pacijente rizične za toksične efekte (31).

Enzim citokrom 2E1 zove se i 4-nitrofenol 2-hidroksilaza. Teoretska izoelektrična točka za elektroforezu CYP2E1 je 8,22 (Pi). Fiziološki metabolički putovi za 2E1: metabolizam masnih kiselina, metabolizam triptofana, degradacija gama-heksaklorocikloheksana. Funkcije enzima 2E1 jesu: katalitičke aktivnosti, vezanje kationa, prijenos elektrona, vezanje hema, vezanje metalnih iona, monooksigenazna aktivnost, oksidoreduktazna aktivnost, djelovanje na parne donore, s inkorporacijom ili redukcijom molekularnog kisika O₂ uz reducirani flavin ili flavoprotein kao donor te inkorporacija jednog atoma kisika.

Najbolji supstrat za funkcionalno ispitivanje i metaboličko fenotipiziranje aktivnosti CYP2E1 jest centralno djelujući miorelaksator klorzoksazon (CHZ) koji se metabolizira u 6-hidroksiklorzoksazon (6-OH CHZ), a određuje se u plazmi. Vrijednost klorzoksazona pokazana je HPLC/DAD-om na životinjskome modelu (32).

Enzimi faze II metaboliziranja lijekova

Glavna svrha enzimske faze II u metabolizmu jest povećanje polarosti lijekova (topljivosti u vodi), a time je olakšano i izlučivanje iz organizma. Hidrofobni ksenobiotici koji se ne mogu prevesti u polaran oblik zadržavaju se u adipoznom tkivu.

UDP – glukuronozil transferaze (UGT)

Obavljaju 60% metabolizma paracetamola. UDP glukuronična kiselina donor je glukuronida. Postoje dvije porodice enzima, UGT1 i UGT2 s ukupno više od 35 izoenzima. Enzimi porodice UGT1 u ljudi produkt su ekspresije jedinstvenoga gena smještenog na kromosomu 2. Enzimi porodice UGT2 produkt su različitih individualnih gena uočljivih na jedinstvenom klasteru, lokaliziranom na kromosomu 4 u ljudi. Potporodica UGT2B sadržava izoforme UGT 2B4, 2B7, 2B10, 2B11, 2B15, 2B17 i 2B28 (33, 34).

U porodici 1 jesu enzimi čiji su supstrati bilirubin, amini, fenoli, a mogu konjugirati i lijekove: analgetike, spolne hormone, kemoterapeutike i drugo. Porodica 2 sadržava enzime čiji su supstrati steroidi, žučne kiseline i opiodi. Morfin je supstrat za 2B7 izoenzim.

No podjela supstrata nije baš tako isključiva. Na primjer, paracetamol je supstrat za mnoge izoenzime iz potporodice 1A (1A6 i u manjem opsegu 1A9) i 2B.

Izoforma enzima glukuronozil transferaza 1A1 koja konjugira bilirubin, pojavljuje se u zdrave hrvatske djece predškolske dobi u homozigotnome recesivnom obliku u 9,8% ispitanika. U njih su razine bilirubina povišene (34).

Li i suradnici opisali su za UGT2B7 strukturu haplotipa, a kvantificirali gensku raznolikost i diferencijaciju i za CYP2B6 i za UGT2B7 gene. Genotipizirali su jedan intron i tri promotorska SPN-a (35).

Sulfotransferaze

Obavljaju 35% metabolizma paracetamola procesom sulfuriranja; pritom je 3'-fosfoadenozin-5'-fosfosulfat (PAPS) kosupstrat koji donosi sulfatnu skupinu.

Glutation-S-transferaze (GST)

Glutation je tripeptid, štiti stanice od oksidativnog oštećenja tako da služi kao sulfurhidrilni pufer. Oksidativni stres dovodi do poremećaja ravnoteže u glutationskom putu.

Primarna funkcija glutacion-S-transferaza jest konjugacija tripeptida glutaciona s tvarima koje sadržavaju polarnu, elektrofilnu skupinu. Tako se sintetizira derivat koji je jače topljiv i manje toksičan.

Vjerojatno je da za enzim glutacion transferazu postoje osobe kojima nedostaju neke forme ovog enzima, odnosno da postoji polimorfizam ovog enzima faze II metabolizma lijekova, a smatra se da su takve osobe rizične za razvoj malignoma.

Reakcije konjugacije reaktivnih metabolita lijekova s glutacionom (GSH) znače detoksikaciju. Spajanje s GSH može biti spontano ili posredovano glutacion-S-transferazama. Ako je posrijedi konjugacija s GSH uz pomoć glutacion-S-transferaza, onda genski deficiti mogu biti uzrok nuspojava jer nastaju reaktivni metaboliti lijekova. Ovaj navod istakli su u svom istraživanju Dragovic i suradnici, a rabili su četiri tipa

rekombinantnih glutacion-S-transferaza: hGST A1-1, hGST M1-1, hGST P1-1, hGST T1-1 (36).

Spoznaje i perspektive za individualizirano doziranje nekih analgetika

PARACETAMOL

Najčešće se u studijama ispituju biomarkeri hepatotoksičnosti, kao u studiji Kumara i koautora. Oni su 5 dana životinjama oralno davali ugljikov tetraklorid; 1000 mg/kg paracetamola; metotreksat. Stvarno nastalo oštećenje jetre provjeravali su standardnom biokemijom: određivanjem alkalne fosfataze, AST-om, ALT-om, kao i biopsijom jetre. Nespecifičnu metabolomiku u svrhu profiliranja radili su s UPLC/TOF-MS (*time of flight MS*). Rezultate su statistički obradili, potom su pretražili i usporedili baze podataka. Definirali su biomarkere jetrene toksičnosti kod primjene ovih triju stranih tvari. Novonađene biomarkere provjerili su dodatnim metabolomičkim profiliranjem – iz urina štakora učinjeno je specifično, ciljano metaboličko profiliranje s plinskom kromatografijom/masenom spektrometrijom i kapilarnom elektroforezom/masenom spektrometrijom. Nakon ove dvije razine istraživanja pokazali su da su steroidi, aminokiseline i žučne kiseline bili metabolički promijenjeni u tretiranih životinja u odnosu na netretirane životinje. Autori su odlučili odabrati: 11-beta-hidroksiandrosteron, epiandrosteron, estron, 11-dehidrokortikosteron, glicin, alanin, valin, leucin, DL-ornitin, 3-metilhistidin, kolnu kiselinu i litokolnu kiselinu kao biomarkere hepatotoksičnosti, jer su njima obuhvatili tri različita metabolička puta (37).

U sljedećoj studiji paracetamol je također primijenjen u toksičnim dozama. Ispitivana je metabolomika urina kod štakora s pomoću 1H-NMR spektroskopije. U rezultatu su se pokazali povišen laktat, snižen 2-oksoglutarat (viđeno i kod toksičnog efekta hepatotoksina hidralazina), snižen TMAO (trimetilamin-N-oksid), snižen allantoin, hipurat i TCA. Glavni metaboliti paracetamola jesu: sulfat, glukuronid, N-acetil-cistein-konjugati, a uz to u urinu je prisutan i nemetabolizirani paracetamol. Metaboliti u urinu razlikuju se u ovisnosti o dozi paracetamola koja je primijenjena. Nakon vezanja paracetamola s glutacionom nastaje metabolit merkaptourat, koji se izlučuje urinom. Kad se zalihe glutaciona istroše, slijedi porast N-acetil-para-benzokinon-imina (NAPQI). Kod visokih doza sistem s citokrom P450 enzimima metabolički je insuficijentan. Predtretman eksperimentalne životinje fenobarbitonom smanjuje u urinu količinu nemetaboliziranog paracetamola, dok razinu sulfata, glukuronida i merkaptourata ne povisuje značajno. Fenobarbiton inducira P450, čime nastaje i veća količina NAPQI. Oksidaciju paracetamola obavlja u ljudi CYP 2E1 (manje 1A2 i 3A4). Kod nastalog deficita GSH merkaptourat u urinu može samo malo porasti, što znači da se počinje gomilati NAPQI. NA-

PQI izaziva oksidaciju i arilaciju u tijelu. U jetri na mitohondrijima izaziva oksidaciju tiolnih skupina, nastaje disfunkcija mitohondrija i razvoj kisikovih reaktivnih tvari – kod paracetamolske toksičnosti primjećuje se porast oftalmičke kiseline, biomarkera oksidativnog stresa (38). S pomoću LC/MS-a, na sličnom animalnome modelu, Sun i suradnici određivali su u urinu metabolit N-acetil-cistein-acetaminofen (39).

Svrha iduće studije bila je određivanje N-acetil-cistein (NAC)-konjugata paracetamola u ljudskom urinu. Nakon razdvajanja LC-a autori su rabili mijenjanje polariteta u tri-kvadrupol M (LC/MS). Metoda se koristi snimkom nastalom gubitkom neutralnosti ili monitoringom multiplih reakcija (MRM-EPI metoda) iz predviđenog odnosa vrijednosti mase i naboja (M/Z). Brzo se dobiva selektivna detekcija NAC-konjugata. Korisnost metode provjerili su analizom NAC-konjugata nakon jedne peroralne doze. Ovom metodom dobiju se tri konjugata paracetamola (dva od tih konjugata inače su prisutna sporadično kao rezultat metabolizma hidroksil-paracetamola i metoksi-paracetamola). Također su testirali detekciju reaktivnih metabolita diklofenaka, a NAC im je bio hvatajuća tvar. U tom dijelu zaključuju da je njihova metoda jednako dobra kao ona koja rabi glutation (GSH) kao hvatajuću tvar (40).

Loo i suradnici izradili su simulacijski model za predviđanje (*screening*) prisutnosti paracetamola i ibuprofena. Koristili su se metodom *orthogonal projection to latent structures discriminant analysis* (OPLS-DA) *algorithm*. Za optimalni paracetamolski predikcijski model najprije su trebali učiniti preprocesiranje parametara (normalizacija, širina vrpce u spektru, skaliranje, ulazni parametri). Rezultat modeliranja bio je vrlo dobar – optimalizirani i validirani paracetamolski model ispravno je predvidio 98,2%, a ibuprofenski model korektno je predvidio 99% uzoraka urina koji su doista sadržavali metabolite ovih lijekova (41).

Winnike i suradnici tražili su individualne pacijente koji su podložni medikamentnom oštećenju jetre. U studiji su ispitanici tijekom sedam dana uzimali 4 grama paracetamola i svakodnevno im je skupljan urin, metabolomički obrađen, a uz to je svakodnevno određivana vrijednost alanin-aminotransferaze (ALT) u krvi. Uspjeli su dokazati da su kod nekih ispitanika relativno brzo nakon započete terapije, a svakako prije povišenja ALT-a u krvi, u metabolomičkoj obradi urina dokazani metaboliti koji nastaju od toksičnog metabolita NAPQI, a koji mogu poslužiti kao prediktori medikamentnog oštećenja jetre, no za njegovu statistički značajnu predikciju potrebno je uključiti i endogene metabolite. Smatraju da bi njihov pristup „rane farmakometabolomičke intervencije“ mogao biti testiran u kliničkim studijama s drugim, potencijalno hepatotoksičnim lijekovima (42).

N-acetil-benzokinon-imin u normalnim se dozama brzo detoksificira reduciranim glutationom i izlučuje urinom nakon konjugacije s cisteinom i merkapturinom kiselinom.

Skupina autora razvila je jednostavnu i pouzdanu metodu za kvantificiranje paracetamola i NAPQI iz uzorka plazme od svega 0,1 ml, što je za pedijatrijsku populaciju izrazito povoljno. Rabili su HPLC obrnute faze i UV detektor (43, 44).

Obavljeno je opsežno pretkliničko animalno testiranje akutne i kronične toksičnosti paracetamola. Metaboličke promjene nađene NMR-om i UPLC/MS-om urina kombinirane su s histopatološkim nalazima u jetri, kao i serumskim AST-om, ALT-om i bilirubinom. Cilj ispitivanja bila je detekcija metabolita najbolje povezanog s paracetamolskom hepatotoksičnošću. Obje metode pokazale su smanjenje antioksidansa i energetskih metabolita. Posebno je bio zanimljiv nalaz NMR-a, koji je pokazao pad u razini 1-metilnikotinata u urinu. Ova molekula povezana je s putom biosinteze glutationa i stvara se za vrijeme konverzije S-adenozilmetionina u S-adenozilhomocistein. Ciljani je LC/MS/MS pokazao smanjenje S-adenozilmetionina (45).

Ovi su rezultati potvrđeni u sljedećoj studiji koja je ispitala regulaciju transsulfuracijskog puta u uvjetima toksičnosti za jetru (NMR, LC/MS), ali i podatke genske ekspresije: nađeno je da u štakora nakon davanja paracetamola nalazimo smanjenu ekspresiju gena uključenih u transsulfuracijski put u jetri, dok su u urinu povišeni S-adenozilmetionin (LC/MS) te taurin i kreatin (NMR) (46).

Nastavak istraživanja na ovome modelu pokazao je da konjugirani metabolit paracetamola N-acetilcistein-paracetamol u urinu dobro korelira sa serumskim AST-om, bilirubinom, kreatinom i histopatologijom, a u značajnoj je antikorelaciji s razinama S-adenozilmetionina, što je prema njihovu mišljenju dobar indikator paracetamolske hepatotoksičnosti. Upotrijebljeni su UPLC/MS i NMR u procjeni ekskrecijske kinetike (prisutnosti u urinu) glavnih metabolita lijeka. Davali su 400 mg/kg odnosno 1600 mg/kg paracetamola. N-acetil-L-cistein-acetaminofen (APAP-NAC) pokazao se kao metabolit sa statistički signifikantnom korelacijom s rutinskim kliničkim biokemijskim nalazima, ali i histopatološkim podacima u štakora. Zaključuju da se potencijal toksičnosti lijeka može procijeniti studijom metaboličkog profila lijeka (47).

TRAMADOL

Glavnina metaboliziranja tramadola zbiva se u mikrosomima jetre. Tramadol je supstrat za 2D6 i 3A4 (54). Osnovni metabolički put jesu O i N-demetilacija (CYP3A4). Nastali metaboliti su O-desmetiltramadol i N-desmetiltramadol (koji se naziva i nortramadol) (48). Autori su pokazali s pomoću GC/MS-a urina životinja nakon derivatizacije da od spojeva kemijske strukture poput tramadola nastaje još nekoliko metabolita.

Lijekovi kao tramadol, koji imaju dualni FD učinak, različito će iskazivati učinke kod pacijenata koji imaju različitu genski uvjetovanu aktivnost ključnoga metabolizirajućeg enzima 2D6. Svojstva tramadola ići će u smjeru monoami-

nergičke, antidepresorne molekule bez opioidne aktivnosti kod CYP2D6 slabih metabolizatora, dok će kod ultrabrzih metabolizatora opioidergička svojstva biti naglašena.

NESTEROIDNI ANTIREUMATICI

Nesteroidni antireumatici (NSAID) upotrebljavaju se opsežno i kao analgetici i kao antipiretici. Kako su osnovne nuspojave ovih lijekova vezane uz oštećenja gastrointestinalnog trakta, Um i suradnici tražili su biomarkere GI oštećenja. Skupljali su urin tijekom pet sati nakon davanja vrlo visokih doza celekoksiba, indometacina odnosno ibuprofena. Multivarijantnom analizom podataka tražili su spektralni uzorak metabolita koji bi bio povezan upravo uz NSAID. NMR spektre klasterirali su prema kriterijima za oštećenje želuca. Rezultirajući metaboliti alantoina, taurina i dimetilamina biomarkeri su oštećenja želuca NSAID-om, pa mogu biti i biomarkeri za njegovo predviđanje (49).

INHIBITORI CIKLOOKSIGENAZE 2

Primjena ovih novijih skupina NSAID-a nikada nije zaživjela u dječjoj dobi pa su sporadična istraživanja vrijedna pažnje. Hullett i koautori određivali su farmakokinetičke parametre iz plazme nakon intravenskog davanja 1 mg/kg parekoksiba, inhibitora ciklooksigenaze 2. Pokazali su jasno da je dob linearno povezana s klirensom parekoksiba i da sa svakom godinom života raste za 5%. Našli su sigmoidni odnos između dobi, klirensa i raspodjele parekoksibova metabolita valdekokoksiba. Da bi sazrijevanje klirensa i raspodjele u djece doseglo 50% zrelosti u odnosu na odrasle, potrebno je da dijete dosegne 87 tjedana postmenstrualne dobi. Rabili su doze na bazi alometrije. Zaključuju da bi u djece do 2 godine bilo potrebno sniženje doze upravo zbog metaboličkog sazrijevanja djeteta (50).

BIOINFORMATIKA I BIostatistika u GENOMICI, TRANskriptomici i METABOLOMICI

Eksplozivna količina podataka koju generiraju moderne metode molekularne biologije i nove tehnike medicinske biokemije (HPLC, MS, NMR) može se u budućnosti rabiti samo uz razvijene specifične informatičke i statističke pakete, i za donošenje kliničkih odluka u terapiji pojedinca i za predviđanje sličnih situacija za buduće bolesnike (51).

Osvrt na primjenu „-omika“ u djece

U kliničkoj praksi učinkovitost analgezije, i u odraslih i u djece, mora se objektivizirati nekom od izabranih i prilagođenih skala boli. Potrebno je izabrati pravi lijek, ordinirati ga na vrijeme, adekvatnim putem primjene i u ispravnoj dozi. Osim toga nužno je izbjeći nuspojave analgetika. Prema istraživanjima koja su uslijedila nakon završetka Projekta humanoga genoma nijedan od dva navedena cilja terapije boli lijekovima ne može se za pojedino dijete ispuniti doziranjem samo na temelju djetetova genoma. U obzir treba

uzeti najrazličitije okolišne čimbenike, ponajprije dob djeteta. Primjena koncepta personalizirane medicine u području primjene analgetika kod djece u liječenju akutne i kronične boli još je udaljen i zasad nedostižan cilj. Manjak robusnosti i reproducibilnosti glavni su nedostaci u kliničkim studijama koje istražuju utjecaj farmakogenomike na područje kliničke primjene analgetika, a jedan od najvažnijih razloga je neodgovarajući dizajn ispitivanja, posebice u pogledu manjkavog broja ispitanika. Druge zapreke implementaciji farmakogenomskih testova u svakodnevnoj primjeni jesu etički, pravni i socijalni razlozi, manjak raspoloživih sredstava i manjak odgovarajućih kvalitetnih znanstvenih informacija (52). Nadamo se da će buduća istraživanja bazirana na novim spoznajama pridonijeti da se približimo primjeni koncepta personalizirane medicine na ovom području.

LITERATURA

- Monte AA, Heard KJ, Vasilou V. Prediction of drug response and safety in clinical practice. *J Med Toxicol* 2012;8:43–51.
- Spintge R, Loewy JV. At a Crossroads. Big Questions- Little Knowledge in Achievements, With Issues of Translation. *Music and Medicine* 2011;3:209–12.
- Coen M, Ruepp SU, Lindon JC i sur. Integrated application of transcriptomics and metabolomics yields new insight into the toxicity due to paracetamol in the mouse. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35:93–105.
- Clayton TA, Lindon JC, Cloarec O i sur. Pharmacometabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 2006;440:1073–77.
- Neville KA, Becker ML, Goldman JL, Kearns GL. Developmental pharmacogenomics. *Paediatr Anaesth* 2011;21:255–65.
- Yang X, Zhang B, Molony C i sur. Systematic genetic and genomic analysis of cytochrome P450 enzyme activities in human liver. *Genome Research* 2010;20:1020–36.
- Stamer UM, Zhang L, Stüber F. Personalized therapy in pain management: where do we stand? *Pharmacogenomics* 2010;11:843–64.
- Samer CF, Dayer P, Desmeules JA. How close are we to individual analgesic adjustment according to a patient's genotype? *Personalized Med* 2011;8:289–292.
- Rollason V, Samer C, Piguet V, Dayer P, Desmeules J. Pharmacogenetics of analgesics: toward the individualization of prescription. *Pharmacogenomics* 2008;9:905–33.
- Stamer UM, Lehnen K, Höthker F i sur. Impact of CYP2D6 genotype on postoperative tramadol analgesia. *Pain* 2003;105:231–8.
- Kirchheiner J, Keulen JT, Bauer S, Roots I, Brockmüller J. Effects of the CYP2D6 gene duplication on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of tramadol. *J Clin Psychopharmacol* 2008;28:78–83.
- Samer CF, Desmeules JA, Dayer P. Individualizing analgesic prescription. Part II: pharmacogenetics of anti-inflammatory analgesics and co-analgesics. *Pers Med* 2006;3:271–97.
- Jakobović J. Specifičnosti farmakokinetike i farmakodinamike analgetika u djece. *Paediatr Croat* 2011;55:35–41.
- Brousseau DC, McCarver DG, Drendel AL, Divakaran K, Panepinto JA. The effect of CYP2D6 polymorphisms on the response to pain treatment for pediatric sickle cell pain crisis. *J Pediatr* 2007;150:623–6.
- Temesvári M, Kóbori L, Paulik J, Sárváry E, Belic A, Monostory K. Estimation of drug-metabolizing capacity by cytochrome P450 genotyping and expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2012;341:294–305.
- Robinette SL, Holmes E, Nicholson JK, Dumas ME. Genetic determinants of metabolism in health and disease: from biochemical genetics to genome-wide associations. *Genome Med* 2012;4:30.
- Bictash M, Ebbels TM, Chan Q i sur. Opening up the „Black Box“: metabolic phenotyping and metabolome-wide association studies in epidemiology. *J Clin Epidemiol* 2010;63:970–9.
- Baraldi E, Carraro S, Giordano G, Reniero F, Perilongo G, Zacchello F. Metabolomics: moving towards personalized medicine. *Ital J Pediatr* 2009;35:30–4.
- Roux A, Lison D, Junot C, Heilier JF. Applications of liquid chromatography coupled to mass spectrometry-based metabolomics in clinical chemistry and toxicology: A review. *Clin Biochem* 2011;44:119–35.
- Wagner S, Scholz K, Sieber M, Kellert M, Voelkel W. Tools in metabolomics: An integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine. *Anal Chem* 2007;79:2918–26.
- Patti GJ, Yanes O, Shriver LP i sur. Metabolomics implicates altered sphingolipids in chronic pain of neuropathic origin. *Nat Chem Biol* 2012;8:232–4.
- Legg K. Metabolomics: Gaining insight into pain. *Nat Rev Drug Discov* 2012;11:188–9.
- Loo RL, Chan Q, Brown LJ i sur. A comparison of self-reported analgesic use and detection of urinary ibuprofen and acetaminophen metabolites by means of metabolomics: the INTERMAP Study. *Am J Epidemiol* 2012;175:348–58.
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. Metabolomics techniques and applications to pharmaceutical research & development. *Pharmaceut Res* 2006;23:1075–88.
- Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E i sur. Summary recommendations for standardization and reporting of metabolic analyses. *Nat Biotechnol* 2005;23:833–8.
- Holmes E, Wilson ID, Nicholson JK. Metabolic phenotyping in health and disease. *Cell* 2008;134:714–7.
- Westhoff M, Litterst P, Freitag L, Baumbach JI. Ion mobility spectrometry in the diagnosis of sarcoidosis: results of a feasibility study. *J Physiol Pharmacol* 2007;58 Suppl5:739–51.
- Vazquez ES. Personalized therapy: an interdisciplinary challenge. *Pers Med* 2004;1:127–30.
- Tzvetkov MV, Saadatmand AR, Lötsch J, Tegeder I, Stingl JC, Brockmüller J. Genetically polymorphic OCT1: another piece in the puzzle of the variable pharmacokinetics and pharmacodynamics of the opioidergic drug tramadol. *Clin Pharmacol Ther* 2011;90:143–50.
- Božina N. Uloga farmakogenetičkih varijacija u terapiji depresije. (dissertacija). Zagreb, Hrvatska: Sveučilište u Zagrebu; 2005., str.116.
- Sistonen J, Madadi P, Ross CJ i sur. Prediction of codeine toxicity in infants and their mothers using a novel combination of maternal genetic markers. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:692–9.
- Piccoli P, Carrieri M, Salamon F, Bartolucci GB, Manno M. Fenotipizzazione in vivo del CYP 2E1 una nuova metodica per il monitoraggio biologico nell'esposizione occupazionale e sperimentale a benzene. *Drug Safety Update* 2010;3:46–7.
- Nagar S, Rimmel RP. Uridine diphosphoglucuronosyltransferase pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 2006;25:1659–72.
- Marinković N, Pašalić D, Gršković B, Ferenčak G, Honović L, Stavljenić Rukavina A. Genotype frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1A1 promoter gene polymorphism in the population of healthy Croatian pre-scholars. *Coll Antropol* 2008;32:725–9.
- Li J, Menard V, Benish RL, Jurevic RJ i sur. Worldwide variation in human drug-metabolism enzyme genes CYP2B6 and UGT2B7: implications for HIV/AIDS treatment. *Summ Pharmacogenomics* 2012;13:555–70.
- Dragovic S, Boerma JS, van Bergen L, Vermeulen NP, Commandeur JN. Role of human glutathione S-transferases in the inactivation of reactive metabolites of clozapine. *Chem Res Toxicol* 2010;23:1467–76.
- Kumar BS, Chung BC, Kwon OS, Jung BH. Discovery of common urinary biomarkers for hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride,

- acetaminophen and methotrexate by mass spectrometry-based metabolomics. *J Appl Toxicol* 2012;32:505–20.
38. Fukuhara K, Ohno A, Ando Y, Yamoto T, Okuda H. A ¹H NMR-based metabolomics approach for mechanistic insight into acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Pharmacokinet* 2011;26:399–406.
 39. Sun J, Schnackenberg LK, Beger RD. Studies of acetaminophen and metabolite in urine and their correlations with toxicity using metabolomics. *Drug Metab Lett* 2009;3:130–6.
 40. Jian W, Yao M, Zhang D, Zhu M. Rapid detection and characterization of the in vitro and urinary N-acetyl-L-cysteine conjugates using quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and polarity switching. *Chem Res Toxicol* 2009;22:1246–55.
 41. Loo RL, Coen M, Ebbels T i sur. Metabolic profiling and population screening of analgesic usage in nuclear magnetic resonance spectroscopy-based large-scale epidemiologic studies. *Anal Chem* 2009;81:5119–29.
 42. Winnike JH, Li Z, Wright FA, Macdonald JM, O'Connell TM, Watkins PB. Use of pharmaco-metabonomics for early prediction of acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans. *Clin Pharmacol Ther* 2010;88:45–51.
 43. Flores-Pérez C, Chávez-Pacheco JL, Ramírez-Mendiola B i sur. A reliable method of liquid chromatography for the quantification of acetaminophen and identification of its toxic metabolite N-acetyl-p-benzoquinoneimine for application in pediatric studies. *Biomed Chromatogr* 2011;25:760–6.
 44. Călinescu O, Badea IA, Vlădescu L, Meltzer V, Pincu E. HPLC separation of acetaminophen and its impurities using a mixed-mode reversed-phase/cation exchange stationary phase. *J Chromatogr Sci* 2012;50:335–42.
 45. Sun J, Schnackenberg LK, Holland RD i sur. Metabonomics evaluation of urine from rats given acute and chronic doses of acetaminophen using NMR and UPLC/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008;871:328–40.
 46. Schnackenberg LK, Chen M, Sun J i sur. Evaluations of the trans-sulfuration pathway in multiple liver toxicity studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009;235:25–32.
 47. Preissner S, Kroll K, Dunkel M i sur. SuperCYP: a comprehensive database on Cytochrome P450 enzymes including a tool for analysis of CYP-drug interactions. *Nucleic Acids Res* 2010;38:D237–43.
 48. El-Haj B, Al-Amri A, Ali H. Gas chromatography-mass spectrometry designation and prediction of metabolic dealkylation and hydroxylation reactions in xenobiotics exemplified by tramadol. *J Anal Toxicol* 2009;33:34–40.
 49. Um SY, Chung MW, Kim KB i sur. Pattern recognition analysis for the prediction of adverse effects by nonsteroidal anti-inflammatory drugs using ¹H NMR-based metabolomics in rats. *Anal Chem* 2009;81:4734–41.
 50. Hullett B, Salman S, O'Halloran SJ, Peirce DB, Davies KM, Ilett KF. Development of a population pharmacokinetic model for parecoxib and its active metabolite valdecoxib after parenteral parecoxib administration in children. *Anesthesiology* 2012;116:1124–33.
 51. Zaretski J, Rydberg P, Bergeron C, Bennett KP, Olsen L, Breneman CM. RS- Predictor models augmented with SMARTCyp reactivities: robust metabolic regioselectivity predictions for nine CYP isozymes. *J Chem Inf Model* 2012;52:1637–59.
 52. Cregg R, Russo G, Gubbay A, Branford R, Sato H. Pharmacogenetics of analgesic drugs. *British Journal of Pain* November 2013;7:189–208.



ADRESA ZA DOPISIVANJE:

Prim. dr. sc. Diana Butković, dr. med.
 Klinika za dječje bolesti Zagreb,
 10000 Zagreb, Klaićeva 16
 e-mail: diana.butkovic1@gmail.com

PRIMLJENO/RECEIVED:

11. 11. 2013.

PRIHVAĆENO/ACCEPTED:

20. 1. 2014.

