

CYP3A4 RS35599367 NE VPLIVA NA ZDRAVLJENJE Z ANTIPSIHOTIKI PRI SLOVENSKIH BOLNIKI S SHIZOFRENIJO

CYP3A4 RS35599367 DOES NOT INFLUENCE ANTIPSYCHOTIC TREATMENT IN SLOVENIAN PATIENTS WITH SCHIZOPHRENIA

Tea Terzić, dr. med.^a;
prof. dr. Vita Dolžan, dr. med.^b;
prof. dr. Blanka Kores Plesničar, dr. med.^a

^a Univerzitetna psihiatrična klinika Ljubljana,
Studenec 48, 1260 Ljubljana, Slovenija

^b Laboratorij za farmakogenetiko, Inštitut za biokemijo,
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani,
Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

KORESPONDENČNA AVTORICA:

prof. dr. Blanka Kores Plesničar, dr. med.
Univerzitetna psihiatrična klinika Ljubljana,
Studenec 48, 1260 Ljubljana, Slovenija
e-mail: blanka.kores@psih-klinika.si,
Tel: +386-1-5872467

POVZETEK

Citokrom P450 3A4 (CYP3A4) je encim, ki presnavlja določene antipsihotike. Genetska variabilnost CYP3A4 lahko vpliva na aktivnost encima in s tem na presnovo zdravil. Tretjina bolnikov s shizofrenijo kljub zdravljenju ostaja terapevtsko rezistentna. Namen naše raziskave je bil preveriti vpliv polimorfizma CYP3A4 rs35599367 na terapevtsko rezistenco, psihopatološko simptomatiko ter na vsakodnevno funkcioniranje slovenskih bolnikov s shizofrenijo. Pri 138 ambulantnih bolnikov s shizofrenijo in 94 zdravih krvodajalci smo iz periferne krvi izolirali DNA in določili genotipe polimorfizma CYP3A4 rs35599367. Med bolniki s shizofrenijo in krvodajalci nismo našli statistično značilnih razlik v frekvencah genotipov preiskovanega polimorfizma, prav tako jih nismo našli med terapevtsko rezistentnimi in terapevtsko odzivnimi bolniki s shizofrenijo. Pri bolnikih s shizofrenijo nismo opazili vpliva polimorfizma CYP3A4 rs35599367 na simptomatiko shizofrenije in funkcioniranje bolnikov. Zaključimo lahko, da CYP3A4 rs35599367 nima pomembnega vpliva na zdravljenje z antipsihotiki pri slovenskih bolnikih s shizofrenijo.

KLJUČNE BESEDE:

Ključne besede: shizofrenija, zdravljenje, genetska variabilnost, polimorfizem, CYP3A4

ABSTRACT

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) is an enzyme responsible for metabolism of several antipsychotics. Genetic variability of CYP3A4 can influence activity of the enzyme and drug metabolism. One third of patients with schizophrenia stay treatment resistant despite antipsychotic therapy. The purpose of the study was to investigate if CYP3A4 rs35599367 polymorphism influences treatment resistance, clinical symptoms, and global functioning of Slovenian patients with schizophrenia. We included 138 outpatients with schizophrenia and 94 healthy blood donors, and isolated DNA from their peripheral blood samples and genotyped them for CYP3A4 rs35599367. Genotype frequencies of the investigated polymorphism did not differ significantly between patients with schizophrenia and healthy blood donors or between the treatment responsive and

treatment resistant patients. *CYP3A4* rs35599367 polymorphism was not associated with clinical symptoms and global functioning of patients with schizophrenia. We can conclude, that *CYP3A4* rs35599367 does not influence antipsychotic treatment in Slovenian schizophrenia patients.

KEY WORDS:

Key words: schizophrenia, treatment, genetic variability, polymorphism, *CYP3A4*

1 UVOD

Citokromi P450 (CYP) so skupina encimov, ki imajo pomembno vlogo v presnovi zdravil. Z encimom *CYP3A4* se v jetrih presnavlja skoraj 50 % pogosto uporabljenih zdravil (1). Razlike v aktivnosti *CYP3A4* med posamezniki so lahko tudi do štiridesetkratne (2) in so odvisne od več dejavnikov, med katerimi je pomembna tudi genetska variabilnost (3). Pri genu *CYP3A4* so opisali že veliko polimorfnih alelov (alelne variante od *1 do *22), vendar večina ni mogla opisati tako velikih razlik v aktivnosti *CYP3A4* v populaciji (4). Intronski funkcionalni polimorfizem *CYP3A4* rs35599367, ki označuje alel *CYP3A4**22, se razlikuje od ostalih SNP, saj lahko vpliva na zmanjšano aktivnost *CYP3A4* in s tem na presnovo nekaterih zdravil (5). Zaradi teh lastnosti je *CYP3A4* rs35599367 primeren kandidat za farmakogenetske raziskave (4).

Antipsihotiki učinkovito zmanjšujejo simptome shizofrenije, vendar kljub temu tretjina bolnikov s shizofrenijo ostaja terapevtsko rezistentna (6). Terapevtsko rezistentni bolniki s shizofrenijo se od terapevtsko odzivnih razlikujejo po vztrajajočih kliničnih simptomih, med katerimi so poleg pozitivnih (halucinacije, blodnje) izraziti tudi negativni (brezvoljnost, anhedonija, splitven afekt in skop govor) in kognitivni simptomi shizofrenije (spominske motnje, motnje pozornosti in izvršilnih funkcij, kritičnost) (7). Psihopatološka simptomatika je povezana s terapevtsko rezistenco, saj imajo terapevtsko rezistentni bolniki izrazitejšo klinično sliko, predvsem negativno simptomatiko shizofrenije, če jih primerjamo s terapevtsko odzivnimi bolniki. Zaradi izrazitejše klinične slike je pričakovati tudi slabše vsakodnevno funkcioniranje pri terapevtsko rezistentnih bolnikih.

Odzivnost na antipsihotike je lahko odvisna od genetske variabilnosti. Encim *CYP3A4* presnavlja antipsihotike, kot so klozapin, haloperidol, aripiprazol, kvetiapin, paliperidon in ziprazidon (8). Raziskave o povezavi med genotipom *CYP3A4* rs35599367 in odzivnostjo na antipsihotike so za zdaj redke. V nizozemski raziskavi so ugotovili, da so imeli nosilci polimorfne alela *CYP3A4* rs35599367 A večje koncentracije kvetiapina v plazmi kot nosilci normalnega alela (9).

Namen naše raziskave je bil preveriti vpliv polimorfizma *CYP3A4* rs35599367 na terapevtsko rezistenco, psihopatološko simptomatiko in na vsakodnevno funkcioniranje bolnikov s shizofrenijo v slovenski populaciji.

2 PREISKOVANCI IN METODE

V raziskavo smo povabili naključno izbrane ambulantno vodene bolnike s shizofrenijo, ki predstavljajo reprezentativni vzorec slovenskih bolnikov s shizofrenijo v stabilni fazi bolezni, ki ne potrebuje hospitalne obravnave. Bolnike smo klinično ocenili z lestvico pozitivnih in negativnih simptomov (PANSS, *Positive and Negative Symptom Scale*) (10), s kratko lestvico psihiatričnih simptomov (BPRS, *Brief Psychiatric Rating Scale*) (11) ter z lestvico ocene vsakodnevnega funkcioniranja (GAF, *Global Assessment of Functioning*) (12). Terapevtsko rezistentno skupino so po uveljavljenih kriterijih sestavljali tisti bolniki, pri katerih remisija ni bila dosežena kljub zdravljenju z dvema različnima antipsihotikoma v ekvivalentnem odmerku 400 do 600 mg klorpromazina, ki v zadnjih petih letih niso imeli zadovoljivega socialnega funkcioniranja (zmožnost zaposlitve, socialnih stikov), ob tem pa so imeli oceno na PANSS ≥ 4 točke v vsaj dveh od določenih kategorij (P2 – formalne motnje mišljenja, P3 – vedenje pod vplivom halucinacij, P6 – občutki nezaupljivosti in preganjanja, G9 – nenavadne miselne vsebine) in oceno na BPRS ≥ 45 točk (12). Terapevtsko odzivno skupino so po uveljavljenih kriterijih sestavljali bolniki z doseženo remisijo in oceno na PANSS ≤ 3 točke v kategorijah P1 – blodnje oz. vsebinske motnje mišljenja, P2 – formalne motnje mišljenja, P3 – vedenje pod vplivom halucinacij, N1 – ohlapen afekt, N4 – pasivnost, N6 – upočasnjenost govornega toka, G5 – manierizmi, stereotipni gibi, G9 – nenavadne miselne vsebine (13, 14). Izključili smo bolnike z drugo duševno motnjo, pomembno telesno boleznijo, nesodelujoče pri jemanju zdravil in tiste z izrazito ek-



strapiramidno simptomatiko. Kontrolno skupino so sestavljali krvodajalci, ki predstavljajo vzorec zdrave populacije. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko in vsi preiskovanci so podpisali informirano privolitev za sodelovanje.

Iz periferne krvi smo izolirali genomsko DNA in za genotipizacijo CYP3A4 rs35599367 uporabili alelni specifični verižno reakcijo s polimerazo v realnem času (KASPar). Hardy Weinbergovo ravnovesje za porazdelitev genotipov smo izračunali s testom χ^2 . Razlike v frekvenčni porazdelitvi genotipov med terapevtsko rezistentno in odzivno skupino ter med bolniki in kontrolami smo preverili s testom χ^2 . Povezavo med genotipi in kliničnimi simptomi smo analizirali z ANCOVO s trenutnim odmerkom antipsihotika kot kovariato. Statistična moč raziskave, izračunana s programom PS: Power and Sample Size Calculation version 3.1.2, 2014, je znašala 0,79.

3 REZULTATI

V raziskavo smo vključili 138 bolnikov s shizofrenijo, 70 žensk in 68 moških. Razdelili smo jih v dve skupini, 94 v terapevtsko odzivno in 44 v terapevtsko rezistentno. V kontrolno skupino smo vključili 94 zdravih krvodajalcev. Bolniki s shizofrenijo so od prve psihotične epizode naprej prejeli različne antipsihotike, terapija je bila med dolgoletnim zdravljenjem večkrat spremenjena s ciljem doseči čim boljši klinični izid. Izbiira antipsihotične terapije je odvisna od zdravnikove presoje in upošteva klinično sliko, somatsko stanje in starost bolnika ter neželene učinke predhodne terapije.

Bolniki so imeli ob vključitvi v raziskavo predpisane različne antipsihotike, nekateri tudi več hkrati. 58 bolnikov je imelo predpisan klopazapin, 28 risperidon, 25 aripiprazol, 21 flufenazin, redkeje predpisani antipsihotiki pa so bili še zuklopentiksol, kvetiapin, olanzapin, amisulprid, paliperidon, ziprazidon, flupentiksol, promazin ter haloperidol. Antipsihotike, ki se v celoti ali delno presnavljajo prek CYP3A4, je ob vključitvi v raziskavo jemalo 47 (34 %) bolnikov, 33 terapevtsko odzivnih in 14 terapevtsko rezistentnih. V raziskavo smo vključili tudi ostale bolnike, saj so v preteklosti imeli predpisane tudi druge antipsihotike.

Frekvence genotipov CYP3A4 rs35599367 so bile v vseh preiskovanih skupinah v Hardy-Weinbergovem ravnovesju,

kar smo izračunali s testom χ^2 na danem vzorcu preiskovancev. Frekvence genotipov se ujemajo s frekvencami CEU populacije v podatkovni bazi SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>). Za slovensko populacijo nimamo podatkov. Polimorfni alel CYP3A4 rs35599367 A je bil zelo redek pri bolnikih (frekvenca redkega alela, *minor allele frequency* – MAF A = 0,0254) in pri kontrolah (MAF A = 0,0372). Med vsemi preiskovanci nismo našli nobenega homozigota in le 7 heterozigotov za polimorfni alel pri bolnikih ter prav tako 7 heterozigotov za polimorfni alel pri kontrolah. Frekvence genotipov CYP3A4 rs35599367 pri bolnikih in zdravih preiskovancih so prikazane v preglednici 1. Med bolniki in kontrolno skupino ter med terapevtsko rezistentnimi in odzivnimi bolniki s shizofrenijo nismo našli statistično značilnih razlik v frekvencah preiskovanih genotipov ($p = 0,317$ in $p = 0,605$) (preglednica 1). Tudi pri celotni skupini bolnikov s shizofrenijo nismo našli statistično značilnih povezav med genotipi in ocenjevalnimi lestvicami (preglednica 2).

4 RAZPRAVA

Različna aktivnost CYP lahko vpliva na presnovo antipsihotikov in vodi v subterapevtske ali prevelike odmerke zdravil. Čeprav v naši študiji nismo spremljali/določali plazemskih koncentracij zdravil, bi glede na nekatere podatke iz literature pri nosilcih polimorfne alela CYP3A4 rs35599367 pričakovali višje koncentracije antipsihotikov kot pri bolnikih z normalnim genotipom (8) in s tem tudi morebiten vpliv na terapevtsko odzivnost. Polimorfni alel CYP3A4 rs35599367 A je pri beli rasi zelo redek, zato ni presenetljivo, da v našem vzorcu nismo našli homozigotov. Med heterozigoti in homozigoti za normalni alel G nismo našli pomembnih razlik glede tveganja za terapevtsko rezistenco ali psihopatološko simptomatiko.

Pomanjkljivost raziskave je, da nismo določali koncentracij antipsihotikov v serumu, saj so nekateri bolniki jemali po več antipsihotikov hkrati. Z merjenjem koncentracij antipsihotikov v serumu bi lahko zmanjšali dvom o nesodelovanju bolnikov pri jemanju terapije, kar lahko vpliva na klinično sliko. S CYP3A4 se presnavlja več antipsihotikov in zato je težko najti vpliv polimorfizmov v celotni skupini bolnikov, ki so jemali zelo različna zdravila. Negativne izide naše raziskave si lahko razložimo tudi z vplivi drugih dejavnikov na

Preglednica 1: Primerjava razporeditve genotipov CYP3A4 rs35599367 med terapevtsko neodzivnimi in terapevtsko odzivnimi bolniki s shizofrenijo ter med vsemi bolniki in kontrolami

SNP	Skupina preiskovancev	Genotip [n (%)]			Vrednost p
CYP3A4 rs35599367		GG	GA	AA	
	vsi bolniki	131 (94,9)	7 (5,1)	0 (0,0)	0,317
	kontrole	87 (92,6)	7 (7,4)	0 (0,0)	
	odzivni	89 (94,7)	5 (5,3)	0 (0,0)	0,605
	neodzivni	42 (95,5)	2 (4,5)	0 (0,0)	

SNP –single nucleotide polymorphism
CYP3A4 – gen za citokrom P450 3A4

Preglednica 2: Povezava med genotipi CYP3A4 rs35599367 in ocenjevalnimi lestvicami pri vseh bolnikih s shizofrenijo (ANCOVA)

SNP	Genotip	Podlestvice PANSS in skupni seštevek (povprečje ± SD)				GAF (povprečje ± SD)	CGI (povprečje ± SD)
		pozitivna podlestvica	negativna podlestvica	splošna podlestvica	skupni seštevek		
CYP3A4 rs35599367	GG	11,57 (4,73)	16,69 (6,44)	30,84 (9,51)	59,10 (19,32)	58,28 (10,55)	3,78 (0,79)
	GA	11,29 (6,24)	14,3 (6,39)	25,28 (7,95)	50,85 (2,27)	59,14 (13,16)	3,57 (0,98)
	AA	/	/	/	/	/	/
vrednost p		0,570	0,664	0,355	0,646	0,702	0,916

SNP – single nucleotide polymorphism
CYP3A4 – gen za citokrom P450 3A4
SD – standardna deviacija

PANSS – Positive and negative syndrome scale for schizophrenia
GAF – Global assessment of functioning
CGI – Clinical global impression

presnovno s CYP3A4. Poleg genetske variabilnosti lahko na aktivnost CYP3A4 vplivajo tudi induktorji in inhibitorji encima (15) ter različni prehranski (16), hormonski (17) in patološki (18) dejavniki.

vsakodnevno funkcioniranje bolnikov. Z razširitvijo vzorca bolnikov in analizo več polimorfnihih alelov CYP3A4, bi morda v prihodnosti lažje opredelili vpliv genetske variabilnosti v presnovi antipsihotikov na odgovor na zdravljenje shizofrenije.

5 SKLEP

Cilj genetskih raziskav v psihofarmakologiji je personalizirana terapija, ki bo omogočala optimalno učinkovitost zdravljenja s čim manj neželenimi učinki. V našem naključno izbranem vzorcu slovenskih ambulantnih bolnikov s shizofrenijo nismo opazili vpliva polimorfizma CYP3A4 rs35599367 na terapevtsko rezistenco, simptomatiko in

6 LITERATURA

1. Danielson PB. The Cytochrome P450 Superfamily: Biochemistry, Evolution and Drug Metabolism in Humans. *Curr Drug Metab* 2002; 3(6): 561–597.
2. Ingelman-Sundberg M. Human Drug Metabolising Cytochrome P450 Enzymes: Properties and Polymorphisms. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 2004; 369(1): 89–104.

3. Ozdemir V, Kalow W, Tang BK et al. Evaluation of the Genetic Component of Variability in Cyp3a4 Activity: a Repeated Drug Administration Method. *Pharmacogenetics* 2000; 10(5): 373–388.
4. Elens L, Van Gelder T, Hesselink DA. CYP3A4*22: promising newly identified CYP3A4 variant allele for personalizing pharmacotherapy. *Pharmacogenomics* 2013; 14(1): 47–62.
5. Wang D, Guo Y, Wrighton SA, Cooke GE, Sadee W. Intronic Polymorphism in Cyp3a4 Affects Hepatic Expression and Response to Statin Drugs. *Pharmacogenomics J* 2011; 11(4): 274–286.
6. Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the Treatment-resistant Schizophrenic: a Double-blind Comparison With Chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry* 1988; 45(9): 789.
7. Conley RR, Kelly DL. Management of treatment resistance in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 898–911.
8. Urichuk L, Prior TI, Dursun S, Baker G. Metabolism of Atypical Antipsychotics: Involvement of Cytochrome P450 Enzymes and Relevance for Drug-drug Interactions. *Curr Drug Metab* 2008; 9(5): 410–418.
9. van der Weide K, van der Weide J. The Influence of the Cyp3a4*22 Polymorphism on Serum Concentration of Quetiapine in Psychiatric Patients. *J Clin Psychopharmacol* 2014; 34(2): 256–260.
10. Kay SR, Flszbein A, Opfer LA. The Positive and Negative Syndrome Scale (panss) for Schizophrenia. *Schizophrenia Bull* 1987; 13(2): 261.
11. Overall JE, Gorham DR. The Brief Psychiatric Rating Scale. *Psychological reports* 1962; 10(3): 799–812.
12. Hall RCW. Global Assessment of Functioning: a Modified Scale. *Psychosomatics* 1995; 36(3): 267–275.
13. Andreasen NC, Carpenter WT, Kane JM et al. Remission in Schizophrenia: Proposed Criteria and Rationale for Consensus. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(3): 441–449.
14. Van Os J, Burns T, Cavallaro R et al. (2006) Standardized remission criteria in schizophrenia. In: (eds) 113(2). Wiley Online Library.
15. Grimm SW, Richtand NM, Winter HR et al. Effects of Cytochrome P450 3a Modulators Ketoconazole and Carbamazepine on Quetiapine Pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 2006; 61(1): 58–69.
16. Veronese ML, Gillen LP, Burke JP et al. Exposure-dependent Inhibition of Intestinal and Hepatic Cyp3a4 in Vivo By Grapefruit Juice. *J Clin Pharmacol* 2003; 43(8): 831–839.
17. Schirmer M, Rosenberger A, Klein K et al. Sex-dependent Genetic Markers of Cyp3a4 Expression and Activity in Human Liver Microsomes. *Pharmacogenomics* 2007; 8(5): 443–453.
18. George J, Byth K, Farrell GC. Influence of Clinicopathological Variables on Cyp Protein Expression in Human Liver. *J Gastroenterol Hepatol* 1996; 11(1): 33–39.