УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Драгана Драгаш Миловановић

УТИЦАЈ ГЕНСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА МЕТАБОЛИШУЋИХ ЕНЗИМА CYP3A5, CYP2C8 И CYP1A2 НА ЕФИКАСНОСТ И БЕЗБЕДНОСТ ТЕРАПИЈЕ КАРБАМАЗЕПИНОМ КОД ДЕЦЕ

докторска дисертација

Крагујевац, 2016. година

САДРЖАЈ

1. УВОД

1.1. Фармакогенетика

Фармакогенетика је научна област која, уз примену нових сазнања из области генетике, биохемије и фармакологије, проучава генске варијације које узрокују индивидуалне разлике у ефикасности и безбедности примењеног лека. Развија се од средине двадесетог века, када је први пут уочено да нежељене ракције на лек могу бити генетски условљене. У то време је Фредрик Вогел, који се сматра родоначелником фармакогенетике, први пут увео овај појам дефинишући га као клинички важну наследну варијацију у одговору на лекове. Од тада ова област привлачи све већу пажњу научне заједнице и у свету и код нас (1, 2).

Фармакогенетски приступ развио се као последица запажања да неки пацијенти постижу врло високе или врло ниске концетрације лека у плазми и урину по примени стандардних доза лека. У клиничкој пракси неретко се дешава да терапијски ефекат изостане код одређеног броја пацијената, иако је примењена препоручена доза лека. Такође, код једног дела пацијената настају различите озбиљне нежељене реакције на лек, због којих се терапијски приступ мора изменити. Недавна истраживања указују да узрок ових појава може бити генетски (3, 4). Генске варијације утичу на експресију гена, те последично настају разлике у количини, структури и функцији кодираних протеина. Генски полиморфизми метаболишућих ензима, транспортера и циљних рецептора потенцијално могу утицати на фаркакокинетику и фармакодинамику лекова (5). Стога фармакогенетика, уз фармакокинетику и фармакодинамику, постаје све значајнија у току прецизног дефинисања фармаколошког профила лека. Основна практична примена фармакогенетских сазнања, односно циљ, јесте повећање ефикасности и безбедности лека на основу анализе генетских особина пацијента.

Подаци из свакодневне клиничке праксе показују да индивидуалне разлике у одговору на лекове чине значајан узрок морбидитета, па чак и морталитета, јер се показало да нежељене реакције на лекове имају значајан удео у броју укупних хоспитализација. Анализом хитних хоспитализација у шпанским болницама утврђено је да 1,69% свих хитних хоспитализација чине оне изазвана нежељеним реакцијама на лек, уз податак да чак више од 5% оваквих случајева има смртни исход (6). Слични, упозоравајући, подаци добијени су и у другим европским земљама. У Француској проценат хоспитализација због нежењених реакција на лек је чак нешто већи и износи 3,6% (7), а хитна стања узрокована рекацијама на лекове чине чак 5,6% непланираних хоспитализација у Холандији (8) . Недавна анализа података из литературе на светском нивоу показала је да број хоспитализација узрокованих нежељеним реакцијама на лекове у задњих пар деценија расте и поред тога што се сматра да би чак половина могла да се превенира(8, 9). Лекови који најчешће изазивају овај тип реакција су најпре антинеопластични лекови, затим лекови који се користе у лечењу цереброваскуларних болести и потом неуролошких болести (9).

Иако реакција појединца на одређени лек зависи од већег броја фактора као што су узраст, пол, телесна маса, присуство хроничних болести, стање јетре и бубрега, и потенцијалне интеракције са другим лековима, генетски фактори такође могу да утичу на ефикасност лека, као и на појаву нежељених реакција (10). Притом, од свих наведених једино су генетски фактори непромењиви током живота. Једном утврђени, они омогућују ”персонализовани приступ” у фармакотерапији, што подразумева избор адекватног лека на индивудуалном нивоу, водећи побољшању ефикасности и безбедности лечења. Поред побољшања квалитета терапије, познавање генских варијација и њиховог утицаја на диспозицију лекова може имати и знатне економске ефекте, у смислу растерећања здравственог система смањењем укупних трошкова повезаних са терапијским мониторингом лека, или смањењем броја хоспитализација узрокованих нежељеним реакцијама на лекове и слично (8, 11).

1.1.1. Метаболизам лекова и фармакогенетски полиморфизам

Биохемијски посматрано, метаболизам је низ реакција за елиминацију егзогених, потенцијално штетних једињења из организма и контролу нивоа ендогених једињења. Низом метаболичких реакција унети лекови и њихови међупроизводи поступно се елиминишу из организма. Метаболизам лекова у литератури најчешће се дели у две основне фазе. Реакције прве фазе (реакције функционализације) подразумевају реакције оксидације, редукције и хидролизе, а реакције друге фазе (реакције синтезе) подразумевају реакције коњугације (ацетилације, метилације, глукуронидације) (10, 12). Сваки метаболички процес не подразумева обавезно обе фазе, нити се увек одигравају наведеним редом (10). Ипак, крајњи циљ обе ове фазе је елиминација лека из организма, превођењем липосолубилних супстанци у супстанце растворне у води.

Најзначајнији ензими прве фазе метаболизма лекова припадају великој суперфамилији ензима под називом цитохром P450 (CYP450) (12-14). Разлике у активности ових ензима, чији основ може бити генска варијација, могу бити узрок интер-индивидуланих разлика у одговору на примењени лек. Стога се данас сматра да проучавање генског полиморфизма као најзаступљенијиг типа варијабилности генома, може бити од великог значаја у терапијском приступу. Варијације у хуманом геному могу бити честе или ретке, зависно од учесталости најређег алела (engl. Minor Allele Frequency- MAF) у популацији. Генски полиморфизми припадају честим варијацијама и подразумевају да варијантни алел има учесталост појаве већу од 1% у укупној популацији. Оне варијације чија је учесталост најређег алела мања од 1% сматрају се ретким (1, 13, 15, 16). То значи да су гени полиморфни када се алелске варијације јављају у популацији са учесталошћу од најмање 1%, а оне су функционално значајне онда када мењају активност кодираног протеина.

Полиморфизми појединачних нуклеотида (енгл. Single Nucleotide Polymorphism- SNP) настају као последица замене једне базе другом у секвенци ДНК, и у хуманом геному су најзаступљеније (17). Њима може бити захваћен било који део гена: промотерски регион, егзон, интрон или интергенски регион. Од наведених региона, полиморфизми појединачних нуклеотида промотерског региона и егзона у највећој мери утичу на функцију протеина који кодирају, па су стога често предмет истраживања. Полиморфизми се у литератури најчешће обележавају јединственим регистарским бројем ”rs "(енгл. Reference SNP ID number), под којим су класификовани у бази података полиморфизама нуклетидних секвенци (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

У разумевању ефеката полиморфизма гена на метаболизам лекова, треба подсетити да је сваки ензим кодиран одређеним геном, где је по један алел наслеђен од сваког родитеља. Као дивљи тип (енгл. wild type, wt) означен је онај алел који је или најчешћи или први потврђен у популацији, и који кодира протеин чија се активност сматра референтном. Измењени тип (енгл. variant type, vt) је онај који се по структури секвенце, мада не неопходно и по активности кодираног протеина, разликује од референтног. Према способности организма да метаболише лек разликују се најмање три фенотипа. Спори метаболизери (енгл. poor metabolizer, PM) не метаболишу адекватно лек, јер имају или смањену количину или смањену активност метаболичког ензима, као последицу присуства бар једног, а најчешће оба, измењена vt алела кодирајућег гена. У овом случају метаболички процеси су успорени, због чега се повећава ризик од настанка нежељних реакција на лек. Они пацијенти који на стандардни начин метаболишу лек фенотипски припадају групи екстензивних метаболизера (енгл. extensive metabolizer, EM), и то је уједно уобичајени и најчешћи фенотип у популацији. У генотипу је присутан бар један, а најчешће оба функционална wt алела, тј. екстензивни метаболизер је или хомозигот или хеторозигот за алел који кодира функционални ензим, од чега и зависи степен његове метаболичке способности. Ултрабрзи метаболизери (енгл. ultrarapid metabolizer, UM) убрзано метаболишу лек, па код њих често изостаје очекивани терапијски ефекат лека примењеног у препорученој дози, а у генотипу се често види умножавање (дупликација) гена (2, 12, 18).

Комбинација наслеђених гена, кодирајућих за ензиме метаболичких путева лека, утиче на фармакокинетику лека, тако мењајући његову ефикасност и безбедност. Данас се сматра да се употребом фармакогенетских метода, чак и пре примене самог лека, може одредити метаболичка способност одређеног пацијента и предвидети појава нежељених реакција или изостанак терапијског ефекта (2). Две основне фармакогенетске методе које се користе у анализи узорка и које се међусобно допуњују су генотипизација и фенотипизација. Генотипизацијом, уз помоћ различитих техника молекуларне биологије, врши се анализа ДНК ради одређивања присуства и структуре гена који кодирају одређени ензим (2, 11). Фенотипизацијом, уз помоћ различитих биохемијских техника, одређује се тренутна активност појединих метаболишућих ензима проценом односа концентрације пробне супстанце и једног или више њених метаболита у узорку телесних течности (крви, урина, пљувачке, суза) (12).

Разумевање фармакогенетских принципа и њихова практична примена води измени досадашњих фармакотерапијских принципа заснованих на принципу „покушаја и грешке“, или примене „према протоколу“ и ствара простор за развој новог индивидуалног приступа у фармакотерапији (2, 11, 19, 20). Данас су фармакогенетска истраживања усмерена првенствено ка лековима уског терапијског опсега, са озбиљним нежељеним реакцијама, тј. чија је широка употреба праћена значајним интер-индивидуалним разликама у одговору, а овакви су управо антиепилептици.

Употребу антиепилептика и даље одликује велика интер-индивидуална варијабилност у терапијском одговору, која се испољава кроз учестале озбиљне нежељене ефекте и неадекватну контролу напада код скоро трећине до половине пацијената (21, 22). Када се једном утврди епилепсија, основна питања у избору терапије су да ли ће изабрани лек бити довољно ефикасан, тј. омогућити да се напади више на појављују, али и довољно безбедан, тј. неће узроковати појаву нежељених реакција због којих би се иста морала прекинути. Проучавање ефеката генских варијација ензима за које је утврђено да учествују у метаболизму антиепилептика можда може дати одговоре на ова питања, па у будућности и омогућити једоставнији и сигурнији избор адекватне терапије на основу познавања фармакогенетског профила пацијента оболелог од епилепсије.

1.2. Епилепсија

Епилепсија је један од најчешћих неуролошких поремећаја, који се може јавити у сваком животном добу, а карактерише се понављаним нападима, насталим због ексцесивног, синхроног пражњења неурона мозга (23, 24). Иако сачувани историјски подаци о епилепсији потичу још из времена пре нове ере, епилепсију и данас прате многе непознанице, како у медицинском тако и у ширем, друштвеном смислу (23, 25, 26). И поред великих помака, савремена истраживања су и даље усмерена ка расветљавању етиологије, унарећењу дијагностичких метода и проналажењу што ефикасније терапије, који ће бити доступни оболелима у целом свету. Напори укупне светске заједнице усмерени су не само на побољшање лечења него и на побољшање друштвеног положаја оболелих кроз заједничку глобалну кампању против епилепсије, под називом "Изађи из сенке", која је започета 1997. године (26, 27).

1.2.1. Дефиниција и класификација епилепсија

Нова научна сазнања, али и још увек недовољно позната етиологија и разноврсне клиничке манифестације епилепсија, утицали су и на промене дефиниције и класификације епилепсија. Данас се епилепсије дефинишу као неуролошки поремећај који се одликује трајном предиспозицијом мозга да генерише епилептичне нападе, што у пракси подразумева два непровоцирана напада у размаку од више од двадесет и четири сата, додатно праћена когнитивним, психолошким или друштвеним последицама. Ова дефиниција из 2005. године је важећа и у пракси прихваћена (27-29). Међутим, почетком 2014. године Међународна лига против епилепсије (енгл. International League Against Epilepsy, ILAE) објавила је најновији предлог допуне важеће дефиниције, који описује епилепсију као "болест мозга 1. када се догоде најмање два неиспровоцирана (или рефлексна) напада у размаку од више од двадесет и четири сата; осим 2. када се догоди један непровоцирани напад, при ком је вероватноћа поновљеног напада око 60%, иста као у случају појаве два непровоцирана напада у размаку већем од 24 сата, у наредних 10 година, и3. када се постави дијагноза епилептичног синдрома“ (29). Предлог најновије дефиниције је изазвао различите реакције у стручној јавности: један део сматра да нови предлог доноси значајне помаке у дијагностици и терапији првог напада, те јасније дефинише критеријуме по којима се пацијент може сматрати залеченим (28), док су други става да предложене измене не доносе суштински значајне новине, али да додатно уносе конфузију у досадашњу дефиницију и класификацију (30, 31).

Као што су нова научна сазнања доприносила промени дефиниције епилепсије, исто тако су утицала и на настанак различитих класификационих система. Класификациони систем, који се најчешће користи и који датира из 80-тих година двадесетог века (32), у основи разврстава епилептичне нападе и синдроме на:

- парцијалне нападе (нападе који почињу локално), који укључују просте нападе (свест није оштећена) са моторним, сензорним, аутономним или психичким симптомима; затим комплексне нападе (са оштећењем свести) чији је почетак као код простог напада али уз прогресију до поремећаја свести, или је праћен оштећењем свести од почетка; и парцијалне нападе са секундарном генерализацијом;

- генерализоване нападе (билатерално симетрични и без локалног почетка), који укључују атипичне и једноставне апсансе, као различнте облике тонично-клоничних напада;

- некласификоване нападе, тј. све оне који не припадају горе наведеним групама.

Како је овај концепт класификације постављен знатно пре најновијих сазнања из области неуронаука, постоје предлози да се класификициони систем осавремени и учини знатно флексибилнијим . У последњој деценији дат је низ нових предлога, а последњи, из 2010. године, је мулти-аксијална дијагностичка шема која делимично мења досадашњу поделу, уводећи разврставање не само по месту настанка, већ и на основу узраста, етиологије, клиничких и електроенцефалографских манифестација (28), али је њена практична вредност још увек предмет дискусија у стручним круговима(31, 33).

1.2.2. Епидемиологија и етиологија епилепсија са посебним освртом на педијатријску популацију

Према проценама Светске зрдавстевене организације, данас у свету од епилепсије болује око педесет милиона људи. Просечна преваленца у општој популацији процењена је на око 3-9 оболелих на 1.000 становника (34, 35). Сматра се да око 50% оболелих од укупног броја у свету припада педијатријској популацији или старијим од 65 година, с тим што је око 25% оболелих млађих од годину дана (36 , 37). Инциденца у укупној светској популацији износи око 1%, а инциденца у педијатријској популацији, од рођења до 15. године је знатно виша, и износи између 5-7% (38).

Публикована истраживања показују да постоје значајне разлике у епидемиолошкој слици епилепсија у развијеним земљама и земљама у развоју, како у општој, тако и у педијатријској популацији. Такође, резултати појединих, али не и већине студија су указали на разлику у оболевању према полу. Постоје поједине студије које су указале на повећану стопу обољевања код дечака током времена праћења (37). Раније се сматрало да се у педијатријској популацији далеко најчешће срећу генерализоване епилепсије и епилептични синдроми, а потом парцијалне епилепсије. Међутим, недавне студије су показале да је дистрибуција типова епилепсије у педијатријској популацији врло слична оној забележеној у општој полулацији (39, 40). Резутати студије из 2011.године, која је проучавала учесталост и дистрибуцију различитих типова епилепсија у педијатријској популацији, показали су да су најчешће парцијалне епилепсије (68%), затим генерализоване (23%), у најмањем проценту (3%) су заступљени епилептични спазми, док код 5% испитаника није било могуће утврдити узрок (37). Будућа истраживања би требало не само да потврде или оповргну досадашње податке о повезаности епилепсије и демографских података на већем узорку, већ и да дају упоредиве податке о узроцима и дистрибуцији различитих типова епилепсијеа допринесу унапређењу дијагностике и примени адекватне терапије, а у крајњем исходу побољшају квалитет живота оболелелих и смање стопу обољевања (33).

Као што су нова научна сазнања доприносила промени дефиниције и класификације, исто тако су утицала и на настанак различитих етиолошких подела. Последњи предлог ILAE из 2010. године донео је нову етиолошку поделу на генетске, структурне / метаболичке, и епилепсије непознатог узрока (28 , 29). Међутим, у пракси (23, 39, 41) се епилепсије етиолошки још увек деле на:

- идиопатске (примарне, функционалне, наследне) , код којих нема патоанатомске промене ткива, које су праћене карактеристичним налазима у клиничкој слици и ЕЕГ-у;
- симптоматске (секундарне, органске, стечене) , код којих се основним узроком сматра патоанатомски видљиво оштећење можданог ткива (као што су урођене малформације, инфекције, тумори, трауме, метаболичке болести, алкохолизам, итд);
- криптогене, за које се сматра да у основи настанка имају патоанатомски супстрат, али који није још увек доказан (неки аутори овде издвајају као посебну класу епилептичне синдроме).

Процењује се да идиопатске епилепсије, које у основи имају генетски фактор, чине око 30%, а симптоматске, тј. узроковане спољашњим факторима, око 25% свих случајева (42). Најчешћи узроци епилептичних напада се разликују у различитим животним добима (34, 37, 43): у раном детињству најчешћи су порођајне трауме, конгениталне малформације и урођени метаболички поремећаји, у каснијем детињству и адолесеценцији генетски, инфекције ЦНС-а и трауме, а у одраслом добу то су повреде главе, тумори и интоксикације. У геријатријској популацији на првом месту су тумори, а затим васкуларне и дегенеративне промене можданог ткива (24, 38, 44). Развој нових метода испитивања можданог ткива омогућио је да се број криптогених епилепсија смањи, али и поред овог напретка, резултати најновијих студија спроведених у Кини и Америци показују да је и даље преко 50% дијагностикованих епилепсија без јасно утврђеног узрока (37, 43). У студији која је анализирала податке у педијатријској популацији, користећи најновију предложену етиолошку класификацију ILAE, у око половине оболелих (50%) узрок је био непознат, а тек потом структурно /метаболички (28%), или генетски (22%) (37).

Развој нових технологија омогућио је напредак и у испитивању генских узрока појединих типова епилепсија. Примена генетских тестова у клиничкој пракси омогућава адекватно дијагностиковање и адекватнији избор терапије, генетско саветовање и тачнију прогнозу даљег тока болести (45). Иако ниједан од до сада проучаваних гена не даје потпуно објашњење зашто напад настаје, ова сазнања помажу у разумевању молекуларне основе епилепсије. Измена одређеног гена може утицати на промену надражљивости мембрана или синаптичко функционисање, а тиме и на фенотипско испољавање одређених типова епилепсија. Ипак, утицај наследних фактора у етиологији епилепсија врло је комплексан. Варијације појединих гена могу допринети настанку епилепсије, али утицај сваког гена понаособ је мали, односно недовољан за настанак болести без дејства спољашњих фактора. Врло је мали број епилептичних синдрома у чијој је основи искључиво генетски фактор (42).

1.2.3. Савремени терапијски приступ

За дијанозу епилепсије потребно је да буду испуњени јасно дефинисани дијагностички критеријуми, који се потврђују на основу анамнестичких података, неуролошког прегледа , резултата ЕЕГ-а, и лабораторијских анализа крвне слике и основних биохемијских параметара. Савремени терапијски приступ подразумева да се лечење започне што пре, у пракси обично после другог напада, јер се појава следећег напада, после другог непровоцираног напада, сматра врло вероватном. Најновији подаци указују да је вероватноћа појаве другог напада у наредне две године 42-50% (29, 46, 47). Иако су ставови истраживача и клиничара још увек контроверзни, најновије препоруке наглашавају значај раног увођења терапије, у одређеним случајевима чак одмах после првог напада (29, 46).

Терапија епилепсија најчешће почиње применом једног лека (монотерапијски приступ). Избор лека и адекватне дозе није нимало једноставан задатак. Неколико систематских прегледа литературе понудило је бар делимичан одговор на питање који лек треба изабрати као почетни терапију. Резултати опсежне анализе из 2006. године показали су да су карбамазепин, фенитоин и валпроати најбољи избор за почетак мон терапије парцијалних епилепсија код одраслих, окскарбамазепин најоптималнији код деце, а габапентин и ламотригин код старије популације (48). Још једно обимно истраживање поредило је ефикасност, безбедност и подношљивост нових у односу на старе антиепилептике. Резултати овог истраживања, публиковани 2011. године, показали су да је карбамазепин, иако уз нешто више нежељених ефеката у односу на новије лекове, још увек лек избора у лечењу епилепсија (49).

У клиничкој пракси најчешће се почиње са стандардном препорученом дневном дозом одређеном према телесној маси пацијента, а потом се корекција дозе врши на основу успешности контроле напада, неуролошког налаза и нивоа концентрације лека у крви (14, 15). Занимљиво је поменути резултате студије која је поредила ефекте стандардних доза четири аниепилептика (која се најчешће користе као иницијална монотерапија (карбамазепин, валпроати, фенитоин, фенобарбитон) у односу на половину стандрадних доза. Утврђено је да не постоји значајна разлика у ефикасности, али да је безбедносни профил ниже дозе знатно бољи (46). Код половине пацијената монотерапијом се постиже потпуна контрола напада у току прве године, а у мањем броју контрола се успоставља или заменом лека или политерапијом (50). Ипак, према досадашњим подацима око 30 % пацијената је резистентно на терапију, што значи да је присутно више од једног напада месечно, при терапији са више од два лека истовремено (46, 47, 51-53). Терапија фармакорезистентних облика епилепсија носи знатно већи ризик од појаве озбиљних нежељених реакција (21, 46, 54). У овим случајевима терапијски приступ подразумева и друге, нефармаколошке методе, као што су кетогена дијета, стимулација вагуса и неурохирургија.

Када монотерапија није довољна у контроли напада, уводи се политерапија. Прецизна правила не постоје када је потребно заменити антиепилептик или увести још један. Такође, врло је индивидуално који је од ова два приступа бољи. Резултати студија које су проучавале ова питања показали су да нема велике разлике у ефикасности, али да је нешто безбеднија политерапија, вероватно због мањих појединачних доза сваког од примењених лекова (46, 52, 55). Отворена питања постоје и током искључивања терапије. Једно од њих је које је оптимално време за престанак даље терапије. Данас се препоручује искључење уколико није било напада уназад две године, али неке студије потврђују да је ризик за поновни напад од 9% до 39% у дечијем добу, што на првом месту зависи од узраста у ком се јавио први напад, типа епилепсије, као и ЕЕГ налаза у време искључења терапије (46).

Избор одговарајућег лека у терапији епилепсије није нимало једноставан задатак, јер зависи од много фактора као што су тип епилепсије, узраст пацијента, пратећа терапија, али и фармаколошки профил лека и фармакоекономски аспекти (56). Сви антиепилептици се деле у две велике групе: антиепилептике старије и новије генерације. Уопштено, антиепилептици старије генерације имају уско терапијску ширину уз бројне нежељене ефекте, док антиепилептици новије генерације испољавају мање нежељених ефеката, уз ефикасност сличну лековима старије генерације. Стога су фактори који утичу на ефикасност и безбедност антиепилептика често предмет савремених истраживања (46, 52).

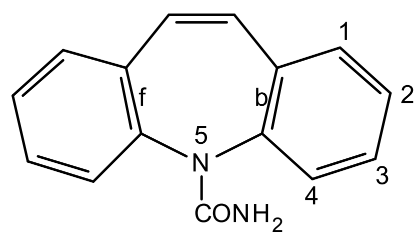
Ексцитабилност неурона зависи од укупног односа и функционисања самог неурона и глија ћелија, као и концентрације јона и неуротрансмитера, који остварују дејство посредством различитих механизама (24, 57). Поремећаји електричног статуса можданог ткива воде клиничком испољавању епилептичног напада. Патофизиолошки основ за настанак епилепсије је појава ʾепилептогеног фокуса' (23, 24, 58). Механизам настанка епилептогеног фокуса још није у потпуности разјашњен, али се сматра да настаје као последица поремећаја концентрација ексцитаторних (глутамат и аспарат) и инхибиторних (гама-аминобутерне киселине) неуротрансмитера, или као последица поремећаја на нивоу волтажно зависних јонских канала (повећање пропустљивости за јоне натријума и калцијума, уз смањену пропустљивост за јоне калијума) (23, 24). Основни механизами дејства антиепилептика су базирани управо на овим патофизиолошким и биохемијским променама, што значи да делују првенствено путем модификације (инхибиције функције) јонских канала (Na^{+}, K^{+}, Ca^{++}), повећањем синаптичке инхибиције (дејством на GABA рецепторе) или инхибицијом синаптичке ексцитације (дејством на глутамат рецепторе), и на крају везивањем за протеин синаптичких везикула 2A (SV2A), па тако мењају ниво неуротрансмитера (55).

Савремени терапијски приступ данас подразумева индивидуални приступ сваком пацијенту, уз континуирану процену ефикасности и безбедности. Карбамазепин, иако антиепилептик старије генерације, и данас остаје лек избора посебно као монотерапија код парцијалних напада, али неретко и у терапији генерализованих напада (24, 48, 49). Колико је распрострањена употреба карбамазепина као антиепилептика добро илуструје чињеница да је, како због своје ефикасности, тако и због фармакоекономских аспеката, наведен као један од основних атиепилептика на листи есенцијалних лекова Светске здравствене организације. Лекови на овој листи су они који се сматрају основним у сваком здравственом систему и наведени су редом по ефикасности, безбедности и економским аспектима (59).

1.3. Карбамазепин

1.3.1.Фармакодинамика и фармакокинетика

Карбамазепин, хемијски сличан трицикличним антидепресивним лековима, у употреби је од средине прошлог века као антиконвулзант. Поред тога, користи се у терапији одређених биполарних поремећаја и неуралгије тригеминуса (14, 60, 61). Иако дуго у употреби, тачан механизам дејства није до краја разјашњен. Карбамазепин стабилизује пренадражене нервне мембране, инхибира понављана пражњења неурона и редукује синаптичку пропагацију ексцитаторних импулса. Сматра се да као антиконвулзант делује тако што инхибира настанак репететивних акционих потенцијала у самом фокусу, успоравајући опоравак волтажно-зависних Na+ канала на мембрани неурона (14). У терапијским концентрацијама не утиче на активност свих неурона, већ селективно блокира Nav1.2 субтип волтажно-зависних Na+ канала у регионима мозга склоним ка епилептичним нападима (13, 15). Механизам антипсихотичног дејства такође није познат, сматра се да делује на ниво инхибиторних и ексцитаторних неуротрансмитера (гама амино бутерну киселину и глутамат). Аналгетичко дејство остварује тако што повећава ниво инхибиторног неуротрансмитера, што може бити повезано са калцијум-зависним каналима (60, 61).



Слика 1. Хемијска формула карбамазепина

Карбамазепин се примењује најчешће орално. Уколико то није могуће, може се применити и у форми супозиторијума, али не дуже од 7 дана, и у 25% већој дози у односу на дозу оралне формулације лека (62). У гастроинтестиналном тракту се апсорбује скоро у целини (од 85 до 100%), неправилном брзином, а максималну концентрацију у плазми најчешће постиже 4 до 8 часова након уноса (60, 61, 63). Просечно време полуелиминације је око 15 часова, а после једномесечне примене брзина елиминације се значајно повећава (60). Запажено је да је елиминација лека нешто бржа код деце (64,), али и да апсорпција зависи од узраста и стања ухрањености (63). Брзина полуелиминације се поступно повећава током примене због тога што је карбамазепин способан да индукује сопствени метаболизам. Ефекти аутоиндукције се могу детектовати већ након 3 до 5 дана по почетку терапије; после прве стандардне дозе почетно време полуелиминације износи око 36 часова, а после пар недеља, око 20 часова и мање. Такође, и многи други лекови, који делују на исте метаболичке ензиме, могу знатно убрзати метаболизам карбамазепина ако се истовремено са њим примењују (60, 65). Карбамазепин се излучује скоро потпуно у форми метаболита, већим делом путем урина (око 70%), а мањим путем столице (око 30%). Око 70% лека везује се за протеине плазме и дистрибуира у сва ткива (63). У неколико истраживања је показано да је концентрација у саливи једнака оној у серуму, те да одређивање лека у серуму може бити коришћено као добра неинвазивна метода праћења концентрације (61, 66, 67). Карбамазепин се дистрибуира једнако и у ликвору и у сузама. Пролази плаценталну баријеру, излучује се у млеку, где постиже и до 60% концентрације лека у плазми (60, 68).

Карбамазепин се скоро у потпуности (до 99%) метаболише у јетри процесима оксидације, епоксидације и хидроксилације. Ове процесе регулише неколико ензима, од којих је најважнији CYP450 систем (69). Поред најзаступљенијих субфамилија CYP3A4 и CYP3A5, у метаболизму прве фазе учествују у мањој мери и CYP2C8 и CYP1A2 (70-72, 73 , 74-76). Најзначајнији метаболички пут карбамазепина подразумева прелазак у активни метаболит карбамазепин-10,11-епоксид посредством CYP3A4, CYP2C8 и CYP3A5 ензима, а потом, уз дејство ензима микрозомалне епоксид-хидролазе, у неактивни метаболит карбамазепин-10,11-трансдиол (61, 63, 77). Мањи метаболички путеви карбамазепина укључују хидроксилацију, оксидацију и глукуронидацију, у којима такође учествују ензими CYP450 комплекса, укључујући CYP2A6, CYP2B6, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C19, CYP2C8 и CYP1A2 (78). У даљем току путеви разградње насталих метаболита могу се одвијати различитим путевима биоактивације, CYP3A4 зависним механизмом и механизмом у који су укључене мијелопероксидазе, до коначног настанка неактивних метаболита и елиминације из организма (79, 80).

1.3.2. Индикације

Основне индикације за примену карбамазепина су одређени типови епилепсија, одређени биполарни поремећаји и поједине неуралгије. Регистрован је као лек у парцијалним и тоничко-клоничким (grand mal) епилепсијама , а новије студије показују да је најефикаснији у лечењу парцијалних напада са или без секундарне генерализације, и да је у неким типовим епилепсија контраиндикован (у случају миоклоничне јувенилне епилепсије и генерализоване епилепсије типа абсанса), тако да је пре примене терапије, изузетно важно адекватно класификовати тип напада (61, 81 , 82, 83). Поред употребе у терапији епилепсија, карбамезепин се користи у лечењу акутне тригеминалне неуралгије, док се код других болних синдрома примењује са различитим ефектом. У психијатрији се користи у лечењу биполарних поремећаја који не реагује на терапију литијумом, шизоафективних стања, резистентне шизофреније. Знатно ређе се користи у терапији против алкохолизма, у процесу детоксикације, као и у политерапији централног дијабетеса инсипидуса уз клофибрат или хлорпропамид (68).

Узраст је битан фактор у терапији карбамазепином. У парцијалним нападима карбамазепин је најефикаснији код одраслих, у старијих је ефикасан и у терапији grand mal епилепсија, па се у пракси тако и користи (48). У педијатријској популацији, показало се да је код парцијалних напада окскарбамазепин једнако ефикасан, али уз бољи безбедносни профил (48, 81 , 82).

1.3.3. Дозирање

Апликује се орално, у облику таблета, таблета са продуженим отпуштањем или у облику сирупа. У лечењу епилепсије, дозирање карбамазепина је индивидуално и заснива се на постигнутом ефекту, што обично захтева концентрацију лека у крви у опсегу од 4 до 12μg/ml (17-50 μmol/l) и у деце и у одраслих (14, 68). Почетна доза код одраслих обично износи од 100 до 200mg дневно, а потом се, зависно од постигнутог ефекта, доза постепено повећава до постизања оптималног терапијског одговора. Доза одржавања најчешће износи 800-1200mg дневно, подељена у више појединачних доза. У ретким случајевима, могу се применити и знатно веће дневне дозе, од 1600 до 2000mg на дан (68). И у педијатријској популацији карбамазепин се уводи постепено, до препоручене дневне дозе од 10-20mg/kg телесне тежине, подељене у неколико појединачних доза (63, 68).У зависности од формулације лека за узраст до годину дана препоручена дневна доза је 5-10ml (100mg/5ml), за узраст од 1 до 5 година 10-20ml на дан, за узраст од 5 до 10 година 20-30ml на дан и за узраст од 10 до 15 година 30-50ml на дан, а у старијих од 15 година дозирање се врши као и у одраслих (800-1200 mg дневно) (68).

1.3.4. Контраиндикације

Карбамазепин је контраиндикован код епилепсије типа абсанса и миоклоничне епилепсије, као и код преосетљивости на карбамазепин или сличне супстанце, преткоморско-коморског блока, супресије костне сржи или порфирије (68). Иако је употреба карбамазепина знато мање ризична него примена валпроата

(84), овај лек код трудница може довести до конгениталних малформација, те је потребно пажљиво дозирање (минимална ефикасна доза) и стално праћење концентрације лека у крви (68). Слично важи и у случају удружених хематолошких и бубрежних поремећаја или обољења јетре.

Поред тога, одређене генске варијације могу бити ограничење у употреби карбамезепина. Тако је присуство *HLA-B*1502* и *HLA-A*3101* алела повезано са развојем Стивенс-Џонсоновог синдрома и токсичне епидермалне некролизе у лечењу карбамазепином, а ова појава је најизраженија код Азијата као најчешћих носилаца ових варијантних алела (85). Подаци студије из 2014. године, која је испитивала ефикасност и економску оправданост употребе овог теста код Азијата, показују да је *HLA-B*1502* скрининг ефикасан у превенцији Стивенс-Џонсоновог синдрома и токсичне епидермалне некролизе слично као употреба мамографије или Папа- теста у скрининг програмима у гинекологији (86).

1.3.5. Нежељени ефекти и интеракције

Примена карбамазепина праћена је великом интер-индивидуалном варијабилности, па и у стандардним препорученим дозама изазива различите нежељене ефекте код појединих пацијената. Нежељене реакције на карбамазепин су бројне, а у 5 до 20% пацијената довољно озбиљне да захтевају прекид терапије. У клиничкој пракси најчешће се срећу главобоља, замућен вид, диплопија, нистагмус, вртоглавица, поспаност и атаксија, потом мучнина и повраћање, бол у стомаку, дијареја и опстипација. Скоро половина пацијената искуси неке од наведених реакција на лек, али их је могуће избећи или бар смањити постепеним увођењем лека, смањивањем дневне дозе или поделом у више појединачних доза. У најчешће хематолошке нежељене реакције на карбамазепин (код око 10% пацијената) спада леукопенија, која захтева прекид терапије јер, иако је најчешће пролазна, може бити и трајна. Ретки хематолошки нежељени ефекти укључују апластичну анемију, агранулоцитозу, еозинофилију, леукоцитозу и тромбоцитопенију. Ретке кожне реакције подразумевају фотосензитивност, алопецију, генерализовани еритем, ексфолијативни дерматитис, али и тешке реакције као су Стивенс-Џонсонов синдром и токсична епидермална некролиза. Остале ретке нежељене реакције на карбамазепин укључују хипонатремију, едеме, парестезије, реакције преосетљивости (лимфаденопатија, спленомегалија, еозинофилија, повишена телесна температура, осип), пнеумонију, срчану инсуфицијенцију и аритмије, оштећење бубрега, оштећење јетре, импотенцију, мушки стерилитет, гинекомастију, галакторeју, дистонију, дискинезију и остеомалацију (68). Акутно тровање карбамазепином може довести до поремећаја свести, настанка конвулзија, респираторне депресије и смртног исхода. Специфични антидот не постоји, па се терапија акутног тровања своди на испирање желуца и примену активног угља, корекцију електролитног дисбаланса и остале супортивне мере (68).

Када су примењени истовремено, многи лекови, али и нутритијенти и биљни препарати, као што су нпр. грејпфрут или кантарион, могу утицати на концентрацију карбамазепина у крви (Табела 1) (68).

Табела 1. Приказ лекова који мењају концентрацију карбамазепина при истовременој употреби

Утицај на концентрацију карбамазепина	**Назив лека**
Повећава концентрацију карбамазепина у крви	изонијазид, верапамил, дилтиазем, ритонавир, декстропропоксифен , флуоксетин, флувоксамин, пароксетин, могуће омепразол , циметидин, омепразол, ацетазоламид, даназол, никотинамид, тразодон, вигабатрин, еритромицин,кларитромицин, азитромицин, итраконазол, кетоконазол, флуконазол, вориконазол, лоратадин, оланзепин, инхибитори протеазе за лечење ХИВ-а
Смањује концентрацију карбамазепина у крви	фенобарбитал, фенитоин, фосфенитоин, пиримидон, теофилин, рифампицин, цисплатин, доксорубицин, клоназепам и окскарбазепин

Карбамазепин може да утиче на концентрације других лекова у случају истовремене примене, укључујући левотироксин, клоназепам, алпразолам, етокукцимид, валпроична киселина, преднизолон, дексаметазон, циклоспорин, дигоксин, доксициклин, фелодипин, индинавир, саквинавир, ритонавир, халоперидол, имипрамин, метадон, парацетамол, трамадол, естрогени, гестагени, теофилин, варфарин, аценокумарол, ламотригин, тиагабин, топирамат, циталопрам, бупропион, миансерин, сертралин, тразодон, имипрамин, амитриптилин, нортриптилин, кломипрамин, клозапин, окскарбазепин, фенитоин, оланзапин, кветиапин, итраконазол, иматиниб, рисперидон.

Истовремено примењен, карбамазепин може потенцирати нежељена дејства изонијазида и алкохола, а антагонизовати дејства недеполаризирајућих миорелаксаната и оралних контрацептива. Иако су током студија токсичности, толеранције, генотоксичности и канцерогености, неки ризици потврђени код животиња, до сада нема показатеља да су ове опсервације од значаја за терапијску примену карбамазепина код људи (68).

1.3.6. Фармакогенетика карбамазепина

Ензими, транспортери и рецептори који одређују фармакокинетику и фармакодинамику карбамазепина кодирани су полиморфним генима, а поједине процене указују на то да би практична примена фармакогенетике могла значајно да смањи број пацијената који на лек развију резистенцију или доживе неки од нежељених ефеката (77, 87). Широка примена карбамазепина и велика интер – индивудуална варијабилност у одговору на терапију, као и уочен потенцијални значај генских варијација, усмерио је један део фармакогенетских испитивања у области антиепилептика управо ка овом леку. Досадашњи резултати показали су да генска варијабилност, уочена у етнички различитим популацијама код пацијената оболелих од епилепсије, може значајно утицати на реакције на карбамазепин. Потврда ове чињенице су уочени ефекти генских варијација у оквиру локуса великог комплекса хистокомпатибилности, као што је утицај полиморфизма *HLA-B*1502* на развој Стивенс-Џонсоновог синдрома и токсичне епидермалне некролизе у лечењу карбамазепином, који је уочен код Азијата, али не и код осталих популација (77). Недавно је и полиморфизам *HLA-A *3101* повезан са озбиљним нежељеним реакцијама на лек како у европским, тако и у јапанској популацији (88, 89). И други гени, за које се сматра да учествују у метаболичким или транспортним процесима, привлаче пажњу истраживача својим потенцијалним ефектима на ефикасност и безбедност карбамезапина. Езими система CYP450 катализшу већину реакција прве фазе метаболима лекова, па се сматрају значајном основом за настанак интеракција, као и интер-индивидуалне варијабилности у одговору на лек (79, 90, 91).

Цитохроми P450 су суперфамилија од преко 50 монооксигеназних ензима јетре, по саставу хемопротеина. Назив „цитохром P450" дат је по локализацији ензима на унутрашњој страни мембране митохондрија или глатког ендоплазматичног ретикулума и одређеним спектрофотометријским карактеристикама (апсорпција светлости на таласној джини од 450nm). Најважнија локализација ових ензима је јетра, али они су присутни и екстрахепатично у гастроинтестиналном тракту, плућима, бубрегу, мозгу, плаценти, простати, итд, с тим што се интестинална мукоза сматра најзначајнијим ектрахепатичким местом биотрансформације лекова (92) . Ови протеини чине скуп ензима који катализшу монооксигене реакције великог броја егзогених и ендогених супстанци. Биохемијски посматрано, они регулишу реакције прве фазе метаболизма, учествујући у реакцијама које уводе реактивне групе, које ће у другој фази бити реактивно место, а све у циљу настанка хидрофилнијих једињења која се лако елиминишу из организма. Оксидација лекова захтева, поред CYP ензима, захтева учешће NADPH-P450 редуктаза и молекула кисеоника. Као производи оксидативних реакција које су катализоване овим ензимима, најчешће настају нетоксична једињења. С друге стране, иако су ове реакције примарно детоксикациони процеси, поједини супстрати, метаболички активирани цитохромима P450, дају потенцијално токсичне или мутагене производе. Поред великог значаја у метаболичкој трансформацији егзогених супстанци, укључујући и лекове, значајни су у процесима синтезе великог броја ендогених молекула, као што су простагландини, леукотријени, холестерол и друга стереоидна једињења (естроген, тестостерон, витамин Д) (92) Ове ензиме одликује различита супстратна специфичност, али и супстратна индукција или инхибиција. Присуство ових особина и ефекта супстрата на ензим у великој мери може да утиче на развој клинички значајних интеракција лекова.

Цитохроми су подељени у три велике групе. Сматра се да цитохроми друге групе, којој припадају фамилије 1, 2 и 3, учествују у првој фази метаболизма већине лекова, а показују значајну интер-индивидуалну варијабилност у каталитичкој активности, што може бити последица генске варијабилности ових фамилија (92). Сваки је представљен најпре ознаком "CYP", затим су у назив укључени арапски бројеви и слова. У номенклатури први број у називу означава фамилију (нпр. CYP1), слово субфамилију (нпр. CYP1A), а други број означава појединачни ензим (CYP 1A2) (92, 93). Припадност истој фамилији подразумева идентичну аминокиселинску секвенцу у преко 40%, а припадност истој подфамијили идентичности у преко 55% (93). Од свих CYP450 ензима, најзаступљенији су ензими из субфамилије CYP3A, потом 2C и потом 1A.

Синтеза сваког CYP ензима кодирана је одговарајућим, истоименим геном. У хуманом геному откривено је до сада око 107 CYP450 гена: 59 активних и око 48 псеудогена (92). Ови гени, који одређују састав CYP ензима, су неретко у одређеној мери полиморфни. Данас се сматра да су врло полиморфни гени који кодирају ензиме CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, као и припадници CYP3A субфамилије (94). Изузетак чине *CYP1A1*, *CYP2E1*, и *CYP3A4*, који су мало или нимало полиморфни, (92, 94-99).

CYP3A4 чини трећину цитохром ензима јетре одраслог човека, и то га чини најзаступљенијим CYP ензимом. Иако има огромну улогу у метаболизму лекова и многих ендогених супстанци, његове генске веријације не сматрају се основом различитог новоа експресије и активности у популацији. Данас се сматра да су основе његове разнолике експресије и индуцибилности налазе у генима који кодирају протеине који регулишу процесе транскрипције и транслације (90, 92, 98, 100) . Стога, иако изузетно значајан у метаболизму карбамазепина, полиморфизам његовог гена није обухваћен овим испитивањем. С друге стране, заступљеност варијација у CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2 је висока. Како ови ензими учествују у метаболизиму карбамазепина у већој или мањој мери, познавање утицаја генске варијабилности ових гена може у великој мери бити од значаја за утврђивање нивоа експересије и активности ензима, што може имати за последицу измењен терапијски одговор.

CYP3A5 (цитохром P450 3A5**)** припада CYP3A субфамилији, и заједно са структурно сличним CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 и CYP3A43 чини једну од најзаступљенијих субфамилија у метаболизму ксенобиотика. Као и већина ензима ове суперфамилије у највећој мери је присутан у јетри, али је и значајан екстрахепатички ензим, те је као такав локализован у епителу дигестивног тракта, у бубрезима и плућима (93). По структури је сличан CYP3A4, оба ензима имају сличне супстрате и заједно учествују у метаболизму многих лекова, укључујући и карбамазепин, с тим што је учешће CYP3A5 много мање (76, 92, 94, 101-103). Код особа код којих је експримиран, овај ензим чини скоро половину CYP3A ензима јетре, па значајно може утицати на фармакокинетику одређених лекова (104). За разлику од других значајних ензима из CYP3A субфамилије, ниво CYP3A5 је сличан у и феталном и у одраслом добу. Последњих година значај CYP3A5 ензима у метаболизму лекова се све више се истражује, па расте број лекова за које је утврђено да су супстрати, али и оних за које је утвђено да су његови инхибитори. Преглед најзначајнијих супстрата, инхибитора и индуктора овог ензима приказан је у Табели 2. (https://www.pharmgkb.org/gene/).

Табела 2. Најзначајнији супстрати, инхибитори и индуктори CYP3A5 ензима

СУПСТРАТИ	алпразолам, амлодипин, астемизол, кофеин, церивастатин, кодеин, диазепам, доцетаксел, домперидон, естрадиол, халоперидол, иринотекан, лидокаин, ловастатин, мидазолам, нифедипин, ондансетрон, паклитаксел, прогестерон, пропранолол, ритонавир, саквинавир, силденафил, симвастатин, такролимус, тамоксифен, терфенадин, тестостерон, тразодон, триазолам, верапамил, винкристин, золпидем
ИНХИБИТОРИ	хлорфенирамин, кокаин, дилтиазем, ловастатин, метадон, саквинавир, верапамил
ИНДУКТОРИ	барбитурати, карбамазепин, глукокортикоиди, модафинил, окскарбамазепин, фенобарбитал, фенитоин, пиоглитазон, рифабутин

CYP3A5 ензим кодиран је истоименим геном, који је изузетно полиморфан. *CYP3A5* је смештен на хромозому 7q21-q22.1, заједно са *CYP3A4*, *CYP3A7* и

CYP3A43 (94). До данас је откривено преко 25 алела гена *CYP3A5* (http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a5.htm), а најчешће проучавани су *CYP3A5*2 (g.27289C>A), CYP3A5*6 (g.14690G>A)* и *CYP3A5*10 (g.29753T>C)* и *CYP3A5*3 (g.6986A>G)* полиморфизам (95, 104). Потпуно функционални ензим кодиран је *CYP3A5*1* алелом, који је означен као wt (101). Остали алели кодирају мање функционалне или нефукционалне протеине (101, 103, 105).

Испитивања утицаја овог гена указују на могућу улогу *CYP3A5* полиморфизма у канцерогенези (106), али и утицаја на метаболизам неких (107-109), али не и свих лекова који се њиме метаболишу (110, 111).Утицај овог гена на на метаболизам карбамазепина није разјашњен; поједини резултати указују на повезаност *CYP3A5* генотипа и концентрације карбамазепина (76 , 87), док постоје и они супротни, који нису доказали никакав утицај генотипа на фармакокинетику карбамазепина (103).

CYP2C8 (цитохром P450 2C8) припада субфамилија CYP2C ензима, која чини око 30% укупних CYP ензима јетре и у значајном проценту учествује у метаболизму лекова (112). Ензими из субфамилије CYP2C (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 и CYP2C19) укључени су у метаболизам око 20% свих лекова. Сам CYP2C8 чини око 7% укупних CYP ензима јетре и има важну улогу у матаболизму низа егзогених и ендогених једињења (113). Поред тога, овај ензим је заступљен и у бубрежном, плућном и срчаном ткиву, као и мукозном ендотелу (114-116). Значај CYP2C8 уочен је у метаболизму низа лекова, а неки од њих су амјодарон (117), репаглинид (118), ибупрофен (119). Преглед најзначајнијих супстрата, индуктора и инхибитора дат је у Табели 3. (https://www.pharmgkb.org/gene/).

Табела 3. Најзначајнији супстрати, инхибитори и индуктори CYP2C8

СУПСТРАТИ	росиглитазон, пиоглитазон, репаглинид, церивастатин, паклитаксел, амодиаквин, хлорокин, бифосфонати, ибупрофен, амјодарон, верапамил
ИНХИБИТОРИ	гемфиброзил, триметоприм, кетоконазол, кверцетин
ИНДУКТОРИ	рифампицин, дексаметазон, фенобарбитал

CYP2C8 је кодиран истоименим геном, који је у значајној мери полиморфан. *CYP2C8* се налази на хромозому 10q24, заједно са другим генима *CYP2C18, CYP2C19, CYP2C9* (94). Сматра се да је око 74% секвенци *CYP2C8* подударно са *CYP2C9* (96). До данас је описано више од 14 различитих алела гена *CYP2C8* (http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c8.htm), а *CYP2C8 *1* се сматра дивљим алелом, који кодира функционални ензим. Варијантни алели имају различит efekat на активност ензима. *CYP2C8*3* (g. 416G>A, 1196A>G) и знатно ређи *CYP2C8*5* (g.475delA) доводе се у везу са смањеном ензимском активношћу (72, 96, 120).

Утицај полиморфизма *CYP2C8* на метаболизам лекова и даље је нејасан (118, 119, 121-123). Што се тиче утицаја на метаболизам карбамазепина, недавно публиковани подаци студије која је испитивала путеве биоактивације карбамазепина *in vitro* утврдила је да секундарни метаболички пут, хидроксилација карбамазепина значајно корелира са нивоом активности CYP2C8 (78).

CYP1A2 **(** цитохром P450 1A2**)** припада субфамилији цитохрома CYP1A , чини око 10%-15% укупних цитохрома P450 јетре човека (92). Учествује у метаболизму ендогених супстанци типа стериода или арахидонске киселине, прокарциногена типа бензопирена и афлатоксина Б, али и многих лекова као што су ацетаминофен, кофеин, лидокаин, фенацетин, теофилин и Р –варфарин (74, 124-126). Последњих година значај овог ензима у метаболизму лекова се све више истражује, па расте број лекова за које је утврђено да су супстрати за CYP1A2, али и оних за које је утврђено да су његови инхибитори. Супстанце које могу да индукују активност овог ензима су, поред лекова, кофеин и неки састојци дуванског дима. Практични значај ових сазнања јесте да активност овог ензима може да се мења под утицајем синаргистичког дејства генских варијација и других фактора које укључују начин исхране, конзумацију кафе и цигарета и слично, а које су подложне променама током живота (127-129). Преглед најзначајнијих супстрата, инхибитора и индуктора овог ензима приказан је у Табели 4. (https://www.pharmgkb.org/gene/).

Табела 4. Најзначајнији супстрати, инхибитори и индуктори CYP1A2

СУПСТРАТИ	кофеин, клозапин, флутамид, мелатонин , оланзапин , расагилин, такрин, теофилин, тизанидин, варфарин, золмитриптан
ИНХИБИТОРИ	артемисинин, атазанавир, циметидин, ципрофлоксацин, естрадиол, флувоксамин, мексилетин, такрин, тиабендазол
ИНДУКТОРИ	барбитурати, карбамазепин, примидон, рифампицин, пушење цигарета, конзумирање кафе

CYP1A2 је кодиран истоименим геном, који је у значајној мери полиморфан. *CYP1A2* је смештен на хромозому 15, заједно са генима *CYP1A1* и *CYP1B1* (126). До данас је описано преко 30 различитих алела овог гена (http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm). Алел *CYP1A2*1* означен је као wt и кодира потпуно функционалан ензим. Најчешће испитиване варијације су *CYP1A2*1C* , *CYP1A2*1D, CYP1A2*1E* и *CYP1A2*1F* , које својим присуством условљавају различиту активност истоименог ензима. Данас постоје показатељи да би полиморфизам овог гена, иако није један од најзначајнијих у метаболичким путевима карбамазепина, могао донекле да утиче на његову фармакокинетику (69, 130).

2. ЦИЉЕВИ, ХИПОТЕЗЕ И ЗНАЧАЈ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Циљеви истраживања

Циљеви овог истраживања су :

1. Испитивање утицаја варијација гена *CYP3A5* (rs28365083 и rs776746), *CYP2C8* (rs11572080 и rs72558196) и *CYP1A2* (rs762551 и rs2069514) на концентрацију карбамазепина у крви након постизања равнотежног стања, као и последично на безбедност и ефикасност терапије, код педијатријских пацијената лечених од епилепсије.
2. Дефинисање популационог фармакокинетичког модела клиренса карбамазепина на основу утицаја фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената.

2.2. Хипотезе истраживања

Хипотезе овог истраживања су:

1. Варијабилност гена *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2* утиче на концентрацију карбамазепина у крви, као и на безбедност и ефикасност терапије код педијатријских пацијената.
2. Употреба алгоритма дозирања карбамазепина на основу фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената може побољшати ефикасност и безбедност терапије.

2.3. Значај истраживачког питања

Карбамазепин је антиконвулзант који се често користи у терапији парцијалних и генерализованих напада и код деце и код одраслих (61, 70). Иако у употреби више од века, и примењиван у многим облицима епилепсија, и у свим узрастима, низ је отворених питања везано за ефикасну и безбедну примену карбамазепина (131, 132). Проблем у ефикасном и безбедном дозирању карбамазепина чини и недостатак студија на педијатријској популацији пацијената.

Познато је да је ризик од појаве нежељених ефеката медикаментозне терапије код деце и до четири пута већи него код одраслих (133). Ипак, у поређењу са популацијом одраслих, фармакогенетске студије у педијатријској популацији су још увек ретке (134). Већина клиничких студија подразумева испитивање фармаколошких својстава лекова на одраслој популацији, а потом екстраполацију података на педијатријску популацију (135-137). Ипак, недавна испитивања у педијатријској популацији, показала су да експресија гена може да зависи и од узраста, односно да може да се мења током периода развоја, од најранијег детињства до одраслог доба (133, 138). Значајне разлике, не само у фармакогенетици, већ и у фармакокинетици и фармакодинамици лекова одвајају педијатријску од осталих група пацијената (63). Поред узраста, генетске варијације могу имати различите ефекте на терапију у различитим етничким групама, што је потврђено утицајем полиморфизма *HLA-B*1502* код Азијата на развој Стивенс-Џонсоновог синдрома и токсичне епидермалне некролизе у лечењу карбамазепином (68, 77).

Карбамазепин је један од најчешћих антиепилепика у употреби у Србији (139). Имајући у виду описани метаболизам карбамазепина, уочене разлике у индивидуалном одговору на терапију, потенцијални утицај полиморфизма гена, као и досадашње контрадикторне резултате фармакогенетских истраживања у овој области, уочен је потенцијални значај испитивања утицаја гена на концентрацију карбамазепина у крви и процене ефикасности и безбедности терапије карбамазепином, дозиране и прилагођаване на стандардни начин у Србији. Додатно, дефинисање популационог фармакокинетичког модела клиренса карбамазепина и утврђивање алгоритма дозирања на основу утицаја испитиваних фармакогенетских и демографских карактеристика пацијената може бити од великог значаја у лечењу епилепсија у педијатријској популацији у Србији

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1.Дизајн истраживања

Истраживање је спроведено у виду интервентне, ретроспективно-проспективне клиничке студије IV фазе, на Клиници за педијатрију Клиничког центра Крагујевац. Испитивање је обављено у складу са начелима Добре клиничке праксе, уз одобрење Етичког одбора Клиницког центра Крагујевац (одлука број 01-7848, од 30.08.2010.) и Агенције за лекове и медицинска средства Србије (решење број 515-04-0271-12-1 од 10.10.2012.). По пријему добровољног писаног притстанка за учешће у студији, процењивана је подобност потенцијалног испитаника за укључивање у студију. Релевантни демографски и медицнски подаци прикуљани су путем директних разговора са испитаницима/родитељима, физикалним и неуролошким прегледом, као и увидом у медицинску историју пацијената. Уколико су били испуњени сви критеријуми за укључење и ниједан критеријум за неукључење, прикупљени су подаци о телесној тежини, узрасту, полу и етничкој припадности. Уколико је терапија карбамазепином била тек прописана, лек је увођен у препорученој дози која одговара узрасту и телесној маси пацијента. Испитаницима који су били на стабилној дози карбамазепина доза није мењана током прве посете, а следећи контролни преглед је био заказан за месец дана.

На првом контролном прегледу, а у време непосредно пре узимања следеће дозе карбамазепина, од испитаника су у Служби за клиничку фармакологију Клиничког центра Крагујевац узети узорци крви за за мерење концентрације лека у серуму, и генотипизацију. Додатни узорак крви узет је за рутинску лабораторијску анализу (Централна лабораторија Клиничког центра Крагујевац) у циљу откривања могућих нежељених ефеката карбамазепина путем процене следећих лабораторијских параметара: C-реактивног протеина (CRP), броја еритроцита, хемоглобина, хематокрита, броја леукоцита, броја тромбоцита, глукозе, урее, креатинина, холестерола, липопротеина велике густине (HDL), липопротеина мале густине (LDL), триглицерида, аспартат аминотрансферазе (AST), аланин аминотрансферазе (ALT), натријума, калијума, калцијума и фосфора. Од испитаника, односно њихових родитеља (старатеља), узета је и детаљна анамнеза о контроли епилептичких напада током студије. Други контролни преглед је био заказан за две недеље.

На другом контролном прегледу се, на основу резултата мерења концентрације карбамазепина у серуму, процењивао дозни режим и по потреби прилагођавала доза лека, а следећи контролни преглед је био заказан за месец дана.

На трећем контролном прегледу, а у време непосредно пре узимања следеће дозе карбамазепина, од испитаника је узет нови узорак крви за мерење концентрације лека у серуму. Такође, нови узорак крви узет је за рутинску лабораторијску анализу (Централна лабораторија Клиничког центра Крагујевац) у циљу откривања могућих нежељених ефеката карбамазепина путем процене претходно наведених лабораторијских параметара. Додатно је безбедност праћена детаљном анамнезом и проценом пријављених нежељених догађаја током трајања испитивања. Од испитаника, односно њихових родитеља (старатеља), поново је узимана детаљна анамнеза о контроли епилептичких напада, након евентуалног прилагођавања дозе лека. Направљен је неуролошки преглед, укључујући и електроенцефалограм (ЕЕГ), ради додатне процене ефикасности терапије. Ефикасност терапије карбамазепином у испитиваној популацији додатно је процењивана детаљном анамнезом о контроли епилептичких напада током трајања студије, као и анализом ЕЕГ- резултата током трајања студије (пре и после прилагођавања дозе лека).Наредни контролни прегледи су заказивани по потреби.

3.2.Испитаници

У истраживање је укључено 40 педијатријских пацијената са дијагностикованом епилепсијом и индикованим карбамазепином као терапијом. Учешће у студији је било добровољно, по пријему потписаног формулара Информисаног пристанка од стране једног од родитеља тј. старатеља (законски заступник детета).

Критеријуми за укључивање испитаника били су следећи:

- Старост испитаника од 2 до 20 година,
- Дијагностикована је парцијална или генерализована тоничко-клоничка епилепсија,
- Карбамазепин је индикован у терапији,

- Испитаник и његов законски заступник сагласни су са учешћем у студији.

Критеријуми за неукључивање испитаника били су следећи:

- Присуство познатих контраиндикација за примену карбамазепина,
- Употреба других лекова за које се зна да ступају у интеракције са карбамазепином или сока од грејпфрута,
- Присуство преткоморско-коморског блока, супресије костне сржи или порфирије,
- Дијагноза апсанса или миоклоничке епилепсије,
- Присуство повишеног очног притиска,
- Етничка припадност кинеском или тајландском народу,
- Трудноћа или дојење.

Критеријуми за искључивање испитаника подразумевали су појаву озбиљне нежељене реакције на лек или угрожену безбедност пацијента на било који други начин даљим учешћем у студији, као и ситуацију у којој би испитаник из било ког разлога одлучио да се повуче из студије, или истраживачи проценили да испитаник треба да буде искључен. Међутим, ови случајеви нису забележени, те ниједан испитаник није искључен из испитивања.

3.3.Узорковање и методе анализе

Од 40 пацијената прикупљени су узорци за одређивање серумске концентрације карбамазепина у времену краја дозног интервала (минимална концентрација), тј. узорковање по истеку интервала од 8-12 часова од претходне дозе лека, а пре узимања следеће, јутарње дозе. Том приликом прикупљени су и узорци крви за генотипизацију. По истеку најмање четири недеље од евентуалног прилагођавања дозе лека, прикупљени су нови контролни узорци крви за испитивање концентрације лека у серуму, такође у времену краја дозног интервала. Генотипизација и мерење концентрације карбамазепина у серуму извршене су на Катедри за фармакологију и токсикологију Факултета медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, а одређивање основних биохемијских параметара у Централној лабораторији Клиничког центра Крагујевац. Узорци су складиштени у одговарајућим, прописаним условима до извођења анализа.

У истраживању праћене су следеће независне варијабле: варијације *CYP3A5**2 (g.27289C>A, rs28365083) и *CYP3A5*3* (g.6986A>G, rs776746), *CYP2C8*3* (g.416G>A, rs11572080) и *CYP2C8*5* (g.475delA, rs72558196) и *CYP1A2*1F* (g.-163C>A, rs762551) и *CYP1A2*1C* (g.-3860G>A, rs2069514), одређиване методом ланчаног умножавања ДНК (енгл. polymerase chain reaction, PCR) и њеним модификацијама, и демографске карактеристике пацијената (узраст, пол и телесна маса). Зависне варијабле у студији су биле концентрације карбамазепина у серуму измерене методом течне хроматографије вискоих преформанси (енгл. high performance liquid chromatography, HPLC), и изабрани параметри ефикасности и безбедности терапије. Ефикасност лечења процењивана на основу контроле напада и ЕЕГ промена током трајања студије, а безбедност на основу изабраних лабораторијских параметара и појаве нежељених догађаја.

Величина узорка процењена је на основу података студије која се бавила испитивањем утицаја присуства генетске варијације *CYP3A5*3* на серумску концентрацију карбамазепина у равнотежном стању код корејских пацијената са епилепсијом (76). Уз употребу средњих вредности и стандардних девијација измерене концентрације карбамазепина код пацијената са функционалним CYP3A5 ензимом (9,94 ± 3,38 ng⁄ml) у односу на хомозиготне и хетерозиготне носиоце варијантног нефункционалног алела *CYP3A5*3* (13,07 ± 4,46 ng/ml), уз α=0,05 и снагу студије од 0,8 добијена је величина узорка од око 20 испитаника по групи, односно укупно 40 испитаника.

3.3.1. Методе генотипизације

ДНК је изолована из узорака пуне крви коришћењем PurelinkTM genomic DNA kit (Иnvitrogen, Carlsbad, CA), а концентрација је мерена употребом Qubit® 2.0 Fluorometer and Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). Генотипизација је спроведена методом ланчаног умножавања (енгл. Polymerase Chain Reaction, PCR) и њеним модификацијама. Све PCR реакције су изведена у

Techne Genius PCR Thermal Cycler (Techne, Cambridge, UK), у лабораторији Факултета медицинских наука у Крагујевцу.

CYP3A5 генотипизација

*CYP3A5*2* (27289C>A, rs28365083) генотипизација је спроведена по PCR методи комбинованој са рестрикцијом (енгл. Restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) van Schaik et al (105), уз мање модификације. Примењена метода је подразумевала умножавање секвенце ДНК у дужини од 269 bp. Реакциона смеша (20ul) садржала је око 20ng DNK, 0.2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,7mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), по 0,2ul прајмера 5'-CTGTTTCTTTCCTTCCAGGC-3' и 5'-CTCCATTTCCCTGGAGACTTG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) и 1 X PCR пуфер (Qiagen, Hilden, Germany). Услови реакције су подразумевали почетну денатурацију у трајању од 7 минута на температури од 94°C, 35 циклуса денатурације (1 минут на 94°C), хибридизације (1 минут на 55°C) и елонгације (1 минут на 70°C) и финалну елонгацију у трајању од 7 минута на 72°C. PCR продукти су потом изложени дејству рестрикционог ензима FastDigest® Tsp509I (Thermo Scientific, Waltham, MA), који на 65°C сече само варијантне алеле на фрагменте величине 182 bp и 87 bp. И PCR продукти и њихови рестрикциони фрагменти детектовани су методом електрофорезе на агарозном гелу концентрације 1,2% или 2,4%, бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

*CYP3A5*3* (6986A>G, rs776746) генотипизација је извршена према публикацији King et al (140). Изабрана PCR-RFLP метода је подразумевала умножавање секвенце величине 196bp у 15ul реакционе смеше, са око 20ng ДНК у 1 X PCR пуфера (Qiagen, Hilden, Germany), 0,2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2,5mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), по 0,2ul прајмера 5'-CTGTTTCTTTCCTTCCAGGC-3' и 5'-CTCCATTTCCCTGGAGACTTG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA), као и 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA). Услови под којим је изведена PCR реакција су били: почетна денатурација у трајању од 2 минута на 94°C, 35 циклуса денатурације (1 минут на 94°C), хибридизације (1 минут на 61°C) и елонгације (1 минут на 70°C), и финална елонгација на 72°C у току 7 минута. Рестрикциони ензим FastDigest® RsaI (Thermo Scientific,Waltham, MA), на температури од 37°C секао је wt алел на фрагменте величине 102bp, 94bp, 74bp и 20bp, а vt алел на фрагменте од 102bp, 74bp и 20bp. Сви продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на агароза гелу концентрације 1,2% или 2,4%, бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

CYP2C8 генотипизација

*CYP2C8*3* (416G>A, rs11572080) генотипизација је извршена по PCR-RFLP методи аутора Nakajima et al (72) у 20 ul PCR реакционе смеше састава: 20ng ДНК узорка, 1 x PCR пуфер (Qiagen, Hilden, Germany), 0,2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2,5mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), по 0,3ul прајмера 5′-AGGCAATTCCCCAATATCTC-3′ и 5′-CAGGATGCGCAATGAAGAC-3′ (New England Biolabs, Ipswich, MA) и 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA). Иницијална денатурација на 94°C је трајала 3 минута, потом је следило 30 циклуса денатурације (30 секунди на 94°C), хибридизације (30 секунди на 55°C) и елонгације (30 секунди на 72°C), док је финална елонгација при температури од 72°C у трајању од 5 минута. Рестрикциони ензим BseRI (New England Biolabs, Ipswich, MA) на температури од 37°C секао је wt алел на фрагменте величине 310bp, 110bp i 47bp, а а vt алел на фрагменте 357bp и 110bp дужине. Добијени фрагмени су раздвајани електрофорезом на 2% агароза гелу, бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

*CYP2C8*5* (475delA, rs72558196) генотипизација спроведена је алел-специфичном PCR методом (енгл. Allele-specific PCR, AS-PCR) по угледу на ранију публикацију(72). Наиме, умножавање ДНК секвенце величине 370bp у 15ul PCR реакционе смеше подразумевало је примену 0,2 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), 0,3ul заједничког прајмера 5′-AGGCAATTCCCCAATATCTC-3′ и 0,3ul прајмера 5′-TCACCCACCCTTGGTTTTT-3′ (за умножавање wt алела) или 5′-TCACCCACCCTTGGTTTTC-3′ (за умножавање vt алела) и 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA) у 1 x PCR пуфера (Qiagen, Hilden, Germany). Реакција је подразумевала иницијалну денатурацију у трајању од 3 минута на 94°C, потом је следило 30 циклуса денатурације (30 секунди на 94°C), хибридизације (30 секунди на 51°C) и елонгације (30 секунди на 72°C), уз финалну елонгацију на 72°C у трајању од 5 минута. Добијени продукти детектовани су електрофорезом на 2% агароза гелу бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

CYP1A2 генотипизација

*CYP1A2*1C* (-3860G>A, rs2069514) генотипизација спроведена је PCR-RFLP методом по угледу на Nakajima et al (141). Умножавање 597bp дуге секвенце ДНК спроведено је у 15 ul укупне реакционе смеше, са око 20ng ДНК, 0,3 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 2 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), по 0,3ul прајмера 5'-GCTACACATGATCGAGCTATAC-3' и 5'-CAGGTCTCTTCACTGTAAAG TTA-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA), у 1 X PCR пуфера (Qiagen, Hilden, Germany). Након иницијалне денатурације на 94°C у трајању од 2 минута, уследило је 30 циклуса денатурације (1,5 минута на 94°C), хибридизације (2 минута на 56°C) и елонгације (2 минута на 72°C), док је финална елонгација на 72°C трајала 2 минута. Рестрикциони ензим FastDigest® Ddel (Thermo Scientific,Waltham, MA) је на температури од 37°C секао само vt алеле на фрагменте величине 465bp и 132bp. Сви продукти и рестрикциони фрагменти су детектовани електрофорезом на агароза гелу концентрације 1,2%, бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

*CYP1A2*1F* (-163C>A, rs762551) генотипизација је извршена по PCR-RFLP методи Sachse et al (142). ДНК узорак у количини од око 20ng додат је PCR реакционој смеши састава 0,3 mM dNTP Mix (Thermo Scientific, Waltham, MA), 1,5 mM $MgCl_2$ (Thermo Scientific, Waltham, MA), по 0,3ul прајмера 5'-CAACCCTGCCAATCTCAAGCAC-3' и 5'-AGAAGCTCTGTGGCCGAGAAGG-3' (Invitrogen, Carlsbad, CA) и 0,5 U Taq полимеразе (Thermo Scientific, Waltham, MA), у 1 X PCR пуфера (Qiagen, Hilden, Germany), до укупног волумена од 15 ul. Услови реакције били су следећи: 2 минута иницијалне денатурације на 94°C, 35 циклуса денатурације (30 секунди на 94°C), хибридизације (10 секунди на 60°C) и елонгације (1 минут на 72°C), и 1 минут финалне елонгације на 72°C. Рестрикциони ензим Bsp120I (Thermo Scientific,Waltham, MA) је на температури од 37° C секао wt алел на фрагменте величине 710bp и 209bp, док је vt алел остао непромењене дужине од 919bp. Добијени продукти и фрагменти су раздвајани електрофорезом на 1.2% агароза гелу бојеном са Sybr® safe DNA gel stain (Invitrogen, Carlsbad, CA).

3.3.2. Мерење концентрације карбамазепина у серуму

Анализа прикупљених узорака у овом испитивању извршена је методом високо специфичне течне хроматографије (енгл. HighPerformance Liquid Chromatography, HPLC), у аналитичкој лабораторији Катедре за фармакологију и токсикологију Факултета медицинских наука у Крагујевцу, а по методологији описаној у литератури (139). Коришћен је изократски HPLC систем са ултраљубичастим детектором, који се састоји од пумпе (ISOS/GRAS, Chrompack,Middelburg, The Netherlands), UV-VIS детектора (Chrompack) и интегратора (Spectra Physics 4600 Data Jet integrator , San Jose, CA, USA). Сепарација је изведена на LiChrospher RP C18 колони (4.6 x250mm, 5μm), са мобилном фазом (55% метанола, 44% воде и 1% глац. сирћетне киселине) при брзини протока од 11ml/min и таласној дужини од 254nm.

Прикупљени узорци крви су прво центрифугирани 10 минута, на 3000 обртаја уз издвајање серума у посебну епрувету. Издвојени серум пацијената је чуван на +4°C (у фрижидеру) или на -20°C (у замрзивачу) зависно од тога да ли су узорци анализирани истог или после 5 дана. Припрема серума за HPLC анализу је извршена течном екстракцијом уз употребу диетил етра као растварача. Нижи лимит квантификације је износио 0,5 mg/ml, при линеарном опсегу до 18 mg/ml. Међудневне и унутардневне варијације у мерењима су биле мање од 5% (143).

3.3.3. Популациона фармакокинетичка анализа

У овом истраживању коришћен је приступ нелинеарног моделовања комбинованих ефеката (*NONinear Mixed-Effects Modelling* − NONMEM), а за развој популационог модела клиренса карбамазепина коришћен је (NONMEM) софтвер (ver. 7.3.0 Icon Development Solution), уз употребу ADVAN 1 субрутине из PREDPP библиотеке.

Изградња популационог фармакокинетичког модела клиренса карбамазепина укључила је три основна корака:

- Без испитивања утицаја коваријанти, уз употребу података о клиренсу и волумену дистрибуције из литературе, процењена је средња вредност клиренса карбамазепина на основу података прикупљених из испитиване популације: узраст ипитаника, телесна тежина, пол, измерене серумске концентрације лека, укупна дневна доза, дозни режим, време протекло од претходне дозе лека, комедикација валпроатима и генотипске групе за појединачни испитивани ген. Затим је процењена типична, средња вредност клиренса карбамазепина (CL-популациони параметар означен као ϴ1), а процењене су варијансе (ω^2 за интериндивидуалну варијабилност и σ^2 за резидуалну, интраиндивидуалну варијабилност), као и стандардне грешке. Овако је добијен базни модел.

- Затим су у базни модел појединачно укључиване испитиване коваријанте . Утицај сваке коваријанте на клиренс карбамазепина испитиван је на линеаран и нелинеаран начин, те је извршена униваријантна селекција што је резултирало регресионим моделима, као међукораком у анализи. Као основни статистички критеријум коришћена је добијена односно процењена вредност минималне објективне функције (енгл. Minimum Objective Function, MOF), при чему је била потребна редукција вредности између базног и појединачних, униваријантних модела од најмање 3.84 ($\chi2=3,841$ за $p<0,01$; df=1) да би се утицај испитиване коваријанте сматрао статистички значајним. Само оне коваријанте које су у потпуности испуниле овај статистички захтев биле су процењене као значајне, и оне су потом процесом истовременог укључивања додате у пуни модел. Потом је процесом који се назива уназадно брисање, а подразумева избацивање добијених коваријанти из пуног модела, изграђен коначни популациони фармакокинетички модел, уз поновну процену статистичког значаја за сваку коваријанту. У овом кораку статистички критеријуми су подразумевали редукцију MOF-а за сваку посебну коваријанту (више од 6,84 $p<0,01$; df=1 или 10,83 за $p<0,001$; df=1), затим, редукцију у интер- и интра-индивидуалној (резидуалној) варијабилности, као и побољшање распореда података представљених на графиконима који приказују однос између предвиђених (енгл. predicted, PRED) и измерених (енгл. dependent variable, DV) концентрација карбамазепина.
- Само фактори који су испунили ове критеријуме остали су укључени у коначни модел. У процесу валидације коначног модела, како би се проценила предиктивност коначних модела клиренса карбамезпина и реална

могућност његове употребе добијених у рутинској клиничкој пракси, примењена је непараметријска метода, тзв.”bootstrapping” анализа на двеста понављања са случајно изабраним вредностима из модела (144) . Све добијене вредности процењених параметара добијених NONMEM анализом су поређене са добијеним "bootstrapping” методом ради процене прецизности и стабилности фаркакокинетичког модела.

3.3.4. Статистичка обрада података

За статистичку обраду користили су се стандардни компјутерски програми Statistica® (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA) и SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences, ver. 20), а хаплотипови анализирани уз употребу програма Arlequin, version 3.11 (http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3). Прикупљени подаци су најпре анализирани методама дескриптивне статистике. Као мере централне тенденције и варијабилности коришћене су средња вредност ($\overline{x}$) и медијана (M_e), односно стандардна девијација (σ) и интерквартални распон (I_Q). За поређење опсервираних и очекиваних фреквенција алела (Hardy-Weinberg равнотежа) користио се $\chi2$ тест, као за и поређење ЕЕГ резултата и појаве нежељених догађаја међу генотипским групама после прилагођавања лека. Shapiro-Wilk тестом процењена је нормалност дистрибуције, а корелација доза и концентрација процењивана је Spearman-овом анализом. Дозе карбамазепине су приказене по килограму телесне тежине, а концентрације су дозно нормализоване по килограму телесне тежине (145). Однос дневних доза и серумских концентрација карбамазепина међу генотипски различитим групама процењиван је параметријским Студентовим- t тестом за две групе или једносмерном анализом варијанси (ANOVA) за три и више група. Анализа разлике у праћеним лабораторијским параметрима безбедности међу генотипски различитим групама спроведена је уз употребу непараметријског Mann-Whitney теста. Статистичка значајност је одређена вредношћу $p<0,05$, а 95% границе поверења рачунате се према модификованој Wald методи. Резултати су приказани табеларно или графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Карактеристике испитаника и примењене терапије

У истраживање је укључено 40 педијатријских пацијената, од којих су 24 (60%) били мушког, а 16 (40%) женског пола. Сви пацијенти били су узраста од 4 до 20 година ($\bar{x}$±σ: 10,6±2,9), и телесне масе у распону од 17-65 кг ($\bar{x}$±σ: 40,4±12,8). Код 34 пацијента епилепсија је била идиопатска, а код 6 симптоматска. Од укупног броја испитаника, 4 су била на истовременој терапији валпроатима, у дозама које су се кретале у распону од 240mg до 1000mg, уз средњу вредност од 585,00 ± 193,79 mg, по прилагођавању дозе лека. Сви остали испитаници били су на монотерапији карбамазепином (дозе су приказане у Табели 6), при чему према анамнестичким подацима није било одступања у дозном режиму. Током периода праћења, ниједан други лек није забележен у комедикацији. Према резултатима лабораторијских анализа, сви учесници имали су очувану функцију јетре и бубрега. Такође, током периода праћења није било значајних промена у неуролошком налазу, нити клинички значајних одступања у праћеним виталним знацима.

У испитиваној популацији није пријављен ниједан епилептични напад током трајања студије. Напротив, код 6 пацијента (15%) регистрована су побољшања у ЕЕГ налазима. Наиме, пре прилагођавања дозе лека код 12 пацијената (30%) регистровани су активни електрофизиолошки фокуси у ЕЕГ налазима, док је код осталих регистрован нормалан или неспецифичан ЕЕГ налаз без јасно изражених фокуса. После прилагођавања дозе лека, код 6 пацијената (15%) описани су активни фокуси, док је код осталих уочен неспецифичан или нормалан ЕЕГ налаз. Уочена разлика у ЕЕГ резултатима пре и после прилагођавања дозе лека била је статистички значајна (χ^2=16,47, p=0,000).

Вредности лабораторијских параметара праћених у току студије налазе се у Табели 5. Иако су за поједине испитанике забележена мања одступања од референтних вредности, ниједно није процењено као клинички значајно, уз напомену да током испитивања код два пацијента техничким пропустом нису забележене вредности два параметра: креатинина и калцијума.

Табела 5. Вредности лабораторијских параметара праћених у току студије

	Min	Max	M_e	I_Q	Референтне вр.	Јединице
CRP (ц-реактивни протеин)	0,10	8,50	2,50	2,50 - 5,00	0 - 5	mg/l
Er (еритроцити)	3,77	5,31	4,76	4,58 - 5,15	4.2 - 6.10	x10 12/l
Hg (хемоглобин)	110,00	150,00	134,00	128,00-150,00	120 - 180	g/l
Hct (хематокрит)	0,34	0,44	0,41	0,39 - 0,44	0.370-0.520	l/l
Le (леукоцити)	3,00	7,80	5,70	4,50 - 7,80	4.8 - 10.8	x109/l
Tr (тромбоцити)	168,00	331,00	265,00	222,00-265,00	130 - 400	x109/l
Gly (глукоза)	3,60	6,40	4,80	4,40 - 4,95	3.8 - 6.1	mmol/l
Urea (уреа)	1,70	5,50	4,35	4,00 - 5,50	3.0 - 8.0	mmol/l
Creat. (креатинин)	24,00	77,50	58,00	53,00-77,50	49 - 106	umol/l
Chol. (холестерол)	3,77	6,14	4,42	4,15 - 4,86	3.10 - 5.2	mmol/l
HDL (липопротеини велике густине)	0,96	2,58	1,75	1,69 - 1,80	1.10 - 2.50	mmol/l
LDL (липопротеини мале густине)	1,80	4,14	2,24	1,80 - 2,72	0.10 - 3.50	mmol/l
TG (триглицериди)	0,24	2,14	0,90	0,70 - 0,90	0.10 - 1.70	mmol/l
AST (аспартат-аминотрансфераза)	0,00	38,00	22,50	20,00-28,00	0 - 40	IU/l
ALT (аланин-амоинотрансфераза)	11,00	52,00	20,00	19,00-21,00	0 - 40	IU/l
Na (натријум)	134,00	145,00	140,00	138,00-142,00	137 - 147	mmol/l

K (калијум)	4,00	5,00	4,40	4,40 - 4,40	3.5 - 5.3	mmol/l
Ca (калцијум)	2,33	2,70	2,46	2,33 - 2,50	2.02 - 2.65	mmol/l
P (фосфор)	1,20	1,94	1,50	1,20 - 1,57	0.80 - 1.60	mmol/l

M_e - медијана ; I_Q - Интерквартални распон

Од укупног броја испитаника, њих 11 (27,5%) је пријавило нежељене догађаје током периода праћења, и то: поспаност односно умор (пријавило 5 испитаника), главобољу и/или мучнину (3 испитаника), слабу концентрацију или бол у стомаку (2 испитаника), промене у меструалном крварењу, раздражљивост, фотофобију и/или смањење апетита (по 1 испитаник). Сви регистровани догађаји су били благог до умереног интензитета, ниједан није захтевао медикаментозно лечење, нити је због њих карбамазепин искључен из терапије или доза смањена. Такође, код свих пацијената, сем код једне пацијенткиње (која је пријавила промене у менструалном крварењу као нежељени догађај током терапије), пријављени догађаји су били пролазног карактера. Применом Нарањо скале (146), сви пријављени догађаји били су процењени као могуће везани за употребу карбамазепина (забележени скор је био у распону од 2 од 4). Ниједан пацијент није искључен из студије, било одлуком лекара, било својевољно.

Укупне дневне дозе карбамазепина, дневне дозе по килограму телесне масе, серумске концентрације, као и дозно нормализоване концентрације карбамазепина пре и после прилагођавања терапијске дозе у испитиваној популацији приказане су у Табели 6. Вредности дневне дозе по килограму телесне масе као и дозно нормализоване серумске концентрације лека су пратиле нормалну расподелу (SW-W≤0,98, p≥0,25).

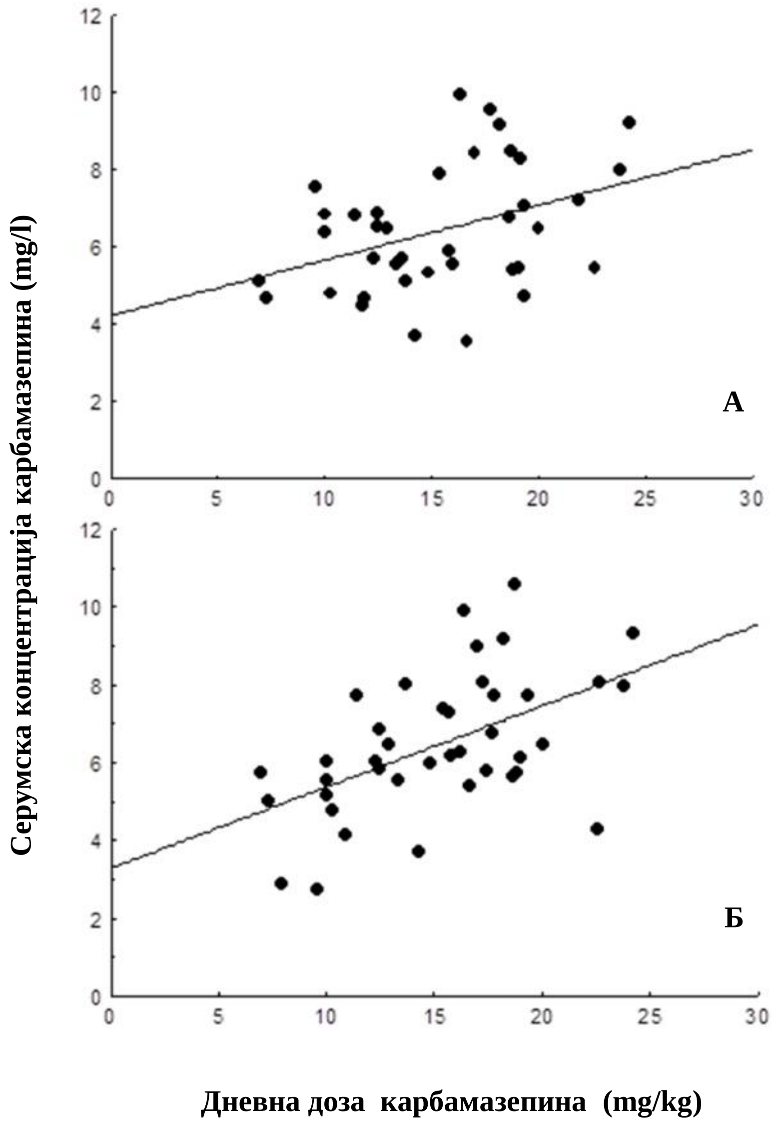
Табела 6. Вредности дневне дозе, дневне дозе по килограму телесне масе, серумске концентрације и дозно нормализоване серумска концентрације пре и после прилагођавања дозе карбамазепина

	$\bar{x} \pm \sigma$	Опсег
ДД (mg/дан)	595,50 ± 194,72	260 - 1000

ДД/ТМ (mg/kg)	15,32 ± 4,36	6,90 - 24,24
СК (mg/l)	6,44 ± 1,63	3,52 - 9,93
НСК (mg/ml)	0,44 ± 0,14	0,21 - 0,79
ДД (mg/dan)	585,00 ± 193,79	240 - 1000
ДД/ТМ (mg/kg)	15,24 ± 4,50	6,89 - 24,24
СК (mg/l)	6,48 ± 1,79	2,71- 10,58
НСК (mg/ml)	0,45 ± 0,13	0,19 - 0,83

ДД - дневна доза, ДД/ТМ - дневна доза по килограму телесне масе, СК - серумска концентрација, НСК - дозно нормализована серумска концентрација, $\bar{x}$ - средња вредност, σ - стандардна девијација

Између дневне дозе и серумске концентрације карбамазепина уочена је позитивна корелација и пре и после прилагођавања дозе лека (Графикон 1).



Графикон 1. Корелација између дневних доза и серумске концентрације карбамезепина: А) пре прилагођавања дозе (r=0,39, p=0,017) и Б) после прилагођавања дозе (r=0,52, p=0,0005)

4.2. *CYP3A5*

4.2.1. Учесталост испитиваних *CYP3A5* полиморфизама

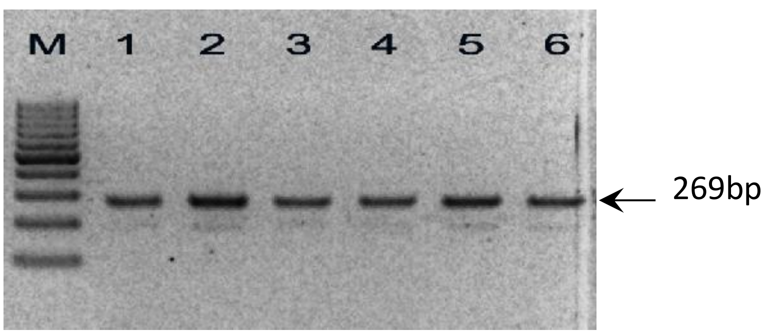
Учесталост испитиваних *CYP3A5* полиморфизама, хаплотипова и генотипова приказана је у Табели 7. Све добијене вредности биле су у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом ($\chi 2<0,584$, p=0,05).

Табела 7. Учесталост испитиваних *CYP3A5* полиморфизама, хаплотипова и генотипова у испитиваној популацији

		Учесталост	95% интервал поверења
Полиморфизми			
	27289C>A	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
	6986A>G	0, 975 (78/80)	0,907; 0, 998
Хаплотипови			
	CYP3A5*1A	0, 025 (2/80)	0,000; 0,093
	CYP3A5*2	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
	CYP3A5*3	0,975 (78/80)	0,907; 0,998
Генотипови			
	CYP3A5*1A/*3	0,050 (2/40)	0,893; 0,989
	CYP3A5*3/*3	0,950 (38/40)	0,893; 0,989

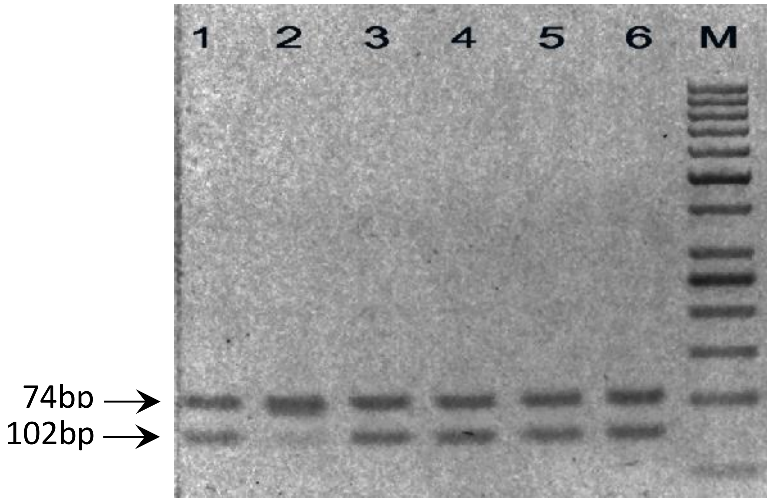
Примери резултата генотипизације *CYP3A5* приказани су на сликама 2 и 3.

Слика 2: Пример резултата генотипизације *CYP3A5*2* (27289C>A, rs28365083)



Колона M: 100bp ДНК маркер; колоне 1-6: 27289C/C

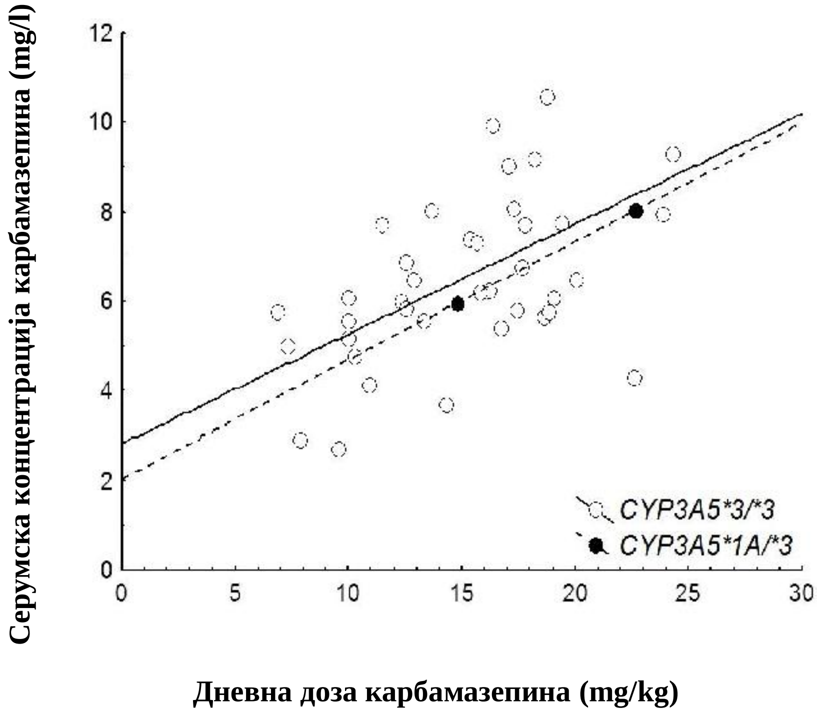
Слика 3: Пример резултата генотипизације *CYP3A5*3* (6986A>G, rs776746)



Колоне 1, 3-6: 6986G/G; колона 2: 6986A/G; колона M: 50bp ДНК маркер

4.2.2. Утицај испитиваних *CYP3A5* полиморфизама на концентрацију карбамазепина

Како у испитиваној популацији није било носилаца *CYP3A5*1A/*1A* генотипа, сви испитаници подељени су у две групе: хетерозиготне (генотип *CYP3A5*1A/*3)* или хомозиготне (генотип *CYP3A5*3/*3*) носиоце варијације **3*. Након прилагођавања дозе карбамазепина, није било статистички значајне разлике међу групама у дневним дозама (p=0,26), као ни у дозно нормализованим концентрацијама лека (p=0,47). Код хомозиготних носилаца варијације **3* у поређењу са осталим испитаницима уочена је тенденција ка нижим дозама ($\bar{x}$±σ: 15,06 ± 4,45 mg/kg наспрам 18,74 ± 5,55 mg/kg), и вишим постигнутим концентрацијама лека ($\bar{x}$±σ: 0,45 ± 0,13 mg/kg наспрам 0,38 ± 0,03 mg/kg). Корелација дневних доза по килограму телесне масе и серумске концентрације карбамазепина према *CYP3A5* генотипским групама након прилагођавања дозе приказана је графиконом 2 (*CYP3A5*3/*3*: p = 0.0002; за *CYP3A5*1A/*3* генотип није било довољно испитаника за израчунавање корелације).



Графикон 2: Корелација између дневних доза по килограму телесне масе и серумске концентрације карбамазепина према *CYP3A5* генотипским групама, након прилагођавања дозе лека

4.2.3. Утицај испитиваних *CYP3A5* полиморфизама на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Анализа ЕЕГ резултата после прилагођавања дозе карбамазепина није показала статистички значајну разлику међу *CYP3A5* генотипским групама (Табела 8.).

Табела 8. Заступљеност ЕЕГ налаза са и без фокуса код испитаника након прилагођавања дозе карбамазепина, у односу на хетерозиготне или хомозиготне носиоце *CYP3A5*3* полиморфизма

		CYP3A5 генотип		
		**1A/*3*	**3/*3*	Укупно
ЕЕГ налаз	са фокусима	0 (0,0%)	6 (100,0%)	6 (100,0%)
	без фокуса	2 (5,9%)	32 (94,1%)	34 (100,0%)
	Укупно	2 (5,0%)	38 (95,0%)	40 (100,0%)

$\chi^2=0{,}37$, df=1, p=0,54

Статистички значајна разлика није уочена ни у праћеним параметрима безбедности терапије карбамазепином, укључујући лабораторијске параметре (Табела 9) и појаву нежељених догађаја (пријавило 10 носилаца *1A/*3* генотипа (26,3%) и 1 носилац *3/*3* генотипа (50%), χ^2=0,53, *p*=0,46). Такође, међу групама није било статистички значајне разлике ни у клиренсу карбамазепина (p=0,79), мада је код хомозиготних носилаца *3* варијације у поређењу са осталим испитаницима уочена тенденција ка нижим вредностима клиренса овог лека ($\bar{x}\pm\sigma$: 0,14 ± 0,05 mg/kg наспрам 0,15 ± 0,01 mg/kg).

Табела 9. Вредности лабораторијских параметара после прилагођавања дозе лека према *CYP3A5* генотипским групама

CYP3A5 генотип	*1A/*3				*3/*3				
	Min	Max	M_e	I_Q	Min	Max	M_e	I_Q	p*
CRP	0,20	2,50	1,35	0,20-/	0,10	8,50	2,50	2,50-5,00	0,24
Er	4,58	4,58	4,58	4,58-4,58	3,77	5,31	4,83	4,46-5,15	0,67
Hg	126,00	126,00	126,00	126,00-126,00	110,00	150,00	134,50	127,00-150,00	0,46
Hct	0,37	0,37	0,37	0,37- ,37	0,34	0,44	0,41	0,38-0,44	0,46
Le	5,20	5,20	5,20	5,20-5,20	3,00	7,80	5,80	4,58-7,80	0,82
Tr	234,00	234,00	234,00	234,00-234,00	168,00	331,00	265,00	221,00-265,00	0,56
Gly	4,60	4,70	4,65	4,60-/	3,60	6,40	4,88	4,45-4,95	0,44
Urea	2,30	2,80	2,55	2,30-/	1,70	5,50	4,65	3,20-5,50	0,10
Creat.	/	/	/	/	24,00	77,50	58,50	46,50-77,50	/
Chol.	4,69	5,00	4,85	4,69-/	3,77	6,14	4,30	4,15-4,86	0,34
HDL	1,26	1,52	1,39	1,26-/	0,96	2,58	1,80	1,38-1,80	0,36
LDL	2,02	3,06	2,54	2,02-/	1,80	4,14	2,24	1,80-2,72	0,57
TG	0,24	1,85	1,05	0,24-/	0,30	2,14	0,90	0,70-0,97	0,97
AST	29,00	35,00	32,00	29,00-/	0,00	38,00	21,50	20,00-29,00	0,11
ALT	21,00	32,00	26,50	21,00-/	11,00	52,00	20,00	19,00-22,00	0,15
Na	145,00	145,00	145,00	145,00-145,00	134,00	145,00	140,00	138,00-142,00	0,05
K	4,40	4,40	4,40	4,40-4,40	4,00	5,00	4,40	4,40-4,55	0,92

Ca	/	/	I	/	2,33	2,70	2,46	2,33-2,54	/
P	1,59	1,59	1,59	1,59-1,59	1,20	1,94	1,47	1,20-1,59	0,53

M_e-медијана , I_Q- Интерквартални распон; *Mann-Whitney U тест

4.2.4. Популациона фармакокинетика карбамазепина и *CYP3A5* полиморфизам

Обзиром на недовољан број испитаника по групама, популациони фармакокинетички модел који би проценио утицај испитиваних *CYP3A5* полиморфизама на клиренс карбамазепина није израђиван.

4.3. *CYP2C8*

4.3. 1. Учесталост испитиваних *CYP2C8* полиморфизама

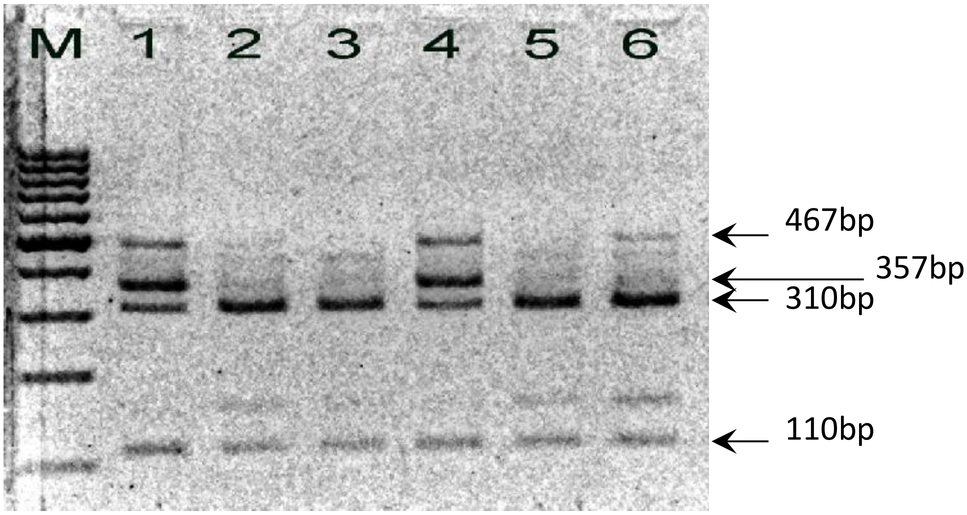
Учесталост испитиваних *CYP2C8* полиморфизама, хаплотипова и генотипова приказана је у Табели 10. Све добијене вредности биле су у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом (χ2<1.111, p=0,05).

Табела 10. Учесталост испитиваних *CYP2C8* полиморфизама, хаплотипова и генотипова у испитиваној популацији

		Учесталост	**95% интервал поверења**
Полиморфизми			
	416G>A	0,100 (8/80)	0,050; 0,188
	475delA	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
Хаплотипови			
	CYP2C8*1A	0,900 (72/80)	0,812; 0,950
	CYP2C8*3	0,100 (8/80)	0,050; 0,188
	CYP2C8*5	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
Генотипови			
	CYP2C8*1A/*1A	0,825 (33/40)	0,676; 0,861
	CYP2C8*1A/*3	0,150 (6/40)	0,068; 0,245
	CYP2C8*3/*3	0,025 (1/40)	0,000; 0,109

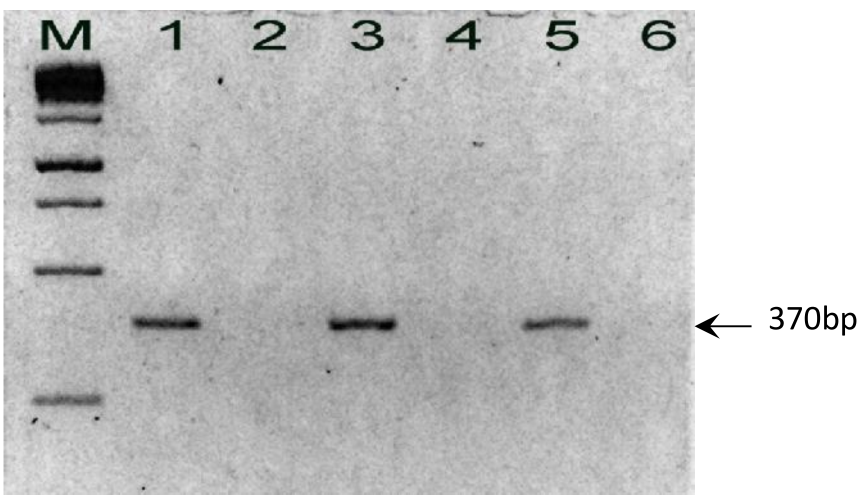
Примери резултата генотипизације *CYP2C8* приказани су на сликама 4 и 5.

Слика 4: Пример резултата генотипизације *CYP2C8*3* (416G>A, rs11572080)



Колона M: 100 bp ДНК маркер; колоне 1, 4: 416G/A; колоне 2, 3, 5, 6: 416G/G

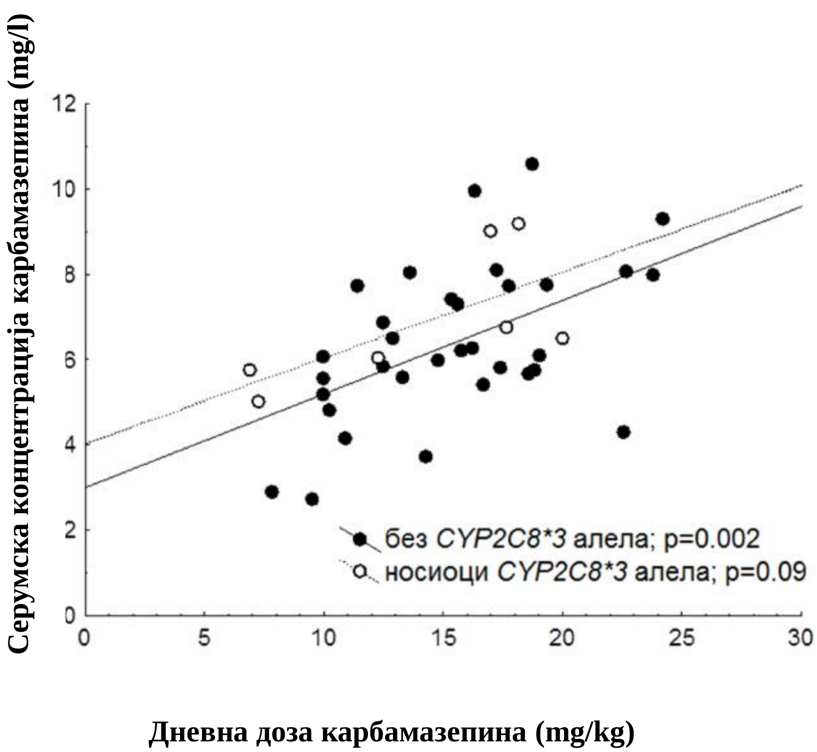
Слика 5.: Пример резултата генотипизације *CYP2C8*5* (475delA, rs72558196)



Колона M: 1kb ДНК маркер; колоне 1, 3, 5: 475A; колоне 2, 4, 6: 475delA

4.3.2. Утицај испитиваних *CYP2C8* полиморфизама на концентрацију карбамазепина

Како у испитиваној популацији није било носилаца *CYP2C8*5* полиморфизма, сви испитаници подељени су према резултатима *CYP2C8*3* генотипизације на групу носилаца **3* полиморфизма (генотипови *CYP2C8*1A/*3* и *CYP2C8*3/*3)* и групу без полиморфизма (генотип *CYP2C8*1A/*1A).* Након прилагођавања дозе карбамазепина, није било статистички значајне разлике међу групама у дневним дозама (p=0,05). Корелација дневне дозе и постигнуте серумске концентрације карбамазепина након прилагођавања дозе била је значајна само у групи испитаника без *CYP2C8*3* полиморфизма (r=0,52, p=0,002, Графикон 3.). Код носилаца ове варијације у поређењу са осталим испитаницима уочена је тенденција ка нижим дневним дозама ($\bar{x}\pm\sigma$: 14,19 ± 5,39 mg/kg наспрам 15,46 ± 4,35 mg/kg, p=0,5) и вишим дозно нормализованим концентрацијама лека ($\bar{x}\pm\sigma$: 0,54 ± 0,18 mg/ml наспрам 0,43 ± 0,11 mg/ml, p=0,04).



Графикон 3: Корелација између дневних доза по килограму телесне масе и серумске концентрације карбамазепина према *CYP2C8* генотипским групама, након прилагођавања дозе лека

4.3.3. Утицај испитиваних *CYP2C8* полиморфизама на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Анализа ЕЕГ резултата после прилагођавања дозе карбамазепина није показала статистички значајну разлику међу *CYP2C8* генотипским групама (Табела 11.).

Табела 11. Заступљеност ЕЕГ налаза са и без фокуса код испитаника након прилагођавања дозе карбамазепина, у односу на присуство *CYP2C8*3* полиморфизма

		CYP2C8 генотип		
		**1A/*3* и **3/*3*	**1A/*1A*	Укупно
ЕЕГ налаз	са фокусима	6 (100,0%)	0 (0,0%)	6 (100,0%)
	без фокуса	27 (84,4%)	7 (20.6%)	34(100,0%)
	Укупно	33 (82,5%)	7 (17,5%)	40(100,0%)

χ^2=1,49, df=1, p=0,22

Статистичка значајна разлика међу групама није уочена ни у праћеним параметрима безбедности терапије карбамазепином, укључујући већину лабораторијских параметара (сем триглицерида, Табела 12.) и појаву нежељених догађаја, које су пријавила 3 (42,9%) испитаника који су припадала групи носилаца испитиване варијације, и 8 (24,2%) испитаника који су били хомозиготни носиоци дивљег алела гена (χ^2=1.00, df=1, p=0,316).

Табела 12. Вредности лабораторијских параметара после прилагођавања дозе лека према *CYP2C8* генотипским групама

CYP2C8 генотип	**1A/*1A*				**1A/*3* и **3/*3*				
	Min	Max	Me	I_Q	Min	Max	Me	I_Q	p*
CRP	0,10	8,50	2,50	2,33-5,00	1,00	7,60	2,50	1,75-6,30	0,68
Er	3,77	5,15	4,76	4,44-5,15	4,42	5,31	5,00	4,58-5,15	0,39
Hg	110,00	150,00	133,50	126,25-150,00	125,00	150,00	142,00	127,00-150,00	0,69
Hct	0,34	0,44	0,41	0,37-0,44	0,38	0,44	0,42	0,39-0,44	0,45
Le	3,00	7,80	5,60	4,60-7,80	3,70	7,80	6,60	4,20-7,80	0,91
Tr	168,00	331,00	265,00	219,00-265,00	216,00	265,00	258,00	252,00-265,00	0,53
Gly	3,60	6,40	4,88	4,60-4,95	3,60	5,80	4,55	3,98-5,16	0,29
Urea	1,70	5,50	4,40	3,20-5,50	2,30	5,50	3,20	2,60-5,50	0,48

Creat.,	24,00	77,50	58,00	43,00-77,50	29,00	77,50	58,00	56,00-77,50	0,69
Chol.	3,77	6,14	4,25	4,15-4,86	4,08	5,48	4,64	4,15-5,26	0,48
HDL	0,96	2,58	1,80	1,41-1,80	1,11	1,80	1,39	1,15-1,80	0,10
LDL	1,80	4,14	2,24	1,80-2,72	1,80	3,86	2,28	1,80-3,06	0,88
TG	0,24	1,85	0,90	0,67-0,90	0,63	2,14	1,27	0,90-1,76	***0,04***
AST	0,00	38,00	23,00	20,00-29,00	0,00	35,00	22,00	20,00-29,00	0,86
ALT	13,00	52,00	20,00	19,00-22,00	11,00	35,00	21,00	17,75-26,75	0,46
Na	134,00	145,00	140,00	137,25-142,00	138,00	145,00	142,00	140,00-142,00	0,13
K	4,00	5,00	4,40	4,40-4,70	4,10	4,40	4,40	4,30-4,40	0,06
Ca	2,33	2,62	2,44	2,33-2,53	2,33	2,70	2,50	2,33-2,62	0,39
P	1,20	1,94	1,45	1,20-1,59	1,20	1,65	1,58	1,20-1,59	0,66

M_e-медијана , I_Q- Интерквартални распон, *Mann-Whitney U тест

4.3.4. Популациона фармакокинетика карбамазепина и *CYP2C8* полиморфизам

У изградњи популационог фармакокинетичког модела за процену утицаја *CYP2C8* генотипа и основних демографских фактора на клиренс карбамазепина, средња вредност клиренса из базног модела износила је 4,04 l/час, уз вредност MOF од 416,076. Интер-индивидуална варијабилност износила је 41,37%, а интра-индивидуална варијабилност 22,64% .

У току развоја пуног популационог модела, добијени су појединачни регресиони модели за сваки испитивани фактор који је појединачно додаван у базни модел (телесна маса, узраст, пол, укупна дневна доза, *CYP2C8* генотип, истовремена терапија валпроатима), који су помоћу вредности MOF процењивани, а приказани у Табели 13.

Табела 13. Вредности MOF током изградње базног и коначног модела клиренса карбамазепина

Модели клиренса	MOF	p*
Базни модел $CL=\theta_1 *EXP(ETA(1))$	416,076	
Појединачни регресиони модели $CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_3 *TBW$	416,076	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_4 * AGE$	416,075	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_5* SEX$	319,251	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_6* DD$	309,305	<0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_7*$ *CYP2C8*	416,017	>0,05
$CL=\theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_8* VPA$	405,936	<0,05
Коначни модел CL= 0,215+0,0696*SEX+0,000183*DD	267.317	

p*-вредност за разлику у МОФ између базног и осталих модела

CL - клиренс (l/h); θ1 – типична вредност CL; ETA (1) –интериндивидуална варијабилност CL; θ3 до θ8 - параметри коваријантних ефекат а; TBW – телесна маса пацијента (kg); SEX - 1 за мушки пол или 0 за женски пол; DD –дневна доза карбамазепина (mg/day); *CYP2C8* – 0, 1 или 2 за *CYP2C8*1A/*1A*, *CYP2C8*1A/*3* и *CYP2C8*3/*3*, VPA – 1 у случају истовремене терапије валпроатима, или 0 у случају монотерапије карбамазепином.

Уз поштовање статистичких критеријума изградње модела у овој фази (разлика у MOF ≤ 3,84 између базног и појединачних модела), у пуни модел укључене су три коваријанте: укупна дневна доза, пол, и истовремена терапија валпроатима. Применом процеса уназадног искључивања (уз MOF разлику > 6,6 за p <0,01 и df = 1), само су пол и укупна дневна доза испунили критеријуме за укључење у коначни модел:

CL (l/h) = 0,215 + 0,0696* SEX + 0,000183* DD.

SEX - 1, у случају мушког пола и 0 у случају женског пола,   и DD - укупна дневна доза карбамазепина (mg/d)

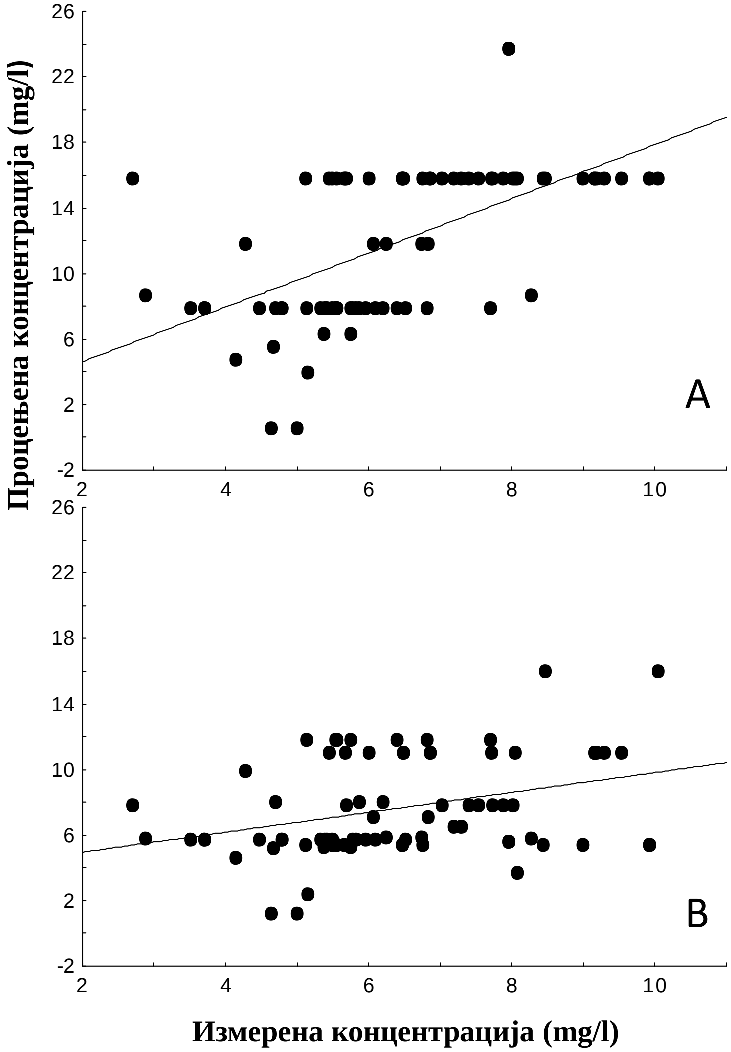
MOF коначног модела била је за 148,759 мања од вредности базног модела, уз смањену интериндивидуалну (25,42%) и интраиндивидуалну варијабилност (15,88%). Параметри коначног модела и њихови интервали поверења представљени су у Табели 14, добијени на основу NONMEM анализе. У истој табели приказани су и вредности фармакокинетичких параметара добијени процесом валидације уз употребу "bootstrap" анализе са двеста понављања.

Табела 14. Процене параметара коначног модела

Параметар	**NONMEM**		**Bootstrap analiza**	
	Процењена вредност	**95% интервал поверења***	**Процењена вредност**	**95% интервал поверења****
CL/F (l/h)	0,215	0,176 – 0,254	0,207	0,189 – 0,225
SEX	0,0696	0,0545 – 0,0847	0,0698	0,0527 – 0,0869
DD (mg/l)	0,000183	0,000079 – 0,000287	0,000079 – 0,000287	0,000141 – 0,000247
Интериндивидуална варијабилност CL-ω^2_{CL}	0,0626	0,0371 – 0,0881	0,0669	0,058 – 0,0758
Резидуална варијабилност - σ^2	0,0249	0,018 – 0,0318	0,0262	0,023 – 0,0294

* (процењена вредност) ± 1,96 x (стандардна грешка); ** 2,5. и 97,5. перцентили процењених параметара помоћу bootstrap анализе

Дистрибуција података измерених вредности карбамазепина у односу на процењене вредности из базног и коначног модела приказана је Графиконом 4.



Графикон 4. Корелација између процењених и измерених концентрација карбамазепина у А) базном моделу и Б) коначном моделу

4.4. *CYP1A2*

4.4.1. Учесталост испитиваних *CYP1A2* полиморфизама

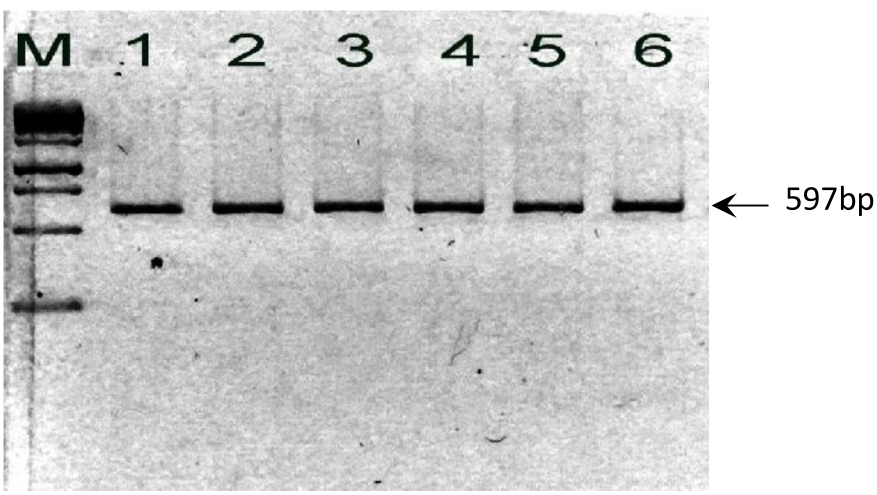
Учесталост испитиваних *CYP1A2* полиморфизама, хаплотипова и генотипова приказана је у Табели 15. Све добијене вредности биле су у складу са Hardy-Weinberg еквилибријумом ($\chi 2<0,026$, $p=0,05$).

Табела 15. Учесталост испитиваних *CYP1A2* полиморфизама, хаплотипова и генотипова у испитиваној популацији

		Учесталост	95% интервал поверења
Полиморфизми			
	-3860G>A	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
	-163C>A	0,650 (52/80)	0,540; 0,745
Хаплотип			
	CYP1A2*1A	0,350 (28/80)	0,255; 0,460
	CYP1A2*1C	0,000 (0/80)	0,000; 0,056
	CYP1A2*1F	0,650 (52/80)	0,540; 0,745
Генотип			
	CYP1A2*1A/*1A	0,150 (6/40)	0,068; 0,245
	CYP1A2*1A/*1F	0,400 (16/40)	0,264; 0,489
	CYP1A2*1F/*1F	0,450 (18/40)	0,307; 0,536

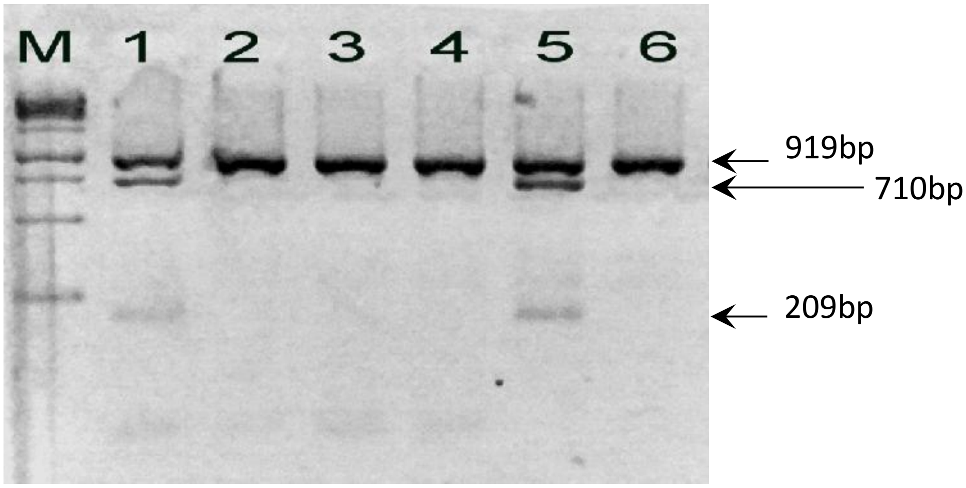
Примери резултата генотипизације *CYP1A2* приказани су на сликама 6 и 7.

Слика 6.: Пример резултата генотипизације *CYP1A2*1C* (-3860G>A, rs2069514)



Колона M: 1kb ДНК маркер; колоне 1-6: -3860G/G

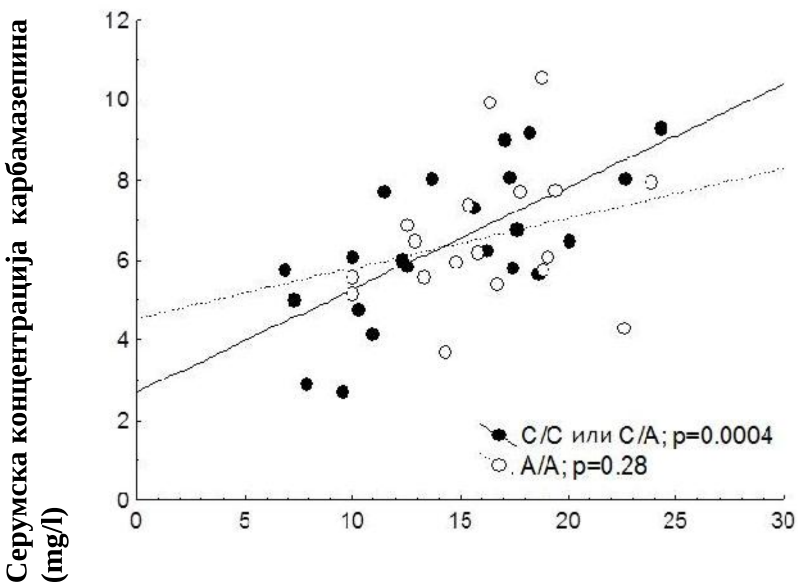
Слика 7.: Пример резултата генотипизације *CYP1A2*1F* (-163C>A, rs762551)



Колона М: 1kb ДНК маркер; колоне 1, 5: -163C/A; колоне 2-4, 6: -163A/A

4.4.2. Утицај испитиваних *CYP1A2* полиморфизама на концентрацију карбамазепина

Генотипизацијом су у испитиваној популацији идентификовани *CYP1A2*1A/*1A*, *CYP1A2*1A/*1F,* и *CYP1A2*1F/*1F* генотипови, па су испитаници подељени у две групе: групу носилаца варијације (*CYP1A2*1A/*1F* и *CYP1A2*1F/*1F)* и групу без варијације (*CYP1A2*1A/*1A).* Након прилагођавања дозе карбамазепина, међу групама није било статистички значајне разлике у дневним дозама (p=0,05). Корелација дневне дозе и концентрације била је значајна у групи носилаца *CYP1A2*1F* варијације (r=0,68, p=0,0004, Графикон 5). Код хомозиготних носилаца *CYP1A2*1F* варијације у односу на остале испитанике, уочена је тенденција ка вишим дозама ($\overline{x}\pm\sigma$: 16,23 ± 3,83 mg/kg наспрам 14,43 ± 4,92 mg/kg, p=0,21) и нижим дозно-нормализованим серумским концентрацијама лека ($\overline{x}\pm\sigma$: 0,42 ± 0,12 mg/kg наспрам 0,47 ± 0,14 mg/kg, p=0,26).



Графикон 5. Корелација између дневних доза по килограму телесне масе и серумске концентрације карбамазепина према *CYP1A2* генотипским групама након прилагођавања дозе лека

4.4.3. Утицај испитиваних *CYP1A2* полиморфизама на ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Анализа ЕЕГ резултата после прилагођавања дозе карбамазепина није показала статистички значајну разлику међу *CYP1A2* генотипским групама (Табела 16.).

Табела 16. Заступљеност ЕЕГ налаза са и без фокуса код испитаника након прилагођавања дозе карбамазепина, у односу на присуство *CYP1A2*1F* полиморфизма

		CYP1A2 генотип		
		**1A/*1A*	**1A/*1F* и **1F/*1F*	Укупно
ЕЕГ налаз	са фокусима	0 (0,0%)	6 (100,0%)	6(100,0%)
	без фокуса	6 (17,6%)	27 (82,4%)	34(100,0%)
	Укупно	6 (15,0.%)	34 (85,0%)	40(100,0%)

χ^2=1,24, df=1, p=0,26

Статистичка значајна разлика међу групама није уочена ни у праћеним параметрима безбедности терапије карбамазепином, укључујући лабораторијске параметре (Табела 17) и појаву нежељених догађаја, које је пријавило 9 (26,5%) носилаца *CYP1A2*1F* полиморфизма и 2 (33,3%) испитаника без овог полиморфизма (χ^2=0,12, df=1, p= 0,73).

Табела 17. Вредности лабораторијских параметара после прилагођавања дозе лека према *CYP1A2* генотипским групама

CYP1A2 генотип	*1A/*1A				*1A/*1F и *1F/*1F				
	Min	Max	Me	I_Q	Min	Max	Me	I_Q	p*
CRP	0,20	5,00	2,50	0.60-3.75	0,10	8,50	2,50	2.5-5.00	0,26
Er	4,10	5,31	5,15	4.35-5.23	3,77	5,15	4,76	4.46-5.15	0,29
Hg	113,00	150,00	146,00	122.50-150.00	110,00	150,00	133,50	126.75-150.00	0,70
Hct	0,34	0,44	0,43	0.37-0.44	0,34	0,44	0,41	0.377-0.44	0,64
Le	3,70	7,80	6,60	4.15-7.80	3,00	7,80	5,70	4.58-7.80	0,93
Tr	237,00	265,00	256,00	244.50-265.00	168,00	331,00	265,00	217.75-265.00	0,78
Gly	3,60	5,80	4,60	4.20-5.16	3,60	6,40	4,88	4.63-4.95	0,36
Urea	2,80	5,50	3,40	2.95-5.50	1,70	5,50	4,65	3.05-5.50	0,59
Creat.	28,00	77,50	63,50	46.75-77.50	24,00	77,50	57,50	43.25-77.50	0,74
Chol.	4,15	5,48	4,58	4.30-4.89	3,77	6,14	4,23	4.15-4.97	0,56
HDL	1,15	1,80	1,52	1.33-1.80	0,96	2,58	1,80	1.32-1.80	0,43
LDL	1,80	3,06	2,43	1.80-2.78	1,80	4,14	2,24	1.80-2.75	0,89
TG	0,24	2,14	0,90	0.30-1.86	0,30	1,85	0,90	0.70-0.97	0,84
AST	0,00	29,00	21,50	15.00-27.50	0,00	38,00	22,50	20.00-29.25	0,44
ALT	17,00	24,00	20,00	18.50-22.50	11,00	52,00	20,00	19.00-22.00	0,89
Na	138,00	142,00	140,00	138.00-142.00	134,00	145,00	140,00	137.75-142.00	0,93
K	4,10	4,80	4,40	4.20-4.60	4,00	5,00	4,40	4.40-4.55	0,35

Ca	2,33	2,70	2,40	2.33-2.64	2,33	2,62	2,47	2.33-2.54	0,84
P	1,20	1,76	1,55	1.20-1.71	1,20	1,94	1,47	1.20-1.59	0,72

Ме-медијана, I_Q - интерквартални распон, *Mann-Whitney U тест

4.4.4. Популациона фармакокинетика карбамазепина и *CYP1A2* полиморфизам

У изградњи популационог фармакокинетичког модела за процену утицаја *CYP1A2* генотипа и основних демографских фактора на клиренс карбамазепина, средња вредност клиренса из базног модела износила је 3,68 l/час, уз вредност MOF од 416,076. Интер-индивидуална варијабилност износила је 41,37%, а интра-индивидуална варијабилност 22,64% .

У току развоја пуног популационог модела добијени су појединачни регресиони модели за сваки испитивани фактор (телесна маса, узраст, пол, укупна дневна доза, *CYP1A2* генотип и истовремена терапија валпроатима), који су приказани у Табели 18. Вредности MOF су коришћене за процену утицаја испитиваних фактора у појединачним моделима.

Табела 18: Вредности MOF током изградње базног и коначног модела клиренса карбамазепина

Модели клиренса	**MOF**	p*
Базни модел		
$CL= \theta_1 *EXP(ETA(1))$	416,076	
Појединачни регресиони модели		
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_3 *TBW$	416,076	>0,05
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_4 * AGE$	416,076	>0,05
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_5* SEX$	319,302	<0,05
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_6* DD$	309,440	<0,05
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_7*$ *CYP1A2*	356,054	<0,05
$CL= \theta_1*EXP(ETA(1)) + \theta_8* VPA$	408,116	<0,05
Коначни модел		
CL = 0,176 + 0,0484*SEX + 0,000156*DD + 0,019**CYP1A2*	259,059	

p*-вредност за разлику у MOF разлика између базног и осталих модела

CL - клиренс (l/h); θ1 – типична вредност CL; ETA (1) –интериндивидуална варијабилност CL; θ3 до θ8 – параметри коваријантних ефеката; BW – телесна маса пацијента (kg); SEX- 1 за мушки пол или 0 за женски пол; DD –дневна доза карбамазепина (mg/day); *CYP1A2* генотип- 0 за -163C/C и C/A или 1 за -163A/A; VPA – 1 у случају истовремене терапије валпроатима, или 0 у случају монотерапије карбамазепином.

У пуни модел су укључене четири коваријанте: укупна дневна доза, пол, *CYP1A2* генотип и истовремена терапија валпроатима, уз статистички захтев да разлика у MOF буде ≤ 3,84 између базног и појединачних модела. Потом је примењен процес уназадног избацивања (уз то да је MOF разлика > 6,6 за p <0,01 и df = 1). Једино су укупна дневна доза, пол и *CYP1A2* генотип испуниле критеријуме за укључење у коначни модел:

CL (l/h) = 0,176 + 0,0484 * SEX + 0,019 * CYP1A2 + 0,000156 * DD.

SEX = 1 у случају мушког пола и 0 у случају женског пола, *CYP1A2* = 1 за -163A/A и CYP1A2 = 0 за -163C/C or C/A генотип, и DD - укупна дневна доза карбамазепина (mg/d)

MOF вредност коначног модела била је за 157,017 мања него у базном моделу, уз смањену интер-индивидуалну (19,76%) и интра-индивидуалну а варијабилност (15,91%). Параметри коначног модела представљени су у Табели19, добијени на основу NONMEM анализа и процесом валидације уз употребу "bootstrap" анализе са двеста понављања.

Табела19. Процене параметара коначног модела

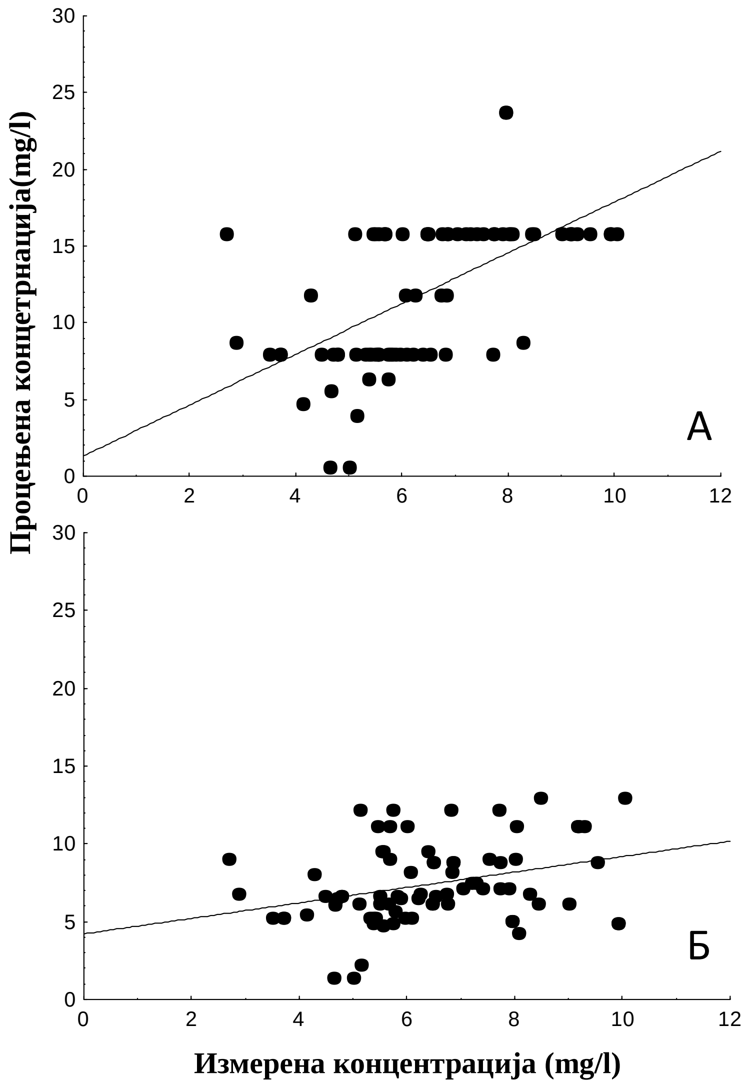
Параметар	**NONMEM**		**Bootstrap анализа**	
	Процењена вредност	**95% интервал поверења***	**Процењена вредност**	**95% интервал поверења** **
CL/F (l/h)	0,176	0,141 – 0,211	0,168	0,154 – 0,182
SEX	0,0484	0,039 – 0,0578	0,0485	0,0329 – 0,0641
DD (mg/l)	0,000156	0,000097 – 0,000215	0,000159	0,000119 – 0,0002
CYP1A2 генотип	0,019	0,0143 – 0,0237	0,02	0,018 – 0,022

Интериндивидуална варијабилност CL-ω^2_{CL}	0,0383	0,023 – 0,0536	0,0409	0,0352 – 0,0466
Резидуална варијабилност - σ^2	0,025	0,0176 – 0,0324	0,0262	0,0224 – 0,0299

* (процењена вредност) ± 1,96 x (стандардна грешка);

** 2,5. и 97,5. перцентили процењених параметара помоћу bootstrap анализе

Дистрибуција података измерених вредности карбамазепина у односу на процењене вредности из базног и коначног модела приказана је Графиконом 6 .



Графикон 6. Корелација између процењених и измерених концентрација карбамазепина у А) базном моделу и Б) коначном моделу

5. ДИСКУСИЈА

Метаболизам лекова у организму подразумева биотрансформацију кроз низ активних и неактивних метаболита до оних који се елиминишу из организма. Активност ензима који каталишу ове реакције може да варира у различитим популацијама, али и индивидуално, под утицајем низа фактора, међу којима су и генске варијације. CYP ензими из фамилија 1-4 учествују у метаболизму већине лекова који су данас у употреби те у великој мери могу утицати на њихову фармакокинетику (94, 147), па генски полиморфизам ових метаболишућих езима у индивидуалном одговору на лекове представља све значајнију и све више истраживану област. С друге стране, терапија епилепсије је дуготрајна и није реткост да пацијент поред антиепилептика прима у неком периоду и лекове за терапију других болести, а такође није реткост да само лечење епилепсије захтева после неког времена политерапијски приступ. Стога ни интеракције са лековима чији се метаболизам одвија преко истих ензима нису ретке. Истовремена примена антиепилептика и лекова као што су одређени антибиотици, орални контрацептиви, хипогликемици, антиаритмици захтева пажљиво дозирање и праћење пацијента како би се превенирале могуће интеракције. Због свега наведеног врло је битно познавати метаболичке путеве најчешће примењиваних антиепилептика, њихов утицај на ензиме јетре, као и способност интеракције са другим медикаментима. Колико је променљив и комплексан међусобни утицај антиепилептика дејством на ензиме сликовито илуструје познат пример из праксе: карбамазепин додат валпроатима значајно смањује њихову концентрацију у крви индукцијом ензима, а с друге стране валпроат, познат инхибитор ензима друге фазе метаболизма, додат карбамазепину као иницијалној терапији не утиче у великој мери на његову концентрацију, јер је ова инхибиција компензована индукцијом (148).

Карбамазепин је широко примењиван антиепилептик који се по апсорпцији у дигестивном тракту везује за протеине плазме у око 75% и постиже максималну концентрацију у периоду од 4-8 сати, а дистрибуира се једнако у целом организму. Метаболише се у јетри најпре помоћу оксидативних ензима, а онда коњугује са глукуронском киселином и елиминише релативно брзо из организма (64). Његово време полуелиминације може бити скраћено у присуству појединих антиепилептика, који су описани као индуктори оних ензима преко којих се метаболише карбамазепин, те је могућност изостанка ефекта већа, а с друге стране неки лекови инхибицијом ензима основног метаболичког пута карбамазепина успоравају његов метаболизам, те се могућност настанка токсичних ефеката повећава при комбиновању ових лекова. Такође, карбамазепин може индуковати сопствени метаболизам, па и на тај начин скратити време полуелиминације, посебно у почетку примене терапије. Поред аутоиндукције, индукујући микрозомалне ензиме јетре, у стању је да утиче на концентрације појединих лекова који се метаболишу уз помоћ истих ензима, те да смањи њихову ефикасност.

Утицај генских полиморфизама некада је био најчешће довођен у везу са ризиком од настанка одређених болести и повећаним степеном обољевања (149, 150), али се све више доводи у везу и са измењеним одговором на примењену медикаментозну терапију. Поред најновијих сазнања о генским полиморфизмима као етиолошким факторима у развоју одређених обољења, уочена је и њихова немала улога у метаболизму знатног броја лекова, која завређује даља испитивања. У главном метаболичком путу карбамазепина значајну улогу имају ензими CYP3A субфамилије , и то првенствено CYP3A4, док се улога CYP3A5 сматра мањом (70). Међутим, иако је улога CYP3A4 предоминантна, сматра се да су варијације овог гена релативно ретке и да не утичу у великој мери на активност ензима, док с друге стране експресија CYP3A5 значајно варира (185) . Како разлике у експресији CYP3A5 гена знатно утичу на укупну количину CYP3A ензима јетре, оправдано је очекивати да је улога варијација овог гена на уочене интер-индивидуалне и интер-етничке разлике у метаболизму CYP3A супстрата велика (184).

У нашој студији, испитивани су гени *CYP3A5, CYP2C8* и *CYP1A2*, јер ензими које они кодирају учествују у метаболизму карбамазепина (75, 76, 78, 79, 96), а по доступним информацијама нису испитивани у нашој педијатријској популацији (151, 152). Истраживање је било усмерено првенствено на испитивање појединачног утицаја функционалних варијација *CYP3A5*, *CYP1A2* и *CYP2C8* на основне фармакокинетичке параметре карбамазепина, као и на ефикасност (процењивану путем праћења појаве напада и постојања јасне фокалне активности у ЕЕГ-у) и безбедност лечења (процењивану путем праћења појаве нежељених догађаја и постојања клинички значајних измена у основним лабораторијским параметрима крви). Додатно је процењен и утицај различитих демографских и клиничких карактеристика пацијената на клиренс лека путем популационе фармакокинетичке анализе.

На основу претраге доступне литературе у медицинским базама података, може се закључити да су подаци о утицају полиморфизма *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2* гена на фармакокинетику карбамазепина малобројни и контрадикторни. Уз то, мали број испитивања је спроведен у педијатријској популацији, што донекле лимитира могућност компарације резултата спроведеног истраживања са резултатима других студија. Додатно, добар део података у литератури о ефектима ових полиморфизама је из ” *in vitro*” студија, а ” *in vivo*” студије, у којима су процењивани ефекти карбамазепина, често су обухватале популацију здравих добровољаца. Познавање заступљености ових полиморфизама у педијатријској популацији у Србији, као и њиховог евентуалног утицаја на фармакокинетику карбамазепина и на клинички исход лечења, могло би допринети бољем дозирању и избору адекватне терапије на индивидуалном нивоу.

5.1. Карактеристике испитаника и примењене терапије

Савремена фармакотерапија пружа смернице када који лек треба применити, тј. у којим индикацијама, у којој дози и ком облику, уз истицање евентуалних специфичности у примени одређеног лека. Неколико је значајних чињеница утицало да овим испитивањем буде обухваћена педијатријска популација. Најпре, познато је да инциденца и преваленца епилепсија варира са узрастом. У општој популацији, инциденца је највећа у педијатријској популацији, нижа у одраслом добу и потом поново расте у геријатријској популацији (35). Педијатријска популација је вулнерабилна, па тим и осетљивија на настанак нежељених ефеката терапије. Међутим, испитивања лекова код деце нису честа. Значајан проблем представља дозирање лекова, јер често не постоје докази из клиничких студија о њиховој ефикасности и безбедности у овој популацији, што захтева посебан опрез током њихове примене. Стога је ово истраживање обухватило управо педијатријску популацију.

Почетак лечења карбамазепином код деце подразумева индивидуалну процену терапијског одговора и праћење нивоа концентрације лека у крви, уз редовну контролу основних биохемијских параметара. На основу добијених резултата иницијална доза лека се постепено коригује до постизања равнотежног стања у терапијском опсегу концентрација. Терапијски мониторинг дозирања је прихваћен начин праћења, али овај приступ не указује на потенцијалне проблеме у ефикасности и безбедности на самом почетку примене терапије. Познато је да одређени фармакокинетички параметри зависе од узраста и утичу на дозирање, а последично и на ефикасност и безбедност примењеног лека. У пракси се доза лека одређује најпре према узрасту и телесној тежини. Међутим, низ физиолошких и биохемијских разлика у педијатријској популацији утиче на измене фармаколошких особина лека. Једна у низу значајних разлика, која може утицати на фармакокинетику лека, јесте количина и ниво активности метаболичких ензима јетре у педијатријској популацији у односу на одрасле (147). Клинички ефекти терапије карбамазепином на првом месту зависе од постигнуте серумске концентрације (153) и због тога измењена фармакокинетика може бити од великог значаја у примени терапије и дозирању.

Подаци о генералној ефикасности карбамазепина датирају још из шездесетих година двадесетог века, када је и почео да се примењује. Ефикасност овог лека показана је у неколико светских студија током седамдесетих и осамдесетих година, у којима је демонстрирана значајна ефикасност у смањењу учесталости парцијалних напада у преко 80% и генерализованих у преко 50% случајева (154). Многе новије компаративне студије ефикасности и безбедности карбамазепина и других антиепилептика учврстиле су став да је карбамазепин добар лек избора, с обзиром на демонстрирану значајну ефикасност и безбедност у односу на друге антиепилептике (155-160). У нашој испитиваној популацији ефикасност је процењивана на основу контроле напада, односно појаве и броја напада у току три месеца праћења, као и проценом побољшања ЕЕГ резултата у смислу нестанка фокалне активности по прилагођавању дозе карбамазепина. Генерално је примењена терапија била ефикасна; у току студије није био регистрован ни један напад, а код шест пацијената регистровано је значајно побољшање у смислу нестанка активне фокалне активности у ЕЕГ-у, по прилагођевању дозе лека.

С обзиром да је код испитаника, који су били обухваћени испитивањем, карбамазепин од раније уведен у терапију, те да су они већ постигли одређене, стабилне конентрације лека у крви, била је очекивана описана висока ефикасност. Познато је да преко 60% пацијената после прве година од увођења антиепилептичне терапије постиже потпуну контролу напада (157). Такође, висока ефикасност карбамазепина као иницијалне монотерапије показана је у студијама које су поредиле карбамазепин са другим антиепилептицима (161-163). У нашој студији, ЕЕГ резултати анализирани су у смислу побољшања, прецизније нестанка фокалне активности после прилагођавања дозе лека на основу измерене концентрације у крви. Трећина пацијената је била са јасно израженим фокалним променама пре прилагођавања дозе лека, а по прилагођавању дозе у 15% испитаника регистрован је нестанак фокалне активности у ЕЕГ-у. Ова значајна побољшања у ЕЕГ налазима после прилагођавања концентрације карбамазепина у нашем узорку могу бити последица примене адекватније дозе на индвидуалном нивоу.

Познато је да је дејство карбамазепина у организму врло комплексно и да се остварује различитим механизмима у мождaном ткиву. Стога, ефекти карбамазепина на појаву напада, као и на ЕЕГ запис могу бити врло различити. Иако моћан антиконвулзант при нижим дозама, карбамазепин је и моћан прокунвулзант при високим дозама од преко 40ugr/kg (164, 165). У литератури је добро описана појава напада у распону од малих појединачних до правих епилептичних статуса при високим токсичним дозама карбамазепина (165), што се рефлектује и у ЕЕГ налазу (166, 167). Студија које је испитивала ефекте габапентина и карбамазепина на ЕЕГ и когнитивну функцију код здравих добровољаца показала је да ефекти карбамазепина зависе од дозе примењеног лека, те да ниже дозе не испољавају негативне ефекте на ЕЕГ и когнитивне функције (168). С друге стране, истраживачи који су пратили ЕЕГ промене и серумску концентрацију карбамазепина током првих месец дана од започињања терапије (169) нису описали статистички значајну корелацију између серумске концентрације карбамазепина и електроенцефалографских параметара праћених у студији. Поред тога, промене које су детектоване у ЕЕГ-у, детектоване су одмах на почетку терапије, током прве недеље администрације лека, а потом је налаз остао константан, те су закључили да је овај однос врло комплексан, и да степен ЕЕГ промена више зависи од индивидуалне осетљивости према карбамазепину током примене терапије (169). С друге стране, у случају примене доза које су испод терапијског опсега може доћи до изостанка терапијског ефекта. Имајућу у виду узак терапијски опсег карбамазепина, уз горе наведено јасно је колико је значајно адекватно дозирање овог антиепилептика.

Поред ефекта прилагођавања дозе, могуће је да уочено побољшање у нашој студији потиче од других фактора, као што је сам природни ток болести. Иако је природа епилепсија у великој мери непозната, постоје јасни показатељи да се спонтана ремисија дешава чак до 30% , а да ће преко 60% новодијагностикованих пацијаната ући у ремисију по примени терапије (170). Поједини истраживачи наглашавају да се нeретко у пракси срећу деца оболела од епилепсије код којих је ЕЕГ налаз потпуно нормалан; код деце са епилепсијом фокалног типа, први рутински ЕЕГ детектује епилептичне промене тек у око 30-50% случајева, те ови подаци показују да је неопходна пажљива корелација ЕЕГ резултата са другим показатељима болести(40).

Поред ефикасности, једнако битна карактеристика сваке терапије је безбедност. У нашој студији, 27,5% популације пријавило је нежељене догађаје благог до умереног интензитета, што одговара подацима из других студија у којима је праћена безбедност карбамазепина, и у којима су као најчешћи нежељени догађаји регистровани поспаност и умор, главобоља и гаситроинтестиналне промене (163, 171, 172). Истраживачи који су се још 1969. године бавили анализом безбедности карбамазепина током терапије неуралгије навели су да су далеко најчешће нежељене реакције описане у централном нервном систему, а потом у гастроинтестиналном систему. Иако се сматра да око 60% пацијената искуси неки од нежељених ефеката током дуготрајне примене карбамазепина, велика већина су благог интензитета и пролазног карактера (173). Чињеница да је у нашој популацији регистрован нижи проценат нежељних догађаја може се објаснити релативо кратким периодом праћења, те чињеницом да су пацијенти били на већ стабилној дози карбамазепина.

Сви регистровани догађаји у нашој студијској популацији су потпуно конзистентни са најчешће забележеним нежељеним ефектима, описаним у Сажетку карактеристика лека (64), у ком се наводи да су поједина нежељена дејства веома честа или честа, посебно на почетку терапије карбамазепином, као нпр. реакције централног нервног система (вртоглавица, главобоља, атаксија, дремљивост, умор, диплопија), гастроинтестинални поремећаји (наузеја, повраћање) и кожне алергијске реакције. Дозно зависна нежељена дејства се обично смањују у року од пар дана, било спонтано или након пролазне редукције дозе. Појава нежељених дејстава од стране централног нервног система може бити знак релативне предозираности или значајних флуктуација у плазми (64). Код једне пацијенткиње регистроване су промене у менструалном крварењу као нежељени догађај, који је био присутан све време праћења. С обзиром на релативно кратак период праћења, овај запажени ефекат може бити и пролазног карактера. Овај налаз не одступа од досадашњих испитивања, јер је установљено да антипилептици могу утицати на ендокрини статус пацијената, мењајући ниво полних хормона. Лекови који имају способност индукције ензима јетре, међу којима је и карбамазепин, низом биохемијских реакција могу смањити ниво тестостерона или етрадиола, што може водити променама у менструалном цикусу (174). Међутим, на основу досадашњих испитивања сматра се да су разлози настанка ових промена врло комплексни, те да су у основи последица удруженог утицаја како природе саме болести тако и утицаја антиепилептика (175).

У низу фактора који могу да утичу на ефекте примене сваког лека, однос дозе и постигнуте концентрације у крви је врло значајан. У нашој испитиваној популацији забележене дневне дозе током периода праћења кретале су се у оквиру препоручених (10-20mg /kg) (64). Измерене серумске концентрације лека такође су биле у оквиру референтних (4 - 12 mg/l) (176). Литературни подаци сугеришу да карбамазепин најбоље постиже свој антиконвулзанти ефекат при концентрацијама које се крећу у опсегу од око 5 до 10 ug/ml (177). Дневне дозе по килограму телесне тежине и концентрације карбамазепина у крви су корелирале, али умерено, што је у складу са подацима из литературе (177-179). Данас је у фармакокинетици карбамазепина преовладао став да одређена корелација постоји, те да је овај однос нелинеаран. Као главни узрок наводи се дозно зависна аутоиндукција метаболизма карбамазепина (65). Умерена корелација, као што је случај у нашој испитиваној популацији, најчешће се објашњава способношћу карбамазепина да измени свој метаболизам дејством на метаболичке ензиме (180, 181). Сматра се да је његова аутоиндукција и временски зависна, јер је утврђено да се одиграва већ у првим данима од увођења терапије или од измене дозе, без обзира на претходну дужину терапије карбамазепином (182).

5.2. Учесталост испитиваних *CYP3A5* полиморфизама

CYP3A5 се са преко 25 алела (http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a5.htm) сматра врло полиморфним геном (104). Смештен је на дужем краку хромозома 7 ((7q21.2), у региону који заузима 231kb, заједно са још три гена (*CYP3A4*, *CYP3A7* и *CYP3A43*) и два псеудогена (*CYP3A5P1* и *CYP3A5P2*) из *CYP3A* подфамилије (95). Овај ген је величине 33kb и састоји се од 13 егзона и 12 интрона, од којих се делови првог и тринаестог егзона не преписују. Кодира ензим CYP3A5, који, кад је присутан, може да чини чак и до 50% укупног нивоа CYP3A у јетри, али је у великој мери распрострањен и екстрахепатично, већински у бубрезима, танком цреву, плућима и простати (183). CYP3A5 је различито експримован у различитим популацијама: најређи је код Европљана, а најчешћи у афричко-америчким популацијама (104).

Низ *CYP3A5* полиморфизама утиче на експресију овог ензима (184), па, иако донедавно мало истраживане, данас се сматра да управо *CYP3A5* варијације могу бити најзначајнији генски фактори који утичу на разлике у клиренсу лекова који су супстрати за CYP3A ензиме (104, 184-186) .Алел *CYP3A5*1* означен је као дивљи и једини кодира потпуно функционалан ензим (101). Остали до сад описани варијантни алели кодирају мање функционалне или потпуно нефункционалне ензимске изоформе. Најчешћа, а уједно и највише испитивана варијација је *CYP3A5*3*, чији је резултат потпуно нефункционалан ензим. Овај полиморфизам, означен као rs776746, подразумева супституцију 6986A>G у интрону 3, и доводи до преране настанка стоп кодона и прекида транслације (104, 187). Насупрот томе, полиморфизам rs28365083 (*CYP3A5*2)* представља несинонимну супституцију у егзону 11 (27289C>A), а доводи до замене аминокиселине на позицији 398 (треонин у аспарагин), узрокујући смањену стабилност и количину синтетисаног протеина (184). Иако је *CYP3A5*2* полиморфизам први описан у кодирајућем региону овог гена (188), утврђено је да он много ређи него *CYP3A5*3* (184). Ове две варијације су биле у фокусу нашег истраживања.

*CYP3A5*2* варијација у делу популације обухваћеном нашим истраживањем није уочена, а овакав резултат подржава литературне податке у којима је ова варијација описана као врло ретка. На пример, генотипизација спроведена у бугарској популацији показала је да учесталост *CYP3A5*2* износи 0,4% (189). Генерално, учесталост ове варијације, која за последицу има делимично нефункционални ензим, у свим до сад испитиваним популацијама креће се у распону од 0-1% (97, 105, 190, 191). С друге стране, наше испитивање је потврдило да је заступљеност *CYP3A5*3* варијације у српској популацији врло висока, што корелира са подацима из сличних популација у којима је учесталост ове варијације детектована у преко 90% случајева (105, 140, 192). У поређењу са резултатима испитивања из Босне и Херцеговине, где је учесталост износила 93% (193), Македоније са 92% (194), као из у грчке, руске и пољске популације, где су се учесталости кретале око 94% (195-197), детектована учесталост код нас је чак нешто већа (98%).

5.3. Утицај испитиваних *CYP3A5* полиморфизама на концентрацију, клиренс, ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Досадашња сазнања о утицају *CYP3A5* генотипа на метаболизам низа лекова који су његови супстрати су различита. Наиме, утицај *CYP3A5* генотипа на метаболизам неких лекова као што су нифедипин, дилтиазем или клопидогрел није детектован (110, 111, 198). Супротно томе, испоставило се да је улога CYP3A5 у метаболизму винкристина чак већа него CYP3A4, те да чести полиморфизми овог гена значајно доприносе интер-индивидуалнима варијацијама у системској елиминацији винкристина (199, 200). Утицај *CYP3A5* полиморфизама уочен је и у метаболизму лекова као што су такролимус (201, 202 , 203), аконитин (204), силодосин (205), циклоспорин (206), симвасатин (207) и алпразолам (208). Па ипак, иако је утицај *CYP3A5*3* варијације на фармакокинетичке параметре такролимуса несумњиво доказан, они нису резултирали измењеним клиничким исходом, те присуство **3* варијације није повезано са већим ризиком од одбацивања трансплантата бубрега код пацијаната лечених такролимусом (209). У новијем истраживању утицаја *CYP3A5* полиморфизма на фармакокинетику такролимуса уочене су ниже дозе, више концентрације и нижи клиренс у хомозиготних носилаца *CYP3A5*3* алела, али нису корелирале са терапијским исходом или токсичношћу овог лека (210). У студији која је испитивала ефекте *CYP3A5*3* варијације на фармакокинетичке параметаре симвастатина, уочено значајно смањене клиренса лека код хомозиготних носилаца ове варијације (207), али никакви ефекти нису уочени у одвојеном испитивању утицаја истог полиморфизма на ефикасност и безбедност симвастатина (211).

Контроверзе у литератури постоје и везано за ефекте *CYP3A5*3* варијације на метаболизам карбамазепина. Недавна испитивања, донекле слична нашем али спроведена у азијским популацијама, потврдила су утицај *CYP3A5*3* полиморфизма на фармакокинетику карбамазепина. Међутим, описани ефекти су били контрадикторни. Истраживање које је обухватило Кореанце оболеле од епилепсије забележило је веће концентрације и нижи клиренс карбамазепина код хомозиготних носилаца **3* варијације у односу на хетерозиготе и хомозиготне носиоце дивљег алела (76). Слични резултати су добијени и у истраживању у Кини, где је код пацијената оболелих од епилепсије који немају експримован ензим, тј. ниједан **1* алел, просечна дозно нормализована серумска концентрација била већа, а доза по килограму телесне масе нижа, у односу на пацијенте код којих је присутан ензим, при чему није било статистички значајне разлике у серумским концентрацијама (187). Супротно, популациона фармакокинетичка анализа у јапанској популацији показала је да је клиренс лека повећан код пацијената код којих ензим није експримиран (носиоци *CYP3A5*3/*3* генотипа) (87). Потврда о утицају *CYP3A5* генотипа на метаболизам карбамазепина публикована је и 2015. године, али је ово истраживање у кинеској популацији показало значајне разлике међу генотипски различитим групама само у случају политерапије са фенитоином или фенобарбиталом (212), што може да указује на индукцију ензима.

За разлику од већине овде поменутих студија спроведених у Азији, испитивања у европским популацијама нису потврдила значајан утицај **3* варијације на метаболизам неколико испитиваних лекова супстрата за CYP3A5 (213, 214). Кад је у питању карбамазепин, опсежна студија која је обухватила 25 полиморфизама 7 различитих гена који у одређеној мери учествују у његовом метаболизму, није описала значајне ефекте *CYP3A5*3* (103). Додатно, иако се сматра да присуство *CYP3A5**1* алела може значајно изменити количину укупног *CYP3A* ензима, новија упоредна анализа експресије *CYP3A* ензима у ткиву јетре 46 испитаника беле популације показала је да CYP3A5 чини свега 2% CYP3A протеина у укупним узорцима, као и да је улога CYP3A5 у метаболизму лекова код припадника беле популације безначајна (215). Описани контрадикторни резултати утицаја полиморфизама *CYP3A5* на метаболизам лекова најчешће се повезују са чињеницом да су поменута испитивања спроведена у различитим популацијама. Поредећи нивое *CYP3A4, CYP3A5* и *CYP3A7* mRNA утврђен је не само два пута већи ниво CYP3A5 mRNA него и битан недостатак ко-регулације експресије *CYP3A4, CYP3A5* и *CYP3A7* код испитаника јапанске популације у односу на испитанике који су припадали белој популацији (216).

Године 2014, у литератури је описан случај пацијенткиње оболеле од епилепсије која је при почетној администрацији малих доза карбамазепина брзо развила нежељене ефекте, уз слабу контролу напада. Генотипизацијом је утврђено да је пацијенткиња хомозиготни носилац *CYP3A5*3* варијације, али и 3435CC варијације гена *ABCB1* (енгл. ATP-binding cassette sub-family B member 1, кодирајући за транспортер П-гликопротеин) (217). У овом случају, могуће је да је синергистичко дејство обе ове варијације разлог оваквог терапијског исхода. Студија спроведена у бразилској популацији недавно је показала да очувана активност CYP3A5 ензима може бити протективни фактор у хиперсензитивним реакцијама индукованим карбамазепином. Међутим, аутори су нагласили да присуство *CYP3A5*3* алела никако није само по себи довољан фактор за развој озбиљних хиперсензитивних кожних реакција, јер је могуће додатно или удружено дејство и других варијација (218). Изостанак разлике у клиничком одговору, чак и када је уочен значајан утицај полиморфизма на фармакокинетику карбамазепина, карактеристичан је за већину поменутих студија (76, 187).

Ефекти *CYP3A5* генотипа на фармакокинетику карбамазепина описани су у азијским (76, 187, 217), афричким (219) и латиноамеричким популацијама (218). Иако се зна да *CYP3A5*3* алел узрокује синтезу нефункционалног ензима, анализом наших података претпостављени ефекат CYP3A5 генотипа на ефикасност и безбедност карбамазепина није доказан. Наиме, статистички значајна разлика међу испитаницима са и без овог полиморфизма није уочена ни у дневним дозама, ни у дозно нормализованим концентрацијама лека, нити у клиренсу карбамазепина по прилагођавању дозе лека, као ни у праћеним параметрима ефикасности и безбедности. Наши резултати корелирају са досадашњим истраживањима у белој популацији, у којима није описан значајнији ефекат варијација овог гена на изабране фармакокинетичке (97, 103), и клиничке параметре карбамазепина (101), посебно када је примењен као монотерапија (212), што је случај са већином овде испитиваних пацијената. Ипак, уочена дискретна тенденција хомозиготних носилаца варијације **3* ка нижим дозама, већим концентрацијама и нижем клиренсу може указивати на успорени метаболизам лека.

Изостанак статистички значајних резултата у нашој студији не значи обавезно и одсуство утицаја испитиваног полиморфизма на фармакокинетику, ефикасност и безбедност карбамазепина. У тумачењу овде презентованих резултата треба поменути одређена ограничења спроведеног испитивања, на првом месту релативно малу студијску популацију, као и последично врло мали број носилаца *CYP3A5*1* алела, што је карактеристично и за већину досадашњих студија спроведених у белим популацијама (214). Друго, овде није испитивано потенцијално удружено или појединачно дејство полиморфизама других гена, који могу имати знатно већу улогу у диспозицији карбамазепина, као што су полиморфизми гена *EPHX1* (енгл. Epoxide hydrolase 1, кодира ензим епоксид хидролазу), *ABCB1*, *ABCC2* (енгл. ATP Binding Cassette Subfamily C Member 2, кодира транспортер ABCC2) и *CYP3A4* (103). Не треба занемарити ни утицај различитих механизама који регулишу *CYP3A* експресију, а који нису били предмет овог испитивања. Изостанак опсервиране разлике у ефикасности и безбедности међу генотипским групама по прилагођавању дозе, у светлу претходних студија у белој популацији, наводи на закључак против рутинске генотипизације *CYP3A5*3* у нашој средини. Значај *CYP3A5*3* генотипизације у појединим случајевима фенотипски спорих метаболизера остаје да се утврди даљим испитивањем на већој студијској популацији.

Са друге стране, у нашем узорку није било носилаца *CYP3A5*2* варијације, па стога нисмо могли испитати потенцијалне ефекте ове варијација на терапију карбамазепином код деце. Пошто је врло редак и у осталим до сада испитиваним популацијама (105, 191) и литературни подаци о његовом утицају на ефикасност и безбедност лекова су ограничени.

5.4. Учесталост испитиваних *CYP2C8* полиморфизама

Са више од 14 варијантних алела (http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c8.htm), *CYP2C8* такође припада полиморфним генима. Смештен је на дужем краку хромозома 10 (10q24), састоји се од 9 егзона, а његова величина износи свега 31kb, од укупних 400 kb колико заузима цела *CYP2C* субфамилија. На овом делу хромозома 10 смештен је заједно са још три гена: *CYP2C9*, *CYP2C18*, и *CYP2C19* (115). *CYP2C8*1* (или **1A*) означен је као дивљи алел и кодира потпуно функционални ензим (115). Од 14 варијација, прве три (*CYP2C8*2*, *CYP2C8*3* и *CYP2C8*4*) су најзаступљеније, док су преостале варијације описане као врло ретке, и то само у азијским популацијама (220). *CYP2C8*3*, који обједињује два високо повезана полиморфизма rs11572080 (416G>A) и rs10509681 (1196A>G), подразумева повезане измене смештене у егзонима 3 и 8, кодира ензим који има две измењене аминокиселине: Arg139Lys и Lys399Arg, (221), а за последицу има смањење метаболичке активности CYP2C8 (73, 120, 222). *CYP2C8*5* (rs72558196, 475delA) припада ретким алелима и његова заступљеност је мања од 1%. Ова варијација смештена у егзону 3, подразумева измене у аминокиселинама почев од позиције 159, доводећи до преране појаве стоп кодона на позицији 177 и синтезе некомплетног протеина без ензимске активности (73, 223).

Заступљеност *CYP2C8*3* варијације у српској популацији износила је 17,5%. Овај резултат најприближнији је учесталости описаној недавно у шпанској популацији (17%), док су врло слични проценти регистровани и у британској (15,5%) и чешкој популацији (10,9%) (116, 119, 222). *CYP2C8**5 је врло ретка варијација, које је до сад описана само у Азији (220), и то са врло ниском фреквенцом која се кретала око 0, 25% (96, 222, 224). Супротно овој, *CYP2C8*3* се често среће у белој, али врло ретко у црној и жутој раси (96). У нашој испитиваној популацији није уочен ниједан носилац *CYP2C8*5*, што додатно потврђује већ прихваћени став да је заступљеност *CYP2C8*5* алела у општој популацији доста ретка (96).

5.5. Утицај испитиваних полиморфизама *CYP2C8* на концентрацију, клиренс, ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Ензим CYP2C8 чини 7% укупних цитохрома јетре и учествује у метаболичкој обради најмање 5% лекова (225). Низ значајних лекова, а међу њима и карбамазепин, представљају у већој или мањој мери CYP2C8 супстрате. Показано је да овај ензим учествује и у метаболизму антидијабетика као што су росиглитазон и троглитазон, затим антинеопластичног агенса паклитаксела, па појединих статина, антиаритмика као што су амјодарон и верапамил, и неких антималарика (113). Улога CYP2C8 је значајна и у ендогеном метаболизму, на првом месту арахидонске киселине (114, 226). Поред локализације у јетри, распрострањен је и у цревима, бубрезима, мозгу и полним жлездама (114, 115).

CYP2C8 одликује знатна интер-индивидуална варијабилност у експресији и активности. У одређеним случајевима, инхибиција или индукција ензима може довести до значајне измене у ефикасности и безбедности лека (92). Наиме, истовремена примена инхибитора или индуктора ензима и ензимског супстрата може довести до наглог пораста или смањења концентрације супстрата и настанка нежељеног или изостанка терапијског ефекта. Структура CYP2C8 ензима је таква да он може везати врло различите супстрате и инхибиторе без великих конформационих промена, па многи лекови инхибирају CYP2C8, а то за последицу има клиничке интеракције лекова (225). У литератури су добро документоване последице истовремене примене CYP2C8 инхибитора и супстрата. Тако, на пример, у случају истовремене примене репаглинида и гемфиброзила долази до повећања концентрације репаглинида (227), а слични ефекти доказани су и при истовременој примени триметоприма (инхибитора) и пиоглитазона (супстрата) (228). Супротно, примена индуктора може довести до смањења концентрације CYP2C8 супстрата. На пример, истовремена примена супстанци које активирају рецепторе индукције PXR (енгл. Pregnane X Receptor) или CAR (енгл. Constitutive Androstane Receptor), као што су рифампицин или фенобарбитал, доводи до индукције *CYP2C* гена, па последично повећања количине CYP2C8 ензима (229). Ове чињенице јасно показују колико може бити комплексна улога CYP2C8 у метаболизму лекова, укључујући карбамазепин (75).

Присуство одређених полиморфизама може повећати или смањити експресију CYP2C8 различитим механизмима (94). У последњој деценији, утицај *CYP2C8*3* на метаболизам низа лекова је испитиван, али јасног става о његовој улози још увек нема. Иако је експериментално показано да *CYP2C8*3* смањује метаболичку активност CYP2C8 за лекове који су примарно његови супстрати, клиничка испитивања су показала донекле контрадикторне резултате. Супстрати који су највише клинички испитивани су паклитаксел (120, 222, 230), нестероидни антиреуматици (ибупрофен) (119, 231), поједини орални антидијабетици (репаглинид, росиглитазон, пиоглитазон) (118, 121, 228, 232), као и неуролептик левомепромазин (123). Испитивања утицаја *CYP2C8*3* на фармакокинетичке параметре Р-ибупрофена дала су супротне податке: најпре је описан успорен метаболизам (119), а недуго затим у другој студији описан је убрзан метаболизам овог лека (231). У већини досадашњих анализа ефеката *CYP2C8*3* на метаболизам оралних антидијабетика утврђено је да хомозиготни носиоци овог алела имају убрзан метаболизам репаглинида (118), пиоглитазона (228) и росиглитазона (122). У овим студијама регистровано је смањење површине испод криве (енгл. Area Under The Curve, AUC), уз повећање клиренса лека код носилаца варијације **3* у односу на хомозиготне носиоце *1 алела. Ипак, поједини аутори разлике у фармакокинетичким параметрима испитиваних антидијабетика нису уочили (233). Контроверзе постоје чак и везано за метаболизам паклитаксела. Низ студија у лабораторијским условима потврдио је смањење метаболизма овог лека у присуству **3* варијације (230, 234), док клиничка студија из 2007. године није показала никакав утицај овог полиморфизма на клиренс паклитаксела (235).

Па ипак, чак и код оних супстрата код којих је описан недвосмислен утицај испитиваних варијација на њихову фармакокинетику, у већини клиничких студија нису уочени значајни ефекти на њихову ефикасност и безбедност. Већ споменута студија из 2007, која је пратила 914 пацијената на терапији доцитакселом или паклитакселом у комбинацији са карбоплатином, није показала да су испитивани полиморфизми *CYP2C8* везани за токсичност или ефикасност примењене терапије (235). У ретроспективној анализи података 119 пацијенткиња лечених паклитакселом није било корелације *CYP2C8*3* и укупног времена преживљавања, сензорне неуропатије и неутропеније (236). Студија споведена у Афричкој популацији о утицају полиморфизма *CYP2C8*3* на терапију антималариком амодиаквином показала је значајно смањење активности CYP2C8 ензима у носилаца испитиване варијације, али без утицаја на ефикасност и безбедност терапије (237). Са друге стране, недавна испитивања утицаја присуства *CYP2C8*3* на развој токсичних ефеката при терапији паклитекселом показала су да носиоци **3* варијације могу бити изложенији нежељеним ефектима (238).

Што се тиче ефеката *CYP2C8* генског полиморфизма на метаболизам, ефикасност и безбедност карбамазепина, недостају клиничке студије. Анализа наших резултата показала је да *CYP2C8*3* полиморфизам дискретно утиче на метаболизам карбамазепина, јер су уочене разлике у дневној дози и концентрацији међу генотипски различитим групама биле без статистичког значаја. Наиме, код носилаца *CYP2C8*3* уочена је тенденција ка нижим дозама и вишим концентрацијама лека, указујући на благо смањење ензимске активности и спорији метаболизам лека у ових пацијената. Поред тога, корелација дозе и концентрације је била статистички значајна само код носилаца **1* алела. Међутим, у додатно спроведеној популационој фармакокинетичкој анализи овај полиморфизам није издвојен као значајан предиктивни параметар у дозирању карбамазепина. Описани недостатак корелације дозе и концентрације лека само у групи носилаца испитиване **3* варијације у нашој популацији може указивати и на утицај низа других фактора у обради овог лека, као што је дозно зависна аутоиндукција CYP2C8 ензимом посредованог метаболизма карбамазепина (239).

Ранија испитивања су показала да ензим кодиран *CYP2C8*3* варијацијом показује супстратно зависне измене у активности (221), (240). Постоје докази да је карбамазепин у стању да активира поједине нуклеарне факторе и регулише транскрипцију оба ова гена. Наиме, у студији из 2006. године, истраживачи су показали да нуклерани фактор CAR може бити активиран карбамазепином (241). Такође, сматра се да PXR і фактор транскрипције HNF4A (енгл. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha) заједно могу да утичу на аутоиндукцију карбамазепина (242). Додатно, постоје хипотезе да се ефекти *CYP2C8*3* алела на фармакокинетичке параметре појединих лекова испољавају само при нижим дозама, а да при терапијским дозама други гени као што је CYP3A4 преузимају знатно већу улогу (96). Данас се сматра да разлике у дозирању до сада испитиваних лекова могу водити значајним разликама у резултатима јер полиморфизми могу имати различит утицај при различитим концентрацијама супстрата (238).

Поред наведених фактора везаних за *CYP2C8*, не треба занемарити ни могуће дејство других ензима, транспортера и рецептора и њихових генских полиморфизама који нису обухваћени овим испитивањем, као што су полиморфизми *EPHX1*, *UGT2B7* (енгл. UDP glucuronosyltransferase family 2 member B7, ген који кодира уридин дифосфат глукуронозил трансферазу 2B7), или *ABCB1*. Тако на пример постоје докази да су полиморфизми гена *CYP2C8* и *MDR1* добри предиктори клиренса паклитаксела (238). Овакав утицај других гена није искључен ни у метаболизму карбамазепина.

У нашој студији није било разлике праћеним параметрима ефикасности међу испитиваним *CYP2C8* генотипским групама. Што се тиче лабораторијских параметара праћених у циљу процене безбедности, описано је значајно повећање нивоа триглицерида код носилаца **3* варијације. Истраживања показују да CYP2C8 има важну улогу у оксидацији арахидонске киселине до епоксиеикосатриенских киселина (енгл. epoxyeicosatrienoic acids, EETs), које се сматрају врло важним протективним супстанцама: имају улогу секундарних гласника, регулатора хормона и фактора раста, део су антихипертензивних и других протективних механизама у виталним органима (226), и представљају хипергликемичне и хиполипидемичне факторе (243). *CYP2C8*3* је повезан са смањењем метаболичке активности CYP2C8 у метаболизму арахидонске киселине у поређењу са дивљим типом ензима (120), а варијације појединих гена из фамилија *CYP1A, CYP2C,* и *CYP2J* , које утичу на смањење ензимске активности и следствено смањење настанка EET, доведене су у везу са повећаним ризиком за настанак болести кардиоваскуларног система (244). Недавна студија која је испитивала повезаност варијација *CYP2J2*7* и *CYP2C8*3* са коронарном болести и настанком инфаркта миокарда, као један од налаза издвојила је управо повезаност *CYP2C8*3* са већим ризиком од развоја хипертензије код мушкараца (245). Ипак, у студији није уочена никаква повезаност *CYP2C8*3* са нивоом укупног холестерола, триглицерида, липопротеина мале густине, липопротеина велике густине или измереним вредностима крвног притиска. Веће вредности триглицерида забележене у нашој студији код носилаца *CYP2C8*3* варијације указују на могућност смањеног нивоа EET, чиме се смањује њихов хиполипидемични ефекат, па долази до измена у липидном статусу пацијента. Овај налаз заслужује пажњу и захева даља испитивања, која би додатно потврдила утицај ове варијације на измене у укупном метаболизму липида.

Постоји низ студија у којима су аутори описали да примена карбамазепина утиче на повећање нивоа липида и/или липопротеина у серуму (246-248) , а исти ефекти су описани и у педијатријској популацији (249) . Овакав ефекат често се у литератури приписује способности карбамазепина да индукује цитохроме P-450 (249, 250). Међутим, има и другачијих ставова, који сматрају да различите промене које су до сад описане у липидном статусу при терапији карбамазепином настају због директног утицаја карбамазепина на физиолошке механизме ендогеног метаболизма холестерола (251). Додатно, у разматрању механизама уочених ефеката поједини истраживачи истичу да је карбамазепин, смањујући ниво тироидних хормона (252), способан да индиректно утиче на пут конверзије липопротеина (253), те да је ово индиректно дејство, поред индукције ензима јетре, врло значајно у патогенези повишених липида код пацијената (253). Међутим, описани су и супротни резултати, у којима није доказан ефекат карбамазепина на ниво серумских липида, а сматра се да контрадикторни резултати потичу делом од начина мерења, различитог дизајна студија, изостанака анализе фактора као што су начин исхране, поремећаји у интестиналној апсорпцији, билијарној секрецији и слично (253). У светлу наведених чињеница, без обзира на механизме, могуће је да су носиоци варијације *CYP2C8*3*, који су на терапији карбамазепином, у повећаном ризику од настанка промена у метаболизму липида, што може бити основ за развој атеросклерозе, и последични развој кардиоваскуларних болести и можданог удара у каснијем животном добу.

Релативно мали број испитаника, као и релативно мала заступљеност варијантних алела, оставља отворено питање да ли би се већи ефекат, како на фармакокинетику тако и на липидни профил јасније исказао у знатно већој популацији. За сада, наши клинички резултати сугеришу да улога *CYP2C8*3* варијације у метаболизму карбамазепина ипак није клинички значајна, стога се увођење фармакогенетске анализе овог параметра у рутинску праксу тренутно не може препоручити.

*CYP2C8*5* варијација узрокује настанак скраћеног и потпуно неактивног ензима (73), па се може претпоставити да његово присуство значајно утиче на фармакокинетику лекова који се метаболишу преко CYP2C8. Тако је у недавним испитивањима овај полиморфизам повезан са успореним метаболизмом церивастатина и озбиљним нежељеним реакцијама на лек због изостанка ензимске активности (223). Ипак, значај *CYP2C8*5* у клиничкој пракси још увек је нејасан, јер су хомозиготни носиоци овог алела изузетно ретки. Како ни у нашој студији није откривен ниједан носилац ове варијације, његови ефекти на ефикасност и безбедност карбамазепина нису могли бити испитани.

5.6. Учесталост испитиваних *CYP1A2* полиморфизама

CYP1A2 је смештен на хромозому 15 (15q22 – q24), састоји се од седам егзона и шест интрона и заузима око 7,8 kb (254). Кодира CYP1A2, протеин од 515 аминокиселина, који чини око 13% укупних цитохрома јетре и сматра се да учествује у метаболизму око 5% лекова (254). До данас је описано преко 200 појединачних полиморфизама у *CYP1A2* гену (255) и преко 40 различитих алела, те се сматра изузетно полиморфним (http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm), са низом варијација чија се преваленца креће преко 10% (255). Па ипак, упркос великом броју описаних алела, свега неколико је повезано са изменом ензимске активности (128).

У општој популацији алел *CYP1A2*1* означен је као wt и кодира потпуно финкционалан ензим (126). Полиморфизми овог гена који су били у фокусу нашег испитивања смештени су у промотерском региону и сматра се да могу утицати на индуцибилност и активност CYP1A2 ензима (126), мада на различите начине. Варијација -3860G>A (rs2069514, *CYP1A2*1C*, у литератури (128) се среће и као −2964G>A варијација*)* представља супституцију у 5′- региону гена, и сматра се да узрокује смањење ензимске индуцибилности и активности (141). У нашој испитиваној популацији присуство *CYP1A2*1C* није детектовано, што корелира са постојећим подацима о дистрибуцији ове варијације. Наиме, *CYP1A2*1C* је најчешћи код Азијата и среће се у око 20% популације, знатно ређе заступљен је у арапским популацијама (око 5%), док се у популацијама белаца среће врло ретко (74, 190, 256, 257, 258.) Варијација −163C>A (rs762551, *CYP1A2*1F)* подразумева супституцију у интрону 1, а за последицу има повећану индуцибилност и повећање ензимске активности под утицајем CYP1A2 индуктора (125, 258). У нашој студији, заступљеност *CYP1A2*1F* алела износила је 65%, што одговара претходно публикованим резултатима из српске популације од 61,1% (258), а корелира са подацима из других белих популација, укључујући мађарску (68,6%) (259), јорданску (67,3%) (190), немачку (67,8%) (142).

5.7. Утицај полиморфизма *CYP1A2* на концентрацију, клиренс, ефикасност и безбедност терапије карбамазепином

Ензим CYP1A2 катализше велики број оксидационих реакција у огранизму, у циљу превођења супстрата у поларнија једињења која се брже елиминишу из организма. Поред тога, има способност да активира низ прокарциногених супстанци, као што су полициклични ароматични угљоводоници и хетероциклични ароматични амини, до реактивних и штетних метаболита, за које се сматра да воде настанку разних обољења (260). Додатно, CYP1A2 учествује у метаболизму важних ендогених супстанци (стероида, ретиноида, естрадиола, билирубина, арахидонске киселине) (261), али и у метаболизму егзогених супстанци. Главну улогу има у метаболизму низа лекова као што су кофеин, кломипрамин, клозапин, имипрамин, лизофилин, миансерин, оланзапин, теофилин (126, 261), а у мањој мери (<10%) укључен је и у метаболизам флувоксамина, талидомида, напроксена, халоперидола, карведилола, амјодарона и карбамазепина (126). Експресија и активност овог ензима варирају интер-индивидуално и интер-етнички (126, 261). Последњих година значајан број испитивања био је усмерен на упознавање интеракција лекова које настају због индукције или инхибиције CYP1A2. Велики број лекова утиче на активност CYP1A2 ензима: омепразол и други инхибитори протонске пумпе могу да га индукују, док орални конрацептиви и флуорохинолони смањују експресију овог гена (261, 262). Индукција CYP1A2 могућа је конзумирањем печеног црвеног меса (263), пушењем или конзумирањем кафе, одређеног лиснатог поврћа (264) или напорним вежбањем (260). Такође, међу лековима који су описани као индуктори налази се и карбамазепин (260, 265). Поред низа фактора из спољашње средине, данас се сматра да знатну улогу у варијабилности CYP1A2 има и полиморфизам кодирајућег гена. На пример, присуство *CYP1A2*1F* алела показало се неопходним за испољавање ефекта CYP1A2 индуктора као што су пушење (125) и кафа (258) и то најпре код хомозиготних носилаца варијације (A/A генотип).

Испитујући утицај алела *CYP1A2*1F* на фармакокинетику карбамазепина по прилагођавању дозе, у нашој популацији није уочена разлика у дневним дозама међу три генотипски различите групе. Међутим, у групи хомозиготних носилаца варијације -163 A/A уочена је тенденција ка нешто вишим дозама и нижим концентрацијама лека. Такође, само у овој групи уочен је недостатак корелације између дневне дозе по килограму телесне тежине и концентрације карбамазепина. Додатно, у спроведеној популационој фармакокинетичкој анализи, управо је −163A/A генотип издвојен као значајан предиктивни фактор клиренса карбамазепина, а уочени ефекат је био чак већи од ефекта дневне дозе лека.

Описани резултати су највероватније последица аутоиндукције CYP1A2-зависног метаболизма карбамазепина у присуству врло индуцибилног генотипа *CYP1A2* −163A/A. Наиме, познато је да се индукција CYP1A2 у највећој мери одвија путем лиганд зависног арил хидрокарбон рецептора (енгл. aryl hydrocarbon receptor, AhR). Овај рецептор, по активацији лигандом, комплексним механизмом утиче на промотерски регион овог гена и повећава транскрипцију. Међутим, постоје и други путеви индукције *CYP1A2*, који делују независно од овог рецептора (128, 266, 267). Карбамазепин, као познати индуктор метаболизма, регулише транскрипцију гена путем нукларних рецептора PXR и CAR (70, 241). Иако AhR не припада истом типу као CAR и PXR, недавна истраживања показују да постоји значајна интеракција међу нуклераним рецепторима; AhR може утицати на активност других протеина који делују као регулатори генске активности, међу којима је и CAR, што потенцијално може узроковати неочекиване последице у метаболизму лекова (268). Поред тога, постоје докази да уклањање AhR-везујућег места са CYP1A2 гена не елиминише могућност индукције (266).

У доступној литератури тренутно нема података о утицају *CYP1A2* генотипа на фармакокинетику или клиничке ефекте карбамазепина. Утицај на метаболизам других лекова знатно је више испитиван, али и даље је контроверзан. Генерално, носиоци -163A/A алела се сматрају индуцибилним, јер у присуству индуктора омогућавају повећање ензимске активности. Тако, на пример, код пацијената пушача на терапији клозапином описане су ниже концентрације лека у крви при стандардним дозама (269-271). Убрзани метаболизам кофеина код пушача у присуству ове варијације показан је код белаца, и то код носилаца AA генотипа у односу на друга два генотипа. У истој студији овај ефекат није забележен код непушача (142). У другој студији, која се бавила утицајем *CYP1A2*1F* на метаболизам кофеина, такође је описано његово убрзање код пушача носилаца -163A/A генотипа (257). С друге стране, ефекат овог полиморфизма на концентрацију теофилина у различитим популацијама није уочен (272 , 273). Популациона фармакокинетичка анализа клиренса теофилина код превремено рођених беба азијског порекла није издвојила *CYP1A2* генотип као значајан фактор (274).Поједини истраживачи су мишљења да ове разлике потичу од чињенице да *CYP1A2*1F* не утиче директно на активност ензима (142), већ да утиче на индуцибилност ензима у присуству јаких индуктора као што су пушење или прекомерна употреба кафе (258, 272). Тако, на пример, повећана активност CYP1A2 ензима уочена је код носилаца -163A/A генотипа уколико редовно конзумирају 3 или више шољица кафе дневно (реф), док је сличан ефекат изостао уколико је био одсутан бар један од фактора - полиморфизам или кафа као индуктор.

У нашој студији, ефекат полиморфизма *CYP1A2* на испитиване параметре ефикасности и безбедности карбамазепина није уочен. Ни клиничке анализе терапијског исхода и појаве нежељених догађаја као основних параметара ефикасности и безбедности других лекова нису дале прецизнију слику о утицају овог полиморфизма. Са једне стране, смањење концентрација клозапина и последичан изостанак терапијског ефекта описан је код хомозиготних носилаца *CYP1A2*1F* варијације који су уједно били и пушачи (269). У литератури су описани случајеви наглог пораста концентрације клозапина и последичног развоја нежељених реакција код пацијената који су прекинули пушење, а који су били носиоци -163A/A генотипа (270). Познати тзв. ”парадокс пушача” је уочен у терапији клопидогрелом, где су постигути већи терапијски ефекти овог лека у пушача него код непушача, сугеришући тако генотипски зависну CYP1A2 активност код пушача (275). Насупрот томе, у студији из 2010. године, код носилаца -163A/A генотипа на терапији оланзапином уочене су ниже концентрације лека и смањење ефикасности терапије, и без утицаја пушења као индукционог фактора (276). Резултат испитивања ефеката *CYP1A2* полиморфизма на појаву нежељених реакција у току примене лефлуномида код пацијаната оболелих од реуматоидног артритиса показао је да су пацијенти са −163C/C генотипом у знатно већем ризику од развоја токисичних ефеката изазваних применом лефлуномидом

(277). У другој студији наглашено да је тек повезан са другим полиморфизмима −163C/C генотип постајао значајан (278, 279). Слично разматрањима односа *CYP1A2*1F* и фармакокинетичких параматера, и у студијама које су се бавила изменама клиничког одговора у присисутву ове варијације, као разлози дискрепанци у резултатима истицани су способност индукције ензима у присуству фактора средине као што су пушење или прекомерна употреба кафе, као и могући много већи утицај удружених полиморфизама на активност ензима, него утицај сваког појединачно(125, 272, 280).

Поред генетских, постоји и низ других фактора који могу да утичу на метаболизам карбамазепина, а међу њима су узраст, пол, дозирање, формулација лека, комедикација са другим антиепилептицима (281). Наведени фактори могу узроковати различите резултате и отежано поређење описаних ефеката, и у до сада спроведеним истраживањима често су управо ови фактори били различити. Поменути ефекат фактора средине, који су описани као јаки индуктори *CYP1A2* овде није анализиран, јер у обухваћеној популацији није било пишача нити конзумената кафе, што је и очекивано, с обзиром на узраст испитаника. Међутим, ефекте других потенцијалних индуктора, који могу бити присутни у педијатријској популацији (282), не можемо проценити, али ни занемарити. На крају, чињеница је да један део података о утицају *CYP1A2* полиморфизама на метаболизам лекова потиче из истраживања спроведених у азијским популацијама, што отежава поређење наших и доброг дела доступних података. Показан ефекат −163A/A генотипа на фармакокинетику карбамазепина у педијатријској српској популацији, уз изостанак ефеката у клиничком исходу, иако може бити објашњен на различите начине, неспорно отвара питање да ли је улога овог гена у укупним метаболичким путевима карбамазепина мала, као што се сматра (70, 78, 126, 128). Исто тако, могуће је да се овде показани утицај испитиваног полиморфизма на фармакокинетику карбамазепина детектује као значајан у параметрима ефикасности и безбедности тек код изузетно великих узорака. Ограничење овог испитивања поред већ поменуте релативно мале величине испитиване популације, је и чињеница да овде нису обухваћени пацијенти код којих је већ у првом месецу од увођења терапије карбамазепином она оцењена као неефикасна или дала нежељене реакције, те остаје питање да ли би ефекат могао бити уочен код пацијената који би били праћени дуже и проспективно од почетка увођења терапије. Стога, наши резултати отварају простор за даља испитивања, као и за даља разматрања о евентуалном значају генотипизације у стандардном дозирању карбамазепина, не само у педијатријској већи и у одраслој српској популацији. Значај додатне потврде или оповргавања описаних ефеката полиморфизма овог гена је утолико већи што је испитивана варијација у српској популацији заступљена у великој мери.

Подаци о ефектима *CYP1A2*1C* полиморфизма на метаболизам лекова су још увек нејасни, иако доста испитивани у последњој деценији. У испитивању спроведеном у Јапану овај полиморфизам повезан је са смањењем клиренса теофилина (283), док у недавној студији спроведеној у Кини није уочен његов утицај на метаболизам теофилина код непушача (272). Године 2007. публиковани су резултати студије у којој су *CYP1A2*1C* и *CYP1A*1D* повезане са већим концентрацијама клозапина у серуму (284). Већина података о ефектима овог полиморфизма потиче из азијских популација, због карактеристичне, горе описане дистрибуције. Како *CYP1A2*1C* није био детектован у нашој популацији, његов утицај овде није могао бити испитан. Ипак, занимљиво је поменути став, базиран на појединим досадашњим испитивањима, да најчешћи полиморфизам овог гена, *CYP1A2*1F*, може бити у дисеквилибријуму са другим полиморфизмима овог гена, међу којима је и *CYP1A2*1C* (272). Слични резултати добијени су у испитивању метаболизма кофеина код Кинеза, где је утврђено да управо комбинација *CYP1A2*1C* и *CYP1A2*1F* генотипова утиче на ниво кофеина у крви (285). Па ипак, иако неки истраживачи због тога предлажу да даља испитивања треба да буду усмерена ка одређивању хаплотипова, пре него испитивању појединачних генотипова овог гена (272), у белој популацији због ниске заступљености .

5.8. Популациона фармакокинетика карбамазепина

Популациона фармакокинетичка анализа је моћна метода у фармакологији која на основу малог броја испитаника и праћених концентрација лека, може да утврди корелацију између низа демографских и клиничких фактора и лека, њихов међусобни утицај, те на основу добијеног модела сугерише евентуалну корекцију примењене терапије. Овакав присуп испитивању фармакокинетичких својстава лека је од великог значаја у вулнерабилним популацијама као што је педијатријска, а посебно у анализи антиепилептика, који због сопствених фармаколошких особина захтевају посебан опрез и титрацију при дозирању. Значајне промене карактеришу организам у различитим животним добима, а оне у одређеној мери могу утицати на фармакокинетику антиепилептика, те процена фактора утицаја и клиренса лека овом методом добри су предиктори евентуалних ризика од изостанка терапијског ефекта или испољавања нежељених ефеката. Фактори који могу да утичу на клиренс антиепилептика су различити: узраст, телесна маса, пол, интеракције са другим лековима, као и промене у количини и активности ензима јетре током живота, узроковане између осталог и генетским разликама. Однедавно су значај и принципи управо ових фармакогенетских фактора у клиничким фармакокинетичким испитивањима дефинисани и од стране Европске агенције за лекове (енгл. European Medicines Agency , EMA).

5.8.1. Популациона фармакокинетика карбамазепина и испитивани полиморфизми метаболишућих ензима *CYP3A5*, *CYP2C8* и *CYP1A2*

Спроведена фармакокинетичка анализа имала је за циљ да додатно процени евентуални ефекат испитиваних полиморфизама на средњу вредност клиренса карбамазепина код педијатријских пацијаната оболелих од епилепсије у српској популацији, као и да процени утицај изабраних демографских и клиничких фактора. У изградњи коначног популационог фармакокинетичког модела који је испитивао *CYP2C8*3* генотип као једну од шест изабраних коваријанти, овај полиморфизам се није показао значајним за клиренс карбамазепина. Насупрот томе**,** у изградњи другог потпуно независног фармакокинетичког модела утицај *CYP1A2* −163A/A генотипа на клиренс карбамазепина је потврђен. Једначина овог коначног модела показала је да је ефекат овог генотипа чак већи од утицаја дневне дозе лека, а значај овог резултата додатно повећава чињеница да је у српској популацији детективан висок проценат хомозиготих носилаца ове варијације.

5.8.2. Популациона фармакокинетика карбамазепина и други испитивани фактори

Добијене просечне вредности клиренса карбамазепина у оба модела кретале су се између вредности добијених у две назависне популационе фармакокинетичке анализе раније спроведене у српској популацији (139, 286). Поред појединачног утицаја гена у два одвојена модела, спроведена анализа процењивала је још додатних пет фактора (узраст, пол, телесну тежину, комедикацију са валпроатима и дневну дозу карбамазепина) од којих су се укупна дневна доза карбамазепина и пол испитаника, издвојили као значајни у оба модела. Постојање линеарног односа клиренса карбамазепина и ова два фактора може се видети из формуле коначног модела клиренса у циљној популацији, уз напомену да су у оба модела величине ефекта веће за пол, него за дневну дозу.

Опсервирани утицај дневне дозе на клиренс карбамазепина одговара претходно публикованим резултатима студија спроведених како у одраслој (287, 288), тако и у педијатријској популацији (289) Иако је утицај дневне дозе на клиренс карбамазепина била често испитивана коваријабла у многим фармакокинетичким моделима, треба поменути у литератури већ разматрано запажање да клиничка пракса подразумева да се дозе прилагођавају на основу континуираног терапијског мониторинга и процене клиничког одговора, те да се дозе титрирају до одређене вредности, што може бити узрок уочених корелација, а не разултат стварног ефекта (290).

Други значајан предиктивни фактор клиренса испитиваног лека у нашем испитивању је пол. Карбамазепин, као индуктор микрозомалних ензима, поред тога што је у стању да утиче на сопствени и на метаболизам других лекова, сматра се да може да утиче и на ниво активних полних хормона. Дуготрајна терапија антиепилептицима који могу да индукују ензиме јетре често узрокује поремећаје менструалног циклуса, сексуалне проблеме, и каткад и смањење плодности (174). У другим истраживањима у којима је описано смањење клиренса карбамазепина код женског пола (291) овај ефекат се објашњава инхибиторним ефектима естрогена на микрозомалне ензиме (291, 292). Ипак, како један број аутора у сличним испитивањима није уочио значајне полне разлике у клиренсу карбамазепина (143, 286, 289, 293) за утврђивање стварног ефекта овог фактора потребна су даља испитивања.

Ставови о утицају узраста и телесне тежине на клиренс карбамазепина у литератури су и даље у одређеној мери контрадикторни. С једне стране, познато је да су јетра и проток крви кроз њу релативно већи у деце него у одраслих (133), што значајно може да утиче на метаболизам лекова. Ипак, описано је да код карбамазепина, за разлику од неких других лекова, ово не утиче на клиренс у великој мери (294). Такође, ниво метаболишућих ензима јетре се, сем у најранијем детињству, одржава доста константно. Генерално,укупни капацитет јетре се развија и мења брзо по рођењу и достиже адултни ниво до треће године, иако постоје многи изузеци (133). Наши резултати подржавају она истраживања у којима није детектован ефекат узраста и телесне тежине на клиренс карбамазепина (181, 288, 295). Ипак, постоје и потпуно супротни резултати, који подржавају генерални став да клиренс карбамазепина, као и других антиепилептика опада са годинама (289, 292, 293, 296, 297). Иако телесна тежина и узраст обично корелирају, па је основано очекивати и повезан ефекат, постоје студије где је, између осталих фактора, уочен утицај телесне тежине, али не и годишта (286). Недостатак ефеката ових фактора може се објаснити чињеницом да је наша испитивана популација обухватила само педијатријске пацијенте, а могуће је да је потребна знатно шира популација, варијабилнија у односу на ове две коваријанте, ради регистровања њиховог ефекта на фармакокинетику испитиваног лека. Управо ово може бити објашење разлика између наших резултата и резултата популационе анализе клиренса карбамазепина спроведене 2008. године у српској популацији, где је уочен утицај телесне масе, узраста и истовремене примене валпроата (139).

Метаболизам карбамазепина може бити измењен код истовремене примене других антиепилептика (286) .Поједина испитивања детектовала су значајан утицај валпроата на клиренс карбамазепина (288). Овај ефекат везује се за уочено повећање концентрације метаболита карбамазепина карбамазепин-10,11-епоксида, што се објашњава способношћу валпроата да селективно инхибирају микрозомалну епоксид-хидролазу (298-300). Међутим, постоје и ставови, поткрепљени експерименталним резултатима, да валпроична киселина није селективни инхибитор епоксид хидролазе, већ да утиче неселективно на укупни ток епоксид-диол фазе метаболичког пута карбамазепина (301). Опсежна анализа природе интеракције карбамазепина и валпроата из 1997. године истакла је да валпроати могу да инхибирају не само први корак у метаболизму карбамазепина, делујући на епоксид-хидролазу, већ и следеће кораке, инхибицијом конверзије карбамазепин-10,11-епоксида до транс-диолног метаболита, као и инхибицијом глукуронидације карбамазепин-10,11-транс- диола блокадом ензима УДП-глукуронидил-трансферазе (302). У нашем испитивању, ефекат истовремене употребе валпроата није потврђен, у складу са резултатима у појединим педијатријским популацијама (289), као и у српској популацији (139). Један од популационих фармакокинетичких модела спроведених у српској популацији 2007. године показао је да ефекат валпроичне киселине може бити дозно-зависан. Наиме, описан је резултат да валпроати примењени у дневној дози већој од 750 mg значајно утичу на клиренс карбамазепина (286) .У нашем узорку свега један пацијент је примао дозу већу од наведене, те ефекат валпроата, чак иако постоји, није могао бити потврђен. Такође, могуће је да је мали број испитаника на истовременој терапији карбамазепином и валпроатима у нашем узорку утицао на немогућност да детектујемо потенцијални ефекат ко-медикације.

Добијени коначни популациони фармакокинетички модел клиренса карбамазепина у педијатријској популацији потврђен је ”bootstrap”' анализом. Овај тип непараметријске валидације је стандардни избор у случају мањег броја испитаника. Добре предиктивне перформансе израчунатог модела указују на велику прецизност и малу пристрасност (енгл. bias). Дефинисани модел је добро описао клиренс карбамазепина у односу на испитиване демографске и друге клинички релевантне параметре код деце оболеле од епилепсије у српској популацији.

6. ЗАКЉУЧАК

Испитивањем утицаја генског полиморфизма метаболишућих ензима CYP3A5, CYP2C8 и CYP1A2 на ефикасност и безбедност терапије кармабазепином код деце у српској популацији показано је следеће:

- заступљеност испитиваних полиморфизама гена *CYP3A5* (алели **2* и **3*), *CYP2C8* (алели **3* и **5*) и *CYP1A2* (алели **1C* и **1F*) у српској популацији је у складу са заступљеностима у другим до сад испитиваним популацијама белаца;

- претпостављени ефекти *CYP3A5* полиморфизма на праћене параметре ефикасности и безбедности терапије карбамазепином нису доказани. Уочена је тенденција ка нижим потребним дозама, вишим плазма концентрацијама и нижем клиренсу лека код хомозиготних *CYP3A5*3/*3* у поређењу са хетерозиготним *CYP3A5*1A/*3* генотиповима. Ипак, за сада нема довољно клиничких доказа у корист увођења рутинске генотипизације испитиваних *CYP3A5* полиморфизама код деце српске популације на терапији карбамазепином;

- претпостављени ефекти *CYP2C8* полиморфизма на праћене параметре ефикасности и безбедности терапије карбамазепином нису доказани. Код носилаца *CYP2C8*3* варијације уочен је већи ниво триглицерида, и тенденција ка нижим дневним дозама и вишим дозно нормализованим концентрацијама лека. Ипак, за сада нема довољно клиничких доказа у корист увођења рутинске генотипизације испитиваних *CYP2C8* полиморфизама код деце српске популације на терапији карбамазепином;

- претпостављени ефекти *CYP1A2* полиморфизма на праћене параметре ефикасности и безбедности терапије карбамазепином нису доказани. Ипак, доказан је утицај −163C>A (*CYP1A2*1F*) полиморфизма на фармакокинетику лека. Наиме, код хомозиготних носилаца ове варијације уочена је тенденција ка вишим дозама и нижим дозно-нормализованим серумским концентрацијама. Притом, популациона фармакокинетичка анализа показала је значајан утицај *CYP1A2*1F/*1F* генотипа на клиренс карбамезепина. Обзиром да је овај *CYP1A2* полиморфизам веома чест у српској популацији, рутинска генотипизација би могла бити од користи код деце са епилепсијом за чије је лечење индикована примена карбамазепина.

7. ЛИТЕРАТУРА

1.Cohen N. Pharmacogenomics and personalized medicine. 1st ed: Humana Press; 2008. 509 p.

2.Đorđević N, Janković S. Farmakogenetika – budućnost medinkametozne terapije. Acta Medica Medianae 2007;46(2):56-61.

3.Phillips EJ, Chung WH, Mockenhaupt M, et al. Drug hypersensitivity: pharmacogenetics and clinical syndromes. J Allergy Clin Immunol. 2011;127(3 Suppl):S60-66.

4.Wei CY, Ko TM, Shen CY, et al. A recent update of pharmacogenomics in drug-induced severe skin reactions. Drug Metab Pharmacokinet. 2012;27(1):132-141.

5.Sutiman N, Chowbay B. Pharmacogenetics and its relevance to clinical practice. Ann Acad Med Singapore. 2013;42(9):429-431.

6.Carrasco-Garrido P-, de Andrés LA, Barrera VH, et al. Trends of adverse drug reactions related-hospitalizations in Spain (2001-2006). BMC Health Serv Res. 2010;10:287-287.

7.Bénard-Laribière A, Miremont-Salamé G, Pérault-Pochat MC, et al. Incidence of hospital admissions due to adverse drug reactions in France: the EMIR study. Fundam Clin Pharmacol. 2015;29(1):106-111.

8.de Graaff LCG, van Schaik RHN, van Gelder T. A clinical approach to pharmacogenetics. Neth J Med. 2013;71(3):145-152.

9.Nivya K, Sri Sai Kiran V, Ragoo N-, et al. Review: Systemic review on drug related hospital admissions – A pubmed based search. Saudi Pharm J. 2015;23:1-8.

10.Weinshilboum R. Inheritance and drug response. N Engl J Med. 2003;348(6):529-537.

11.Harper AR, Topol EJ. Pharmacogenomics in clinical practice and drug development. Nat Biotechnol. 2012;30(11):1117-1124.

12.Linder MW, Prough RA, Valdes RJ. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. Clin Chem.1997;43(2):254 -266.

13.Brunton LL PK, Blumenthal DK, Buxton ILO,editors. Goodman & Gilman’s the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed: The McGraw-Hill Companies, Inc; 2008. 1219 p.

14.Ritter JM, Lewis LD, Mant TG, et al. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics. 5th ed: Oxford University Press; 2008. 408 p.

15.Wells BG, Dipiro JT, Schwinghammer TL, et al. Pharmacotherapy handbook. 7th ed: The McGraw-Hill Companies, Inc.; 2009. 1072 p.
16.Turnpenny PD. Emerijevi osnovi medicinske genetike.13th ed: Data Status; 2011.433p.
17.Lieberman MA, Marks A. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 4th ed: 1024 p.
18.Mayer UA. Pharmacogenetic and adverse event reactions. Lancet 2000;356:1667-1671.
19.Chen P, Lin JJ, Lu CS, et al. Carbamazepine-induced toxic effects and HLA-B*1502 screening in Taiwan. N Engl J Med. 2011;364(12):1126-1133.
20.Glauser TA. Biomarkers for antiepileptic drug response. Biomark Med. 2011;5(5):635-641.
21.Kwan P, Brodie MJ. Early identification of refractory epilepsy. N Engl J Med. 2000;342:314-319.
22.Szoeke CEI, Newton M, Wood JM, et al. Update on pharmacogenetics in epilepsy: a brief review. Lancet Neurol. 2006;5:189-196.
23.Radojičić B. Opšta i specijalna klinička neurologija. Beograd: Elit Medica; 1998.584 p.
24.Levic ZM. Osnovi savremene neurologije. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva Beograd; 2000.
25.Magiorkinis E, Sidiropoulou K, Diamantis A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. Epilepsy Behav. 2010;17(1):103-108.
26.de Boer HM. Epilepsy stigma: moving from a global problem to global solutions. Seizure 2010;19:630-636.
27. Atlas: Epilepsy care in the world: World Health Organisation. 2005.; available at : www.who.int/mental_health/neurology/Epilepsy_atlas_r1.pdf
28.Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on classification and terminology, 2005–2009. Epilepsia. 2010;51(4):676-685.
29.Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al. A practical definition of epilepsy. Epilepsia. 2014;55(4):475-482.
30.Gómez-Alonso J, Bellas-Lamas P. The new International League Against Epilepsy (ILAE) classification of epilepsies: a step in the wrong direction. Rev Neurol. 2011;52(9):541-547.

31.French JA. ILAE classification redux: ready for prime time. Epilepsy Currents. 2014;14(2):84-85.

32.National Clinical Guideline, Centre . The Epilepsies: The Diagnosis and Management of the Epilepsies in Adults and Children in Primary and Secondary Care: Pharmacological Update of Clinical Guideline 20. Royal College of Physicians (UK) ,National Clinical Guideline Centre.2012.636p., available at : https://www.nice.org.uk/guidance/cg137/evidence/cg137-epilepsy-full-guideline-185134861

33.Linehan C, Zentano JT, Burneo JG, et al. Future directions for epidemiology in epilepsy. Epilepsy Behav. 2011;22(1):112-117.

34.Senanayake N, Roman GC. Epidemiology of epilepsy in developing countries. Bull World Health Organ. 1993;71(2):247-258

35.Banerjee PN, Filippi D, Hauser WA. The descriptive epidemiology of epilepsy-a review. Epilepsy Res. 2009 85(1):31-45.

36.Bell GS, Sander JW. The epidemiology of epilepsy: the size of the problem. Seizure. 2001;10:306-316.

37.Wirrell EC, Grossardt BR, Wong-Kisiel L, et al. Incidence and classification of new-onset epilepsy and epilepsy syndromes in children in Olmsted county, Minnesota from 1980–2004: a population-based study. Epilepsy Res. 2011;95(1-2):110-118.

38.Cowan LD. The epidemiology of the epilepsies in children. Ment Retard Dev Disabil Res Rev. 2002;8(3):171-181.

39.Shorvon SD. The etiologic classification of epilepsy .Epilepsia. 2011;52(6):1052-1057.

40.Kenney D, Wirrell E. Patient considerations in the management of focal seizures in children and adolescents. Adolesc Health Med Ther. 2014;5:49-65.

41.Iliescu C, Craiu D. Diagnostic approach of epilepsy in childhood and adolescence. Maedica (Buchar)– a Journal of Clinical Medicine. 2013;8(2):195-199.

42.Chaudhary R. Role of genes in epilepsy- a review of genetic factors behind the causes of epilepsy. Advances in Pharmacology & Toxicology. 2012;13(2):31-38.

43.Si Y, Liu L, Hu J, et al. Etiologic features of newly diagnosed epilepsy: Hospital-based study of 892 consecutive patients in West China. Seizure 2012;21(1):40-44.

44.Shinnar S, Pellock JM. Update on the epidemiology and prognosis of pediatric epilepsy. J Child Neurol. 2002;17:S4-17.
45.Elliott A, Bergner A. Improving the molecular diagnosis and treatment of epilepsy with complex genetic testing. Med Lab Obs . 2016;48(2):36-39.
46.Beghi E. Treating epilepsy across its different stages. Ther Adv Neurol Disord. 2010;3(2):85-92.
47.Mohanraj R, Brodie MJ. Early predictors of outcome in newly diagnosed epilepsy. Seizure 2013;22:333-344.
48.Glauser T, Ben-Menachem E, Bourgeois B, et al. ILAE treatment guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. Epilepsia. 2006;47(7):1094–1120.
49.Talati R, Scholle JM, Phung OJ, et al. Effectiveness and Safety of Antiepileptic Medications in Patients with Epilepsy. AHRQ Comparative Effectiveness Reviews .Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2011.
50.Kwan P, Brodie MJ. Effectiveness of first antiepileptic drug. Epilepsia. 2001;42(10):1255-1260.
51.Arts WFM, Brouwer OF, Boudewijn Peters AC, et al. Course and prognosis of childhood epilepsy: 5-year follow-up of the Dutch study of epilepsy in childhood. Brain 2004;127:1774-1784.
52.Aneja S, Sharma S. Newer Anti-epileptic drugs. Indian Pediatr. 2013;50:1033-1040.
53.Dragoumi P, Tzetzi O, Vargiami E, et al. Clinical course and seizure outcome of idiopathic childhood epilepsy: determinants of early and long-term prognosis. BMC Neurol. 2013;13(206):1-12.
54.Berg AT, Zelko FA, Levy SRM, et al. Age at onset of epilepsy, pharmacoresistance,and cognitive outcomes. Neurology. 2012;79:1384-1391.
55.Hajnšek S, Kovačević I, Petelin Ž. Epilepsy – therapeutic guidelines. Neurol Croat. 2010;59(1-2).
56.French JA, Kanner AM, Bautista J, et al. Efficacy and tolerability of the new antiepileptic drugs II: treatment of refractory epilepsy: report of the therapeutics and technology assessment subcommittee and quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the American Epilepsy Society. Neurology. 2004;62(8):1261-1273.
57.Chang BS, Lowenstein DH. Mechanism of disease. Epilepsy. N Engl J Med. 2003;349:1257-1266.

58.Browne TR, Holmes GL. Handbook of epilepsy. 4th ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. 288p.
59.WHO Model List of Essential Medicines for Children, 4th List. April 2013. available at:http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/4th_EMLc_FINAL_web_8Jul13.pdf
60.Varagic VM, Milosevic MP. Farmakologija. seventeenth ed: Elit Medica, 2009.
61.Tolou-Ghamari Z, Zare M, Habibabadi JM, et al. A quick review of carbamazepine pharmacokinetics in epilepsy from 1953 to 2012. Res Med Sci. 2013;18(1):81-85.
62.Neuvonen PJ, Tokola O. Bioavailability of rectally administered carbamazepine mixture. Br J Clin Pharmac. 1987;24:839-841.
63.Battino D, Estienne M, Avanzini G. Clinical pharmacokinetics of antiepileptic drugs in paediatric patients. Part II. Phenytoin, carbamazepine, sulthiame, lamotrigine, vigabatrin, oxcarbazepine and felbamate. Clin Pharmacokinet. 1995;29(5):341-369.
64.Summary of Product Characteristics: Tegretol Liquid 100 mg/5ml. In Edition Leatherhead, UK: Datapharm Communications Ltd 2009

65.Kudriakova TB, Sirota LA, Rozova GI, et al. Autoinduction and steady-state pharmacokinetics of carbamazepine and its major metabolites. Br J Clin Pharmacol. 1992;33:611-615.
66.Rylance GW, Edwards C, Gard P. Carbamazepine 10,11-epoxide in children.Br J Clin Pharmac. 1984;18:935-939.

67.Chee KY, Lee D, Byron D, et al. A simple collection method for saliva in children: potential for home monitoring of carbamazepine therapy. Br J Clin Pharmacol. 1993;35(3):311-313.
68.Summary of Product Characteristics: Tegretol Tablets 100mg, 200mg, 400mg: In Edition Leatherhead, UK: Novartis Pharmaceuticals UK Ltd . ; 2014 [updated Last Updated on eMC 06-Jun-2014 cited 2015. 30.12.]; available at: http://www.medicines.org.uk/emc/medicine/1328/SPC/Tegretol+Tablets+100mg,+200mg,+400mg/.
69.Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. Pharmacol Ther 2013;138:103-141.
70.Thorn CF, Leckband SG, Kelsoe J, et al. PharmGKB summary: carbamazepine pathway. Pharmacogenet Genomics. 2011;21(12):906-910.

71.Guillemette C. Pharmacogenomics of human UDP-glucuronosyltransferase enzymes. Pharmacogenomics J. 2003;3:136-158.
72.Nakajima M, Fujiki Y, Noda K, et al. Genetic polymorphism of CYP2C8 in Japaneze population Drug Metab Dispos. 1999;31(6):687-690.
73.Soyama A, Saito Y, Momamura K, et al. Five novel single nucleotide polymorphisms in the CYP2C8 gene , one of wich induces a frame- shift. Drug Metabol Pharmacokin. 2002;17(4):374-377.
74.Hamdy SI, Hiratsuka M, Narahara K, et al. Genotyping of four genetic polymorphisms in the CYP1A2 gene in the Egyptian population. Br J Clin Pharmacol. 2003;55:321-324.
75.Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, et al. Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. Biochem Pharmacol. 1994;47(11):1969-1979

76.Park PW, Seo YH, Ahn JY, et al. Effect of CYP3A5*3 genotype on serum carbamazepine concentrations at steady-state in Korean epileptic patients. J Clin Pharm Ther. 2009;34(5):569-574.
77.Loscher W, Klotz U, Zimprich F, et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. Epilepsia. 2009;50(1):1-23.
78.Pearce RE, Vakkalagadda GR, Leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro I. Characterization of human cytochromes P450 responsible for the formation of 2- and 3-hydroxylated metabolites. Drug Metab Dispos. 2002;30(11):1170-1179.
79.Pearce RE, Uetrecht JP, Leeder JS. Pathways of carbamazepine bioactivation in vitro: II. The role of human cytochrome P450 enzymes in the formation of 2-hydroxyiminostilbene. Drug Metab Dispos. 2005;33(12):1819-1826.
80.Lu W, Uetrecht JP. Peroxidase-mediated bioactivation of hydroxylated metabolites of carbamazepine and phenytoin .Drug Metab Dispos 2008;36(8):1624-1636.

81.Chen YB, Y.P. H, X.S. H, et al. Clinical efficacy of oxcarbazepine suspension in children with focal epilepsy. CJCP. 2013;15(5):340-342.

82.Herranz JL, Argumosa A. Characteristics and indications of oxcarbazepine. Rev Neurol. 2002;35(Suppl 1):S101-109.
83.Liu L, Zheng T, Morris MJ, et al. The mechanism of carbamazepine aggravation of absence seizures. J Pharmacol Exp Ther. 2006 319(2):790-798.

84.Morrow J, Russell A, Guthrie E, et al. Malformation risks of antiepileptic drugs in pregnancy: a prospective study from the UK epilepsy and pregnancy register. Neurol Neurosurg Psychiatry 2006;77:193-198.
85.Leckband SG, Kelsoe JR, Dunnenberger HM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for HLA-B genotype and carbamazepine dosing. Clin Pharmacol Ther. 2013;94(3):324-328.
86.Chen Z, Liew D, Kwan P. Real-world efficiency of pharmacogenetic screening for carbamazepine-induced Ssevere cutaneous adverse reactions. PLoS ONE. 2014;9(5):e96990.
87.Seo T, Nakada N, Ueda N, et al. Effect of CYP3A5*3 on carbamazepine pharmacokinetics in Japanese patients with epilepsy. Clin Pharmacol Ther. 2006;79(5):509-510.
88.McCormack M, Alfirevic A, Bourgeois S, et al. HLA-A*3101 and carbamazepine-induced hypersensitivity reactions in Europeans. N Engl J Med. 2011;364(12):1134-1143.
89.Ozeki T, Mushiroda T, Yowang A, et al. Genome-wide association study identifies HLA-A*3101 allele as a genetic risk factor for carbamazepine-induced cutaneous adverse drug reactions in Japanese population. Hum Mol Genet. 2011;20(5):1034-1041.
90.Danielson PB. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. Curr Drug Metab. 2002;3(6):561-597.
91.Sevrioukova IF, Poulosa TL. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. Dalton Trans 2013;42(9):3116–3126.
92.Božina N, Bradamante V, Lovric M. Genetic polymorphism of metabolic enzymes P450 (CYP) as a susceptibility factor for drug response, toxicity, and cancer risk. Arh Hig Rada Toksikol. 2009;60:217-242.
93.Smith G, Stubbins MJ, Harries LW, et al. Molecular genetics of the human cytochrome P450 monooxygenase superfamily. Xenobiotica. 1998;28(12):1129-1165.
94.Ingelman-Sundberg M, Sim SC, Gomez A, et al. Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects. Pharmacol Ther. 2007;116(3):496-526.
95.Chen X, Wang HW, Zhou G ea. Molecular population genetics of human CYP3A locus: signatures of positive selection and implications for evolutionary environmental medicine. . Environ Health Perspect. 2009;117(10):1541-1548.
96.Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. Pharmacogenomics. 2009;10(9):1489-1510.

97.Hustert E, Haberl M, Burk Oea. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. Pharmacogenetics 2001;11(773-9).

98.Lynch T, Price A. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. Am Fam Physician. 2007;76(3):391-396.

99.Solus JF, Arietta BJ, Harris JR, et al. Genetic variation in eleven phase I drug metabolism genes in an ethnically diverse population. Pharmacogenomics. 2004;5(7):895-931.

100.Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1999;39:1-17.

101.Emich-Widera E, Likus W, Kazek B, et al. CYP3A5∗3 and C3435T MDR1 polymorphisms in prognostication of drug-resistant epilepsy in children and adolescents. Biomed Res Int. 2013;2013:7 pages.

102.Panomvana D, Traiyawong T, Towanabut S. Effect of CYP3A5 genotypes on the pharmacokinetics of carbamazepine when used as monotherapy or co-administered with phenytoin, phenobarbital or valproic acid in Thai patients. J Pharm Pharm Sci. 2013;16(4):502-510.

103.Puranik YG, Birnbaum AK, Marino SE, et al. Association of carbamazepine major metabolism and transport pathway gene polymorphisms and pharmacokinetics in patients with epilepsy. Pharmacogenomics 2013;14(1):35-45.

104.Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nat Genet. 2001;27(4):383-391.

105.van Schaik RH, van der Heiden IP, van den Anker JN, et al. CYP3A5 variant allele frequencies in Dutch Caucasians. Clin Chem 2002;48(10):1668-1671.

106.Keshava C, McCanlies E, Weston A. CYP3A4 polymorphisms--potential risk factors for breast and prostate cancer: a HuGE review. Am J Epidemiol. 2004;160:825-841.

107.Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. Clin Pharmacol Ther. 2003;74(3):245-254.

108.Jin Y, Wang YH, Miao J, et al. Cytochrome P450 3A5 genotype is associated with verapamil response in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther. 2007;82(5):579-585.

109.Josephson F, Allqvist A, Janabi M, et al. CYP3A5 genotype has an impact on the metabolism of the HIV protease inhibitor saquinavir. Clin Pharmacol Ther. 2007;81(5):708-712.

110.Fukuda T, Onishi S, Fukuen S, et al. CYP3A5 genotype did not impact on nifedipine disposition in healthy volunteers. Pharmacogenomics J. 2004;4(1):34-39.
111.Yamamoto T, Kubota T, Ozeki T, et al. Effects of the CYP3A5 genetic polymorphism on the pharmacokinetics of diltiazem. Clin Chim Acta. 2005;362(1-2):147-154.
112.Makia NL, Goldstein JA. CYP2C8 Is a Novel Target of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha in Human Liver. Mol Pharmacol. 2016;89(1):154-164.
113.Totah RA, Rettie AE. Cytochrome P450 2C8: substrates, inhibitors, pharmacogenetics, and clinical relevance. Clin Pharmacol Ther. 2005;77(5):341-352.
114.Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, et al. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. Nature. 1999;401(6752):493-497.
115.Klose TS, Blaisdell JA, Goldstein JA. Gene structure of CYP2C8 and extrahepatic distribution of the human CYP2Cs. J Biochem Mol Toxicol. 1999;13(6):289-295.
116.Pechandova K, Helena Buzkova H, Matouskova O, et al. Genetic Polymorphisms of CYP2C8 in the Czech Republic. Genet Test Mol Biomarkers. 2012;16(7):812-816.
117.Ohyama K, Nakajima M, Nakamura S, et al. A significant role of human cytochrome P450 2C8 in amiodarone N-deethylation: An approach to predict the contribution with relative activity factor. Drug Metab Dispos. 2000;28:1303-1310.
118.Niemi M, Leathart JB, Neuvonen M, et al. Polymorphism in CYP2C8 is associated with reduced plasma concentrations of repaglinide. Clin Pharmacol Ther. 2003;74(4):380-387.
119.Martínez C, García-Martín E, Blanco G, et al. The effect of the cytochrome P450 CYP2C8 polymorphism on the disposition of (R)-ibuprofen enantiomer in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol. 2004;59(1):62-68.
120.Dai D, Zeldin DC, Blaisdell J, A., et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. Pharmacogenetics. 2001;11:597-607.
121.Kirchheiner J, Thomas S, Bauer S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rosiglitazone in relation to CYP2C8 genotype. Clin Pharmacol Ther. 2006;80(6):657-667.
122.Aquilante CL, Bushman LR, Knutsen SD, et al. Influence of SLCO1B1 and CYP2C8 gene polymorphisms on rosiglitazone pharmacokinetics in healthy volunteers. Human Genomics 2008;3(1):7-16.

123.Wójcikowski J, Basińska A, Daniel WA. The cytochrome P450-catalyzed metabolism of levomepromazine: a phenothiazine neuroleptic with a wide spectrum of clinical application. Biochem Pharmacol 2014;90(2):188-195.
124.Klein K, S. W, Turpeinen M, et al. Pathway-targeted pharmacogenomics of CYP1A2 in human liver. Front Pharmacol. 2010 1(129):xxx.
125.Han XM, Ouyang DS, Chen XP, et al. Inducibility of CYP1A2 by omeprazole in vivo related to the genetic polymorphism of CYP1A2. Br J Clin Pharmacol. 2002;54(5):540-3.(5):540-543.
126.Zhou SF, Yang LP, Zhou ZW, et al. Insights into the substrate specificity, inhibitors, regulation, and polymorphisms and the clinical impact of human cytochrome P450 1A2. AAPS J. 2009;11(3):481-494.
127.Lucas RA, Gilfillan DJ, Bergstrom RF. A pharmacokinetic interaction between carbamazepine and olanzapine: observations on possible mechanism. Eur J Clin Pharmacol. 1998;54:639-643.
128.Thorn, .F., Aklillu E, Klein TE, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP1A2. Pharmacogenet Genomics. 2012;22(1):73-77.
129.Rasmussen BB, Brix TH, Kyvik KO, et al. The interindividual differences in the 3-demethylation of caffeine alias CYP1A2 is determined by both genetic and environmental factors. Pharmacogenetics. 2002;12(6):473-478.
130.Brodie MJ, Mintzer S, Pack AM, et al. Enzyme induction with antiepileptic drugs: Cause for concern? . Epilepsia 2013;54(1):11-27.
131.Laxer KD, Trinka E, Hirsch LJ, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. Epilepsy Behav. 2014;37:59-70.
132.Simonato M, French JA, Galanopoulou AS, et al. Issues for new antiepilepsy drug development. Curr Opin Neurol. 2013;26(2):195-200.
133.Yokoi T. Essentials for starting a pediatric clinical study (1): Pharmacokinetics in children. J Toxicol Sci. 2009;34 Suppl 2:Sp307-312.
134.Sing CW, Cheung CL, Wong IC. Pharmacogenomics--how close/far are we to practising individualized medicine for children? Br J Clin Pharmacol. 2015;79(3):419-428.
135.Cella M, Knibbe C, Danhof M, et al. What is the right dose for children? Br J Clin Pharmacol. 2010;70(4):597-603.
136.Johnson TN. Modelling approaches to dose estimation in children. Br J Clin Pharmacol. 2005;59(6):663-669.

137.Manolis E, Pons G. Proposals for model-based paediatric medicinal development within the current European Union regulatory framework. Br J Clin Pharmacol. 2009;68(4):493-501.
138.Stevens A, De Leonibus C, Hanson D, et al. Pediatric perspective on pharmacogenomics. Pharmacogenomics. 2013;14(15):1889-1905.
139.Jankovic SM, Jovanovic D, Milovanovic JR. Pharmacokinetic modeling of carbamazepine based on clinical data from Serbian epileptic patients. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 2008;30(9):707-713.
140.King BP, Leathart JB, Mutch E, et al. CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. Br J Clin Pharmacol. 2003;55(6):625-629.
141.Nakajima M, Yokoi T, Mizutani M, et al. Genetic polymorphism in the 5'-flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans. J Biochem. 1999;125(4):803-808.
142.Sachse C, Brockmöller J, Bauer S, et al. Functional significance of the CÆA polymorphism in intron I of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine Br J Clin Pharmacol. 1999(47):445-449.
143.Milovanovic JR, Jankovic SM. Factors influencing carbamazepine pharmacokinetics in children and adults: population pharmacokinetic analysis. Int J Clin Pharmacol Ther. 2011;49(7):428-436.
144. Guidance for Industry Population Pharmacokinetics. FDA. 1999.; available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM072137.pdf.

145.Crom WR. Pharmacokinetics in the child. Environ Health Perspect. 1994;102 Suppl 11:111-117.

146.Naranjo CA, Busto U, Sellers EM, et al. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. Clin Pharmacol Ther. 1981;30(2):239-245.
147.Fernandez E, Perez R, Hernandez A, et al. Factors and mechanisms for pharmacokinetic differences between pediatric population and adults. Pharmaceutics. 2011;3(1):53-72.
148.Veličković- Radovanović R, Catić- Djordjević A, M D. Klinički značajne farmakokinetičke interakcije antiepileptika Acta Medica Medianae. 2007;46(4):55-60.
149.Ma L-M, Liu H-C, Ruan L-H, et al. CYP3A5 ∗ 3 genetic polymorphism is associated with childhood acute lymphoblastic leukemia risk: A meta-analysis. Biomed J 2015;38(5):428-432.

150.Wang B, Liu Z, Xu W, et al. CYP3A5*3 polymorphism and cancer risk: a meta-analysis and meta-regression. Tumour Biol 2013;34(4):2357-2366.
151.Milovanovic DD, I. R, Radovanovic M, et al. CYP3A5 Polymorphism In Serbian Paediatric Epileptic Patients On Carbamazepine Treatment. SJERC. 2015;16(2):93–99.
152.Djordjevic N, Milovanovic DD, Radovanovic M, et al. CYP1A2 genotype affects carbamazepine pharmacokinetics in children with epilepsy. Eur J Clin Pharmacol. 2016;72(4):439-445.
153.Bertilsson L, Tomson T. Clinical pharmacokinetics and pharmacological effects of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide. An update. Clin Pharmacokinet. 1986;11(3):177-198.
154.Rogawski MA, Porter RJ. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. Pharmacol Rev. 1990;42(3):223-286.
155.de Silva M, MacArdle B, McGowan M, et al. Randomised comparative monotherapy trial of phenobarbitone, phenytoin, carbamazepine, or sodium valproate for newly diagnosed childhood epilepsy. Lancet. 1996;347(9003):709-713.
156.Richens A, Davidson DL, Cartlidge NE, et al. A multicentre comparative trial of sodium valproate and carbamazepine in adult onset epilepsy. Adult EPITEG Collaborative Group. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1994;57(6):682-687.
157.Verity CM, Hosking G, Easter DJ. A multicentre comparative trial of sodium valproate and carbamazepine in paediatric epilepsy. The Paediatric EPITEG Collaborative Group. Dev Med Child Neurol. 1995;37(2):97-108.
158.Marson AG, Williamson PR, Hutton JL, et al. Carbamazepine versus valproate monotherapy for epilepsy. Cochrane Database Syst Rev. 2000(3):Cd001030.
159.Gamble CL, Williamson PR, Marson AG. Lamotrigine versus carbamazepine monotherapy for epilepsy. Cochrane Database Syst Rev. 2006(1):Cd001031.
160.Nolan SJ, Marson AG, Weston J, et al. Carbamazepine versus phenobarbitone monotherapy for epilepsy: an individual participant data review. Cochrane Database Syst Rev. 2015(7):Cd001904.
161.Brodie MJ, Perucca E, Ryvlin P, et al. Comparison of levetiracetam and controlled-release carbamazepine in newly diagnosed epilepsy. Neurology. 2007;68(6):402-408.
162.Trinka E, Marson AG, Van Paesschen W, et al. KOMET: an unblinded, randomised, two parallel-group, stratified trial comparing the effectiveness of levetiracetam with controlled-release carbamazepine and extended-release sodium valproate as monotherapy

in patients with newly diagnosed epilepsy. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2013;84(10):1138-1147.

163.Perry S, Holt P, Benatar M. Levetiracetam versus carbamazepine monotherapy for partial epilepsy in children less than 16 years of age. J Child Neurol. 2008;23(5):515-519.

164.Perez A, Wiley JF. Pediatric carbamazepine suspension overdose-clinical manifestations and toxicokinetics. Pediatr Emerg Care. 2005;21(4):252-254.

165.Spiller HA, Carlisle RD. Status epilepticus after massive carbamazepine overdose. J Toxicol Clin Toxicol. 2002;40(1):81-90.

166.Cock HR. Drug-induced status epilepticus. Epilepsy Behav. 2015;49:76-82.

167.Howard RS, Trend PS, Townsend HR. EEG appearances in acute carbamazepine toxicity (ABSTRACT AVAILABLE). Hum Exp Toxicol. 1990;9(5):313-315.

168.Salinsky MC, Binder LM, Oken BS, et al. Effects of gabapentin and carbamazepine on the EEG and cognition in healthy volunteers. Epilepsia. 2002;43(5):482-490.

169.Besser R, Hornung K, Theisohn M, et al. EEG changes in patients during the introduction of carbamazepine. Electroencephalogr Clin Neurophysiol. 1992;83(1):19-23.

170.Kwan P, Sander J. The natural history of epilepsy: an epidemiological view. Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry. 2004;75(10):1376-1381.

171.Herranz JL, Armijo JA, Arteaga R. Clinical side effects of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, and valproate during monotherapy in children. Epilepsia. 1988;29(6):794-804.

172.Zeng K, Wang X, Xi Z, et al. Adverse effects of carbamazepine, phenytoin, valproate and lamotrigine monotherapy in epileptic adult Chinese patients. Clin Neurol Neurosurg. 2010;112(4):291-295.

173.Gayford JJ, Redpath TH. The side-effects of carbamazepine. Proc R Soc Med. 1969;62(6):615-616.

174.Svalheim S, Sveberg L, Mochol M, et al. Interactions between antiepileptic drugs and hormones. Seizure. 2015;28:12-17.

175.Svalheim S, Tauboll E, Bjornenak T, et al. Do women with epilepsy have increased frequency of menstrual disturbances? Seizure. 2003;12(8):529-533.

176.Eadie MJ. Therapeutic drug monitoring--antiepileptic drugs. Br J Clin Pharmacol. 1998;46(3):185-193.

177.Bertilsson L. Clinical pharmacokinetics of carbamazepine. Clin Pharmacokinet. 1978;3(2):128-143.

178.Rane A, Hojer B, Wilson JT. Kinetics of carbamazepine and its 10,11-epoxide metabolite in children. Clin Pharmacol Ther. 1976;19(3):276-283.

179.Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, et al. Dose-dependent metabolism of carbamazepine in humans. Epilepsy Res. 1996;24(3):163-172.

180.Battino D, Bossi L, Croci D, et al. Carbamazepine plasma levels in children and adults: influence of age, dose, and associated therapy. Ther Drug Monit. 1980;2(4):315-322.

181.El Desoky ES, Sabarinath SN, Hamdi MM, et al. Population pharmacokinetics of steady-state carbamazepine in Egyptian epilepsy patients. J Clin Pharm Ther. 2012;37(3):352-355.

182.Bertilsson L, Tomson T, Tybring G. Pharmacokinetics: time-dependent changes--autoinduction of carbamazepine epoxidation. J Clin Pharmacol. 1986;26(6):459-462.

183.Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. Pharmacogenet Genomics. 2012;22(7):555-558.

184.Xie HG, Wood AJ, Kim RB, et al. Genetic variability in CYP3A5 and its possible consequences. Pharmacogenomics. 2004;5(3):243-272.

185.Givens RC, Lin YS, Dowling AL, et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults. Journal of Applied Physiology. 2003;95(3):1297-1300.

186.Mouly SJ, Matheny C, Paine MF, et al. Variation in oral clearance of saquinavir is predicted by CYP3A5*1 genotype but not by enterocyte content of cytochrome P450 3A5. Clin Pharmacol Ther. 2005;78(6):605-618.

187.Meng H, Ren, Y. L, et al. Association study of CYP3A5 genetic polymorphism with serum concentrations of carbamazepine in Chinese epilepsy patients. Neurol Asia 2011;16(1):39-45.

188.Jounaidi Y, Hyrailles V, Gervot L, et al. Detection of CYP3A5 allelic variant: a candidate for the polymorphic expression of the protein? Biochem Biophys Res Commun. 1996;221(2):466-470.

189.Petrova DT, Yaramov N, Toshev S, et al. Genotyping of CYP3A5 polymorphisms among Bulgarian patients with sporadic colorectal cancer and controls. Onkologie. 2007;30(11):559-563.

190.Salameh G, Hadidi KA, Khateeb ME. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 and CYP1A2 among the Jordanian population. Environ Toxicol Pharmacol 2012;34:23-33.

191.Hiratsuka M, Takekuma Y, Endo Nea. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. Eur J Clin Pharmacol. 2002;58:417-421.
192.Hilli J, Rane A, Lundgren S. Genetic polymorphism of cytochrome P450s and P-glycoprotein in the Finnish population. Fundam Clin Pharmacol. 2007;21:379-386.
193.Semiz S, Dujic T, Ostanek B, et al. Analysis of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms in population of Bosnia and Herzegovina. Med Glas (Zenica). 2011;8(1):84-89.
194.Jakovski K, Kapedanovska Nestorovska A, Labacevski N, et al. Frequency of the most common CYP3A5 polymorphisms in the healthy population of the Republic of Macedonia. Macedonian pharmaceutical bulletin. 2012;58(1,2):25-30.
195.Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, et al. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population. Fundam Clin Pharmacol 2007;21(4):419-426.
196.Adler G, Loniewska B, Parczewski M, et al. Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants. Pharmacol Rep. 2009;61(5):947-951.
197.Seredina TA, Goreva OB, Talaban VO, et al. Association of cytochrome P450 genetic polymorphisms with neoadjuvant chemotherapy efficacy in breast cancer patients. BMC Med Genet. 2012;13:45.
198.Kim KA, Park PW, Park JY. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and antiplatelet effect of clopidogrel in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol. 2008;64(6):589-597.
199.Dennison JB, Kulanthaivel P, Barbuch RJ, et al. Selective metabolism of vincristine in vitro by CYP3A5. Drug Metab Dispos. 2006;34(8):1317-1327.
200.Dennison JB, Jones DR, Renbarger JL, et al. Effect of CYP3A5 expression on vincristine metabolism with human liver microsomes. J Pharmacol Exp Ther. 2007;321(2):553-563.
201.Macphee IA, Fredericks S, Mohamed M, et al. Tacrolimus pharmacogenetics: the CYP3A5*1 allele predicts low dose-normalized tacrolimus blood concentrations in whites and South Asians. Transplantation. 2005;79(4):499-502.
202.Mac Guad R, Zaharan NL, Chik Z, et al. Recent advances in transplantation: effects of CYP3A5 genetic polymorphism on the pharmacokinetics oftTacrolimus in renal transplant recipients. Transplant Proc. 2016;48:81-87.

203.Hesselink DA, Bouamar R, Elens L, et al. The role of pharmacogenetics in the disposition of and response to tacrolimus in solid organ transplantation. Clin Pharmacokinet. 2014;53(2):123-139.
204.Tang L, Ye L, Lv C, et al. Involvement of CYP3A4/5 and CYP2D6 in the metabolism of aconitine using human liver microsomes and recombinant CYP450 enzymes. Toxicol Lett. 2011;202:47-54.
205.Wang Z, Xiang Q, Cui Y, et al. The Influence of UGT2B7, UGT1A8, MDR1, ALDH, ADH, CYP3A4 and CYP3A5 Genetic Polymorphisms on the Pharmacokinetics of Silodosin in Healthy Chinese Volunteers. Drug Metab Pharmacokinet 2013;28:239-243.
206.Tao XR, Xia XY, Zhang J, et al. CYP3A4 *18B and CYP3A5 *3 polymorphisms contribute to pharmacokinetic variability of cyclosporine among healthy Chinese subjects. Eur J Pharm Sci. 2015;76:238-244.
207.Kim K-A, Park P-W, Lee O-J, et al. Effect of Polymorphic CYP3A5 Genotype on the Single-Dose Simvastatin Pharmacokinetics in Healthy Subjects. J Clin Pharmacol. 2007;47(1):87-93.
208.Park JY, Kim KA, Park PW, et al. Effect of CYP3A5*3 genotype on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam in healthy subjects. Clin Pharmacol Ther. 2006;79(6):590-599.
209.Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. Pharmacogenet Genomics. 2008;18(4):339-348.
210.Provenzani A, Santeusanio A, Mathis E, et al. Pharmacogenetic considerations for optimizing tacrolimus dosing in liver and kidney transplant patients. World J Gastroenterol. 2013;19(48):9156-9173.
211.Fiegenbaum M, da Silveira FR, Van der Sand CR, et al. The role of common variants of ABCB1, CYP3A4, and CYP3A5 genes in lipid-lowering efficacy and safety of simvastatin treatment. Clin Pharmacol Ther. 2005;78(5):551-558.
212.Wang P, Yin T, Ma H-Y, et al. Effects of CYP3A4/5 and ABCB1 genetic polymorphisms on carbamazepine metabolism and transport in Chinese patients with epilepsy treated with carbamazepine in monotherapy and bitherapy. Epilepsy Res. 2015;117:52-57.
213.Floyd MD, Gervasini G, Masica AL, et al. Genotype-phenotype associations for common CYP3A4 and CYP3A5 variants in the basal and induced metabolism of

midazolam in European- and African-American men and women. Pharmacogenetics. 2003;13(10):595-606.
214.Gervasini G, Vizcaino S, Carrillo JA, et al. The effect of CYP2J2, CYP3A4, CYP3A5 and the MDR1 polymorphisms and gender on the urinary excretion of the metabolites of the H-receptor antihistamine ebastine: a pilot study. Br J Clin Pharmacol. 2006;62(2):177-186.
215.Westlind-Johnsson A, Malmebo S, Johansson A, et al. Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism. Drug Metab Dispos. 2003;31(6):755-761.
216.Yamaori S, Yamazaki H, Iwano S, et al. Ethnic differences between Japanese and Caucasians in the expression levels of mRNAs for CYP3A4, CYP3A5 and CYP3A7: lack of co-regulation of the expression of CYP3A in Japanese livers. Xenobiotica. 2005;35(1):69-83.
217.Yeap LL, Lim KS, Ng CC, et al. Slow carbamazepine clearance in a nonadherent Malay woman with epilepsy and thyrotoxicosis. Ther Drug Monit. 2014;36(1):3-9.
218.Tanno LK, Kerr DS, dos Santos B, et al. The Absence of CYP3A5*3 Is a Protective Factor to Anticonvulsants Hypersensitivity Reactions: A Case-Control Study in Brazilian Subjects. PLoS ONE. 2015;10(8):1-11.
219.Adeagbo BA, Bolaji OO, Olugbade TA, et al. Influence of CYP3A5*3 and ABCB1 C3435T on clinical outcomes and trough plasma concentrations of imatinib in Nigerians with chronic myeloid leukaemia. J Clin Pharm Ther. 2016;41(5):546-551.
220.Jiang H, Zhong F, Sun L, et al. Structural and functional insights into polymorphic enzymes of cytochrome P450 2C8. Amino Acids. 2011;40(4):1195-1204.
221.Kaspera R, Naraharisetti SB, Tamraz B, et al. Cerivastatin in vitro metabolism by CYP2C8 variants found in patients experiencing rhabdomyolysis. Pharmacogenet Genomics. 2010;20(10):619-629.
222.Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, et al. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6alpha-hydroxylase activity in human liver microsomes. Biochem Pharmacol. 2002;64(11):1579-1589.
223.Ishikawa C, Ozaki H, Nakajima T, et al. A frameshift variant of CYP2C8 was identified in a patient who suffered from rhabdomyolysis after administration of cerivastatin. J Hum Genet. 2004;49(10):582-585.

224.Arnaldo P, Thompson RE, Lopes MQ, et al. Frequencies of Cytochrome P450 2B6 and 2C8 Allelic Variants in the Mozambican Population. Malays J Med Sci. 2013;20(4):13-23.
225.Lai XS, Yang LP, Li XT, et al. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. Curr Drug Metab. 2009;10(9):1009-1047.
226.Roman RJ. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. Physiol Rev. 2002;82(1):131-185.
227.Tornio A, Niemi M, Neuvonen M, et al. The effect of gemfibrozil on repaglinide pharmacokinetics persists for at least 12 h after the dose: evidence for mechanism-based inhibition of CYP2C8 in vivo. Clin Pharmacol Ther. 2008;84(3):403-411.
228.Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, et al. Trimethoprim and the CYP2C8*3 allele have opposite effects on the pharmacokinetics of pioglitazone. Drug Metab Dispos. 2008;36(1):73-80.
229.Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, et al. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture. Drug Metab Dispos. 2001;29(3):242-251.
230.Bergmann TK, Brasch-Andersen C, Green H, et al. Impact of CYP2C8*3 on paclitaxel clearance: a population pharmacokinetic and pharmacogenomic study in 93 patients with ovarian cancer. Pharmacogenomics J. 2011;11(2):113-120.
231.Lopez-Rodriguez R, Novalbos J, Gallego-Sandin S, et al. Influence of CYP2C8 and CYP2C9 polymorphisms on pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of racemic and enantiomeric forms of ibuprofen in healthy volunteers. Pharmacol Res. 2008;58(1):77-84.
232.Kadam R, Bourne D, Kompella U, et al. Effect of cytochrome P450 2C8*3 on the population pharmacokinetics of pioglitazone in healthy caucasian volunteers. Biol Pharm Bull. 2013;36(2):245-251.
233.Pedersen RS, Damkier P, Brosen K. The effects of human CYP2C8 genotype and fluvoxamine on the pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. Br J Clin Pharmacol. 2006;62(6):682-689.
234.Hertz DL, Motsinger-Reif AA, Drobish A, et al. CYP2C8*3 predicts benefit/risk profile in breast cancer patients receiving neoadjuvant paclitaxel. Breast Cancer Res Treat 2012(1):401.
235.Marsh S, Somlo G, Li X, et al. Pharmacogenetic analysis of paclitaxel transport and metabolism genes in breast cancer. Pharmacogenomics J. 2007;7(5):362-365.

236.Bergmann TK, Green H, Brasch-Andersen C, et al. Retrospective study of the impact of pharmacogenetic variants on paclitaxel toxicity and survival in patients with ovarian cancer. Eur J Clin Pharmacol. 2011;67(7):693-700.
237.Parikh S, Ouedraogo JB, Goldstein JA, et al. Amodiaquine metabolism is impaired by common polymorphisms in CYP2C8: implications for malaria treatment in Africa. Clin Pharmacol Ther. 2007;82(2):197-203.
238.Green H, Soderkvist P, Rosenberg P, et al. Pharmacogenetic studies of Paclitaxel in the treatment of ovarian cancer. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009;104(2):130-137.
239.Liu H, Delgado MR. In influence of sex, age, weight, and carbamazepine dose on serum concentrations, concentration ratios, and level/dose ratios of carbamazepine and its metabolites. Ther Drug Monit 1994;16:469-476.
240.Kaspera R, Naraharisetti SB, Evangelista EA, et al. Drug metabolism by CYP2C8.3 is determined by substrate dependent interactions with cytochrome P450 reductase and cytochrome b5. Biochem Pharmacol. 2011;82(6):681-691.
241.Oscarson M, Zanger UM, Rifki OF, et al. Transcriptional profiling of genes induced in the livers of patients treated with carbamazepine. Clin Pharmacol Ther. 2006;80(5):440-456.
242.Saruwatari J, Yoshida S, Tsuda Y, et al. Pregnane X receptor and hepatocyte nuclear factor 4alpha polymorphisms are cooperatively associated with carbamazepine autoinduction. Pharmacogenet Genomics. 2014;24(3):162-171.
243.Newman JW, Morisseau C, Hammock BD. Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. Prog Lipid Res. 2005;44(1):1-51.
244.Zordoky BN, El-Kadi AO. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. Pharmacol Ther. 2010;125(3):446-463.
245.Tzveova R, Naydenova G, Yaneva T, et al. Gender-Specific Effect of CYP2C8*3 on the Risk of Essential Hypertension in Bulgarian Patients. Biochem. Genet. 2015(11-12):319.
246.Mintzer S, Skidmore CT, Abidin CJ, et al. Effects of antiepileptic drugs on lipids, homocysteine, and C-reactive protein. Ann Neurol. 2009;65(4):448-456.
247.Yamamoto Y, Terada K, Takahashi Y, et al. Influence of antiepileptic drugs on serum lipid levels in adult epilepsy patients. Epilepsy Res. 2016;127:101-106.
248.Talaat FM, Kamel T, Rabah AM, et al. Epilepsy and antiepileptic drugs: risk factors for atherosclerosis. Int J Neurosci. 2015;125(7):507-511.

249.Yilmaz E, Dosan Y, Gurgoze MK, et al. Serum lipid changes during anticonvulsive treatment serum lipids in epileptic children. Acta Neurol Belg. 2001;101(4):217-220.
250.Luoma PV, Sotaniemi EA, Pelkonen RO, et al. Serum low-density lipoprotein and high-density lipoprotein cholesterol, and liver size in subjects on drugs inducing hepatic microsomal enzymes. Eur J Clin Pharmacol. 1985;28(6):615-618.
251.Brown DW, Ketter TA, Crumlish J, et al. Carbamazepine-induced increases in total serum cholesterol: clinical and theoretical implications. J Clin Psychopharmacol. 1992;12(6):431-437.
252.Verrotti A, Laus M, Scardapane A, et al. Thyroid hormones in children with epilepsy during long-term administration of carbamazepine and valproate. Eur J Endocrinol. 2009;160(1):81-86.
253.Bramswig S, Kerksiek A, Sudhop T, et al. Carbamazepine increases atherogenic lipoproteins: mechanism of action in male adults. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282(2):H704-716.
254.Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. J Pharmacol Exp Ther. 1994;270(1):414-423.
255.Haraya K, Kato M, Chiba K, et al. Prediction of inter-individual variability on the pharmacokinetics of CYP1A2 substrates in non-smoking healthy volunteers. Drug Metab Pharmacokinet. 2016;31(4):276-284.
256.Chida M, Yokoi T, Fukui T, et al. Detection of three genetic polymorphisms in the 5¢-flanking region and intron I of human CYP1A2 in the Japanese

population. . Jpn J Cancer Res 1999;90:899-902.
257.Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, et al. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. Eur J Clin Pharmacol 2007;63:537-546.
258.Djordjevic N, Ghotbi R, Jankovic S, et al. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption is associated with the CYP1A2 −163C>A polymorphism. Eur J Clin Pharmacol. 2010;66:697-703.
259.Szalai R, Magyari L, Matyas P, et al. Genetic polymorphisms in promoter and intronic regions of CYP1A2 gene in Roma and Hungarian population samples. Environ Toxicol Pharmacol 2014;38:814-820.

260.Faber MS, Jetter A, Fuhr U. Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when? Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2005;97(3):125-134.
261.Rendic S, Di Carlo FJ. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors. Drug Metab Rev. 1997;29(1-2):413-580.
262.Gunes A, Dahl ML. Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. Pharmacogenomics. 2008;9(5):625-637.
263.Sinha R, Rothman N, Brown ED, et al. Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. Cancer Res. 1994;54(23):6154-6159.
264.Kall MA, Vang O, Clausen J. Effects of dietary broccoli on human in vivo drug metabolizing enzymes: evaluation of caffeine, oestrone and chlorzoxazone metabolism. Carcinogenesis. 1996;17(4):793-799.
265.Parker AC, Pritchard P, Preston T, et al. Induction of CYP1A2 activity by carbamazepine in children using the caffeine breath test. Br J Clin Pharmacol. 1998;45(2):176-178.
266.Quattrochi LC, Vu T, Tukey RH. The human CYP1A2 gene and induction by 3-methylcholanthrene. A region of DNA that supports AH-receptor binding and promoter-specific induction. J Biol Chem. 1994;269(9):6949-6954.
267.Punyawudho B, Cloyd JC, Leppik IE, et al. Characterization of the time course of carbamazepine deinduction by an enzyme turnover model. Clin Pharmacokinet. 2009;48(5):313-320.
268.Patel RD, Hollingshead BD, Omiecinski CJ, et al. Aryl-Hydrocarbon Receptor Activation Regulates Constitutive Androstane Receptor Levels in Murine and Human Liver. Hepatology. 2007;46(1):209-218.
269.Eap CB, Bender S, Jaquenoud Sirot E, et al. Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene. J Clin Psychopharmacol. 2004;24(2):214-219.
270.Bondolfi G, Morel F, Crettol S, et al. Increased clozapine plasma concentrations and side effects induced by smoking cessation in 2 CYP1A2 genotyped patients. Ther Drug Monit. 2005;27(4):539-543.
271.Derenne JL, Baldessarini RJ. Clozapine toxicity associated with smoking cessation: case report. Am J Ther. 2005;12(5):469-471.

272.Wang L, Hu Z, Deng X, et al. Association between common CYP1A2 polymorphisms and theophylline metabolism in non-smoking healthy volunteers. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2013;112(4):257-263.
273.Uslu A, Ogus C, Ozdemir T, et al. The effect of CYP1A2 gene polymorphisms on Theophylline metabolism and chronic obstructive pulmonary disease in Turkish patients. BMB Rep. 2010;43(8):530-534.
274.Kim SE, Kim BH, Lee S, et al. Population pharmacokinetics of theophylline in premature Korean infants. Ther Drug Monit. 2013;35(3):338-344.
275.Park KW, Park JJ, Jeon KH, et al. Enhanced clopidogrel responsiveness in smokers: smokers' paradox is dependent on cytochrome P450 CYP1A2 status. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31(3):665-671.
276.Laika B, Leucht S, Heres S, et al. Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2*1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome. Pharmacogenomics J. 2010;10(1):20-29.
277.Bohanec Grabar P, Rozman B, Tomsic M, et al. Genetic polymorphism of CYP1A2 and the toxicity of leflunomide treatment in rheumatoid arthritis patients. Eur J Clin Pharmacol. 2008;64(9):871-876.
278.Wiese MD, Schnabl M, O'Doherty C, et al. Polymorphisms in cytochrome P450 2C19 enzyme and cessation of leflunomide in patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther. 2012;14(4):R163.
279.Soukup T, Dosedel M, Nekvindova J, et al. Genetic polymorphisms in metabolic pathways of leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol. 2015;33(3):426-432.
280.Sachse C, Bhambra U, Smith G, et al. Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism. Br J Clin Pharmacol. 2003;55(1):68-76.
281.Lanchote VL, Bonato PS, Campos GM, et al. Factors influencing plasma concentrations of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in epileptic children and adults. Ther Drug Monit. 1995;17(1):47-52.
282.Tapeshkina NV. The structure of the nourishment of preschoolers during the weekend (short report). Vopr Pitan. 2014;83(2):64-67.

283.Obase Y, Shimoda T, Kawano T, et al. Polymorphisms in the CYP1A2 gene and theophylline metabolism in patients with asthma. Clin Pharmacol Ther. 2003;73(5):468-474.
284.Melkersson KI, Scordo MG, Gunes A, et al. Impact of CYP1A2 and CYP2D6 polymorphisms on drug metabolism and on insulin and lipid elevations and insulin resistance in clozapine-treated patients. J Clin Psychiatry. 2007;68(5):697-704.
285.Han XM, Ou-Yang DS, Lu PX, et al. Plasma caffeine metabolite ratio (17X/137X) in vivo associated with G-2964A and C734A polymorphisms of human CYP1A2. Pharmacogenetics. 2001;11(5):429-435.
286.Vucicevic K, Miljkovic B, Velickovic R, et al. Population pharmacokinetic model of carbamazepine derived from routine therapeutic drug monitoring data. Ther Drug Monit. 2007;29(6):781-788.
287.Kong ST, Lim SH, Chan E, et al. Estimation and comparison of carbamazepine population pharmacokinetics using dried blood spot and plasma concentrations from people with epilepsy: the clinical implication. J Clin Pharmacol. 2014;54(2):225-233.
288.Jiao Z, Shi XJ, Zhao ZG, et al. Population pharmacokinetic modeling of steady state clearance of carbamazepine and its epoxide metabolite from sparse routine clinical data. J Clin Pharm Ther 2004;29(3):247-256.
289.Delgado Iribarnegaray MF, Santo Bueldga D, García Sánchez MJ, et al. Carbamazepine population pharmacokinetics in children: mixed-effect models. Ther Drug Monit. 1997;19(2):132-139.
290.Ahn JE, Birnbaum AK, Brundage RC. Inherent correlation between dose and clearance in therapeutic drug monitoring settings: possible misinterpretation in population pharmacokinetic analyses. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2005;32(5-6):703-718.
291.Furlanut M, Montanari G, Bonin P, et al. Carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide serum concentrations in epileptic children. J Pediatr 1985;106(3):491-495.
292.Summers B, Summers RS. Carbamazepine clearance in pedetric epilepsy patients. Influence of both mass, dose, sex and co-medication. Clin Pharmacokin. 1989;12:208-216.
293.Chan E, Lee HS, Hue SS. Population pharmacokinetics of carbamazepine in Singapore epileptic patients. Br J Clin Pharmacol. 2001;51(6):567-576.
294.Mangoni AA, Jackson SH. Age-related changes in pharmacokinetics and pharmacodynamics: basic principles and practical applications. Br J Clin Pharmacol. 2004;57(1):6-14.

295.Reith DM, Hooper WD, Parke J, et al. Population pharmacokinetic modeling of steady state carbamazepine clearance in children, adolescents, and adults. J Pharmacokinet Pharmacodyn. 2001;28(1):79-92.
296.Jiao Z, Zhong MK, Shi XJ, et al. Population pharmacokinetics of carbamazepine in Chinese epilepsy patients. Ther Drug Monit. 2003;25(3):279-286.
297.Correa T, Rodriguez I, Romano S. Population pharmacokinetics of valproate in Mexican children with epilepsy. Biopharm Drug Dispos. 2008;29(9):511-520.
298.Chang SL, Levy RH. Inhibitory effect of valproic acid on the disposition of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in the rat. Drug Metab Dispos. 1986;14(3):281-286.
299.Robbins DK, Wedlund PJ, Kuhn R, et al. Inhibition of epoxide hydrolase by valproic acid in epileptic patients receiving carbamazepine. Br J clin Pharmac. 1990;29:759-762.
300.Patsalos PN, Froscher W, Pisani F, et al. The importance of drug interactions in epilepsy therapy. Epilepsia. 2002;43(4):365-385.
301.Svinarov DA, Pippenger CE. Valproic acid-carbamazepine interaction: is valproic acid a selective inhibitor of epoxide hydrolase? Ther Drug Monit. 1995;17(3):217-220.
302.Bernus I, Dickinson RG, Hooper WD, et al. The mechanism of the carbamazepine-valproate interaction in humans. Br J Clin Pharmacol. 1997;44(1):21-27.