

# Je možná farmakogenetická predikcia terapeutické účinnosti paroxetínu?

MUDr. Zuzana Vidová<sup>1</sup>, MUDr. Martina Čižmáriková<sup>2</sup>, MUDr. Jozef Dragašek, PhD.<sup>1</sup>, MUDr. Silvia Žofčáková<sup>3</sup>, MUDr. Silvia Kitková<sup>1</sup>, prof. MUDr. Ján Mojžiš, CSc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 1. psychiatrická klinika LF UPJŠ a UN L. Pasteura, Košice

<sup>2</sup> Ústav farmakológie LF UPJŠ, Košice

<sup>3</sup> Psychiatrická ambulancia, Letecká vojenská nemocnica, Košice

Variabilita odpovede na antidepresíva môže byť spojená s dostupnosťou lieku k cieľovej štruktúre. P-glykoproteín (P-gp) nachádzajúci sa v hematoencefalickej bariére je kódovaný génom mnohopočetnej liekovej rezistencie 1 (MDR1) a pôsobí ako bunková efluxná pumpa. V našej práci sme skúmali možný vplyv polymorfizmu G2677T génu MDR1 vo vzťahu k terapeutické účinnosti paroxetínu (substrát P-gp) u 50 pacientov s depresívnou poruchou. Na genotypizáciu bola použitá metóda PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism), ktorá stanovuje genotypy na základe tzv. polymorfizmov dĺžky reštrikčných fragmentov. Terapeutickú odpoveď sme hodnotili prostredníctvom Hamiltonovej hodnotiacej škály pre depresiu. Zlyhanie terapeutické odpovede bolo signifikantne častejšie u nositeľov G alely (G vs. T:  $p = 0,018$ ; TT vs. GG:  $p = 0,009$ ; Fisherov presný resp.  $\chi^2$  test). Naše výsledky poukazujú na možné ovplyvnenie terapeutické efektivity paroxetínu uvedeným polymorfizmom.

**Kľúčové slová:** farmakogenetika, P-glykoproteín, paroxetín, antidepresívna liečba.

## Is pharmacogenetic prediction of therapeutic efficacy of paroxetine possible?

Variability in antidepressant response may be linked to availability of the drug at the target side. P-glycoprotein (P-gp) located in the blood brain barrier is encoded by the multidrug resistance 1 (MDR1) gene and acts as a cellular efflux pump. We monitored the influence of G2677T polymorphism of MDR1 gene on therapeutic efficacy and tolerability of paroxetine (substrate of P-gp) in 50 depressive patients. PCR-restriction fragment length polymorphism was used for genotyping. Therapeutic response was evaluated using the Hamilton Rating Scale for Depression. A failure of therapeutic response was significantly more frequent in patients with G allele (G vs T:  $p = 0,018$ ; TT vs GG:  $p = 0,009$ ; Fisher exact or  $\chi^2$  test). We failed to show any evidence that G2677T polymorphism could influence the occurrence of tested side effects of paroxetine. Our results demonstrate that G2677T/A polymorphism could play the role in inter-individual variability in therapeutic response to paroxetine.

**Key words:** pharmacogenetics, P-glycoprotein, paroxetine, antidepressive therapy.

Psychiatr. prax; 2012; 13(2): 66–68

## Úvod

V súčasnosti 30 až 40 % pacientov nevykazuje signifikantnú odpoveď na terapeutické dávky antidepresívnej liečby podávanej 6 až 8 týždňov, teda viac ako 50 % redukciu počiatočného skóre na Hamiltonovej hodnotiacej škále pre depresiu (Hamilton rating scale for depression; HAM-D) (14). Interindividuálna variabilita v odpovedi na psychotropné liečivá je častou príčinou polypragmázie, dlhšej hospitalizácie, vyššieho výskytu nežiaducich účinkov lieku a neustupujúcich symptómov, ktoré napokon môžu vyústiť do suicídia (11). Z tohto dôvodu by skorá identifikácia respondérov na špecifickú antidepresívnu liečbu mohla byť veľkým prínosom z klinického i ekonomického pohľadu.

Možnou príčinou interindividuálnej variability v odpovedi na antidepresíva je ich rozdielna penetrácia do CNS. Bola pozorovaná zaujímavá asociácia medzi variantmi génov kódujúcich transportné proteíny hematoencefalickej bariéry a odpoveďou na niektoré antidepresíva.

## Farmakogenetika v psychiatrii

Predpokladá sa, že genetické faktory prispievajú približne až 50 percentami k odpovedi na antidepresíva (3). V súčasnosti jedným z najviac sľubných prístupov v psychiatrickom výskume je farmakogenetika. Jej hlavným cieľom je individualizácia terapie a možnosť predpovedať pravdepodobnosť liečebnej odpovede i riziko toxicity skôr, ako je liečba podávaná (1).

Pri množstve moderných antidepresív, vrátane selektívnych inhibítorov spätného vychytávania serotonínu (SSRI), je známe, že sérové koncentrácie nie sú využiteľné na predikciu účinnosti v klinickej praxi (13). Liečivá môžu byť totiž transportérmi v CNS aktívne premiestňované nezávisle od sérových koncentrácií a terapeutický výsledok môže byť modifikovaný (17).

P-glykoproteín (P-gp), ktorým sa v našej práci zaoberáme, bol objavený v roku 1976 v súvislosti so štúdiom mechanizmu rezistencie nádorových buniek na chemoterapeutiká. Anglicky býva tento fenomén označovaný ako „MDR“ (multidrug resistance). Hlavnou príčinou MDR je zvýšená ex-

presia P-gp na membránach nádorových buniek a následný zvýšený eflux cytostatík do extracelulárneho priestoru (9). O 10 rokov neskôr bol izolovaný ľudský gén mnohopočetnej liekovej rezistencie 1 (MDR1) z rezistentných karcinómových buniek a bolo opísané, že kóduje ľudský P-gp (5).

Pri skúmaní interindividuálnej variability účinku psychofarmák je dôležitá lokalizácia P-gp v hematoencefalickej bariére (2). Pre biologickú dostupnosť, distribúciu a elimináciu jeho substrátov má význam prítomnosť P-gp v enterocytoch, žilových kanálikoch i renálnom proximálnom tubule (10).

Hoci P-gp ochraňuje CNS, jeho zmenená expresia na hematoencefalickej bariére sprevádza viac neuropatológií. Redukovaná expresia alebo transportná funkcia P-gp v tejto lokalizácii je spojená napr. s Alzheimerovou, Jacob-Creutzfeldovou a Parkinsonovou chorobou, HIV infekciou; zvýšená expresia P-gp je spájaná s epilepsiou a limitovanou účinnosťou terapie tumorov mozgu a viacerých duševných porúch (4).

Pre P-gp je typická široká substrátová špecificita, jeho substrátmi sú mnohé xenobiotiká, en-

dogénne hormóny i liečivá vrátane antidepresív (paroxetín, venlafaxín, amitriptylín a citalopram, pre escitalopram sú dáta sporné, fluoxetín a mirtazapín nie sú jeho substrátmi) (16, 17, 18, 19).

### Polymorfizmus G2677T/A génu MDR1 a jeho účinky

Polymorfizmy sú známe ako alelické obmeny so stabilnými populačnými frekvenciami 1 % alebo viac, ktoré môžu vyústiť do funkčného alebo nefunkčného génového produktu (t. j. proteínov). Do súčasnosti bolo v géne MDR1 zaznamenaných viac ako 100 bodových polymorfizmov (zámena jednej bázy na špecifickom mieste génu za inú). V našej práci sme sa zaoberali možným vplyvom polymorfizmu G2677T/A génu MDR1 na terapeutickú odpoveď na paroxetín. Polymorfizmus G2677T/A je lokalizovaný v exóne 21 a kodóne 2677 a vedie k záмене aminokyseliny alanínu (Ala) za serín (Ser) alebo treonín (Thr). Niektoré štúdie poukázali na to, že variant G polymorfizmu G2677T/A je spojený s vyššou expresiou a funkciou P-gp (6), hoci boli opísané tiež opačné výsledky a význam jednotlivých alel daného polymorfizmu preto zostáva stále kontroverzný (12).

### Súbor pacientov a metodika

Do štúdie bolo zahrnutých 50 pacientov (33 žien a 17 mužov) vo veku od 20 do 61 rokov (priemerný vek = 41,4 rokov) s diagnózou prvej depresívnej epizódy alebo recidivujúcej depresívnej poruchy. Všetci pacienti boli slovenskej národnosti (kaukazská populácia). Výskumný protokol bol schválený lokálnou etickou komisiou a každý pacient podpísal informovaný súhlas so štúdiou. Pri výbere pacientov sme použili nasledujúce inklúzne kritériá: vek 18 až 65 rokov, pacienti s prvou alebo opakovanou epizódou depresie podľa MKCH-10, všetci pacienti museli užívať paroxetín kontinuálne 6 týždňov a skóre na 21 položkovej verzii HAMD muselo byť na začiatku štúdie najmenej 18 bodov. Pacienti neboli zahrnutí do štúdie, ak spĺňali akékoľvek z nasledujúcich kritérií: a) hlavná psychiatrická diagnóza iná ako depresia, b) trvanie súčasnej depresívnej epizódy viac ako 2 roky za účelom vylúčenia chronickej depresie, c) škodlivé užívanie resp. závislosť od alkoholu a iných drog, okrem fajčenia tabaku, d) organické psychiatrické poruchy a poruchy osobnosti, e) prítomnosť psychotických symptómov, f) tehotenstvo, g) klinicky nestabilné somatické ochorenie, h) elektrokonvulzívna liečba v predchádzajúcich 6 mesiacoch. Depresívne symptómy boli sledované prostredníctvom HAMD-21 na začiatku a po 6 týždňoch liečby paroxetínom v terapeutickom rozmedzí. Pacienti buď pred štúdiou neužívali žiadne antidepresívum, alebo užívali antidepresívum bez efektu. Po 7 dňoch po jeho vysadení bol do liečby nasadený paroxetín

v iniciálnej dávke 10 až 20 mg denne. Pri predchádzajúcej liečbe fluoxetínom bol interval zaradenia do štúdie po jeho vysadení stanovený na 6 týždňov, ale takýto pacient sa v našom súbore nevyskytol. Iničiálna terapeutická dávka paroxetínu mohla byť navýšená do 40 mg denne od ôsmeho až jedenásteho dňa do konca štúdie. Súbežná liečba inými psychofarmakami nebola povolená, s výnimkou nízkych dávok symptomatickej benzodiazepínovej liečby do 1 mg alprazolamu denne v minimálnom trvaní. Ako respondéri boli definovaní pacienti, u ktorých došlo od začiatku do konca štúdie k redukcii skóre HAMD-21 o 50 % a viac. Tolerancia liečby bola hodnotená prostredníctvom otázok na prítomnosť alebo absenciu 2 najčastejších nežiaducich účinkov liečby paroxetínom, nauzey a sexuálnej dysfunkcie, na začiatku štúdie a po 6 týždňoch liečby.

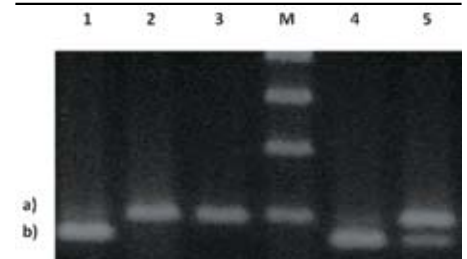
### DNA extrakcia a genotypizácia

DNA sme získavali izolačným kitom (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Corporation, USA) zo 600 µl periférnej venózne krvi odobratej do ependorfiek s protizrážavým činidlom (1 % roztok Na<sub>2</sub>EDTA). Kvôli výskytu extrémne nízkeho počtu nositeľov alely 2677A v kaukazskej populácii bol do analýzy polymorfizmu G2677T/A zahrnutý len alelický variant 2677T. Na genotypizáciu bola použitá metóda PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism), pri ktorej sa stanovujú jednotlivé genotypy na základe tzv. polymorfizmov dĺžky reštrikčných fragmentov (sekvencie použitých primerov F: 5'-TTACCCAGAATATAGCAAATCTTGG-3' a R: 5'-CATATTTAGTTTGACTCACCTTCTCAG-3'). PCR reakčná zmes obsahovala: približne 200 ng genomickej DNA, 1 x PCR pufor s 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Solis BioDyne, Estonia), 200 µM deoxynukleotid trifosfátovej (dNTP) zmesi (Jena Bioscience, Germany), 0,4 µM každého primeru (Sigma-Aldrich, Germany) a 1U HOT FIREPol® DNA polymerázy (Solis BioDyne, Estonia). Zmes bola doplnená sterilnou vodou do konečného objemu 25 µl. Výsledné PCR produkty boli štiepené pri 37 °C cez noc použitím reštrikčnej endonukleázy Hpy188I (New England BioLabs, UK). Získané reštrikčné fragmenty boli separované elektroforézou na 3 % agarózovom géle 90 minút pri 140 V a analyzované po 30 minútovej inkubácii s GelRed (Biotium, USA) pod UV žiarením (obrázok 1).

### Štatistická analýza výsledkov

Na analýzu výsledkov bol použitý štatistický program GraphPad Prism (verzia 5.00, GraphPad Software,

**Obrázok 1.** Agarózová elektroforéza PCR produktu po štiepení reštrikčnou endonukleázou Hpy188I



Legenda: fragment a: 198 bp, fragment b: 173 bp; dráhy 1, 4: homozygoti pre variantnú alelu T; dráhy 2, 3: homozygoti pre štandardnú alelu G; dráha 5: heterozygot; M = marker (DNA 100 bp ladder)

Inc., USA). Pri overovaní asociácií znakov delených do kategórií (alely, genotypy) boli používané kontingenčné tabuľky založené na Pearsonovom  $\chi^2$ -teste resp. Fisherovom presnom teste. Zistené frekvencie genotypov v populácii boli porovnané s očakávanými frekvenciami na základe Hardy-Weinbergovho zákona. Na posúdenie relatívnych vzťahov medzi respondérmi a nonrespondérmi boli určené pomery šancí (OR, odds ratios) a korešpondujúce 95 % intervaly spoľahlivosti (CI, confidence intervals). Vo všetkých testoch sa za signifikantný výsledok považovala hodnota pravdepodobnosti omylu  $p < 0,05$ .

### Výsledky

#### Terapeutická odpoveď na paroxetín vo vzťahu k pohlaviu

V nami sledovanom súbore pacientov s depresívnou poruchou bolo vyššie zastúpenie žien ( $n = 33$ ; 66 %) ako mužov ( $n = 17$ ; 34 %) (tabuľka 1). V práci sme preto najprv sledovali, či status respondéra a nonrespondéra súvisí s pohlavím jednotlivých pacientov. V tomto prípade sme nepozorovali štatisticky signifikantný rozdiel ( $p = 1,000$ ; OR = 1,048 (0,3087 – 3,556)) (tabuľka 1). Zastúpenie respondérov a nonrespondérov bolo porovnateľné v oboch skupinách hodnotených pacientov (respondéri: muži – 64,7 %; ženy – 63,6 %; nonrespondéri: muži – 35,3 %; ženy – 36,4 %). Z uvedených výsledkov vyplýva, že pohlavie nie je hlavným faktorom zodpovedným za interindividuálne rozdiely pozorované v liečebnej odpovedi na paroxetín.

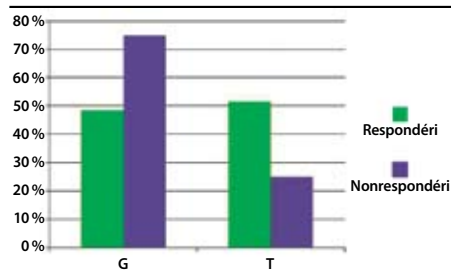
#### Terapeutická odpoveď na paroxetín v závislosti od polymorfizmu G2677T génu MDR1

Pre genotypy sledovaného polymorfizmu sme u vyšetrovaných osôb zistili genetickú rovnováhu

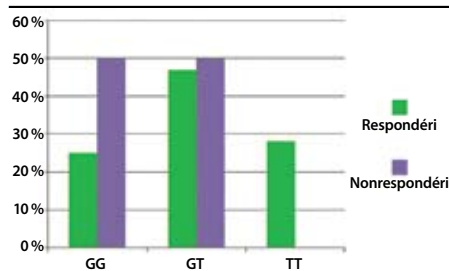
**Tabuľka 1.** Zastúpenie respondérov a nonrespondérov podľa pohlavia

Pohlavie	Súbor n	Respondéri	Nonrespondéri
Muži	17	11 (64,7 %)	6 (35,3 %)
Ženy	33	21 (63,6 %)	12 (36,4 %)

**Graf 1.** Alelové frekvencie polymorfizmu G2677T u respondérov a nonrespondérov



**Graf 2.** Genotypové frekvencie polymorfizmu G2677T u respondérov a nonrespondérov



**Tabuľka 2.** Genotypové a alelové frekvencie polymorfizmu G2677T génu MDR1: respondéri verus nonrespondéri

Genotyp/alela	Respondéri	Nonrespondéri	P	OR	95 % CI
G	31 (48,4 %)	27 (75,0 %)		1,00	Ref.
T	33 (51,6 %)	9 (25,0 %)	a0,018*	0,31	0,13 – 0,77
GG	8 (25,0 %)	9 (50,0 %)		1,00	Ref.
GT	15 (46,9 %)	9 (50,0 %)	a0,358	0,53	0,15 – 1,88
TT	9 (28,1 %)	0 (0,0 %)	a0,009*	0,05	0 – 0,94
GT+TT	24 (75,0 %)	9 (50,0 %)	a0,139	0,33	0,1 – 1,13
TT	9 (28,1 %)	0 (0,0 %)		1,00	Ref.
GT	15 (46,9 %)	9 (50,0 %)	b0,039*	11,65	0,61 – 224,05
GG	8 (25,0 %)	9 (50,0 %)	b0,009*	21,24	1,07 – 422,84
GG+GT	23 (71,9 %)	18 (100,0 %)	b0,018*	14,96	0,82 – 274,31

a =  $\chi^2$ -test; b = Fisherov exaktný test; ref. – referenčná alela alebo genotyp

zhodnú s Hardy-Weinbergovou predikciou ( $p = 0,995$ ). Pri porovnávaní frekvencií jednotlivých genotypov a alel u ženského a mužského pohlavia neboli medzi oboma skupinami sledované štatisticky významné rozdiely.

Pri hodnotení terapeuticko-odpovede bolo u respondérov zaznamenané významne častejšie zastúpenie variantnej alely T (G vs. T:  $p = 0,018$ ) (graf 1, tabuľka 2).

Pri analýze genotypov sme pozorovali, že všetci pacienti homozygotní pre alelu T ( $n = 9$ ) boli respondéri (GG vs. TT:  $p = 0,009$ ). Naopak, nositelia aspoň jednej alely G významne častejšie zlyhávali v terapeuticko-odpovede v porovnaní s pacientmi s genotypom TT (TT vs. GT:  $p = 0,039$ ; TT vs. GG:  $p = 0,009$ ; TT vs. GG + GT:  $p = 0,018$ ) (graf 2, tabuľka 2).

## Diskusia

Rezistencia na liečbu je bežným problémom v liečbe veľkej depresie. Z toho vyplýva dôležitosť hľadania príčin nedostatočnej efektívnosti antidepresív. Predpokladá sa, že klinická účinnosť systémovo podávaných liečiv pôsobiach na CNS závisí od schopnosti liečiva prestúpiť hematoencefalickú bariéru, čo je regulované jej transportermi (napr. P-gp). V prezentovanej práci sme sa zaoberali možným vplyvom variantov polymorfizmu G2677T génu MDR1 na terapeutickú efektívnosť a tolerančný profil paroxetínu. Zistili sme významne vyššie zastúpenie alely T (G vs. T:  $p = 0,018$ ) u respondérov. Naopak, nositelia aspoň jednej alely G boli významne častejšie nonrespondérmi (TT vs. GT:  $p = 0,039$ ; TT vs. GG:  $p = 0,009$ ; TT vs. GG + GT:  $p = 0,018$ ). Jedným

z vysvetlení tejto skutočnosti môže byť to, že polymorfizmus G2677T môže viesť k vyššej expresii P-gp alebo aktívnejším proteínovým formám a tým k rezistencii na klinickú odpoveď. Nedávne práce poukázali na to, že jedinci s genotypom 2677TT vykazovali nižšiu expresiu P-gp mRNA, ako tí s genotypom GG2677 (8). Na druhej strane, niektoré farmakokinetické štúdie poukázali na opačný efekt variantnej alely 2677T, a to na zvýšenie v transportnej aktivite (7) v porovnaní s alelou G2677. Ďalší autori poukázali na nesignifikantný trend expresie P-gp v súvislosti s polymorfizmom G2677T (15). Tieto rozdielne pozorovania mohli byť spôsobené interetnickou variabilitou variantov G2677T. Nie je vylúčené, že daný polymorfizmus môže mať rozdielny účinok v závislosti od druhu liečiva (7).

Naše výsledky poukazujú na to, že remisia depresívnych symptómov pri liečbe paroxetínom by mohla závisieť od variantov polymorfizmu G2677T génu MDR1. Posúdenie kapacity liečby pôsobiť ako substrát P-gp a súčasne MDR1 genotypu pacienta by preto mohlo byť silným prediktorom dosiahnutia remisie. Na potvrdenie týchto výsledkov a identifikáciu ich biologickej bázy je potrebná analýza väčšej vzorky pacientov a *in vitro* a *in vivo* funkčné štúdie. Ideálne by mala byť pre výber vhodnej liečby využívaná kombinácia genetickej a negenetickej informácie (enviroentálne, klinické, demografické faktory), ale genetické testovanie môže byť užitočné ako „predliečebný test“. V súčasnej dobe nie je stanovovanie genotypu P-gp bežnou metódou v klinickej praxi psychiatrov, prebieha len na

úrovni výskumných zámerov. Hlavným cieľom do budúcnosti je nájsť možné klinické koreláty a ich uplatnenie v praxi.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0302/10.

## Literatúra

1. Arranz MJ, et al. Difficulties in replication of results. *Lancet* 2000; 356: 1359–1360.
2. Cordon-Cardo C, et al. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 695–698.
3. Crisafulli C, et al. Pharmacogenetics of antidepressants. *Front Pharmacol* 2011; 2(6) Epub 2011, Feb 16.
4. Gerstner ER, et al. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2306–2312.
5. Chen C, et al. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 1986; 47: 381–389.
6. Kato M, et al. ABCB1 (MDR1) gene polymorphisms are associated with the clinical response to paroxetine in patients with major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psych* 2008; 32: 398–404.
7. Kim RB. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 70: 189–199.
8. Lamba J, et al. MDR1 genotype is associated with hepatic cytochrome P4503A4 basal and induction phenotype. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 79: 325–338.
9. Lehne G. P-glycoprotein as a drug target in the treatment of multidrug resistant cancer. *Curr Drug Targets* 2000; 1: 1–18.
10. Macfarland A, et al. Stage-specific distribution of P-glycoprotein in first-trimester and full-term human placenta. *Histochem J* 1994; 26: 417–423.
11. Malhotra AK, Murphy GM Jr, Kennedy JL. Pharmacogenetics of psychotropic drug response. *Am J Psych* 2004; 161: 780–796.
12. Marzolini C, et al. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther* 2004; 75: 13–33.
13. Mitchell PB, et al. Therapeutic drug monitoring of non-tricyclic antidepressant drugs. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42: 1212–1218.
14. Moncrieff J, Kirsch I. Efficacy of antidepressants in adults. *BMJ* 2005; 331: 551–557.
15. Tanabe M, et al. Expression of P-glycoprotein in human placenta, relation to genetic polymorphism of the multidrug resistance (MDR)-1 gene. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 1137–1143.
16. Thuermer N, Fromm MF. The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2006; 256: 281–286.
17. Uhr M, et al. Differential enhancement of antidepressant penetration into the brain in mice with *abcb1ab* (*mdr1ab*) P-glycoprotein gene disruption. *Biol Psychiatry* 2003; 54: 840–84.
18. Uhr M, et al. Blood-brain barrier penetration and pharmacokinetics of amitriptyline and its metabolite in P-glycoprotein (*abcb1ab*) knock-out mice and controls. *J Psychiatr Res* 2007; 41: 179–188.
19. Uhr M, et al. Polymorphisms in the drug transporter gene ABCB1 predict antidepressant treatment response in depression. *Neuron* 2008; 24: 203–209.

**MUDr. Zuzana Vidová**  
1. psychiatrická klinika LF UPJŠ  
a UN L. Pasteura  
Trieda SNP 1, 040 11 Košice  
zuskastera@gmail.com

