



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

УТИЦАЈ ГЕНЕТСКОГ ПОЛИМОРФИЗМА МЕТАБОЛИШУЋИХ ЕНЗИМА И ЊИХОВИХ ИНДУКТОРА НА КЛИНИЧКИ ОДГОВОР ТЕРАПИЈЕ ОЛАНЗАПИНОМ

Кључне речи :

оланзапин, CYP12A, конзумирање кафе, пушење цигарета

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

Третман шизофрених пацијента, као и пацијената са дијагнозом менталног поремећаја из психотичног спектра измењен је последњих деценија, углавном захваљујући појави нове групе лекова названих атипични, новији или антипсихотици друге генерације, где се сврстава и оланзапин (Zalasta®). Он подлеже екстензивној биотрансформацији у процесима I и II фазе. Главни ензими укључени у метаболизам оланзапина су: UDP-глукуронозилтрансфераза 1A4 (UGT1A4), цитохром P450 1A2 (CYP1A2), тип 3 монооксигеназног ензима који садржи флавин (FMO3) и цитохром P450 2D6 (CYP2D6). Метаболизам оланзапина, ензимски системи и њихови индуктори остварују директан утицај на клиничке ефекте терапије оланзапином. Наша студија ће бити спроведена као проспективна, интервентна, контролисана, клиничка студија IV фазе. У студију ће бити укључено око 100 пацијената, који према истраживачким критеријумима (DSM- IV) имају постављену дијагнозу шизофреније, шизоафективног поремећаја или биполарног поремећаја са психотичним карактеристикама. Предвиђено је да студија траје 30 дана, у 6 студијских фаза и исто толико визита ће се извршити узимање узорака крви за лабораторијске анализе, узорака за генотипизацију, као и процена ефикасности и безбедности третмана оланзапином. Циљ рада је да се испита како варијације гена у присуству индуктора могу довести до смањења концентрације оланзапина и последично лошијег клиничког одговора. Клинички одговор биће евалуиран процентом промене BPRS скорa у односу на почетну вредност, а биће процењивана и нежељена дејства. У размазтрање ће бити узет утицај полиморфизма гена: UGT1A4, CYP1A2, FMO3, CYP2D6, као и утицај њихових идуктора: пола (мушки, женски), конзумирања цигарета (пушачи, непушачи), конзумирања кафе (интензивни и неинтензивни конзументи), како би се предложио алгоритам подесне почетне дозе оланзапина.

Циљ истраживања

- A. Истраживачка хипотеза је да варијације гена у присуству индуктора смањују концентрацију оланзапина и последично клинички одговор.



- V. У разматрање ће бити узет утицај полиморфизма гена: UGT1A4, CYP1A2, FMO3, CYP2D6.
- C. Индуктори гена који ће бити праћени: пол (мушки, женски), конзумирање цигарета (пушачи, непушачи), конзумирање кафе.
- D. Предлог алгоритма подесне почетне дозе оланзапина, а који се базира на генетском полиморфизму, полу, конзумирању кафе и пушењу цигарета.

Актуелност истраживања

Лечење схизофрених пацијента, као и пацијената са дијагнозом менталног поремећаја психотичног спектра, измењен је последњих деценија, углавном захваљујући појави нове групе лекова названих атипични, новији или антипсихотици друге генерације. До сада је потврђено да ови лекови имају мање нежељених ефеката него класични антипсихотици (1).

У ову групу се сврстава и оланзапин (Zalasta®) (2, 3, 4), антипсихотик тиенобензодиазепинске структуре, који има специфична фармаколошка својства, нежељене ефекте, дозирање и интеракције са другим лековима. Биохемијске студије су показале да има широк фармаколошки профил, да делује на допаминске (D₁/D₂/D₃/D₄), серотонинске (5-HT_{2A/2C}), мускаринске (посебно M1), хистаминске (H1) и адренергичке (α₁) рецепторе. У клиничким студијама на пацијентима који пате од схизофреније или схизофрениформног поремећаја, оланзапин се показао ефикасним у третману и позитивних и негативних симптома, уз малу инциденцу екстрапирамидалних симптома. Антипсихотични ефекат оланзапина показан је у дозама од 5- 20мг/дан. Око 87% дозе је излучено у урину и фецесу, у оквиру 7 дана од дозирања, уз реналну екскрецију. Фармакокинетику оланзапина карактерише релативно дуг полу- живот (27h, према неким студијама до 31h) и велики волумен дистрибуције (22l/kg) (5).

Оланзапин подлеже екстензивној биотрансформацији у процесима I и II фазе, при чему су примарни метаболички путеви директна глукуронидација и оксидација посредована P450 цитохромом. Главни ензими укључени у метаболизам су: UDP-глукуронозилтрансфераза 1A4 (UGT1A4) (6,7), цитохром P450 1A2 (CYP1A2) (8,9,10), тип 3 монооксигеназног ензима који садржи флавин (FMO3) (11) и нешто мање цитохром P450 2D6 (CYP2D6) (12). Познато је да пушење цигарета индукује CYP1A2, убрзавајући транскрипцију гена везивањем за посебан интраћелијски рецептор (9, 15). Поред тога, полиморфизам -163C>A, који повећава индуцибилност ензима, код пушача значајно корелира са већом ензимском активношћу, а тиме и са мањом плазма концентрацијом оланзапина. Притом, мања концентрација оланзапина у плазми резултује слабијим одговором на лек у смислу побољшања параноидних и депресивних симптома у схизофренији (19). Ипак, само пушење цигарета и полиморфизам -163C>A не могу објаснити велике интериндивидуалне разлике у активности CYP1A2 ензима које се јављају и међу непушачима. Недавно је показано и да интензивно конзумирање кафе (3 и више шоља кафе дневно) индукује CYP1A2 (9), при чему је највероватнији механизам индукције идентичан механизму индукције дуванским димом. Штавише, ефекат полиморфизма -163C>A на индуцибилност ензима кафом идентичан је претходно описаном код пушача (резултати нису публиковани). Међутим, кофеин из кафе такође је супстрат ензима CYP1A2, па је код пацијената леченим оланзапином могућа и компетитивна инхибиција ензима. Притом, механизми индукције ензима UGT1A4 и FMO3, који такође метаболишу оланзапин, највероватније су идентични механизму индукције ензима CYP1A2 (19, 20), па је могуће да пушење цигарета и интензивно конзумирање кафе утичу и на активност UGT1A4 и FMO3 ензима. На основу наведеног, верујемо да навике као што су пушење цигарета и интензивно конзумирање кафе, честе међу пацијентима оболелим од схизофреније, схизоафективног поремећаја или биполарног поремећаја, у зависности од генотипа могу значајно да измене одговор на терапију оланзапином. Овај потенцијално комплексни утицај пушење цигарета и интензивног конзумирања кафе на ефекат оланзапина до сада није био испитиван.



**Предмет и опис истраживања,
задачи, методологија, очекивани резултати:**

Студија ће бити спроведена као проспективна, интервентна, клиничка студија IV фазе по типу серије случајева, при чему ће се стратификација испитаника вршити према добијеним типовима испитаних генотипа, па ће пацијенти који припадају појединачним генотиповима бити међусобне контроле.

Прелиминарна процена величине студијског узорка обављена је према подацима студије Кариља и сарадника (10). Прорачун узорка за т-тест (два независна узорка) претпоставља укупан узорак од 26 испитаника. Обзиром да се испитују укупно 4 гена која учествују у метаболизму оланзапина, укупан узорак је процењен на око 100 испитаника: 50 мушког и 50 женског пола. Предвиђено је пацијенти буду регрутовани на Клиници за психијатрију, Клиничког центра Крагујевац, уколико према истраживачким критеријумима (DSM- IV) (13) имају постављену дијагнозу шизофреније, шизоафективног поремећаја или биполарног поремећаја са психотичним карактеристикама (14). Истовремено ће им бити узети и узорци крви, а генотипизација CYP1A2, UGT1A4, FMO3 и CYP2D6 гена ће се вршити у Институту за фармакологију и токсикологију, Медицинског факултета, Универзитета у Крагујевцу и на Институту за клиничку фармакологију, Универзитетске болнице Каролинска, у Стокхолму, Шведска.

Студија ће се спроводити у складу са принципима Добре клиничке праксе и Хелсиншке декларације, а већ је одобрена од надлежног Етичког комитета Клиничког центра Крагујевац. Учешће у студији ће бити добровољно, а пацијенти ће у студију бити укључивани по добијању њиховог пристанка за учешће у студији, а пошто испуне све прецизиране критеријуме за укључење и ни један искључујући критеријум (тичу се демографских карактеристика испитаника, потврде постављене дијагнозе, искључивања других менталних поремећаја и соматских обољења). На основу претходних студија које су испитивале ефекат пушења и конзумирања кафе на активност ензима CYP1A2, пушачи су дефинисани као они који пуше 2 или више цигарета дневно, а као интензивни конзументи кафе они који пију бар 3 шоље кафе дневно (9, 15).

Протокол ће се спроводити у следећим фазама:

1. Фаза I: Након процене подобности пацијента за укључење, биће прикупљени демографски подаци, као и подаци о пушачким навикама, конзумирању кафе, па ће према добијеним подацима учесници бити подељени у три групе: а) непушачи, умерени конзументи кафе, б) непушачи, интензивни конзументи кафе, ц) пушачи, умерени конзументи кафе. Скрининг процедуре ће укључивати рутинска лабораторијска тестирања, као и психијатријску евалуацију (већ нацедени специфични DSM-IV критеријуми менталних поремећаја, па даља процена скалама: BPRS (Brief Psychiatric Rating Scale), CGI- S (Clinical Global Impressions- Severity), које су скале општег клиничког утиска, као и GAF (Global Assessment of Functioning) скалом процене психолошког, социјалног и радног функционисања). У дијагностичким категоријама шизофреније и шизоафективног поремећаја пацијенти ће бити процењивани PANSS (Positive and Negative Symptoms Scale) и манична епизода биполарног поремећаја ће бити евалуирана YMRS (Young Mania Rating Scale).
2. Фаза II: На следећој визити, обављеној до седам дана по скринингу (дан 1) биће обављено мерење тежине пацијенту, као и рутинска лабораторијска тестирања, па процена психијатријским скалама. Биће процењивани нежељени ефекти примењене терапије (дискинезије, акатизије, ригидитет, тремор, итд.) помоћу: AIMS (Abnormal



Involuntary Movement Scale), BARS (the Barnes Akathisia Rating Scale), SAS (Simpson Angus Scale). Пацијентима се у терапију уводи 10мг оланзапина дневно (према British National Formulary).

3. Фаза III: Током овог периода (2-14 дана), партиципанти ће примати перорално 10мг олазапина.
4. Фаза IV: На овој визити (дан 15) ће се процењивати први клинички ефекти наведеним скалама психијатријске процене, као и могући нежељени ефекти терапије проценом наведеним специфичним скалама, уз могућност прилагођавања дозе лека. Узорак за генотипизацију у виду 10 мл пуне крви биће узет од сваког испитаника у вакуум-епрувету са EDTA и чуван на -20°C до анализе. Генотипизација појединачног нуклеотидног полиморфизма -163C>A (*CYP1A2*1F*) биће изведена коришћењем PCR-RFLP методе. Према утврђеним генотиповима, учесници ће бити распоређивани у следеће групе: а) *CYP1A2*1A/*1A*, б) *CYP1A2*1A/*1F*, с) *CYP1A2*1F/*1F*. Генотипизација за појединачни нуклеотидни полиморфизам *UGT1A4*, *FMO3* и *CYP2D6* ће бити изведена помоћу AS-PCR, PCR-RFLP или TaqMan анализе.
5. Фаза V: Током овог периода (16- 29 дан), испитаници ће примати редовно прилагођену дневну дозу оланзапина, биће процењивани већ наведеним психијатријским скалама и скалама за процену нежељених дјестава.
6. Фаза VI: Састоји се из једне визите, која ће бити обављена 30. дана студије. Контролни узорак крви за генотипизацију од 10 мЛ биће узет од сваког испитаника у вакуум-епрувету са EDTA и чуван на -20°C до анализе. Процењивање клиничких ефеката терапије, као и евентуалних нежељених дјестава терапије биће процењивано као у фази 4.

Током извођења студије биће надзирано узимање лека, уз праћење количина попијене кафе и попушених цигарета, као и давање инструкција о пријави евентуалних нежељених дјестава.

Основни статистички модели ће бити анализа варијансе и корелација, којима ће се испитати симултани утицај независних категоријалних фактора, појединачно на промену BPRS скорa (током визита) и у међусобној интеракцији и то: *UGT1A4*, *CYP1A2*, *FMO3*, *CYP2D6*, пол, кафа, пушење. (16,17,18).

Резултати студије ће установити утицај појединих генотипова цитохрома P450 (*CYP*) на варијације клиничког одговора болесника са менталним поремећајима који примају овај лек. Симултана анализа више варијабли од интереса као што су пол, пушење дувана, конзумирање кафе, ће омогућити градацију испитиваних варијабли према магнитуди и значајности утицаја на праћене лабораторијске и клиничке исходе.

Значај истраживања

Значајан део болесника који се лече психофармацима нема очекивани, задовољавајући терапијски одговор, што може захтевати комплексан мултидисциплинарни приступ и увођење све агресивнијих терапијских третмана. Један од разлога изостанка терапијског одговора може да буде и разлика у брзини метаболисања, због генетичких варијација ензима биотрансформације лека. Познавање тачног генотипа код датог пацијента би могло да омогући индивидуализацију дозног протокола у циљу остваривања оптималних, терапијских концентрација у крви и последично у циљном ткиву. Сазнања добијена током ове студије би такође могла да имају и ширу примену у смислу оптимизовања хигијенско-дијететског режима као и осмишљавање комплекснијих стратегија у индивидуализацији одн. оптимизацији терапије, као што су клинички алгоритми подржани одговарајућим информатичким технологијама.



Временски оквир

Процена је да ће се са извођењем студије почети крајем текуће 2009. године, односно почетком 2010. године. Трајање студије се процењује најмање на годину дана, све док се не регрутује предвиђени број пацијената.

Литература

1. Prior TI, Baker GB. Interactions between the cytochrome P450 system and the second-generation antipsychotics. *J Psychiatry Neurosci.* 2003 Mar;28(2):99-112.
2. EUROPEAN PUBLIC ASSESSMENT REPORT (EPAR) ZALASTA EPAR summary for the public www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/zalasta/H-792-en1.pdf
3. Zyprexa (Olanzapine) drug description; San Clemente, RxList Inc; c2008, p about 7 screens.
4. Sweetman S (ed) Martindale: The complete drug reference London, Pharmaceutical Press, 2005.
5. Kassahun K, Mattiuz E, Nyhart E, Jr., et al. Disposition and biotransformation of the antipsychotic agent olanzapine in humans. *Drug Metab Dispos* 1997;25:81-93.
6. Linnert K. Glucuronidation of olanzapine by cDNA-expressed human UDP-glucuronosyltransferases and human liver microsomes. *Hum Psychopharmacol* 2002;17:233-8.
7. Tukey RH, Strassburg CP. Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:581-616.
8. Shirley KL, Hon YY, Penzak SR, et al. Correlation of cytochrome P450 (CYP) 1A2 activity using caffeine phenotyping and olanzapine disposition in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2003;28:961-6.
9. Djordjevic N, Ghotbi R, Bertilsson L, Jankovic S, Aklillu E. Induction of CYP1A2 by heavy coffee consumption in Serbs and Swedes. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008 Apr;64(4):381-5. Epub 2007 Dec 22.
10. Carrillo J, Herráiz A, Ramos S, et al. Role of the smoking-induced cytochrome P450 (CYP)1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 2003;23:119-27.
11. Hisamuddin IM, Yang VW. Genetic polymorphisms of human flavin-containing monooxygenase 3: implications for drug metabolism and clinical perspectives. *Pharmacogenomics.* 2007 Jun;8(6):635-43.
12. Zanger UM, Raimundo S, Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004 Jan;369(1):23-37. Epub 2003 Nov 15.
13. American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fourth Edition, Washington, DC, American Psychiatric Association, 1994.
14. Baldessarini R, Tarazi F. Pharmacotherapy of psychosis and mania.; in Brunton L (ed): Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 2006, pp 93-115.
15. Ghotbi R, Christensen M, Roh HK, Ingelman-Sundberg M, Aklillu E, Bertilsson L. Comparisons of CYP1A2 genetic polymorphisms, enzyme activity and the genotype-phenotype relationship in Swedes and Koreans. *Eur J Clin Pharmacol* 2007; 63 (6):537-546
16. Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behavior Research Methods*, 39, 175-191.
17. Lehmann EL. Comparison with Student's t-test. In: Lehman EL, ed. *Nonparametrics: Statistical Methods Based on Ranks.* New Jersey: Prentice Hall, 1998: 76-80.
18. Carrillo JA, Herráiz AG, Ramos SI, Gervasini G, Vizcaino S, Benítez J. Role of the Smoking-Induced Cytochrome P450 (CYP)1A2 and Polymorphic CYP2D6 in Steady-State Concentration of Olanzapine. *J Clin Psychopharmacol* 2003;23: 119-127.



19. Laika B, Leucht S, Heres S, Schneider H, Steimer W. Pharmacogenetics and olanzapine treatment: CYP1A2*1F and serotonergic polymorphisms influence therapeutic outcome. *Pharmacogenomics J* 2009; 1-10.
20. Erichsen TJ, Ehmer U, Kalthoff S, Lankisch TO, Muller TM, Munzel PA, Manns MP, Strassburg CP. Genetic variability of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated regulation of the human UDP glucuronosyltransferase (UGT) 1A4 gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 230: 252-60.
21. Chung WG, Kang JH, Park CS, Cho MH, Cha YN. Effect of age and smoking on in vivo CYP1A2, flavin-containing monooxygenase, and xanthine oxidase activities in Koreans: determination by caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 200; 67: 258-66.

Руководилац пројекта:

проф. др Славица Ђукић Дејановић

Главни истраживач:

проф. др Славица Ђукић Дејановић

Ангажовани истраживачи:

Проф. др Драган Миловановић

Доц. др Наташа Ђорђевић

Др Милица Боровчанин, сарадник у настави