

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARJETA BIZJAN (FERLIN)

**VPLIV GENETSKIH POLIMORFIZMOV UDP-GLUKURONOSILTRANSFERAZ NA
FARMAKOKINETIKO HALOPERIDOLA IN EKSTRAPIRAMIDNE SIMPTOME PRI
BOLNIKI S SHIZOFRENIJO**

**INFLUENCE OF GENETIC POLYMORPHISMS OF UDP-
GLUCURONOSYLTRANSFERASES ON PHARMACOKINETICS OF HALOPERIDOL AND
EXTRAPYRAMIDAL SYMPTOMS IN SCHIZOPHRENIA PATIENTS**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom **izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.** Klinični del je bil opravljen v sklopu doktorske disertacije Marije Bošković Ribarski z naslovom: Vloga vitamina E in omega-3 polinenasičenih maščobnih kislin pri omejevanju oksidativnih poškodb pri zdravljenju shizofrenije s haloperidolom. Raziskavo je odobrila Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko (147/05/08). Plazemske koncentracije haloperidola in njegovih metabolitov so bile določene na Katedri za biofarmacijo Fakultete za farmacijo, genotipizacija pa je bila opravljena v Laboratoriju za farmakogenetiko Inštituta za biokemijo pri Medicinski fakulteti v Ljubljani.

Za strokovno svetovanje, vodstvo in potrpežljivost pri izdelavi magistrskega dela se zahvaljujem izr. prof. dr. Iztoku Grabnarju. Rada bi se zahvalila tudi svoji družini za vso podporo in spodbudo tekom študija ter vsem ostalim, ki ste kakorkoli pripomogli k nastanku moje magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Iztoka Grabnarja, mag. farm.

Marjeta Bizjan

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

KAZALO

KAZALO	iii
KAZALO PREGLEDNIC.....	iv
KAZALO SLIK.....	v
POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
KLJUČNE BESEDE	viii
ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV.....	viii
1. UVOD	1
1.1. Shizofrenija	1
1.1.1. Simptomi	1
1.1.2. Prognoza.....	1
1.1.3. Etiologija bolezni.....	2
1.1.3.1. Dopaminska hipoteza	2
1.1.3.2. Glutamatna hipoteza.....	2
1.1.3.3. Serotoninska hipoteza.....	3
1.2. Antipsihotiki.....	4
1.2.1. Neželeni učinki antipsihotikov	4
1.3. Haloperidol.....	6
1.3.1. Metabolizem haloperidola	6
1.3.1.1. Redukcija.....	6
1.3.1.2. N-dealkilacija	7
1.3.1.3. Oksidacija do piridinijevih metabolitov	8
1.3.1.4. Glukuronidacija.....	8
1.3.2. Intrinzični jetrni očistek.....	9
1.3.3. Terapevtsko območje haloperidola.....	9
1.4. Farmakokinetika in farmakogenetika haloperidola	11
1.4.1. Farmakokinetika	11
1.4.2. Farmakogenetika	12
1.4.3. Vpliv na presnovne encime haloperidola	13
1.5. Neželeni učinki in metabolizem haloperidola	18
2. NAMEN DELA.....	19
3. MATERIALI IN METODEDE	20
3.1. Materiali	20
3.2. Metode.....	20
3.2.1. Klinična ocena.....	20

3.2.2.	Merjenje koncentracij analitov	20
3.2.3.	Genotipizacija.....	21
3.2.4.	Statistična analiza	21
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	23
4.1.	Opisna statistika: frekvence alelov, genotipov in fenotipov pri bolnikih s shizofrenijo	23
4.1.1.	UGT1A4.....	23
4.1.2.	UGT2B7.....	23
4.2.	Vpliv obravnavanih polimorfizmov na metabolizem haloperidola	25
4.2.1.	CYP3A4	26
4.2.2.	MDR1 protein.....	26
4.2.3.	CYP2D6	27
4.2.4.	UGT1A4.....	28
4.2.5.	UGT2B7.....	29
4.3.	Vpliv uporabe najpogosteje sočasno predpisanih zdravil in kajenja na metabolizem haloperidola.....	32
4.4.	Vpliv močnih induktorjev CYP3A4 in inhibitorjev CYP2D6 na metabolizem haloperidola	35
4.5.	Povezava med preučevanimi polimorfizmi in ocenami psihopatoloških lestvic.....	37
4.6.	Povezava med kajenjem in ocenami psihopatoloških lestvic	40
4.7.	Multipli linearni regresijski modeli	41
5.	SKLEP.....	43
6.	LITERATURA.....	46

KAZALO PREGLEDNIC

Tabela I:	Pogosti neželeni učinki tipičnih antipsihotikov (1, 5)	5
Tabela II:	Intrinzični očistki posameznih metabolnih poti (14).....	9
Tabela III:	Farmakokinetični parametri haloperidola in haloperidol dekanota (13, 14, 25, 26, 28) ..	11
Tabela IV:	Zaviralni učinek haloperidola in njegovih metabolitov na izoencim CYP2D6 (16).....	13
Tabela V:	Demografski in klinični podatki pacientov.....	23
Tabela VI:	Predstavitev genotipov, fenotipov in njihovih frekvenc.	24
Tabela VII:	Vpliv določenih polimorfizmov na z odmerkom normirane koncentracije HAL, HAL-G, MET1 in MET2.....	25
Tabela VIII:	Vpliv določenih polimorfizmov na razmerja koncentracij MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL in MET1/MET2.	26
Tabela IX:	Vpliv sočasne uporabe nekaterih zdravil in kajenja na z odmerkom normirane koncentracije HAL, HAL-G, MET1 in MET2.....	32

Tabela X: Vpliv sočasne uporabe nekaterih zdravil in kajenja na metabolična razmerja MET2/HAL, HAL-G/HAL MET1/HAL in MET1/MET2.	33
Tabela XI: Vpliv sočasne uporabe močnih induktorjev CYP3A4 in močnih inhibitorjev CYP2D6 na z odmerkom normirane plazemske koncentracije HAL in njegovih glavnih metabolitov ter metabolična razmerja MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL in MET1/MET2.....	35
Tabela XII: Vpliv polimorfizmov UGT na psihopatološke ocene bolnikov s shizofrenijo.	37
Tabela XIII: Vpliv polimorfizmov CYP2D6, CYP3A4 in MDR1 na psihopatološke ocene bolnikov s shizofrenijo.....	38
Tabela XIV: Povezava med kajenjem in ocenami psihopatoloških lestvic.....	40
Tabela XV: Koeficienti modelov linearne regresije.....	41

KAZALO SLIK

Slika 1: Presnovne poti haloperidola.	7
Slika 2: Odras plazemskih koncentracij učinkovine na fenotip izoencima CYP2D6.	14
Slika 3: Koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) in metabolično razmerje (Met2/Hal) glede na fenotip CYP2D6.....	28
Slika 4: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) glede na prisotnost polimorfizma UGT1A4 70C>A. .	28
Slika 5: Kvantilni diagram z odmerkom haloperidola normirane koncentracije HAL-G (HalG_D) v odvisnosti od genotipa UGT1A4 70C>A.	29
Slika 6: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 372A>G. 30	
Slika 7: Metabolično razmerje Met2/Hal glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 372A>G.	30
Slika 8: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in metabolično razmerje HAL-G z HAL (HalG/Hal) glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 -161T>C.	31
Slika 9: Grafični prikaz razlik prisotnosti negativnih (levo) in globalnih (desno) simptomov shizofrenije v odvisnosti od prisotnosti polimorfizma UGT1A4 70C>A.	39

POVZETEK

Shizofrenija je močno genetsko pogojena bolezen, katere vzrok še ni dokončno razvozan. Zdravimo jo z antipsihotiki, ki uravnavajo kemična neravnovesja v možganih. Haloperidol spada med klasične antipsihotike. Deluje tako, da se veže na D₂ dopaminske receptorje. Njegova molekula je lipofilna, zato se obsežno presnavlja v jetrih. Reducirani haloperidol lahko prehaja nazaj v prvotno obliko, a se v večji meri presnavlja po podobnih poteh kot haloperidol.

Cilj naše raziskave je opredeliti vpliv polimorfizmov v genih za encime, ki so odgovorni za glukuronidacijo haloperidola, na plazemsko koncentracijo haloperidola in njegovih metabolitov ter pojav ekstrapiramidnih simptomov. Podatke za analizo smo pridobili iz doktorske disertacije Marije Bošković Ribarski z naslovom: Vloga vitamina E in omega-3 polinenasičenih maščobnih kislin pri omejevanju oksidativnih poškodb pri zdravljenju shizofrenije s haloperidolom. Za širši pregled smo poleg polimorfizmov UGT1A4 70C>A in UGT2B7 -161T>C ter 372A>G, v statistično obdelavo vključili tudi podatke o polimorfizmih CYP3A4 -392A>G, MDR1 C3435T in G2677T/A ter fenotipu CYP2D6. Dodatno smo preverili vpliv sočasno uporabljenih zdravil, močnih induktorjev CYP3A4, močnih inhibitorjev CYP2D6 in kajenja.

Za vse podatke smo izračunali aritmetično sredino, standardno deviacijo in enofaktorsko analizo variance. Pojav psiholoških simptomov glede na prisotnost polimorfizmov in kajenja smo opredelili z mediano in uporabo neparametričnega Kruskal-Wallisovega testa, za ocenjevanje prisotnosti ekstrapiramidnih simptomov pa χ^2 test. Mejo signifikance smo postavili na $p < 0,05$. Nazadnje smo za vse izmerjene analite oblikovali multipli linearni regresijski model.

Bolniki s polimorfizmom UGT1A4 70C>A so imeli značilno višje koncentracije haloperidola in reduciranega haloperidola. Prisotnost polimorfizma UGT2B7 372A>G je vplivala na koncentracije haloperidola, reduciranega haloperidola in njuno metabolično razmerje, -161T>C pa na koncentracije haloperidola in metabolično razmerje glukoronidiranega haloperidola s haloperidolom. Pri pregledu vplivov na psihopatološke lestvice smo ugotovili značilen vpliv polimorfizma UGT1A4 70C>A na pojav negativnih simptomov pri bolnikih s shizofrenijo. Poleg tega je imel ta polimorfizem močno, a neznačilno povezavo tudi s slabšimi rezultati na lestvici za splošno oceno bolnikovega stanja (GAF) ($p = 0,050$).

Pri oblikovanju multiplega linearnega regresijskega modela smo ugotovili, da koncentracije haloperidola najbolj napove fenotip CYP2D6 ter prisotnost polimorfizmov UGT1A4 70C>A in UGT2B7 372A>G. Koncentracije reduciranega haloperidola pa fenotip encima CYP2D6.

Ugotavljamo, da je vpliv polimorfizmov UGT na metabolizem haloperidola lahko pomemben, zato spodbujamo raziskave v tej smeri.

ABSTRACT

Schizophrenia is a mainly genetically conditioned disease, the cause of which is not yet completely clarified. It can be treated with antipsychotic drugs that regulate chemical imbalances in the brain. Haloperidol is one of the classical antipsychotics. It works by binding to D₂ dopamine receptors. Haloperidol has a lipophilic molecule, therefore it is extensively metabolized in the liver. Reduced haloperidol can go back to its original shape, but mostly it is metabolized through similar pathways as haloperidol.

The aim of our study was to evaluate the influence of polymorphisms in the genes of the enzymes responsible for glucuronidation of haloperidol on plasma levels of haloperidol and its metabolites as well as the occurrence of extrapyramidal symptoms. The data for the analysis were obtained from the doctoral dissertation Marije Bošković Ribarski entitled: The Role of Vitamin E and omega-3 polyunsaturated fatty acids in reducing oxidative damage in schizophrenia treated with haloperidol. For a wider overview in addition to UGT1A4 70C>A, UGT2B7 -161T>C and 372A>G polymorphisms, the statistical analysis also included data on CYP3A4 -392A>G, MDR1 C3435T, and G2677T/A polymorphisms and CYP2D6 phenotype. The next step in our study was to check the influence of co-administered drugs, strong inducers of CYP3A4, strong inhibitors of CYP2D6 and smoking on haloperidol metabolism.

Results were expressed as the arithmetic mean, standard deviation and one-way analysis of variance. The occurrence of psychological symptoms and smoking have been defined by the median and the non-parametric Kruskal-Wallis test. For assessing the presence of extrapyramidal symptoms, the χ^2 test was used. The limit of significance was set at $p < 0.05$. In the end, we formed a multiple linear regression model for each analyte.

Patients with polymorphism UGT1A4 70C>A, had significantly higher concentrations of haloperidol and reduced haloperidol. The presence of polymorphism UGT2B7 372A>G had an impact on the haloperidol, reduced haloperidol concentrations, and their metabolic rate. SNP -161T>C had a significant effect on the concentration of haloperidol and haloperidol glucuronide/haloperidol ratio. Moreover, we found a significant statistical correlation between polymorphism UGT1A4 70C>A and the occurrence of the negative symptoms of the schizophrenic patients. Strong but non-significant link, with poorer results on the scale of Global Assessment of Functioning (GAF) ($p = 0.050$), was also observed.

The results of the multiple linear regression model showed that the concentration of haloperidol is best predicted by the phenotype of CYP2D6, the presence of polymorphism UGT1A4 70C>A and UGT2B7 372A> G. The concentrations of reduced haloperidol is best predicted by the phenotype of CYP2D6.

We conclude that the impact of the UGT polymorphism may be important for the metabolism of haloperidol, and we encourage all further research in this direction.

KLJUČNE BESEDE

shizofrenija, zdravila, haloperidol, metabolizem, genetski polimorfizem, ekstrapiramidni simptomi

Schizophrenia, Medicines, Haloperidol, Metabolism, Genetic polymorphism, Extrapyramidal symptoms

ABECEDNI SEZNAM OKRAJŠAV

5-HT _{2A}	serotoninski receptor 2A
AIMS	lestvica abnormalnih nehotenih gibov (angl. Abnormal Involuntary Movement Scale)
adrenergični α 1	adrenergični receptor alfa 1
ANOVA	analiza variance
ATP	adenozin trifosfat
ABCB1	aktivna membranska črpalka: ATP-vezavna kasetna, poddružina B, član 1 (angl. ATP-binding cassette sub-family B member 1)
BARS	Barnesova lestvica za oceno akatizije (angl. Barnes Akathisia Rating Scale)
CR	karbonilna reduktaza
CYP	citokrom P450
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSM-IV	Diagnostični in statistični priročnik duševnih motenj (DSM), zadnja izdaja l. 1994 (IV) (angl. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders), priročnik za pomoč pri klasifikaciji
EM	hitri presnavljalci (angl. extensive metabolizers)
EPS	ekstrapiramidni simptomi
F	biološka uporabnost
GABA nevroni	Nevroni, ki se aktivirajo ob prisotnosti nevrotitraterja gama-aminomaslene kisline (angl. gamma-aminobutyric acid).
GAF	Lestvica za splošno oceno bolnikovega stanja (angl. Global Assessment of Functioning)
NMDA	N-metil-D-aspartat
H1 receptor	histaminski receptor H1
HAL	haloperidol
HAL-G	haloperidol-glukuronid
HPP ⁺	4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-oksobutilpiperidinijev ion

IM	srednje hitri presnavljalci (angl. intermediate metabolizers)
Im	intramuskularna aplikacija
Im dekanooat	intramuskularna aplikacija predzdravila (haloperidol dekanooat) v oljnem mediju (podaljšano sproščanje)
Iv	intravenska aplikacija
mACh receptorji	muskarinski acetilholinski receptorji
MDR1	Prenašalec MDR1 (angl. multidrug resistant protein 1)
MET1	4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin, metabolit 1
MET2	reduciran haloperidol, metabolit 2
mRNK	informacijska (angl. messenger) ribonukleinska kislina
PANSS	Lestvica za ocenjevanje pozitivnih in negativnih simptomov (angl. Positive And Negative Symptoms Scale)
PANSSG	del PANSS lestvice o splošnem stanju bolnika (angl. General sub-scale)
PANSSN	del PANSS lestvice o negativnih simptomih (angl. Negative sub-scale)
PANSSP	del PANSS lestvice o pozitivnih simptomih (angl. Positive sub-scale)
PANSST	celoten rezultat dosežen na PANSS lestvici (angl. PANSS total score)
PerOs	peroralna aplikacija
PM	počasni presnavljalci (angl. poor metabolizers)
P-gp	P-glikoprotein (protein, ki ga kodira ABCB1 gen)
R-HPP ⁺	4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-hidroksibutylpiperidinijev ion
RT-PCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času (angl. real time polymerase chain reaction)
SAS	Simpson-Angus lestvica za ocenjevanje ekstrapiramidnih simptomov (angl. Simpson-Angus Scale)
SD	standardni odklon
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. Single-nucleotide polymorphism)
t _{1/2}	biološka razpolovna doba učinkovine
TDM	terapevtsko spremljanje koncentracije zdravil (angl. Therapeutic Drug Monitoring)
t _{max}	čas do maksimalne plazemske koncentracije
UDPGA	uridin difosfat glukuronska kislina
UGT	UDP-glukuronoziltransferaza, uridin-difosfat-glukuroniltransferaza

UHPLC-MS	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti, sklopljena z masnim spektrometrom (angl. Ultra High Performance Liquid Chromatography – Mass Spectrometry)
UM	ultra hitri presnavljalci (ang. ultra rapid metabolizers)
V_z	navidezni volumen porazdelitve
χ^2 test	test hi kvadrat

1. UVOD

1.1. Shizofrenija

Shizofrenija je močno genetsko pogojena duševna bolezen, ki prizadene kar 1 % populacije (1–3, 5–7). Je eden večjih javno zdravstvenih problemov, saj prizadene mlade ljudi, poteka kronično in ima velik vpliv na življenje bolnikov (7). Njeno ime (grško: »*skhizein*« - razcepiti, razdeliti, »*phren*« - duša, um) izvira iz zgodnjega opazovanja bolnikov, za katere so takrat mislili, da je značilen »odklop« oziroma »cepitev« psihičnih funkcij (1, 4). Najpogosteje poteka v epizodah, ki so sestavljene iz akutne faze in faze stabilizacije. Izrazitost in pestrost simptomov v različnih fazah variirajo od bolnika do bolnika (5, 6).

1.1.1. Simptomi

Simptome delimo na pozitivne, negativne, kognitivne in afektivne (3).

- **Pozitivni simptomi** so najhitreje prepoznavni in so lahko zelo dramatični (3). Mednje uvrščamo blodnje, halucinacije, motnje mišljenja, simptome dezorganizacije in katatone simptome (psihomotorične motnje) (1–3, 6). Bolnik običajno sliši glasove, ki ga kritizirajo ali zlorabljajo. Namenjeni so lahko neposredno njemu ali drugim bolnikom in se pogosto nanašajo na določeno temo (grožnje, zarota, verska, spolna tematika). V njih iščejo smisel, kar jih pripelje do razvoja nenavadnih prepričanj ali zablod (1, 2).
- **Negativne simptome** delimo na primarne in sekundarne. Primarni so posledica bolezni, sekundarni pa pozitivnih, ekstrapiramidnih simptomov, depresije in osiromašenja socialnega življenja. Najpogostejši so čustvena odmaknjenost, nezmožnost občutiti zadovoljstvo (anhedonija), obubožan govor (alogija), socialni umik (avtizem), brezvoljnost in apatija (1, 3).
- **Kognitivni simptomi** so večinoma motnje spomina, koncentracije in izvršilnih funkcij ter se pogosto prepletajo z negativni simptomi (3).
- **Afektivni simptomi** so zelo moteči in močno znižujejo kvaliteto življenja. Mednje štejemo občutek brezupa, splošno nelagodje ali nemir (disforija), napetost, zaskrbljenost, razdražljivost in depresijo. So pogosti, a manj izraziti kot pri anksioznih motnjah. Pri bolnikih povečujejo možnost za samomor (3, 7).

1.1.2. Prognoza

Boljšo prognozo napovedujemo ženskam (so bolj socialno aktivne) (1, 5), pacientom, pri katerih so zdravljenje začeli že pri pojavu prvih neznačilnih simptomov ali so imeli akuten začetek bolezni (1, 5,

6), poročenim, poklicno uspešnim, tistim z dobrimi socialnimi stiki, stresnimi dogodki ob pojavu bolezni, psihotičnimi simptomi, dobrim odzivom na zdravljenje in tistim, ki redno jemljejo predpisana zdravila (5). Slabšo prognozo imajo bolniki, pri katerih se bolezen začne počasi in zato do zdravljenja preteče več časa. Ter tisti, ki se težje prilagajajo, slabo delujejo v službi, imajo več negativnih simptomov, so agresivni, če bolezen poteka kronično; tudi če ima bolnik slab socialni status, je samski, starejši, ima pomanjkanje podpore v družini, komorbidne duševne motnje, zlorablja psihoaktivne substance ali prekinja jemanje zdravil (1, 5).

Več kot 80 % vseh obolelih si po prvi epizodi opomore, vendar le 20 % od teh nima več nobene ponovitve (1). Najpogosteje se epizode pojavljajo celo življenje, redkeje imajo bolniki le nekaj zagonov, po katerih dobro okrevajo (1, 6).

1.1.3. Etiologija bolezni

Vzrok za pojav shizofrenije ni v celoti razvozan. Delno je pogojen z genetsko predispozicijo in delno z okoljskimi faktorji. Pomembno vlogo igra zvišana raven dopamina in neravnovesje nekaterih drugih živčnih prenašalcev (glutamata, serotonina) v možganih (1, 2, 7). O možnem izvoru teh neravnovesij se je razvilo več hipotez. Analitiki domnevajo, da bi shizofrenija lahko bila posledica motenj v fetalnem razvoju možganov, ki se pokaže šele v adolescenci (nevrorazvojna hipoteza), ali posledica izgube nevronskih funkcij, do katere pride zaradi z glutamatom povzročene ekscitotoksičnosti (nevrodegenerativna hipoteza) (5, 7).

1.1.3.1. Dopaminska hipoteza

Dokazano je, da imajo bolniki s psihozo povečano dopaminsko dejavnost v mezolimbicni poti. Ta povzroča večjo aktivacijo D₂ dopaminskih receptorjev, kar se navzven kaže kot pozitivni simptomi. Negativni in kognitivni simptomi so posledica pomanjkanja dopamina v mezokortikalni poti, kjer prevladujejo D₁ dopaminski receptorji. Druge dopaminske poti (nigrostriatna, tuberoinfundibularna) delujejo normalno, lahko pa se njihovo ravnovesje poruši med zdravljenjem. Antipsihotiki nespecifično zasedajo vezavna mesta na dopaminiergičnih receptorjih, kar povzroča določene neželene učinke. Pomanjkanje dopamina v nigrostriatni poti povzroči motnje gibanja, presežek pa hiperkinetične motnje: diskinezijo (motnja hotenih in prisotnost nehotenih gibov), horejo (sunkoviti nekoordinirani zgibki telesa, grimasiranje) in tike. Pomanjkanje aktivnosti dopamina v tuberohipofizni poti pa zavira sproščanje prolaktina iz hipofize, kar povzroča hormonska neravnovesja (1, 2, 5, 7).

1.1.3.2. Glutamatna hipoteza

Druga možnost je, da je vzrok za dopaminska neravnovesja spremenjena učinkovitost glutamata, ki nastane zaradi zmanjšane funkcije glutamatnega NMDA receptorja in se navzven kaže kot pozitivni in negativni simptomi. Glutamatergični in GABA nevroni igrajo zapleteno funkcijo v kontroli aktivnosti

mezokortikalne in mezolimbicne dopaminergične poti. Hipofunkcija NMDA receptorjev zmanjša delovanje dopaminergičnih nevronov v mezokortikalni poti, kar povzroči nižje koncentracije dopamina v prefrontalem korteksu in izražanje negativnih simptomov. V mezolimbicni poti pa sproži večjo aktivnost dopamina, ki se izraža s pozitivnimi simptomi (7).

1.1.3.3. Serotoninska hipoteza

Serotonin je živčni prenašalec, ki nadzoruje spomin, zaznavanje, razpoloženje, agresijo, spolni nagon, spanje, endokrine funkcije in raven energije posameznika (5). Novejši atipični antipsihotiki v večjem obsegu blokirajo tudi 5-HT_{2A} receptorje (5-hidroksitriptamin 2A, serotoninski receptor 2A), za katere še ne vemo, ali imajo dejansko vlogo pri nastanku bolezni, ali njihova inhibicija le uspešno preprečuje nekatere hujše neželene stranske učinke (8, 9).

1.2. Antipsihotiki

So skupina več kot 30 zdravil, s katerimi uravnavamo kemična neravnovesja v možganih. Najdemo jih tudi pod imenom nevroleptiki ali antishizofreniki. Namenjena so zdravljenju različnih psihotičnih motenj; poleg shizofrenije tudi manije, bipolarni motnje, depresije idr. Delimo jih na 1. generacijo, tipične, klasične oz. konvencionalne antipsihotike (npr. klorpromazin, haloperidol, flufenazin, flupentiksol, klopiantiksol ...) in 2. generacijo oz. atipične antipsihotike (npr. klopazin, risperidon, sertindol, kvetiapin, ziprazidone ...) (7).

Klasični antipsihotiki delujejo kot antagonisti D_2 dopaminskih receptorjev v možganih (vežejo se na receptor, ki ni dejaven, ko je zaseden). Zmanjšajo prekomerno dejavnost mezolimbicne poti, kar izboljša pozitivne simptome. Njihova slabost je, da neselektivno zavirajo tudi mezokortikalno dopaminsko pot, ki pa je pri shizofreniji v pomanjkanju dopamina, zaradi česar se negativni in kognitivni simptomi lahko poslabšajo. V manjši meri se vežejo tudi na serotoninske receptorje 2A, kar pomaga izboljšati negativne simptome (7).

Antipsihotiki druge generacije, poleg D_2 dopaminskih receptorjev, v večjem obsegu zavirajo tudi serotoninske receptorje 2A. Sproščanje dopamina znižajo tudi v nigrostriatni poti in omilijo ekstrapiramidne stranske učinke ter delno izboljšajo negativne simptome. Pomemben predstavnik druge generacije je klopazin. Z njim zdravimo bolnike s slabšim odzivom pri uporabi drugih antipsihotikov. Deluje kot manj selektivni zaviralec dopaminskih receptorjev (5, 7, 9).

Vsi antipsihotiki pa poleg D_2 in serotoninskih receptorjev 2A v manjši meri inhibirajo tudi nekatere druge možganske receptorje (mACh, adrenergične α_1 in histaminske H1), kar povzroča določene neželene učinke (5, 7). Soinhibicija mACh in serotoninskih receptorjev 2A zmanjša resnost ekstrapiramidnih stranskih učinkov. Da dosežemo terapevtski učinek, potrebujemo okoli 80 % zasedenost D_2 receptorjev (7).

1.2.1. Neželeni učinki antipsihotikov

Pri uporabi antipsihotikov se pojavljajo bolj in manj resni neželeni učinki (Tabela I). Največja slabost prve generacije so ekstrapiramidni simptomi (EPS), med katere uvrščamo akatizijo (občutek nemira v mišicah), psevdoparkinsonizem (simptomi parkinsonizma, povzročeni z zdravili), akutno distonijo (neželeni gibi vratnih mišic, ki jih pogosto spremljajo tudi simptomi Parkinsonove bolezni) in tardivno diskinezijo (neželeni gibi obraza in jezika, občasno tudi trupa in okončin). Slednji nastanejo direktno ali indirektno zaradi blokade D_2 receptorjev v nigrostriatni poti. Tardivna diskinezija se razvije po dolgotrajni uporabi (več mesecih ali letih) klasičnih antipsihotikov pri 20–40 % bolnikov, večkrat pri prejemnikih višjih odmerkov in starejših. Največji problem je njena ireverzibilnost, saj se kljub prenehanju zdravljenja stanje lahko še poslabša. Akutna distonija se praviloma pojavi v prvih tednih terapije in je reverzibilna (7, 10, 11).

Druga večja težava pri uporabi antipsihotikov je blokada D₂ receptorjev v tuberohipofizni poti, kjer vezava dopamina preprečuje sekrecijo prolaktina. Njegova raven se poveča in lahko, tako pri ženskah kot pri moških, povzroči ginkomastijo (otekanje prsi), bolečino v prsih in laktacijo. Poročali so tudi o zmanjšani sekreciji ravnega hormona, a je to klinično manj pomembno. Med blažje neželene učinke štejemo tudi sedacijo in zaspanost, ki pa se z dolgotrajno uporabo zmanjšujeta (7).

Pri uporabi antipsihotikov lahko pride do različnih preobčutljivostnih reakcij: zlatenice (pri kloropromazinu), levkopenije, agranulocitoze (redko reverzibilno stanje s potencialno smrtnimi posledicami, pogosteje pri klopazinu), blagih kožnih izpuščajev, hipersenzitivnosti na UV svetlobo in redko antipsihotičnega malignega sindroma (mišične otopenosti z visoko vročino in zmedenostjo) (7).

Tabela I: Pogosti neželeni učinki tipičnih antipsihotikov (1, 5).

Neželeni učinki tipičnih antipsihotikov	<ul style="list-style-type: none">• sedacija• hiperprolaktinemija• ginkomastija• galaktoreja• ortostatska hipotenzija, hipertenzija• antiholinergični učinki (zamegljen vid, suha usta, zastoj seča v telesu)• povečanje telesne mase• spolna disfunkcija (lahko vpliva tudi psihoza), motnje menstruacije• kardiotsičnost, aritmije – podaljšan QTc interval• ekstrapiramidni učinki: distonija, psevdoparkinsonizem, akatizija, tardivna diskinezija
--	---

1.3. Haloperidol

Haloperidol (HAL) je klasični antipsihotik, ki spada med butirofenone. Najpogosteje ga predpisujemo za zdravljenje shizofrenije in drugih psihotičnih motenj. Deluje v možganih, kjer neselektivno zavira postsinaptične dopaminergične D₂ receptorje, v manjši meri pa tudi α_1 , D₁ in serotoninске 2A receptorje. Uporablja se kot merilo delovanja in učinkovitosti drugih antipsihotikov (7, 12, 13).

1.3.1. Metabolizem haloperidola

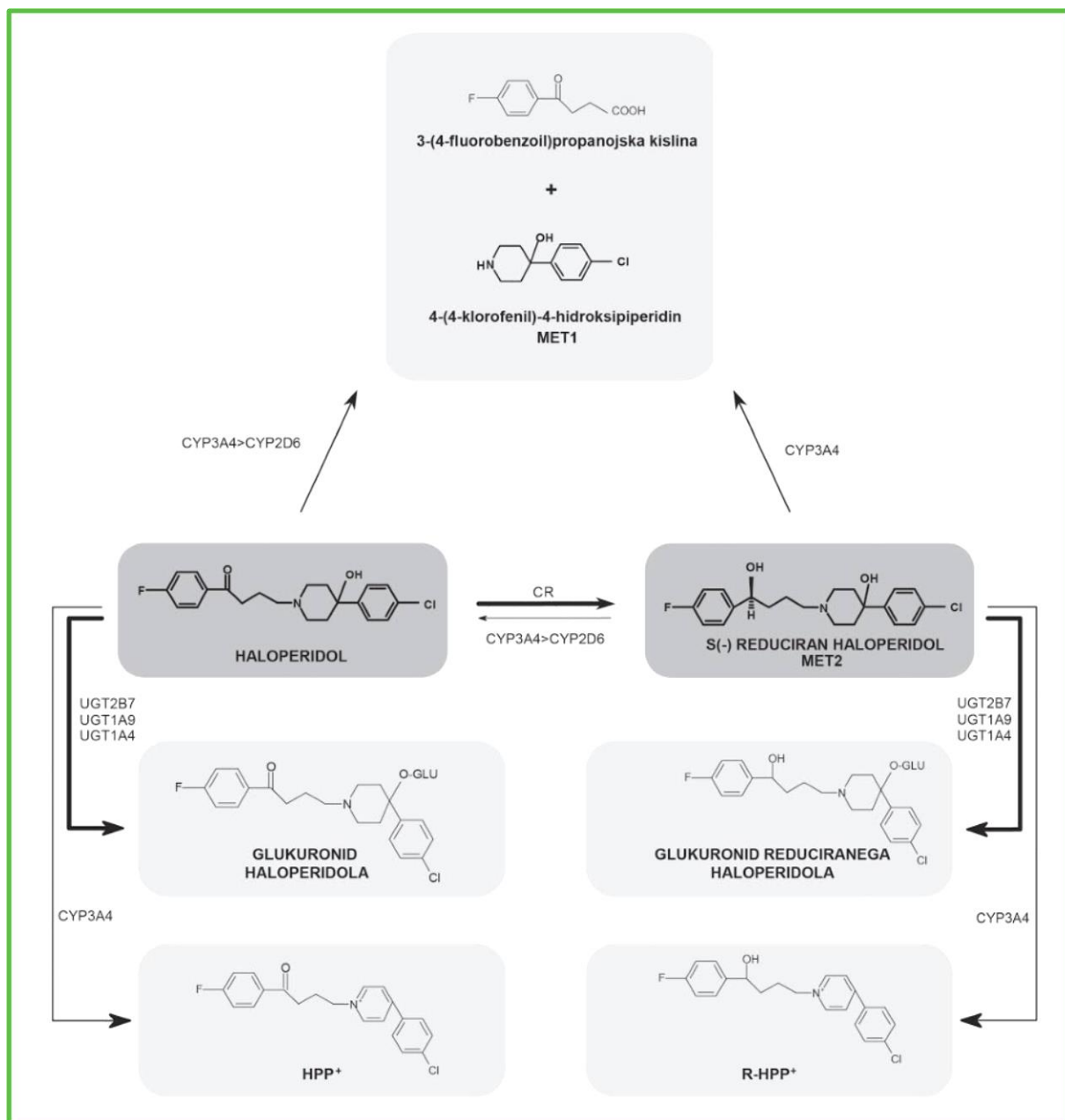
Molekula HAL je lipofilna, zato je njegov metabolizem precej kompleksen (Slika 1). V fazi I potekajo tri presnovne poti: redukcija, N-dealkilacija in oksidacija do piperidnijevih metabolitov, v fazi II pa glukuronidacija HAL in njegovih metabolitov. Nekateri presnovki so lahko farmakološko učinkoviti. Ker vse presnovne oblike HAL še niso določene, je pomen variabilnosti v presnovi med različnimi bolniki v veliki meri neznan. V presnovo je vključenih več encimov, ki zaradi genskega polimorfizma doprinesejo k razlikam v učinkovitosti in varnosti zdravljenja s HAL med posamezniki in onemogočajo preprosto odmerjanje zdravila (14, 15).

Encimi, vključeni v biotransformacijo HAL, so:

- **v fazi I:**
 - karbonilna reduktaza (CR),
 - citokromi P450 (CYP): izooblike CYP2D6, CYP3A4,
- **v fazi II:**
 - uridin-difosfat-glukuronoziltransferaze (UGT): izooblike UGT1A4, UGT1A9 in UGT2B7 (14, 15).

1.3.1.1. Redukcija

HAL se s pomočjo karbonilne reduktaze (CR) pretvori v reducirano obliko (MET2). Za reakcijo je potreben kofaktor NADPH. CR se nahaja v citoplazmi hepatocitov, eritrocitov in nekaterih celic v možganih. Sestavljena je iz ene peptidne verige v velikosti približno 30 kDa. Pretvorba poteka stereospecifično: *in-vivo* nastaja le S(-)-enantiomera. Reakcija je reverzibilna, saj se MET2 lahko s pomočjo CYP3A4 in CYP2D6 oksidira nazaj do HAL. CYP3A4 katalizira reakcijo z večjo kapaciteto in manjšo afiniteto, medtem ko CYP2D6 sodeluje le pri nižjih koncentracijah, ima visoko afiniteto za substrat in nizko zmogljivost pretvorbe. Reducirana oblika se naprej presnavlja z N-dealkilacijo, nastankom reduciranega piridinijevega iona, hidroksilacijo 4-fluorofenilnega obroča in glukuronidacijo. Med posamezniki so v aktivnosti CR opazne le manjše razlike (13, 14, 16, 17).



Slika 1: Presnovne poti haloperidola.

HPP+ = 4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-oksobutilpiridinijev ion; *R-HPP+* = 4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-hidroksibutilpiridinijev ion; *glukuronid haloperidola = O-glukuronid haloperidola

1.3.1.2. N-dealkilacija

Pri oksidativni N-dealkilaciji s cepitvijo C-N vezi HAL ireverzibilno razpade v 4-(4-klorofenil)-4-hidroksipiperidin (piperidinijev metabolit, MET1) in 3-(4-fluorobenzoil)propanojsko kislino. Večji delež reakcij katalizira CYP3A4, manjši pa CYP2D6. Pri N-dealkilaciji iz MET2 sodeluje le CYP3A4. V študiji, ki so jo izvedli Pan in sod., so ugotovili, da pri N-dealkilaciji HAL obstaja med različnimi osebami kar 10-kratno nihanje, zaradi česar lahko sklepamo na veliko interindividualno variabilnost koncentracij metabolitov (13, 14, 16–18).

1.3.1.3. Oksidacija do piridinijevih metabolitov

HAL se lahko oksidira do potencialno nevrotoksičnega piridinijevega presnovka 4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-oksobutilpiridinijevega iona (HPP⁺), MET2 pa do 4-(4-klorofenil)-1-(4-fluorofenil)-4-hidroksibutilpiridinijevega iona (R-HPP⁺). Obe reakciji katalizira CYP3A4 (14). Potek kemijske pretvorbe, vmesne stopnje in vpleteni encimi še niso točno določeni. Oksidacija poteka v jetrih in v možganih, a je večina proizvedenega HPP⁺ jetrnega izvora, saj oksidacija v živčnih celicah poteka v nižjih koncentracijah. Plazemske koncentracije so odvisne od dnevnega odmerka in plazemskih koncentracij HAL. Piridinijeve metabolite je Subramanyamu in sod. uspelo povezati z nastankom EPS, čeprav točen mehanizem vpletenosti še ni pojasnjen. Med preučevanjem kinetičnih lastnosti oksidacije HAL do HPP⁺ pri štirinajstih različnih vzorcih jetrnega tkiva, so Usuki in sod. opazili 10-kratno nihanje aktivnosti, kar nakazuje veliko variabilnost teh reakcij med posamezniki (14, 16, 19, 20).

1.3.1.4. Glukuronidacija

V drugi fazi metabolizma ksenobiotikov pride do glukuronidacije, ki jo katalizirajo UDP-glukuronoziltransferaze (UGT). Pri presnovi HAL sodelujejo tri izooblike: UGT1A4, UGT1A9 in UGT2B7. Njihovi produkti so polarnejši, zaradi česar se lažje izločajo skozi ledvice ali v žolč in so manj biološko aktivni (21).

Poteka lahko na dva načina; večina substrata se presnavlja z O-glukuronidacijo, pri kateri se glukuronska kislina iz kofaktorja UDPGA (uridin difosfat glukuronske kisline) veže na molekulo HAL preko kisika. 70 % teh reakcij katalizira UGT2B7, preostalih 20 % UGT1A9 in 10 % UGT1A4. Drugi način predstavlja N-glukuronidacija, ki poteka v 10-krat nižjih koncentracijah. Katalizira jo le izoencim UGT1A4, ki s pomočjo nukleofilne substitucije veže glukuronsko kislino iz UDPGA na atom dušika (15, 22). Glukuronidni konjugati zdravil se v enterohepatičnem obtoku izločajo z žolčem v tanko črevo, kjer se s pomočjo β -glukuronidaze, encima bakterijske flore, dekonjugirajo nazaj v izhodno spojino in se zopet vsrkajo v krvni obtok. Pri HAL pa je glukuronidacija ireverzibilen proces, saj je vez, kjer β -glukuronidaza navadno cepi glukuronide, sterično zaščitena s tremi obroči in tako do reakcije ne pride. To je eden izmed možnih vzrokov, da je koncentracija glukuronidiranega HAL v plazmi najvišja izmed vseh metabolitov. Na drugem mestu je nespremenjeni HAL, sledita MET2 in MET2-glukuronid (14, 15, 21).

V urinu bolnikov lahko določimo koncentracijo HAL-O-glukuronida, HAL-N-glukuronida pa le redko. Domnevajo, da je koncentracija N-glukuronida prenizka ali pa je ob prisotnosti β -glukuronidaze v kislih pogojih možen njegov razpad s hidrolizo (nižji pH spremeni obliko proteina in vezavno mesto za encim postane dostopno) (15).

V najvišjih koncentracijah se UGT encimi nahajajo na endoplazemskem retikulumu in jedrni membrani hepatocitov, prisotni pa so tudi v drugih organih: v celotni prebavni cevi z vključeno trebušno slinavko,

v ledvicah in možganih. Predvidevajo, da je njihova naloga prestreči toksične produkte, ki se izmuznejo jetrnim mehanizmom in so zmožni prehajati krvno-možgansko pregrado (21, 23).

1.3.2. Intrinzični jetrni očistek

Najobsežnejša presnovna pot HAL je glukuronidacija, preko katere se metabolizira od 50–60 % vse učinkovine, nadaljnjih 23 % biotransformacij poteka preko redukcije. Glavna izoblika, odgovorna za presnovo preko N-dealkilacije, nastajanja piridinijevih ionov in oksidacijo MET2 nazaj v HAL, je CYP3A4. Očistki, ki jih katalizira, so med sabo primerljivi. Prispeva k 20–30 % intrinzičnega jetrnega očistka HAL. Med HAL in MET2 poteka cikel metabolične redukcije in oksidacije, intrinzični očistek redukcije je približno 4-krat večji od očistka oksidacije (Tabela II) (14).

Tabela II: Intrinzični očistki posameznih metabolnih poti (14).

encim	pretvorba	CL _{int} (L/h/kg jeter)
UGT2B7, UGT1A9, UGT1A4	<i>glukuronidacija</i> (HAL → HAL-G)	114
CR	<i>redukcija</i> (HAL → MET2)	93
CYP3A4*	<i>oksidativna N-dealkilacija</i> (HAL → MET1 + 3-(4-fluorobenzoil)propanojska kislina)	28,2
CYP3A4*	<i>oksidacija</i> (MET2 → HAL)	21
CYP3A4	<i>oksidacija do piridinijevega metabolita</i> (HAL → HPP ⁺)	18,6

*Ocena intrinzičnega očistka za CYP2D6 ni bila opravljena. Določitev otežuje nihanje aktivnosti glede na fenotip in etnično pripadnost posameznika.

1.3.3. Terapevtsko območje haloperidola

Terapevtsko območje HAL pri bolnikih z akutno shizofrenijo je od 5,6 do 16,9 µg/L (14). Ciljna plazemska koncentracija HAL, pri kateri naj bi bil terapevtski učinek največji, pa je 10 µg/L (17). Ker so pri metabolizmu prisotne večje interindividualne razlike, je potrebna optimizacija odmerjanja in spremljanje plazemske koncentracije zdravila pri vsakem posamezniku (TDM). Po poročanju Ulricha in sod. se terapevtski učinek pri višjih koncentracijah zmanjšuje, poleg tega pa pogosteje prihaja tudi do neželenih stranskih učinkov (17). Razmerje med koncentracijo starševske spojine v plazmi in odmerkom je linearno, pri razmerju odmerka s koncentracijo MET2 pa so raziskovalci že večkrat opisali nesorazmerno naraščanje koncentracij pri višjih odmerkih (17, 18). V nekaterih študijah so predlagali, da je HAL odmerjan v prevelikih odmerkih in da se dopaminski D₂ receptorji nasitijo že pri odmerkih

1–2 mg/dan (24) oziroma so pri odmerkih 3–5 mg/dan zasedeni v 70–80 % (17). To pomeni, da bi bile lahko plazemske koncentracije pri bolnikih nižje (0,38–1,65 µg/L), znižala pa bi se tudi verjetnost za pojav stranskih učinkov (24).

1.4. Farmakokinetika in farmakogenetika haloperidola

1.4.1. Farmakokinetika

Ob preučevanju plazemskih koncentracij HAL pri bolnikih, ki so prejeli enake odmerke zdravila, lahko opazimo znatne razlike. Aplikacija zdravila je lahko intravenska (Iv), intramuskularna (Im) ali peroralna (perOs) (14, 18). Intramuskularna aplikacija je možna v vodnem ali oljnem mediju – dekanat. Pri uporabi oljnega medija se HAL s hidrolizo estra sprošča iz predzdravila in se iz mišičnega tkiva v kri izloča počasneje. To je uporabno predvsem pri bolnikih, ki slabše sodelujejo pri zdravljenju, saj omogoča nadzor nad jemanjem zdravila (25). Intramuskularna aplikacija zdravila v vodnem mediju se uporablja, kadar je potreben hiter učinek, predvsem pri obvladovanju nasilnih bolnikov. Največje farmakokinetične razlike pa nastanejo pri peroralnem prejemanju zdravila. Točni mehanizmi izvora teh niso razjasnjeni (14, 18). Vemo, da je absorpcija iz prebavil dobra, a se precej razlikuje med posamezniki. Nanjo lahko vpliva določena hrana, ki zmanjša njeno hitrost in obseg (Tabela III) (26). HAL je zelo lipofilna molekula, zato se obsežno presnavlja v jetrih. Na razlike intrinzičnega jetrnega očistka poleg aktivnosti encimov vpliva tudi sposobnost vezave na plazemske beljakovine in pretok krvi skozi jetra. Vezana frakcija obsega 88,4–92,5 % učinkovine, prisotne v plazmi, neodvisno od starosti in zdravstvenega stanja pacienta; celo pri bolnikih s cirozo jeter obseg vezave ni zmanjšan. Izloča se z urinom (30–40 % odmerka, od tega približno 1 % v nespremenjeni obliki) in blatom (60 %) (13, 14, 18, 26, 27).

Tabela III: Farmakokinetični parametri haloperidola in haloperidol dekanata (13, 14, 25, 26, 28).

farmakokinetični parametri	oznaka	vrednosti
čas do maksimalne plazemske koncentracije	t_{\max}	<i>perOs</i> : 2–6 h <i>Iv</i> : takoj (sekunde) <i>Im</i> : 20 min (zdravi), 33,8 min (shizofreniki) <i>Im dekanat</i> : 6 dni
navidezni volumen porazdelitve	V_z	<i>perOs</i> : 37,1–68,1 L/kg <i>Iv</i> : 9,5–21,7 L/kg
biološka razpolovna doba učinkovine	$t_{1/2}$	<i>perOs</i> : 14–37 h <i>Iv</i> : 14–26 h <i>Im</i> : 20 h <i>Im dekanat</i> : 21dni
plazemski očistek	CL	0,39–0,71 L/h/kg
biološka uporabnost	F	<i>perOs</i> : približno 60 %* <i>Iv</i> : 100 % <i>Im</i> : približno 60 %*

* Približno 60 %, ker se pri prvem prehodu jeter 40 % že metabolizira.

V raziskavi, ki jo je opravil Yukawa s sodelavci, je bila interindividualna variabilnost očistka HAL med pacienti, težkimi 60 kg, ki prejemaajo odmerek 200 µg/kg/dan, 30,3 %. Variabilnost za navidezni volumen porazdelitve pa 46,8 %. Odmerek je bil odvisen od mase, višine in starosti bolnika. Preiskovanci, starejši od 55 let, so presnavljali HAL počasneje in imeli tudi do 18,6 % nižji očistek kot mlajši preiskovanci. Spol ni imel vpliva.

Naklon regresijske premice pri primerjavi odmerka s povprečno koncentracijo v dinamičnem ravnovesju se razlikuje med rasami. Pri belcih je 0,51, pri rumeni rasi pa 0,88 (18).

Zapletena farmakokinetika HAL otežuje izbiro odmerka in režima odmerjanja za posameznika, kar podaljša čas do izboljšanja klinične slike in poveča možnost stranskih učinkov. Potrebno je razumevanje različnih razvojnih in demografskih vplivov na obnašanje učinkovine tako pri posamezniku kot pri celotni populaciji (14, 18).

1.4.1.1. Farmakokinetične interakcije haloperidola z drugimi učinkovinami

Aktivnost presnovnih encimov vpliva na plazemsko koncentracijo in očistek HAL. Nekatere snovi z indukcijo ali inhibicijo spreminjajo njihovo aktivnost in povzročajo klinično pomembne učinke. Dokazano je, da sočasna uporaba karbamazepina, fenobarbitala in fenitoina s HAL močno inducira CYP3A4 in UGT izoencime ter pospeši njegovo presnovo. Vpliv na farmakokinetiko HAL imajo tudi rifampicin, kinidin in nekateri antiepileptiki, ki lahko pri sočasni uporabi povzročijo 32 % povečanje njegovega očistka, ni pa znano, ali vplivajo tudi na CYP2D6 izoobliko. Substrati za CYP2D6 sicer bistveno ne spremenijo očistka HAL, medtem ko HAL in njegovi metaboliti inhibirajo CYP2D6 ter tako lahko vplivajo na plazemske koncentracije drugih sočasno uporabljenih zdravil, ki se presnavljajo s to izoobliko. Najpogosteje so to dodatni antipsihotiki, antidepresivi in benzodiazepini (14, 16, 18, 20).

1.4.2. Farmakogenetika

Za velika nihanja v plazemskih koncentracijah HAL lahko delno krivimo tudi genske variabilnosti med presnovnimi encimi. Kar 10-kratne razlike so opazili pri reakcijah CYP sistema, za katere večji del odgovornosti prisojajo CYP3A4 izoencimu. CYP2D6 izoencim je sicer bolj polimorfen, a je njegova aktivnost bistvena le pri nižjih odmerkih. Pri aktivnosti CR so prisotna manjša, zanemarljiva nihanja. Encimov iz družine UGT pa v preteklosti niso raziskovali, češ da je potek glukuronidacije preobsežen (14) in bi bila povzročena nihanja precej večja. V novejših raziskavah pa so že izpostavili možnost, da bi majhne variabilnosti v tej veliki presnovni poti lahko bile vzrok za nihanja plazemskih koncentracij med posamezniki (15, 21).

1.4.3. Vpliv na presnovne encime haloperidola

1.4.3.1. CYP3A4

CYP3A4 je najpomembnejši humani citokrom faze I za presnovo ksenobiotikov. Najdemo ga v endoplazemskem retikulumu jetrnega tkiva, krvno-možganski pregradi in večini nevronov (65–85 %). V možganih opravlja zaščitno vlogo. Pri metabolizmu HAL in njegovih presnovkov katalizira več reakcij: N-dealkilacijo, oksidacijo MET2 nazaj do HAL in HAL do piridinijevih metabolitov. Sam HAL ga inducira, njegovi metaboliti pa ga inhibirajo (a ne tako močno kot CYP2D6). Sočasna uporaba nekaterih že predhodno omenjenih zdravil lahko spremeni njegovo aktivnost in vpliva na farmakokinetiko HAL (12, 15, 16, 20, 21, 29, 30). K razlikam med posamezniki in med različnimi populacijami prispevajo tudi farmakogenetični dejavniki. Najpogostejša točkovna mutacija na genu za CYP3A4 leži v regulativnem delu, na mestu -392A>G. Njena frekvenca močno niha glede na preučevano populacijo. Pri Kitajcih in Japoncih je skoraj ne najdemo (0 %), medtem ko je pri Afro-američanih prisotna skoraj pri polovici (45 %). Spremeni lahko izražanje gena *in-vitro*, zato jo povezujemo z različnimi bolezenskimi stanji (31).

1.4.3.2. CYP2D6

CYP2D6 se v celici nahaja na endoplazemskem retikulumu. Sodeluje v prvi fazi presnove več kot 20 % najpogosteje predpisanih zdravil (12, 21). HAL je njegov stimulator in hkrati inhibitor. Inhibirajo ga tudi določena druga zdravila (kinidin, paroksetin, fluoksetin ...) in presnovki HAL, ki se kopičijo v jetrih. Nekateri od njih imajo večjo zaviralno sposobnost kot HAL ter signifikantno vplivajo na interakcije encima z drugimi substrati ter eliminacijo HAL iz telesa (Tabela IV) (16).

Tabela IV: Zaviralni učinek haloperidola in njegovih metabolitov na izoencim CYP2D6 (16).

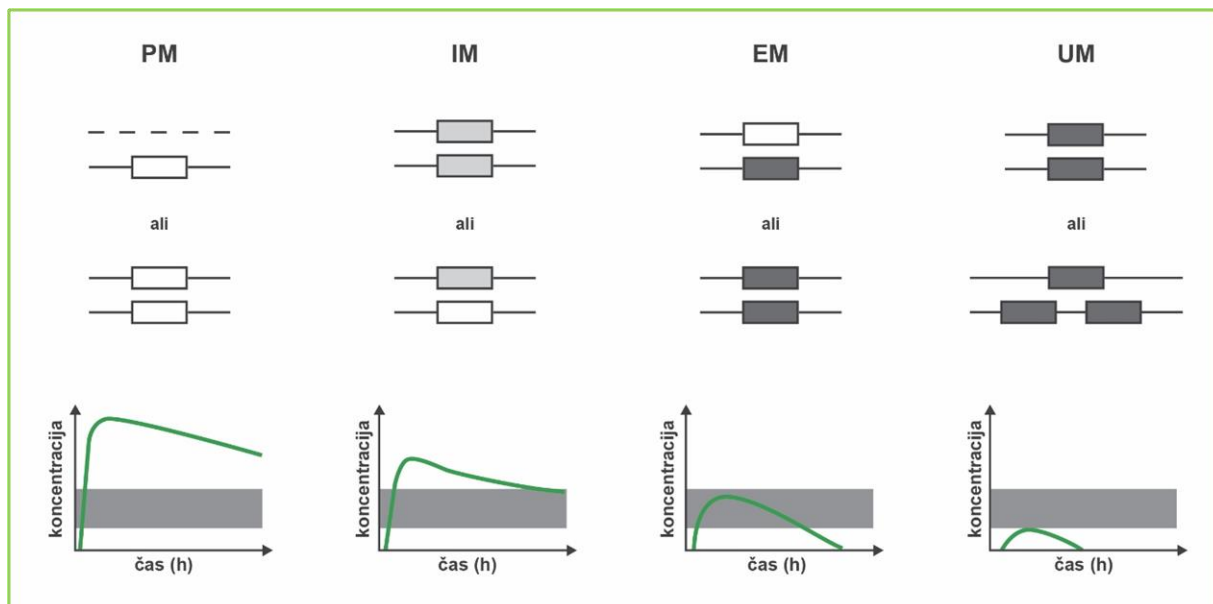
metabolit	moč / vrsta inhibicije	Ki (μM)
HAL	delno kompetitivno	0,89±0,15
MET2*	delno kompetitivno	S(-)-enantiomer: 0,11±0,01 R(+)-enantiomer: 1,11±0,16
MET1	kompetitivno	20,90±1,6
HPP ⁺	nekompetitivno	0,79±0,11
R-HPP ^{***}	močno	/ (ni meritve)

* *In-vivo* nastaja le S(-)-enantiomer. Bolniki z višjimi koncentracijami MET2 so občutljivejši na interakcije, v katerih sodeluje CYP2D6.

** Domnevajo, da R-HPP⁺ močno zavira CYP2D6, ker imata tako HAL kot HPP⁺ močan učinek. Njegova koncentracija v plazmi naj bi bila višja od koncentracij HPP⁺. Meritev v študiji Shin in sod. niso izvedli.

Gen za izoenzim CYP2D6 se nahaja na kromosomu 22 in je zelo polimorfen. Znanih je več kot 50 različnih mutacij in kar 90 alelov. Njegova dejavnost je pogojena z vrsto izraženega alela. Posameznike so, glede na encimsko aktivnost, razporedili v štiri skupine: na počasne (PM – poor), srednje hitre (IM – intermediate), hitre (EM – extensive) in ultra hitre (UM – ultra rapid) presnavljalce. Povezavo polimorfne narave CYP2D6 z metabolizmom HAL so preučevali v številnih študijah. Rezultati pa se razlikujejo med različnimi populacijami. Med počasne presnavljalce (PM) uvrščamo 5–10 % belcev, od katerih jih ima kar 90–95 % prisotnega enega od alelov 3*, 4* ali 5*. Med Azijci in črnci je procent PM nižji, poleg tega v orientalskih populacijah alela 4* skorajda ne najdemo. Veliko več je prisotnega alela 10*, ki ima srednje nizko aktivnost.

Opazne razlike med rasami lahko pojasnimo tudi z nekaterimi meritvami aktivnosti encima. Belci, ki so homozigoti za alel *10/*10, spadajo med PM in imajo višjo encimsko aktivnost kot homozigoti s tem alelom rumene rase. Med orientalskimi skupinami alelov *1/*1, *1/*10 in *10/*10 je razlika med plazemskimi koncentracijami HAL namreč manjša kot pri belcih. V študiji Roh s sod. so odkrili tudi, da se plazemske koncentracije HAL med genotipi *1/*1, *1/*10 in *10/*10 signifikantno razlikujejo le pri odmerkih, nižjih od 20 mg/dan, kar potrjuje domneve, da je CYP2D6 vpleten v metabolizem nizkih odmerkov HAL. Pri posameznikih z dvema nefunkcionalnima aleloma, dvema aleloma z zmanjšano aktivnostjo, s popolno odsotnostjo funkcije ali motnjo v delovanju CYP2D6, je aktivnost encima znižana, zato so plazemske koncentracije HAL višje (Slika 2).



Slika 2: Odras plazemskih koncentracij učinkovine na fenotip izoenzima CYP2D6.

CYP2D6 se ravno tako izraža v področjih možganov, bogatih z dopaminom. Vpleten je v njegovo presnovo ter delovanje drugih nevrotransmitorjev, ki jih povezujejo z nastankom EPS. Tudi on igra zaščitno funkcijo v regijah, dovzетnejših za okvare s toksini, ki so zmožni prehoda preko krvno-

možganske pregrade. Raziskovalci pričakujejo, da bodo nefunkcionalne alele CYP2D6 lahko povezali s pogostejšim pojavljanjem EPS. Poleg polimorfne narave CYP2D6 pa moramo biti pozorni tudi na številne proteine, ki lahko uravnesijo njegovo znižano aktivnost (12, 16, 17, 21, 24, 29, 32).

1.4.3.3.MDR1

Eden od takih proteinov je od ATP odvisni transporter MDR1 (multidrug resistant protein oz. P-glikoprotein (P-gp) ali ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1)), ki je kodiran z genom MDR1. Sodeluje pri absorpciji, distribuciji ter eliminaciji številnih ksenobiotikov. Regulira njihov vstop v telo ali le v posamezna tkiva. Izraža se na epiteliju tankega črevesa, v jetrih, ledvicah in v luminalnih membranah endotelijskih celic krvno-možganske pregrade. Deluje kot obrambni sistem pred možnimi poškodbami z endo- ali eksogenimi spojinami, a njegova aktivnost ni usklajena s presnovnimi encimi. Variacije gena MDR1, ki vplivajo na funkcionalnost črpalke, lahko pri posameznikih uravnovežijo spremenjeno aktivnost CYP2D6. Sam HAL se sicer ne prenaša z MDR1 transporterjem, ampak je njegov inhibitor in bi tako lahko vplival na koncentracijska razmerja učinkovin, ki se prenašajo z njim. Na MDR1 genu so našli več mutacij, od katerih pa imajo le nekatere dokazan učinek. Nižjo aktivnost črpalke povzročata SNP:

- C3435T, genotip T/T v 26. eksonu in
- G2677T/A, genotipa T/A in T/T v 21. eksonu.

Polimorfizem C3435T je povezan tudi z nižjim izražanjem črpalke v tankem črevesu. Obe spremembi povečata biološko uporabnost peroralnih odmerkov in povzročita višje plazemske koncentracije zdravil, ki se prenašajo s tem proteinom (12, 33–35).

1.4.3.4. UGT

Uridin-difosfat-glukoronoziltransferaze so družina encimov, ki sodelujejo pri fazi II metabolizma ksenobiotikov. Mednje uvrščamo več kot 24 različnih glikoproteinov, ki jih delimo v dve večji poddružini (21, 23).

Poddružino UGT1 kodira en sam gen, ki leži na lokusu 2q37. Sestavljen je iz trinajstih eksonov 1, od katerih ima vsak svojo promotorsko regijo, ter štirih pogostih eksonov 2-5. Izoencimi UGT1 se med seboj razlikujejo glede na posttranskripcijsko izrezovanje prevedene mRNK. Nastali protein sestavlja ohranjena domena na 3' koncu in variabilna domena na 5' koncu. Mutacije, ki so prisotne na skupnem delu prepisa, spremenijo izražanje in delovanje vseh izoencimov v poddružini, tiste prisotne na eksonu 1 ali njegovi promotorski regiji, pa vplivajo le na določen izoencim. Variabilnost eksona 1 omogoča

širok spekter substratov, eksoni 2–5 pa kodirajo vezavno mesto za kofaktor UDPGA (21, 36). Pri metabolizmu HAL iz te poddružine sodelujeta izoencima UGT1A4 in UGT1A9.

UGT1A4 je odgovoren za N-glukuronidacijo terciarnih aminov, različnih karcinogenih spojin, progestinov, androgenov, rastlinskih steroidov in nekaterih ksenobiotikov (21, 36, 37). Na njegovem genu ležita dve nepovezani drugačnosmiselni mutaciji: 70C>A (rs6755571) in 142T>G (rs2011425) (38 – 40). SNP 142T>G se pojavlja pri 9 %, 70C>A pa pri 8 % belcev (40).

UGT1A9 sodeluje pri številnih reakcijah. Zadolžen je za metabolizem ksenobiotskih fenolov, nekaterih zdravil proti raku in nekaterih endogenih spojin. Na njegovem genu se nahajajo tri znane drugačnosmiselne mutacije na kodonih: 33 (Met>Thr), 167 (Val>Ala) in 183 (Cys>Gly). UGT1A9^{33Thr} so v študiji Villeneuve in sod. določili pri 4,4 % belcih, ostala dva omenjena polimorfizma pa sta se v študiji Olson in sod. pojavljala pri manj kot 2 % pri belcev in Afroameričanov. UGT1A9^{33Thr} in UGT1A9^{183Gly} spremenita aktivnost encima, a je tudi tu sprememba odvisna od substrata, medtem ko mutacija UGT1A9^{167Ala} nima vpliva na aktivnost encima (21, 36, 41). Tako za UGT1A4 kot tudi za UGT1A9 vpliv teh polimorfizmov na presnovo HAL še ni bil določen.

Poddružino UGT2 kodira šest eksonov, ki se nahajajo na lokusu 4q13. UGT2B7 sodeluje pri glukuronidaciji steroidnih hormonov (aldosteronov, epitestosterona), maščobnih in žolčnih kislin. Pri metabolizmu eksogenih substanc je med drugim udeležen pri glukuronidaciji analgetikov, opioidov, karboksilnih nesteroidnih zdravil, zdravil proti raku in tudi HAL (21, 23, 37).

Obstaja v dveh različicah, ki se ločita po aminokislini na mestu 268, kjer se lahko vgradi histidin ali tirozin. Sprememba aminokislinskega zaporedja je odvisna od prisotnosti SNP mutacije na eksonu 2 (802T>C). Prisotna je približno pri polovici kavkazijcev (0,44). Glede na pretekle raziskave ta sprememba naj ne bi imela vpliva na aktivnost in specifičnost vezave substrata na aktivno mesto, a v novejših so jo že povezali s spremenjeno presnovo različnih učinkovin (37, 38, 42). Da bi razložili, zakaj so med različnimi vzorci jeter prisotne variacije v hitrosti glukuronidacije substratov, ki se metabolizirajo izključno z UGT2B7 (morfin, kodein, zidovudin), bo potrebno preučiti tudi vplive drugih SNP. V študiji, ki so jo izvedli Holthe in sod., so pri norveških bolnikih z rakom na genu za UGT2B7 opisali 12 polimorfizmov. Šest v regulatorni regiji in šest v eksonih. Opazili so sedem genotipov in tri glavne haplotipe. SNP -161T>C (rs7668258), ki leži v promotorski regiji in je v popolni neravnovesni povezavi s 802T>C, se je pojavljal s frekvenco 0,44. SNP 372A>G (rs28365063), ki leži na eksonu 1, pa s frekvenco 0,03 (23, 37). Študija polimorfizmov izoencima UGT2B7, ki bi vključevala presnovo HAL, še ni bila objavljena.

Področja farmakogenetike, farmakokinetike in farmakodinamike glukuronidacije antipsihotikov so resnično slabo poznana. Meritve glukuronidacije HAL so pokazale večja odstopanja med posamezniki, razlike so bile tudi 11-kratne. Domnevamo, da so razlike v glukuronidaciji možen dejavnik interindividualnih variabilnosti med plazemskimi koncentracijami HAL. Vemo, da nekatera zdravila,

hrana in hormoni (spolni, ščitnični in rastni) lahko vplivajo na hitrost glukuronidacije. Triciklični antidepresivi, oksazepam, valprojska kislina, ketoprofen, lorazepam in probenecid lahko nespecifično inhibirajo encime UGT; fenobarbital in rifampicin pa jih inducirata. Precej specifično delujeta karbamazepin in fenitoin, ki inducirata le UGT1A4 (21). Policiklični aromatski ogljikovodiki iz tobačnega dima inducirajo UGT1A9 izoencim, delovanje UGT1A9 in UGT2B7 pa nekateri antioksidanti iz hrane. Ker je presnovna pot glukuronidacije HAL najboljšežnejša, imajo te spremembe lahko velik vpliv tako na plazemske koncentracije HAL kot na njegovo klinično učinkovitost in pojavnost neželenih učinkov (15, 21).

1.5. Neželeni učinki in metabolizem haloperidola

Neželene učinke med antipsihotično terapijo je težko napovedati, saj med bolniki prihaja do precejšnjih razlik. Natančen mehanizem njihovega nastanka še ni razjasnjen, vemo pa, da določeno vlogo igra genetska predispozicija. Prisotnost nekaterih polimorfizmov vpliva na potek in hitrost presnove HAL. Višje plazemske koncentracije HAL in njegovih presnovkov pa povečajo možnost za pojav neželenih učinkov (12). Poleg tega imajo metaboliti HAL significantne farmakološke učinke, katerih nastanek še ni dobro razjasnjen (npr. visoko afinitetno vezavo na za HAL občutljiva sigma receptorska vezavna mesta v možganih, povečujejo izločanje prolaktina, višajo raven homovaniliske kisline (končnega produkta dopamina), MET2 zavira z apomorfinom povzročene stereotipnosti pri podganah, piridinijevi metaboliti so zmožni povzročati toksične učinke itd.) (16).

2. NAMEN DELA

Glukuronidacija je najboljšežnejša presnovna pot haloperidola, preko katere se metabolizira 50–60 % vse učinkovine. Natanko iz tega razloga je do zdaj veljalo, da ni povezana s klinično pomembni razlikami v farmakokinetiki haloperidola (14).

V magistrski nalogi želimo preučiti vpletenost polimorfizmov UGT na farmakokinetiko haloperidola in nekaterih njegovih metabolitov ter tako raziskati in ovrednotiti njihov vpliv na velika nihanja plazemskih koncentracij in pojav neželenih učinkov pri bolnikih s shizofrenijo. Posebej bomo opredelili tudi njihov vpliv na pojav ekstrapiramidnih simptomov. Za čim bolj celostno obravnavo problematike bomo v statistično analizo vključili tudi podatke o genetskem vplivu prve faze metabolizma, proteina MDR1 in nekaterih zunanjih vplivov.

Osnova za delo bodo klinični podatki iz doktorske disertacije Marije Bošković Ribarski z naslovom: Vloga vitamina E in omega-3 polinenasičenih maščobnih kislin pri omejevanju oksidativnih poškodb pri zdravljenju shizofrenije s haloperidolom (53) in rezultati genotipizacije, ki je bila opravljena v Laboratoriju za farmakogenetiko Inštituta za biokemijo pri Medicinski fakulteti v Ljubljani. Za haloperidol in izmerjene metabolite bomo izračunali povezanost variabilnosti v plazemskih koncentracijah s prisotnimi polimorfizmi na izoencimih UDP-glukuronoziltransferazah, v sistemu CYP in na transportnem proteinu MDR1. Od teh bodo podatki o polimorfizmi na genih za UDP-glukuronoziltrasferaze predstavljeni prvič, medtem ko so bili ostali polimorfizmi že predstavljeni v omenjeni doktorski disertaciji. Dodatno bomo preverili povezanost izmerjenih koncentracij s pogosto souporabo določenih zdravil, močnih induktorjev CYP3A4, močnih inhibitorjev CYP2D6, vplivom kajenja in pojavom ekstrapiramidnih simptomov. Za haloperidol in vsakega od preučevanih metabolitov bomo izdelali multipli linearni regresijski model.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Za analizo smo uporabili podatke iz klinične raziskave, ki je bila del doktorske disertacije Marije Bošković Ribarski (53). Za namen te raziskave so v času petih ambulantnih obiskov spremljali 52 bolnikov iz štirih slovenskih psihiatričnih bolnišnic (Oddelek za psihiatrijo Univerzitetnega kliničnega centra Maribor, Univerzitetna psihiatrična klinika Ljubljana, Psihiatrična bolnišnica Vojnik in Psihiatrična bolnišnica Begunje). Vsi vključeni preiskovanci so kavkaškega porekla in vsem je bila postavljena klinična diagnoza na podlagi strukturiranega kliničnega razgovora iz DSM-IV. Vzorčno populacijo so sestavljali telesno zdravi posamezniki starejši od 18 let z najmanj tri leta trajajočo boleznijo in 6-mesečnim stabilnim intramuskularnim odmerkom haloperidol dekanota (4,2–50 mg/teden). 14 bolnikov je hkrati dobivalo tudi peroralni odmerek HAL (2–30 mg/dan). Udeleženci so bili deležni pregledne anamneze in fizičnega pregleda. Za pridobitev podatkov o zdravstvenem stanju posameznikov so uporabili njihove bolnišnične kartoteke in razgovore z bolniki. Tekom teh so naredili psihopatološko oceno bolezni in oceno prisotnosti ekstrapiramidnih simptomov. Med vsako obravnavo jim je bil vzet vzorec venske krvi. Del vzorca so takoj centrifugirali, da so pridobili vzorec plazme. Polna kri in plazma sta bili zamrznjeni na -80 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Klinična ocena

Psihopatološko oceno bolnikov in prisotnost ekstrapiramidnih simptomov so izvedli s pomočjo psihiatričnih lestvic DSM-IV. Prisotnost pozitivnih in negativnih simptomov so ovrednotili z lestvico PANSS (Positive And Negative Symptoms Scale) (54), oceno globalnega stanja bolnikov pa z GAF lestvico (Global Assessment of Functioning) (55). Prisotnost parkinsonizma so ocenili s pomočjo lestvice SAS (Simpson-Angus Scale) (57), prisotnost in stopnjo tardivne diskinezije z lestvico AIMS (Abnormal Involuntary Movement Scale) (56) in akatizije z lestvico BARS (Barns Akathisia Rating Scale) (58).

3.2.2. Merjenje koncentracij analitov

Koncentracije HAL, MET1, MET2 in HAL-G so izmerili iz vzorcev plazme z metodo UHPLC-MS, ki je bila posebej razvita za določanje HAL in njegovih presnovkov. Ekstrakcijo analitov so izvedli z uporabo mešane kationsko-izmenjevalne trde faze; ločba je potekala na reverznofazni koloni Kinetex (100 × 3mm C18) z gradientno metodo. Kot mobilno fazo so uporabili mešanico 0,1 % mravljične

kislina in acetonitrila. Spodnja meja detekcije HAL in MET2 je bila 0,1 µg/L, HAL-G 0,5 µg/L in MET1 0,6 µg/L. Metoda je pokazala natančnost, ponovljivost in selektivnost za vse analite. Linearno območje metode za HAL in MET2 je od 0,1 do 50,0 µg/L, za HAL-G od 0,5 do 25 µg/L in za MET1 od 0,6 do 10,0 µg/L. Farmakokinetične analize so bile izvedene slepo glede na bolnikov genotip in klinično stanje.

3.2.3. Genotipizacija

Genomsko DNK so ekstrahirali iz belih krvničk, odvzetih s 5 mL polne krvi z uporabo FlexiGene kita proizvajalca Qiagen (Hilden, Nemčija). Na Applied Biosystems ABI 7500 Real Time PCR System (Foster City, Kalifornija, ZDA) so izvedli RT-PCR.

SNP UGT1A4 70C>A (rs6755571), UGT2B7 -161C>T (rs7668258) in 372 A>G (rs28365063) so določili z metodo alelne diskriminacije (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Za opredelitev genotipov CYP2D6 alelov *3 (rs35742686, ID testa: 4312563), *4 (rs3892097, ID testa: 4312564), *6 (rs5030655, ID testa:4312565) in MDR1 C3435T (rs1045642, ID testa: C_7586657_10) so uporabili TaqMan SNP genotipizacijo. Delecijo (*5) in duplikacijo alela (*1/2x*1) so izvedli z metodo pomnoževanja dolgih fragmentov DNA (long PCR) in hibridizacijsko analizo s cDNA sondami. Alel CYP2D6 *41 (rs28371725) so določili s TaqMan SNP genotipizacijo po meri (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, ZDA). Začetni oligonukleotid in sonde so bili oblikovani kot sledi: začetna sonda: 5'-GAGCCCATCTGGGAAACAGT, končna sonda (Reverse): 5'-GGTGTCCCAGCAAAGTTCATG, VIC-sonda: 5'- CTGTACCCTTTCTCCCT, FAM-sonda: 5'-CTGTACCCTTCCTCCCT. Vzorcem, kjer niso zaznali nobenega izmed testiranih alelov CYP2D6, so pripisali prisotnost alela CYP2D6 *1. SNP CYP3A4 *1B (rs2740574) so določili s pomočjo kompetitivne alelno-specifične PCR reakcije (KASP) z detekcijo s pomočjo fluorescence proizvajalca Kbiosciences (Herts, UK). Za genotipizacijo alela MDR1 G2677T/A (rs2032582) pa so uporabili PCR podvojevanje z analizo fragmentov na agaroznem gelu, kot je že opisano (43).

3.2.4. Statistična analiza

Pridobljene podatke smo najprej analizirali deskriptivno. Starost, telesno maso, trajanje bolezni, opisne spremenljivke iz psihopatoloških lestvic in lestvic za ocenjevanje prisotnosti ekstrapiramidnih simptomov (lestvice PANSS, GAF, BARS, AIMS in SAS) smo predstavili z mediano, minimalno in maksimalno vrednostjo. Kategorične spremenljivke, spol in delež kadilcev, pa s številom oseb in deležem (%). Pojavljanje preučevanih genotipov v populaciji smo prikazali s frekvenco. Za vse zvezne spremenljivke (HAL, MET2, HAL-G, MET1, MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL, MET1/MET2) smo izračunali aritmetično sredino in standardni odklon (SD).

Vpliv genotipov, souporabe določenih pogosteje sočasno predpisanih zdravil, močnih CYP3A4 induktorjev, močnih CYP2D6 inhibitorjev in kajenja na plazemske koncentracije HAL, MET2, HAL-G, MET1 in izračunana metabolična razmerja smo ocenili z enofaktorsko analizo variance (one-way ANOVA) s posthoc testom z Bonferronijevo korekcijo. Moč povezave med numeričnimi spremenljivkami smo določili s pomočjo Pearsonovega koeficinta. Razlike, pri katerih je bila stopnja značilnosti $p < 0,05$, smo opredelili kot statistično značilne. Za ocenjevanje vpliva genotipov in kajenja na pojav psihopatoloških simptomov (PANNS, GAF) smo uporabili neparametrični Kruskal-Wallis test, za ocenjevanje pojavljanja ekstrapiramidnih simptomov (BARS, AIMS, SAS) pa χ^2 test.

Dodatno smo za vsak izmerjen analit, normiran s tedenskim odmerekom haloperidola (HAL, HAL-G, MET1, MET2), uporabili metodo multiple linearne regresije, da smo določili vpliv neodvisnih spremenljivk, ki so z odvisno spremenljivko v prvem delu analize izkazovale trend statistične značilnosti ($p < 0,100$). Poleg teh smo v vsak regresijski model vključili starost, maso in pri metabolitih tudi normirane koncentracije HAL. Zaradi velikega števila ustreznih spremenljivk smo za izdelavo modela uporabili način postopnega vključevanja sočasnih spremenljivk.

Statistično analizo podatkov smo opravili v programu SPSS, verzija 22.0 (IBM SPSS, Chicago, IL, ZDA).

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Opisna statistika: frekvence alelov, genotipov in fenotipov pri bolnikih s shizofrenijo

V tabeli V so predstavljeni demografski podatki pacientov, ki so sodelovali v raziskavi, in povzeti rezultati lestvic za ocenjevanje kliničnega statusa pacienta ne glede na prisotnost polimorfizmov.

Tabela V: Demografski in klinični podatki pacientov.

		mediana (območje), n = 52
starost		46 (34–74)
spol ^a (moški/ženske, %)		31/21, 60/40
kadilci ^a (n, %)		30, 58
število cigaret na dan ^b		20 (5–50)
telesna masa		86,0 (57,0–148,0)
trajanje bolezni (v letih)		15 (3–39)
PANSS	PANSSP	10 (7–23)
	PANSSN	16 (7–37)
	PANSSG	26 (16–52)
	PANSST	54 (34–103)
GAF		61 (25–90)
SAS		3 (0–14)
AIMS		0 (0–12)
BARS		0 (0–8)

^a – kategorični podatki, posredovani kot število in procent pacientov.

^b – podskupina pacientov, ki so kadilci.

»Positive and negative symptoms scale« (**PANSS**): nižji je rezultat, manj simptomov je prisotnih. Lestvico delimo na več sklopov, s »positive sub-scale« PANSSP ocenjujemo pozitivne simptome, z »negative sub-scale« PANSSN negativne, s »general sub-scale« PANSSG prisotnost splošnih psihopatoloških simptomov. S »total score« PANSST je podan skupni rezultat. »Global assessment of functioning« (**GAF**): lestvica od 0–100, pri kateri višji rezultat pomeni boljšo psihološko oceno. »Barnes akathisia rating scale« (**BARS**), »Anormal involuntary movements scale« (**AIMS**), »Simpson Angus scale« (**SAS**).

4.1.1. UGT1A4

Pri določitvi genotipa za SNP 70C>A smo določili dve kombinaciji. Prevladoval je genotip CC, ki se je pojavljal v 92,3 %, AC pa je bil prisoten pri 7,7 % preiskovancev. Homozigotov za genotip AA v preučevani populaciji ni bilo.

4.1.2. UGT2B7

Na genetskem zapisu za encim UGT2B7 smo določili dva polimorfizma. SNP 372A>G se je pri preiskovanih osebah pojavil v vseh treh možnih kombinacijah. Ker pa je bil nosilec genotipa GG le en bolnik, smo ga pri analizi podatkov vključili v skupino AG/GG. Genotip AA se je pojavljal v 56,9 %, AG/GG pa v 43,1 %. Genotip za SNP -161T>C se je pojavljal v frekvencah TT 21,3 %, CT 48,9 % in

CC 29,8 %. Zaradi nadaljnje statistične analize smo glede na izmerjene plazemske koncentracije bolnike z genotipom TT ali CT združili v skupino TT/CT (70,2 %).

V predhodni raziskavi so pri istih osebah določili še genotipe CYP3A4 -392A>G, CYP2D6 in MDR1 (53). Podatki so predstavljeni v tabeli VI.

Tabela VI: Predstavitev genotipov, fenotipov in njihovih frekvenc.

genotipi	število pacientov	frekvence (%)	fenotip
<i>CYP2D6¹ (n = 51)</i>			
0/0	4	7,8	PM
0/x	3	5,9	IM
0/1, 1/x, 1/1	43	84,3	EM
XN	1	2,0	UM
<i>CYP3A4 rs2740574 (-392A>G) (n = 52)</i>			
AA	48	92,3	normalna ekspresija
AG	4	7,7	zmanjšana ekspresija
<i>MDR1 rs1045642 (C3435T) in MDR1 rs2032582 (G2677T/A) (n = 52)</i>			
brez T/A ²	9	17,3	normalna ekspresija
T/A ³	43	82,7	zmanjšana ekspresija
<i>UGT1A4 rs675571 (70C>A) (n = 52)</i>			
CC	48	92,3	
AC	4	7,7	
<i>UGT2B7 rs28365063 (372A>G) (n = 51)</i>			
AA	29	56,9	
AG/GG	22	43,1	
<i>UGT2B7 rs7668258 (-161T>C) (n = 47)</i>			
TT/CT	33	70,2	
CC	14	29,8	

¹ – Določili smo več nefunkcionalnih alelov (*3, *4, *5, *6), en alel z zmanjšano aktivnostjo (*41) in funkcionalen alel (*1). Oznaka »0« predstavlja nefunkcionalne alele, »x« alele z zmanjšano aktivnostjo, »1« alele z normalno aktivnostjo, »XN« pa podvojenost funkcionalnega alela (*1/2x*1). Razmerje med genotipom in fenotipom: bolniki v skupini 0/0 so kategorizirani kot počasni (PM – poor), v skupini 0/x kot srednje hitri (IM – intermediate) in v skupini XN kot ultra hitri (UM – ultra-rapid metabolizers) presnavljalci. Bolniki z vsaj enim funkcionalnim alelom so kategorizirani kot hitri presnavljalci (EM – extensive metabolizers).

² – V skupini »brez T/A« so nosilci C/C MDR1 C3435T in G/G MDR1 G2677T/A.

³ – Pacienti z vsaj enim polimorfizmom na genu za MDR1 (MDR1 C3435T ali MDR1 G2677T/A) so bili kategorizirani kot nosilci alela T/A. Med njih smo uvrstili C/T in T/T alel MDR1 C3435T ter alele G/T, G/A, T/A in T/T MDR1 G2677T/A.

4.2. Vpliv obravnavanih polimorfizmov na metabolizem haloperidola

Določili smo zvezo med opisanimi polimorfizmi in z odmerkom normiranimi koncentracijami HAL, HAL-G, MET1 in MET2. Rezultati so predstavljeni v Tabeli VII. V nadaljevanju smo izračunali povezave med istimi polimorfizmi in razmerji koncentracij MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL in MET1/MET2, izračuni so predstavljeni v Tabeli VIII.

Tabela VII: Vpliv določenih polimorfizmov na z odmerkom normirane koncentracije HAL, HAL-G, MET1 in MET2.

		#HAL (µg/L)		#HAL-G (µg/L)		#MET1 (µg/L)		#MET2 (µg/L)	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
<i>CYP3A4</i> (-392A>G)	AA (n = 47)	0.112 (0.059)	0.324	0.335 (0.232)	0.792	0.017 (0.029)	0.739	0.075 (0.129)	0.347
	AG (n = 4)	0.146 (0.138)		0.303 (0.117)		0.022 (0.019)		0.140 (0.180)	
<i>CYP2D6</i>	PM (n = 4)	0.107 (0.038)	0.181	0.503 (0.395)	0.158	0.011 (0.015)	0.871	*0.214 (0.119)	<0.001
	IM (n = 3)	0.181 (0.156)		0.355 (0.176)		0.015 (0.021)		*0.234 (0.161)	
	EM/UM (n = 43)	0.108 (0.058)		0.299 (0.181)		0.019 (0.030)		0.042 (0.068)	
& <i>MDR1</i>	non T/A (n = 8)	0.082 (0.029)	0.126	0.273 (0.158)	0.425	0.096 (0.022)	0.391	0.026 (0.023)	0,213
	T/A (n = 43)	0.121 (0.070)		0.343 (0.234)		0.019 (0.029)		0.090 (0.142)	
<i>UGT1A4</i> (70C>A)	CC (n = 47)	0,108 (0,062)	0,021	0,317 (0,208)	0,090	0,017 (0,029)	0,832	0,065 (0,099)	0,006
	AC (n = 4)	0,187 (0,085)		0,515 (0,353)		0,021 (0,025)		0,249 (0,317)	
<i>UGT2B7</i> (372A>G)	AA (n = 29)	0,132 (0,078)	0,020	0,346 (0,264)	0,696	0,020 (0,028)	0,595	0,120 (0,165)	0,011
	AG (n = 21)	0,088 (0,034)		0,320 (0,164)		0,015 (0,029)		0,025 (0,017)	
<i>UGT2B7</i> (-161T>C)	TT/CT (n = 33)	0,128 (0,070)	0,027	0,328 (0,222)	0,865	0,016 (0,022)	0,166	0,087 (0,143)	0,526
	CC (n = 13)	0,079 (0,046)		0,341 (0,265)		0,006 (0,013)		0,059 (0,102)	

– Meritve koncentracij, deljene z odmerkom haloperidola (mg/teden).

& – Pacienti z najmanj enim SNP v genu za MDR1 (*MDR1* C3435T ali *MDR1* G2677T/A) so upoštevani kot nosilci alela T/A.

* – Signifikantno se razlikuje od genotipa EM/UM ($p < 0.05$).

Tabela VIII: Vpliv določenih polimorfizmov na razmerja koncentracij MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL in MET1/MET2.

		##MET2 /HAL		##HAL-G/HAL		##MET1/HAL		###MET1/MET2	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
CYP3A4 (-392A>G)	AA (n = 48)	0,528 (0,674)	0,360	3,318 (2,072)	0,754	0,150 (0,284)	0,825	0,485 (0,949)	0,997
	AG (n = 4)	0,854 (0,745)		2,980 (1,805)		0,182 (0,180)		0,487 (0,837)	
CYP2D6	PM (n = 4)	1,912 (0,416)	<0,001	4,407 (1,989)	0,316	0,141 (0,178)	0,794	0,090 (0,119)	0,443
	IM (n = 3)	1,452 (0,274)		4,309 (5,486)		0,051 (0,055)		0,041 (0,049)	
	EM/UM (n = 44)	0,306 (0,253)		3,089 (1,726)		0,164 (0,294)		0,562 (0,996)	
&MDR1	non T/A (n = 9)	0,376 (0,473)	0,395	3,656 (2,701)	0,561	0,112 (0,227)	0,633	0,547 (1,164)	0,830
	T/A (n = 43)	0,590 (0,712)		3,216 (1,903)		0,161 (0,287)		0,472 (0,893)	
UGT1A4 (70C>A)	CC (n = 48)	0,504 (0,575)	0,071	3,342 (2,088)	0,546	0,156 (0,286)	0,743	0,500 (0,967)	0,701
	AC (n = 4)	1,139 (1,459)		2,693 (1,356)		0,108 (0,105)		0,311 (0,351)	
UGT2B7 (372A>G)	AA (n = 29)	0,743 (0,825)	0,023	2,909 (1,869)	0,089	0,145 (0,225)	0,763	0,376 (0,769)	0,303
	AG/GG (n = 22)	0,308 (0,307)		3,889 (2,160)		0,169 (0,341)		0,652 (1,126)	
UGT2B7 (-161T>C)	TT/CT (n = 33)	0,545 (0,687)	0,869	2,757 (1,577)	0,004	0,123 (0,205)	0,472	0,430 (0,805)	0,357
	CC (n = 14)	0,582 (0,726)		4,648 (2,621)		0,079 (0,148)		0,214 (0,490)	

– Razmerje koncentracij danega analita s koncentracijo haloperidola.

– Razmerje koncentracij MET1 z MET2.

& – Pacienti z najmanj enim SNP v genu za MDR1 (*MDR1* C3435T ali *MDR1* G2677T/A) so upoštevani kot nosilci alela T/A.

4.2.1. CYP3A4

Pri polimorfizmu -392A>G na genu za CYP3A4 se za pomembno ni izkazala nobena povezava s preučevanimi koncentracijami. Sklepamo lahko, da ta ne povzroča 10-kratnih nihanj med osebami v aktivnosti tega encima, ki so jih dokazali v študijah Pan in sod. ter Usuki in sod. (14). Kot druge možne vzroke bi lahko navedli vpletenost CYP2D6 pri N-dealkilaciji HAL in reverzni oksidaciji MET2. Pri oksidaciji HAL do HPP⁺ pa naj bi, glede na nekatere novejšje študije, sodelovali tudi izoobliki CYP3A5 in CYP3A7 (19, 44). CYP3A5 naj ne bi povzročal variabilnosti (45), možno vlogo CYP3A7 pa bi bilo potrebno še raziskati.

4.2.2. MDR1 protein

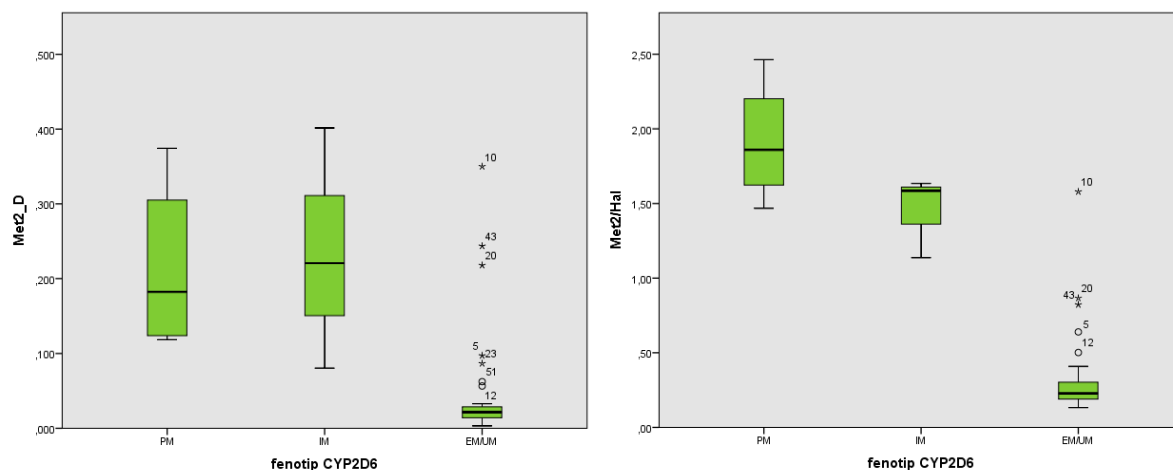
MDR1 črpalka, oz. prisotnost določenih polimorfizmov na genu MDR1, glede na naše rezultate ne vpliva na nihanja koncentracij HAL ali njegovih presnovkov v plazmi.

4.2.3. CYP2D6

Pri obravnavi povezav s fenotipskimi skupinami CYP2D6 smo se, glede na dobljene plazemske koncentracije in zaradi poenostavitve nadaljnje statistične obdelave podatkov, odločili, da fenotipa EM in UM združimo v fenotipsko skupino EM/UM. Med počasne (PM) je spadalo 7,8 %, med srednje hitre (IM) 5,9 % in med hitre/ultra hitre (EM/UM) 86,3 % preiskovancev.

Zelo močno statistično povezavo lahko vidimo med fenotipom CYP2D6 in normirano koncentracijo MET2 ($p < 0,001$). Bolniki, uvrščeni med počasne in srednje hitre presnavljalce, imajo signifikantno višje koncentracije MET2 v plazmi v primerjavi z hitrimi in ultra hitrimi presnavljalci. Enaka signifikantna povezava se ponovno pokaže med fenotipom CYP2D6 in razmerjem koncentracij MET2/HAL ($p < 0,001$) (Slika 3).

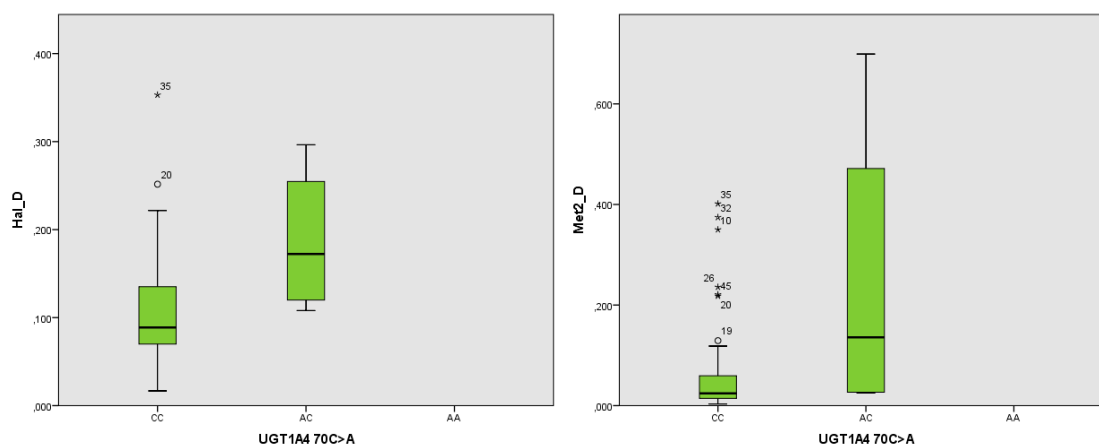
Encim CYP2D6 je poleg CYP3A4 odgovoren za oksidacijo MET2 nazaj do HAL. Oba sodelujeta tudi pri N-dealkilaciji HAL, N-dealkilacijo MET2 pa katalizira le CYP3A4 in ne tudi CYP2D6 (15,19). Sklepamo lahko, da so višje koncentracije MET2 pri počasnih in srednje hitrih presnavljalcih posledica nižje aktivnosti encima CYP2D6, do katere pride zaradi prisotnosti dveh nefunkcionalnih alelov ali kombinacije alela z zmanjšano aktivnostjo in nefunkcionalnega alela. Podobne rezultate so dobili tudi raziskovalci Mihara in sod., ki so pri japonskih pacientih s prisotnim vsaj enim alelom z zmanjšano aktivnostjo ravno tako ugotovili signifikantno višje vrednosti MET2 (14). Medtem pa pri korejskih pacientih raziskovalcem Roh in sod. ni uspelo najti enake povezave. Z nižjo aktivnostjo encima so bile povezane le z odmerkom normirane plazemske koncentracije HAL pri odmerkih nižjih od 20 mg/dan (17). Enake rezultate kot v naši raziskavi so dobili Pan in sod. pri belgijskih bolnikih. Pacienti, ki so jih klasificirali kot PM, so imeli signifikantno višje vrednosti normiranih plazemskih koncentracij MET2 in razmerja MET2/HAL v primerjavi z EM (46).



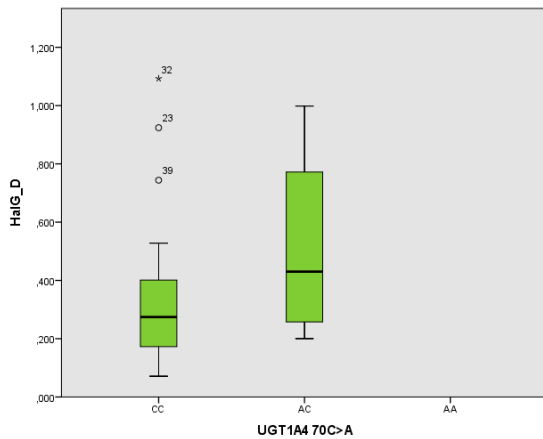
Slika 3: Koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) in metabolično razmerje (Met2/Hal) glede na fenotip CYP2D6.

4.2.4. UGT1A4

Pri družini encimov UGT se je za statistično pomembne izkazalo več zvez. Značilna je povezava med polimorfizmom 70C>A na UGT1A4 in normiranimi koncentracijama HAL ($p = 0,021$) ter MET2 ($p = 0,006$). Precej močna zveza, a ne statistično značilna, se kaže tudi s koncentracijami HAL-G ($p = 0,090$). Heterozigoti imajo opazno višje koncentracije teh dveh analitov (Slika 4). Sklepamo lahko, da je aktivnost encima UGT1A4 pri heterozigotih znižana. Isti trend se odraža pri razmerju MET2/HAL, a ni statistično značilen ($p = 0,071$) (Slika 5).



Slika 4: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) glede na prisotnost polimorfizma UGT1A4 70C>A.

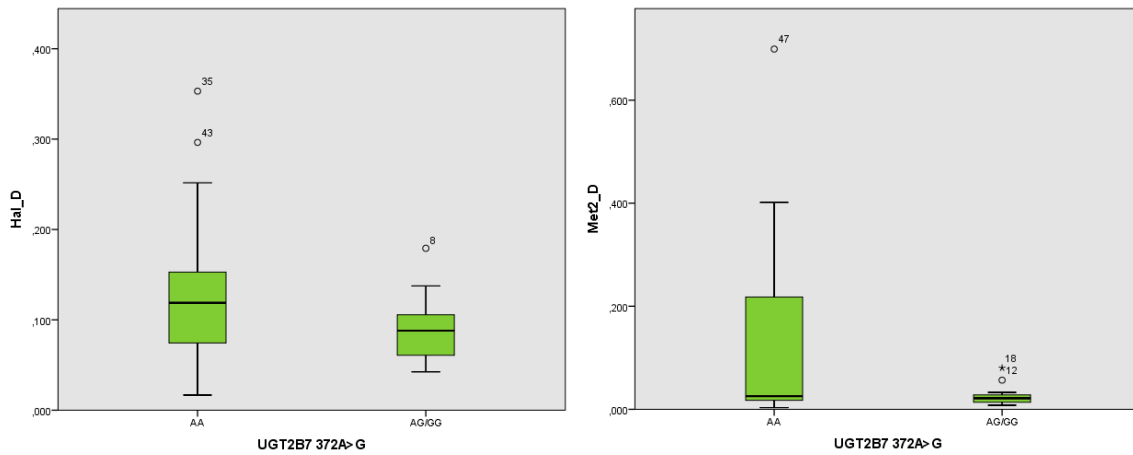


Slika 5: Kvantilni diagram z odmerkom haloperidola normirane koncentracije HAL-G (HalG_D) v odvisnosti od genotipa UGT1A4 70C>A.

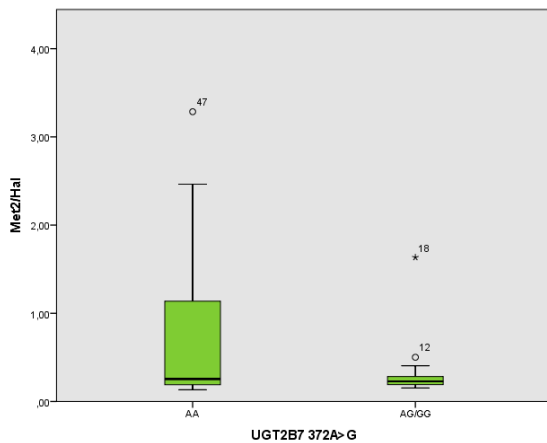
Študija, kjer bi raziskovali vpliv SNP UGT1A4 70C>A na metabolizem HAL, še ni bila izvedena, večkrat pa so ga preučevali z drugimi substrati. Ehmer in sod. so obravnavali učinke polimorfizmov UGT1A4 na metabolizem β -naftilamina, benzidina, aldosterona in dihidrotestosterona. Pri vseh štirih substratih se je aktivnost encima ob prisotnosti SNP 70C>A, kot v naši raziskavi, znižala ali celo popolnoma izginila. Polimorfizem 70C>A so določili pri 8 % bolnikov, kar je ravno tako primerljivo z našo frekvenco (7,7 %) (40). V drugi študiji, ki so jo izvedli Romero-Lorca in sod., so raziskovali učinke več različnih polimorfizmov na metabolizem tamoksifena, kjer pa SNP 70C>A ni imel signifikantnega vpliva (39). Izgleda, da ima polimorfizem UGT1A4 70C>A lahko učinek na aktivnost encima, a je ta odvisen od substrata (38–40). Po pregledu podatkov, pridobljenih v naši študiji, se nam postavi vprašanje, kakšna bi bila aktivnost encima pri preiskovancih z genotipom AA. Enaka heterozigotom, še nižja ali celo ničelna? Ker je encim UGT1A4 v celoti odgovoren za N-glukuronidacijo, je teh reakcij pri bolnikih s prisotnim SNP 70C>A toliko manj. Možno je celo, da so povsem odsotne.

4.2.5. UGT2B7

Na genu za UGT2B7 sta se oba analizirana polimorfizma izkazala za statistično pomembna. Bolniki, ki so heterozigoti za polimorfizem 372A>G, imajo značilno nižje koncentracije z odmerkom normiranega HAL ($p = 0,020$), MET2 ($p = 0,011$) (Slika 6) ter razmerja MET2/HAL ($p = 0,023$) (Slika 7). V statistično analizo določitve razmerja MET2/HAL je bil vključen tudi edini homozigot (GG), ki smo ga za ta polimorfizem določili v naši raziskavi. Njegovi podatki niso vključeni v statistično obravnavo analitov, normiranih z odmerkom, zaradi pomanjkljivih podatkov o odmerkih, ki jih je prejemal.

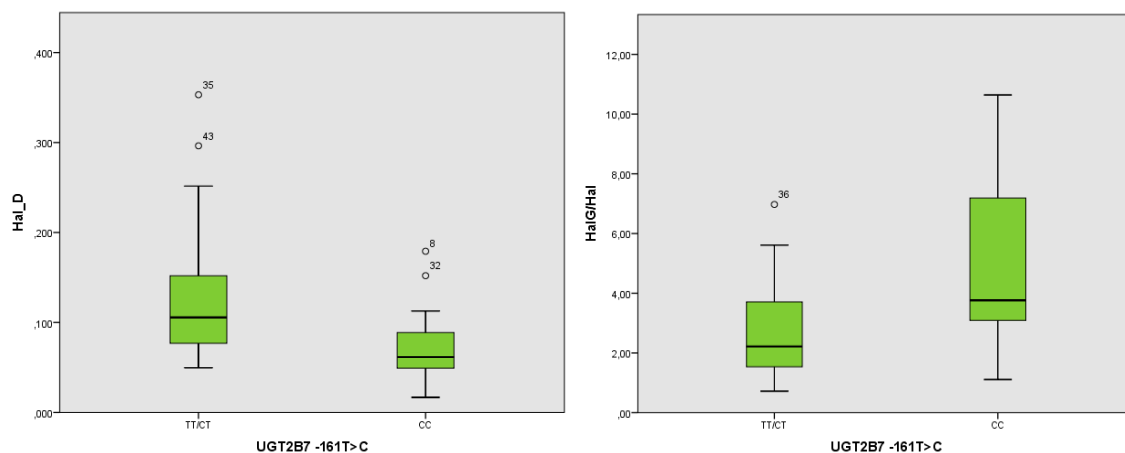


Slika 6: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in koncentracija MET2, normirana na odmerek haloperidola (Met2_D) glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 372A>G.



Slika 7: Metabolično razmerje Met2/Hal glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 372A>G.

S SNP UGT2B7 -161T>C sta statistično značilno povezani z odmerkom normirana koncentracija HAL ($p = 0,027$) in razmerje HAL-G/HAL ($p = 0,004$). Pri analizi podatkov smo bolnike homozigote za divji tip (TT) in heterozigote (TC) obravnavali skupaj. Za ta korak smo se odločili zaradi primerljivih koncentracij in lažje nadaljnje analize. Bolniki z genotipom CC so imeli opazno nižje plazemske koncentracije z odmerkom normiranega HAL in višje razmerje HAL-G/HAL (Slika 8).



Slika 8: Koncentracija haloperidola, normirana na odmerek (Hal_D) in metabolično razmerje HAL-G z HAL (HalG/Hal) glede na prisotnost polimorfizma UGT2B7 -161T>C.

Iz naših rezultatov se zdi, da oba SNP v UGT2B7 zvišata aktivnost UGT2B7. Polimorfizem 372A>G pa ima večji učinek tudi na koncentracije MET2. Sklepamo lahko, da prisotnost polimorfizma toliko zviša aktivnost encima, ki je odgovoren za 70 % O-glukuronidacije, da se delež haloperidola, ki se presnavlja z redukcijo, zmanjša.

Študija, v kateri bi preučevali vpliv polimorfizmov na genu za UGT2B7 na metabolizem HAL, še ni bila objavljena. Učinek omenjenih polimorfizmov pa so preučevali v povezavi z metabolizmom nekaterih drugih zdravilnih učinkovin. V že omenjeni norveški študiji so Holthe in sod. preučevali vpliv genotipiziranih polimorfizmov na presnovo morfina. A noben izmed opisanih SNP ni imel signifikantnega vpliva na farmakokinetiko in glukuronidacijo morfina (23).

Oba polimorfizma so preučevali v študiji Singkham in sod.. Tudi oni so pri SNP -161T>C homozigote za divji tip in heterozigote obravnavali skupaj. Ugotovili so, da imajo nosilci alelov CC kar 18 % višji očistek lamotrigina kot preostali bolniki. SNP 372A>G pa na presnovo lamotrigina ni imel vpliva (38). V novejši raziskavi so Wang in sod. prišli do delno drugačnih ugotovitev med preučevanjem vpliva polimorfizmov UGT2B7 na presnovo valprojske kisline pri kitajskih otrocih z epilepsijo. SNP -161T>C in 802T>C so povezali z višjimi serumskimi koncentracijami valprojske kisline, učinek pa se je še poslabšal ob souporabi lamotrigina. Mutacija 372A>G tudi na presnovo valprojske kisline ni imela vpliva (42).

Ker so rezultati študij o vplivu polimorfizmov na genu UGT2B7 neskladni in očitno odvisni tudi od preučevanega substrata, bodo za končni odgovor potrebne dodatne raziskave.

4.3. Vpliv uporabe najpogosteje sočasno predpisanih zdravil in kajenja na metabolizem haloperidola

Iz podatkov o zdravilih, ki so jih sočasno prejeli naši preiskovanci, smo preverili vpliv šestih najpogosteje sočasno predpisanih učinkovin na izmerjene analite in preračunana razmerja. Največ preiskovancev, kar 53,8 %, je poleg HAL prejelo zdravilo Akineton, ki vsebuje učinkovino biperiden hidroklorid in se uporablja za preprečevanje EPS (47). 21,2 % bolnikov je uživalo protiepileptična zdravila z valprojsko kislino, 19,2 % atipični antipsihotik kvetiapin in pomirjevalo lorazepam, 15,4 % pomirjevalo z učinkovino diazepam in 13,5 % atipični antipsihotik olanzapin. Hkrati smo preverili učinek kajenja na normirane koncentracije izmerjenih presnovkov. Kadilcev je bilo med preiskovanci 55,8 %. Rezultati so predstavljeni v Tabelah IX in X.

Tabela IX: Vpliv sočasne uporabe nekaterih zdravil in kajenja na z odmerkom normirane koncentracije HAL, HAL-G, MET1 in MET2.

		#HAL (µg/L)		#HAL-G (µg/L)		#MET1 (µg/L)		#MET2 (µg/L)	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
BIPERIDEN HIDRO- KLORID	da (n = 28)	0,126 (0,061)	0,186	0,361 (0,210)	0,320	0,022 (0,029)	0,187	0,091 (0,148)	0,525
	ne (n = 23)	0,101 (0,071)		0,297 (0,241)		0,018 (0,027)		0,067 (0,112)	
KVETIAPIN	da (n = 10)	0,148 (0,074)	0,076	0,422 (0,241)	0,159	0,027 (0,034)	0,268	0,162 (0,220)	0,028
	ne (n = 41)	0,107 (0,063)		0,310 (0,217)		0,015 (0,027)		0,060 (0,094)	
VALPROJSKA KISLINA	da (n = 11)	0,122 (0,046)	0,691	0,274 (0,241)	0,333	0,115 (0,015)	0,425	0,062 (0,064)	0,626
	ne (n = 40)	0,113 (0,071)		0,348 (0,220)		0,019 (0,031)		0,085 (0,146)	
LORAZEPAM	da (n = 10)	0,122 (0,066)	0,675	0,369 (0,236)	0,570	0,025 (0,033)	0,388	0,096 (0,113)	0,674
	ne (n = 41)	0,113 (0,067)		0,323 (0,223)		0,016 (0,028)		0,076 (0,138)	
DIAZEPAM	da (n = 8)	0,111 (0,062)	0,885	0,324 (0,223)	0,913	0,031 (0,040)	0,139	0,051 (0,069)	0,502
	ne (n = 43)	0,115 (0,068)		0,334 (0,227)		0,015 (0,026)		0,085 (0,141)	
OLANZAPINE	da (n = 7)	0,119 (0,072)	0,843	0,293 (0,214)	0,626	0,017 (0,020)	0,559	0,051 (0,076)	0,547
	ne (n = 44)	0,114 (0,066)		0,338 (0,228)		0,019 (0,030)		0,084 (0,139)	
KAJENJE	kadilci (n = 29)	0,112 (0,074)	0,727	0,323 (0,162)	0,737	0,023 (0,030)	0,099	0,064 (0,093)	0,333
	nekadilci (n = 22)	0,118 (0,056)		0,344 (0,291)		0,010 (0,025)		0,101 (0,171)	

– Meritve koncentracij, deljene z odmerkom haloperidola (mg/teden).

Statistično signifikanten vpliv na z odmerkom normirane plazemske koncentracije MET2 ima souporaba kvetiapina ($p = 0,028$). Močna povezava je prisotna tudi z normiranimi koncentracijami HAL ($p = 0,076$) in pri metaboličnem razmerju MET2/HAL ($p = 0,099$). Metabolizem kvetiapina ni dobro raziskan, najverjetneje pa se enako kot HAL presnavlja s CYP3A4 in CYP2D6 (48). Iz tega vidika so naši rezultati razumljivi, saj imajo bolniki, ki so prejeli obe zdravili, višje koncentracije HAL, signifikantno višje koncentracije MET2 in povečano razmerje MET2/HAL. V študiji, ki so jo opravili Potkin in sod., so opazovali vpliv HAL na farmakokinetiko kvetiapina, a niso našli signifikantnih vplivov (49). Za razjasnitev medsebojnih učinkov teh dveh učinkovin bi bile smiselne dodatne raziskave.

Tabela X: Vpliv sočasne uporabe nekaterih zdravil in kajenja na metabolična razmerja MET2/HAL, HAL-G/HAL MET1/HAL in MET1/MET2.

		##MET2/HAL		##HAL-G/HAL		##MET1/HAL		###MET1/MET2	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
BIPERIDEN HIDRO- KLORID	da (n = 28)	0,581 (0,724)	0,797	3,103 (1,561)	0,475	0,183 (0,249)	0,373	0,628 (1,031)	0,215
	ne (n = 23)	0,531 (0,644)		3,522 (2,558)		0,113 (0,312)		0,298 (0,804)	
KVETIAPIN	da (n = 10)	0,879 (1,001)	0,099	2,952 (1,183)	0,566	0,165 (0,172)	0,864	0,396 (0,581)	0,760
	ne (n = 41)	0,480 (0,571)		3,374 (2,225)		0,148 (0,300)		0,499 (1,015)	
VALPROJSKA KISLINA	da (n = 11)	0,514 (0,514)	0,811	2,146 (1,224)	0,036	0,108 (0,167)	0,568	0,229 (0,429)	0,325
	ne (n = 40)	0,571 (0,728)		3,607 (2,140)		0,163 (0,303)		0,548 (1,033)	
LORAZEPAM	da (n = 10)	0,659 (0,629)	0,607	3,493 (1,805)	0,734	0,164 (0,170)	0,878	0,391 (0,580)	0,744
	ne (n = 41)	0,534 (0,701)		3,242 (2,134)		0,148 (0,301)		0,501 (1,015)	
DIAZEPAM	da (n = 8)	0,362 (0,235)	0,381	3,167 (2,042)	0,854	0,313 (0,495)	0,073	0,867 (1,275)	0,207
	ne (n = 43)	0,595 (0,733)		3,315 (2,085)		0,121 (0,213)		0,407 (0,866)	
OLANZAPINE	da (n = 7)	0,319 (0,257)	0,323	2,724 (1,454)	0,438	0,065 (0,115)	0,382	0,238 (0,546)	0,470
	ne (n = 44)	0,596 (0,723)		3,382 (2,139)		0,165 (0,295)		0,518 (0,989)	
KAJENJE	kadilci (n = 29)	0,468 (0,448)	0,316	3,565 (2,311)	0,282	0,216 (0,337)	0,063	0,710 (1,148)	0,050
	nekadilci (n = 23)	0,660 (0,887)		2,947 (1,616)		0,073 (0,141)		0,201 (0,438)	

– Razmerje koncentracij danega analita s koncentracijo haloperidola.

– Razmerje koncentracij MET1 z MET2.

Drugi pomemben vpliv na metabolizem HAL se je pokazal pri bolnikih, ki so uživali valprojsko kislino. Slednja statistično značilno vpliva na razmerje koncentracij HAL-G/HAL ($p = 0,036$), ki je nižje v

primerjavi s preostalimi preiskovanci. Razlika gre predvsem na račun neznačilno višjih koncentracij HAL in nižjih koncentracij HAL-G. Takšne rezultate lahko razložimo z nespecifično kompetitivno inhibicijo UGT. Valprojska kislina se namreč ravno tako v 50 % izloča z glukuronidacijo, med drugim tudi z UGT1A4, UGT1A9 in UGT2B7 (15, 50).

Že večkrat so poročali, da je med bolniki s shizofrenijo delež kadilcev večji. Ti naj bi imeli hujše psihotične simptome, prejeli višje odmerke antipsihotikov (predvsem tisti, ki zdravilo prejemajo peroralno) in imeli večje tveganje za pojav tardivne diskinezije (46, 51). V naši študiji kajenje statistično značilno ne vpliva na nobenega izmed merjenih analitov, se pa močno približa značilni razliki pri povezavi s koncentracijami MET1 ($p = 0,099$) in pri razmerju MET1/HAL ($p = 0,063$). Mejno statistično značilno vpliva na razmerje koncentracij MET1/MET2, kjer je $p = 0,050$. Odmerki, ki so jih prejeli kadilci, se statistično ne razlikujejo od odmerkov nekadilcev.

Vpliv kajenja na metabolizem HAL so preverjali tudi v študiji Pan in sod.. Njihove ugotovitve se razlikujejo od naših, saj so pri njih kadilci imeli značilno nižje z odmerkom normirane plazemske koncentracije HAL, ravno tako pa niso opazili razlik pri koncentracijah MET2. Na žalost v njihovi študiji niso izvajali meritev MET1. Predlagali so, da lahko kajenje zniža koncentracije HAL tako, da inducira UGT izoencime, kar iz naših rezultatov ne bi mogli potrditi (46).

Kot zadnje lahko omenimo neznačilen trend, ki se je pokazal med razmerjem koncentracij MET1/HAL in diazepamom ($p = 0,073$). Diazepam se enako kot HAL presnavlja z encimom CYP3A4 (52). Predvidevali smo, da pri sočasnem uživanju med njima pride do kompetitivne inhibicije. Pretvorba iz HAL v MET1 se upočasni in razmerje med tema dvema analitoma bi moralo biti nižje kot pri preostali populaciji. Naši rezultati pa kažejo ravno nasprotno, saj je metabolično razmerje MET1/HAL višje. Smiselno bi bilo opraviti dodatne raziskave.

4.4. Vpliv močnih induktorjev CYP3A4 in inhibitorjev CYP2D6 na metabolizem haloperidola

Med študijo sta dve osebi sočasno s HAL prejeli karbamazepin, enega izmed najširše uporabljenih antiepileptikov. Je močan induktor CYP3A4, pospešuje pa tudi delovanje encimov UGT (7, 14). Preverili smo njegov vpliv na izmerjene koncentracije in izračunana razmerja, a se ni izkazal za signifikantnega.

Štirje preiskovanci so prejeli eno izmed zdravil, ki močno inhibirajo CYP2D6 (fluoksetin, paroksetin in bupropion), en preiskovanec pa kar dva. Njihova souporaba se je izkazala za statistično pomembno v povezavi z normiranimi plazemskimi koncentracijami HAL ($p = 0,047$). Močna, a ne značilna, je tudi zveza s koncentracijami MET1 ($p = 0,068$). Rezultati so predstavljeni v Tabeli XI.

Tabela XI: Vpliv sočasne uporabe močnih induktorjev CYP3A4 in močnih inhibitorjev CYP2D6 na z odmerkom normirane plazemske koncentracije HAL in njegovih glavnih metabolitov ter metabolična razmerja MET2/HAL, HAL-G/HAL, MET1/HAL in MET1/MET2.

		#HAL (µg/L)		#HAL-G (µg/L)		#MET1 (µg/L)		#MET2 (µg/L)	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
močni CYP3A4 induktorji	da (n = 2)	0,072 (0,025)	0,361	0,307 (0,168)	0,873	0,014 (0,019)	0,837	0,012 (0,002)	0,465
	ne (n = 49)	0,116 (0,067)		0,333 (0,228)		0,018 (0,029)		0,083 (0,134)	
močni CYP2D6 inhibitorji	da (n = 5)	0,170 (0,093)	0,047	0,477 (0,073)	0,130	0,040 (0,044)	0,068	0,159 (0,133)	0,160
	ne (n = 46)	0,109 (0,061)		0,316 (0,230)		0,015 (0,026)		0,071 (0,131)	
		##MET2/HAL		##HAL-G/HAL		##MET1/HAL		###MET1/MET2	
		srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>	srednja vrednost (SD)	<i>p</i>
močni CYP3A4 induktorji	da (n = 2)	0,172 (0,027)	0,420	4,091 (0,899)	0,580	0,150 (0,212)	0,995	0,978 (1,383)	0,450
	ne (n = 49)	0,574 (0,692)		3,259 (2,091)		0,151 (0,283)		0,459 (0,934)	
močni CYP2D6 inhibitorji	da (n = 5)	0,973 (0,623)	0,155	4,167 (3,722)	0,322	0,183 (0,188)	0,790	0,263 (0,263)	0,594
	ne (n = 46)	0,513 (0,680)		3,196 (1,840)		0,148 (0,288)		0,503 (0,987)	

– Meritve koncentracij, deljene z odmerkom haloperidola (mg/teden).

– Razmerje koncentracij danega analita s koncentracijo haloperidola.

– Razmerje koncentracij MET1 z MET2.

V raziskavi Pan in sod. so pri belgijskih bolnikih ravno tako preverjali potencialne interakcije souporabljenih zdravil na metabolizem HAL. Kot v naši raziskavi so udeležence glede na zdravila, ki so jih prejeli, razdelili na »induktorje« (karbamazepin, fenobarbital in fenitoin), »inhibitorje« (cimetidin, fluoksetin, levomepromazin, paroksetin, tioridazin) in tiste »brez učinka«. Opazili so trend

višjih odmerkov in nižjih koncentracij HAL normiranega z odmerkom, MET2 in razmerja MET2/HAL pri »induktorjih« in obratno pri »inhibitorjih«, a te razlike niso bile signifikantne (46). Pri nas v skupini »močnih CYP3A4 induktorjev« ni vidnega trenda nižjih koncentracij HAL. Možno je, da so taki rezultati posledica nizkega števila preiskovancev, saj je v njihovi študiji le karbamazepin prejelo kar 15 bolnikov. Dokazali smo značilen učinek »močnih inhibitorjev CYP2D6« na koncentracije HAL, a ne tudi MET2. Čeprav je tudi v naših rezultatih opaziti trend višjih koncentracij MET2 pri uživalcih »močnih CYP2D6 inhibitorjev«. Še bolj opazne so razlike v koncentracijah MET1, a teh v študiji Pan in sod. niso določali.

4.5. Povezava med preučevanimi polimorfizmi in ocenami psihopatoloških lestvic

Povezave med analiziranimi UGT polimorfizmi, psihopatologijo in EPS so predstavljene v Tabeli XII, med ostalimi analiziranimi polimorfizmi in psihopatološkimi simptomi pa v Tabeli XIII.

Tabela XII: Vpliv polimorfizmov UGT na psihopatološke ocene bolnikov s shizofrenijo.

	UGT1A4 70C>A			UGT2B7 -161T>C			UGT2B7 372A>G		
	CC (n = 48)	AC (n = 4)		TT/TC (n = 33)	CC (n = 14)		AA (n = 29)	AG/GG (n = 22)	
	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost
PANSSP (7 – 49)	9 (7-23)	13 (9-15)	0,190	9 (7-23)	9,5 (7-20)	0,571	10 (7-23)	8,5 (7-22)	0,196
PANSSN (7 – 49)	16 (7-37)	24,5 (18-34)	0,044	16 (7-37)	15,5 (8-28)	0,552	18 (8-37)	15 (7-34)	0,212
PANSSG (16 – 112)	26 (16-52)	30,5 (26-39)	0,191	26 (17-52)	24 (16-40)	0,428	27 (18-52)	25,5 (16-40)	0,223
PANSST (30 – 210)	53,5 (34-103)	71 (53-82)	0,126	53 (34-103)	51,5 (35-88)	0,561	58 (34-103)	51 (34-88)	0,196
GAF	61 (30-90)	42,5 (25-70)	0,050	60 (25-90)	65,5 (35-85)	0,221	60 (30-85)	70 (25-90)	0,195
	število		p vrednost	število		p vrednost	število		p vrednost
BARS	odsotni	34	0,360	21	10	0,435	21	15	0,490
	prisotni	14		12	4		8	7	
AIMS	odsotni	43	0,397	27	14	0,103	24	21	0,171
	prisotni	5		6	0		5	1	
SAS	odsotni	27	0,249	16	9	0,251	14	14	0,210
	prisotni	21		17	5		15	8	

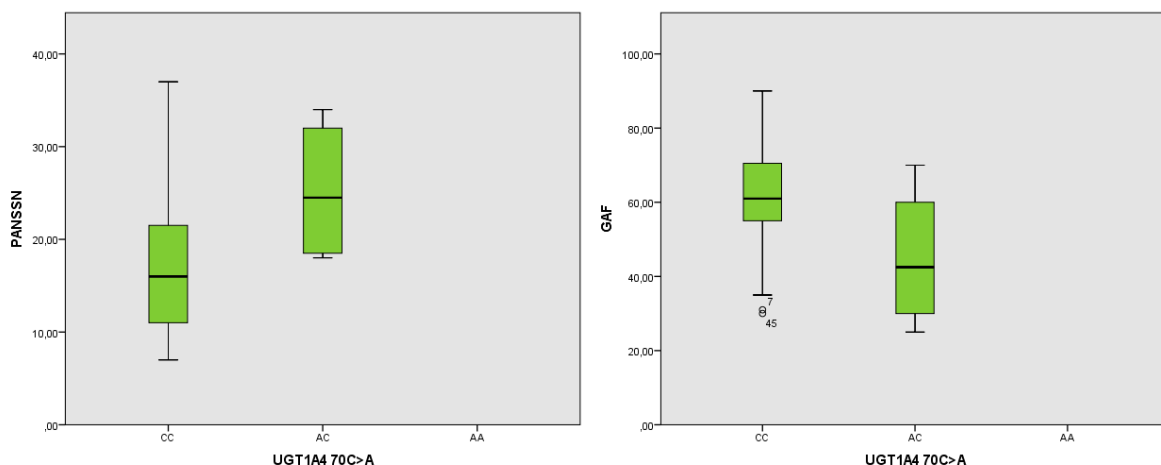
»Positive and negative symptoms scale« (**PANSS**): nižji je rezultat, manj simptomov je prisotnih. Lestvico delimo na več sklopov, s »positive sub-scale« PANSSP ocenjujemo pozitivne simptome, z »negative sub-scale« PANSSN negativne, z »general sub-scale« PANSSG prisotnost splošnih psihopatoloških simptomov. S »total score« PANSST je podan skupni rezultat. »Global assessment of functioning« (**GAF**): lestvica od 0–100, pri kateri višji rezultat pomeni boljšo psihološko oceno. »Barnes akathisia rating scale« (**BARS**), »Abnormal involuntary movements scale« (**AIMS**), »Simpson Angus scale« (**SAS**).

Tabela XIII: Vpliv polimorfizmov CYP2D6, CYP3A4 in MDR1 na psihopatološke ocene bolnikov s shizofrenijo.

	CYP2D6				CYP3A4 -392A>G			MDR1			
	PM (n = 4)	IM (n = 3)	EM/UM (n = 44)		AA (n = 48)	AG (n = 4)		Brez T/A (n = 9)	T/A (n = 43)		
	mediana (območje)	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost	mediana (območje)	mediana (območje)	p vrednost	
PANSSP	7,5 (7 – 13)	15 (11 – 22)	9,5 (7 – 23)	0,120	9 (7 – 23)	13,5 (7 – 15)	0,383	11 (7 – 23)	9 (7 – 23)	0,522	
PANSSN	12 (9 – 22)	16 (15 – 37)	16,5 (7 – 34)	0,454	16 (7 – 37)	18,5 (16 – 22)	0,481	15 (7 – 24)	16 (7 – 37)	0,475	
PANSSG	22,5 (19 – 32)	28 (22 – 44)	26,5 (16 – 52)	0,493	26 (16 – 52)	30,5 (22 – 35)	0,353	30 (19 – 34)	26 (16 – 52)	0,513	
PANSST	42 (35 – 67)	54 (53 – 103)	55,5 (34 – 99)	0,430	53,5 (34 – 103)	61 (53 – 67)	0,353	58 (35 – 80)	53 (34 – 103)	0,837	
GAF	72,5 (60 – 85)	55 (30 – 60)	61 (25 – 90)	0,097	61 (25 – 90)	60 (60 – 75)	0,902	57,5 (51 – 90)	61 (25 – 85)	0,990	
	število			p vrednost	število		p vrednost	število		p vrednost	
BARS	odsotni	4	2	30	0,404	33	3	0,795	7	29	0,429
	prisotni	0	1	14		15	1		2	14	
AIMS	odsotni	4	3	38	0,582	43	3	0,380	9	37	0,299
	prisotni	0	0	6		5	1		0	6	
SAS	odsotni	3	1	24	0,544	26	2	0,872	6	22	0,318
	prisotni	1	2	20		22	2		3	21	

»Positive and negative symptoms scale« (**PANSS**): nižji je rezultat, manj simptomov je prisotnih. Lestvico delimo na več sklopov, s »positive sub-scale« PANSSP ocenjujemo pozitivne simptome, z »negative sub-scale« PANSSN negativne, z »general sub-scale« PANSSG prisotnost splošnih psihopatoloških simptomov. S »total score« PANSST je podan skupni rezultat. »Global assessment of functioning« (**GAF**): lestvica od 0–100, pri kateri višji rezultat pomeni boljšo psihološko oceno. »Barnes akathisia rating scale« (**BARS**), »Abnormal involuntary movements scale« (**AIMS**), »Simpson Angus scale« (**SAS**).

Z analizo podatkov smo ugotovili, da prisotnost polimorfizma UGT1A4 70C>A signifikantno vpliva na povečanje pojava negativnih psihopatoloških simptomov (PANSSN) ($p = 0,044$) in ima nesignifikantno, a zelo močno povezavo s poslabšanjem globalnega stanja pacientov (GAF) ($p = 0,050$) (Slika 9). Predpostavljamo, da je to posledica signifikantno povišanih koncentracij HAL in MET2 pri pacientih s tem polimorfizmom. Da SNP 70C>A povzroči znižanje aktivnosti ali njeno popolno odsotnost, so opisali tudi že v drugih študijah (40). Iz tega razloga se moramo vprašati, kakšna je aktivnost UGT1A4 pri presnovi HAL pri homozigotih s prisotnim SNP 70C>A. Poudariti moramo tudi, da je izoencim UGT1A4 v celoti odgovoren za N-glukuronidacijo HAL. Verjetno bi bilo v prihodnosti smiselno preveriti vpliv polimorfizma posebej na izločanje N- in O-glukuronidov, opredeliti možne posledice zastajanja N-glukuronidov v telesu in potrditi njegov vpliv na izražanje negativnih simptomov pri bolnikih s shizofrenijo. Za potrditev in nadaljnje raziskave v tej smeri bi bilo treba izvesti klinične študije na večjem vzorcu bolnikov.



Slika 9: Grafični prikaz razlik prisotnosti negativnih (levo) in globalnih (desno) simptomov shizofrenije v odvisnosti od prisotnosti polimorfizma UGT1A4 70C>A.

Pri obravnavi ostalih polimorfizmov ni bilo nobene signifikantne povezave s psihopatološkimi simptomi.

Nesignifikantna zveza se kaže le med rezultati na lestvici GAF in polimorfizmom CYP2D6 ($p = 0,097$). Zvezo EPS s številom funkcionalnih alelov CYP2D6 so preverjali tudi v študiji Panagiotidis in sod. Njihovi rezultati se skladajo z našimi, saj ravno tako niso uspeli najti signifikantne povezave (24).

V študiji Drago in sod. pa so preverjali zvezo med polimorfizmi na CYP3A4 in pojavljanjem stranskih učinkov. Tudi tu niso našli signifikantnih povezav (12).

4.6. Povezava med kajenjem in ocenami psihopatoloških lestvic

Dodatno smo izračunali povezave med pojavom psiholoških simptomov in kajenjem. Noben izmed izračunov se ni izkazal za statistično pomembnega. Rezultati so predstavljeni v Tabeli XIV.

Tabela XIV: Povezava med kajenjem in ocenami psihopatoloških lestvic.

		KAJENJE		p vrednost
		DA (n = 29)	NE (n = 23)	
		mediana (območje)	mediana (območje)	
PANSSP		10 (7 – 23)	9 (7 – 23)	0,574
PANSSN		16 (7 – 37)	18 (8 – 30)	0,536
PANSSG		26 (17 – 52)	28 (16 – 39)	0,580
PANSST		54 (34 – 103)	56 (36 – 82)	0,651
GAF		61 (25 – 90)	60 (35 – 85)	0,548
		število		p vrednost
BARS	odsotni	15	12	0,116
	prisotni	14	11	
AIMS	odsotni	18	14	0,768
	prisotni	11	9	
SAS	odsotni	4	2	0,935
	prisotni	25	21	

»Positive and negative symptoms scale« (**PANSS**): nižji je rezultat, manj simptomov je prisotnih. Lestvico delimo na več sklopov, s »positive sub-scale« PANSSP ocenjujemo pozitivne simptome, z »negative sub-scale« PANSSN negativne, z »general sub-scale« PANSSG prisotnost splošnih psihopatoloških simptomov. S »total score« PANSST je podan skupni rezultat. »Global assessment of functioning« (**GAF**): lestvica od 0–100, pri kateri višji rezultat pomeni boljšo psihološko oceno. »Barnes akathisia rating scale« (**BARS**), »Abnormal involuntary movements scale« (**AIMS**), »Simpson Angus scale« (**SAS**).

4.7. Multipli linearni regresijski modeli

V model multiple linearne regresije za z odmerkom normirane koncentracije HAL smo vključili starost, maso, kajenje, prisotnost polimorfizmov UGT2B7 -161T>C, UGT2B7 372A>G, UGT1A4 70C>A in CYP2D6, sočasno uporabo kvetiapina, valprojske kisline ali diazepama in močnih inhibitorjev CYP2D6. Upoštevajoč predpostavljene pogoje se je v izračun uvrstilo preveč neodvisnih spremenljivk, zato smo glede na nizke vrednosti nestandardiziranih koeficientov B izključili vplive starosti, močnih CYP2D6 inhibitorjev in kajenja. Rezultati so predstavljeni v Tabeli XV.

V zasnovanem modelu ima največji vpliv na normirano koncentracijo HAL v plazmi fenotip IM encima CYP2D6. Bolniki, ki spadajo med srednje hitre presnavljalce, imajo za 0,080 µg/L*teden višje vrednosti HAL, kot tisti s fenotipom EM/UM. Za pomembno sta se izkazala tudi dva izmed testiranih polimorfizmov UGT. Bolniki s prisotnim polimorfizmom UGT1A4 70C>A imajo za 0,091 µg/L*teden višje vrednosti HAL v plazmi, tisti s prisotnim UGT2B7 372A>G polimorfizmom pa za 0,039 µg/L*teden nižje vrednosti.

Tabela XV: Koeficienti modelov linearne regresije.

odvisna spremenljivka	neodvisne spremenljivke, vključene v model	nestandardizirana koeficienta		p vrednost	R ²
		B	std. napaka		
#HAL(µg/L)	konstanta	0,153	0,027	≤0,001	0,280
	CYP2D6 IM	0,080	0,035	0,028	
	UGT1A4 70C>A	0,091	0,035	0,013	
	UGT2B7 372A>G	-0,039	0,018	0,037	
#HAL-G(µg/L)	konstanta	0,182	0,062	0,005	0,146
	#HAL(µg/L)	1,254	0,474	0,011	
#MET2(µg/L)	konstanta	-0,066	0,014	≤0,001	0,797
	#HAL(µg/L)	1,017	0,112	≤0,001	
	CYP2D6 PM	0,172	0,025	≤0,001	
	CYP2D6 IM	0,117	0,030	≤0,001	
#MET1(µg/L)	konstanta	0,003	0,008	0,749	0,091
	#HAL(µg/L)	0,133	0,061	0,035	

– Meritve koncentracij, deljene z odmerkom haloperidola (mg/teden).

V model za z odmerkom normirane koncentracije HAL-G smo vključili: starost, maso, z odmerkom normirane koncentracije HAL, prisotnost polimorfizmov UGT1A4 70C>A, UGT2B7 -161T>C, UGT2B7 372A>G in sočasno zdravljenje z valprojsko kislino. Na koncentracije HAL-G ima zelo velik vpliv koncentracija HAL (B = 1,254), ostali vključeni parametri pa nimajo signifikantnega vpliva.

V multipli linearni regresijski model z odvisno spremenljivko MET2 smo vključili neodvisne spremenljivke: starost, maso, z odmerkom normirane koncentracije HAL, fenotipe CYP2D6 (PM, IM, EM/UM), polimorfizme UGT2B7 372A>G, UGT1A4 70C>A, souporabnike kvetiapina in kajenje. Največji vpliv na koncentracije MET2 ima normirana plazemska koncentracija HAL (B = 1,017), sledi

pa ji fenotip encima CYP2D6. Najvišje koncentracije MET2 v plazmi imajo bolniki, klasificirani kot počasni presnavljalci (PM), te so kar 0,172 $\mu\text{g/L}$ višje od koncentracij bolnikov s fenotipom EM/UM. Bolniki, ki spadajo v fenotipsko skupino IM, pa imajo za 0,117 $\mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$ višje koncentracije MET2 kot bolniki skupine EM/UM.

V linearni regresijski model za MET1 smo vključili starost, maso, z odmerkom normirane koncentracije HAL, kajenje in sočasno zdravljenje z močnimi inhibitorji CYP2D6 in/ali diazepamom. Največji in edini statistično pomemben vpliv na koncentracije MET1 ima normirana plazemska koncentracija HAL ($B = 0,133$).

5. SKLEP

Glavni namen magistrske naloge je bil preučiti vpletenost polimorfizmov UGT na farmakokinetiko haloperidola in nekaterih njegovih presnovkov ter ovrednotiti njihov vpliv na velika nihanja plazemskih koncentracij pri bolnikih s shizofrenijo. V analizo smo, zaradi širše perspektive pri pristopu do problema, vključili tudi analizo podatkov genotipov CYP3A4 in MDR1, fenotipov CYP2D6 in nekaterih možnih zunanjih vplivov. Opravili smo vse zadane naloge in pokazalo se je več pomembnih vplivov.

Pri analizi podatkov UGT polimorfizmov smo ugotovili, da vsi preučevani SNP pomembno vplivajo na presnovo HAL. UGT1A4 70C>A je bil prisoten pri 7,7 % preiskovancev, ki so bili vsi heterozigoti za preučevani polimorfizem. Statistično pomembno je vplival na koncentracije HAL in MET2. Iz rezultatov sklepamo, da imajo nosilci polimorfizma nižjo aktivnost encima, kar se odraža v višjih plazemskih koncentracijah omenjenih analitov. Na genu za izoencim UGT2B7 smo preučevali vpliv dveh polimorfizmov. SNP 372A>G se je pojavljal pri 43,1 % preiskovancev, a je bil le en od teh homozigot, zato smo genotipa AG in GG obravnavali skupaj. Prisotnost je pri bolnikih statistično pomembno znižala koncentracije HAL, MET2 in razmerje koncentracij MET2/HAL. SNP -161T>C se je v našem vzorcu pojavil v homo- in heterozigotni obliki. Zaradi podobnih plazemskih koncentracij in lažje nadaljnje analize smo se odločili, da homozigote brez prisotnega polimorfizma združimo s heterozigoti. Tako sta nastali skupini TT/TC in CC. Homozigotov z genotipom CC je bilo med preiskovanci 29,8 %. Ugotovili smo, da imajo statistično značilno nižje koncentracije HAL in razmerje koncentracij HAL-G/HAL.

S statistično analizo podatkov ostalih priključenih polimorfizmov smo dobili enake rezultate kot že nekateri raziskovalci pred nami. Z analizo polimorfizmov na genu CYP2D6 smo potrdili, da imajo bolniki s fenotipom PM ali IM signifikantno višje vrednosti MET2 in da obstajajo signifikantne razlike med razmerji koncentracij MET2/HAL, in sicer med vsemi tremi skupinami (PM, IM, EM/UM).

Pri ostalih preučevanih polimorfizmih, -392A>G na CYP3A4 in G2677T/A ter C3435T na MDR1, se je izkazalo, da ne vplivajo na presnovo HAL. Polimorfizma na genu za MDR1 smo obravnavali skupaj. Bolniki so bili kategorizirani kot »brez T/A« alela ali »nosilci T/A« alela.

Poleg naštetih genetskih vplivov smo preverili možne interakcije s šestimi najpogosteje sočasno predpisanimi zdravili, močnimi induktorji CYP3A4 in močnimi inhibitorji CYP2D6. Izmed najpogosteje predpisanih zdravil (biperiden hidroklorid, valprojska kislina, kvetiapin, lorazepam, diazepam in olanzapin) se je izkazalo, da imata dve signifikanten vpliv na koncentracije presnovkov HAL. Ugotovili smo, da je imelo 19,2 % bolnikov, ki so sočasno prejeli kvetiapin, signifikantno višje koncentracije MET2. 21,2 % bolnikov, ki so sočasno prejeli valprojsko kislino, pa signifikantno višje razmerje koncentracij HAL-G/HAL.

Edino zdravilo, ki spada med močne induktorje CYP3A4 in je bilo predpisano dvema vključenima bolnikoma, je bil karbamazepin. Izkazalo se je, da ni imel vpliva na metabolizem HAL. Pomembno povezavo pa smo odkrili s sočasno predpisanimi močnimi inhibitorji CYP2D6. Bolniki, ki so poleg HAL prejeli tudi fluoksetin, paroksetin in/ali bupropion, so imeli pomembno višje plazemske koncentracije HAL.

Zaradi večjega deleža kadilcev med shizofreniki smo preverili vpliv kajenja tudi na metabolizem haloperidola. Kajenje v naši študiji ni statistično pomembno vplivalo na noben izmerjen analit. Opazili pa smo zelo močan trend višjih koncentracij MET1 in večjega razmerja koncentracij MET1/HAL ter MET1/MET2 ($p = 0,050$) pri kadilcih. Bolniki, ki so sodelovali v naši študiji, so prejeli ustaljen intramuskularni odmerek, le 14 bolnikov je dodatno prejelo HAL tudi peroralno. V študiji Pan in sod. pa so poročali, da imajo bolniki kadilci, ki HAL prejema peroralno, 4-krat višje koncentracije z odmerkom normiranega plazemskega HAL (46). Možno je, da bi bili naši zaključki drugačni, če bi več vključenih bolnikov prejelo zdravilo peroralno.

Pregledali smo tudi vpliv vseh določenih polimorfizmov in kajenja na pojav psihopatoloških simptomov. Za statistično pomembno se je izkazala le ena povezava. Ugotovili smo, da imajo bolniki s prisotnim polimorfizmom UGT1A4 70C>A signifikantno slabši rezultat na lestvici PANSSN, ki prikazuje pojavljanje negativnih psiholoških simptomov. Poleg tega imajo ti bolniki tudi precej nižji, a ne signifikanten rezultat na lestvici GAF ($p = 0,050$), kar odraža slabše splošno stanje bolnikov s tem polimorfizmom.

Kot sklepno dejanje smo s pridobljenimi podatki za vsak izmerjen analit (HAL, HAL-G, MET1, MET2) osnovali model multiple linearne regresije. Zaradi obširnega nabora možnih neodvisnih spremenljivk smo modele izdelali s pomočjo načina postopnega vključevanja sočasnih spremenljivk. Navkljub precejšnjemu številu novih statistično pomembnih vplivov na presnovo HAL, nam ni uspelo oblikovati dobrega modela za napovedovanje plazemske koncentracije HAL ($R^2 = 0,280$). Največji vpliv je imel fenotip izoencima CYP2D6, čeprav ga povezujejo zlasti z uravnavanjem njegovih nižjih koncentracij. Bolniki s fenotipom IM so imeli $0,080 \mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$ višje vrednosti HAL kot tisti s fenotipom EM/UM. Kot dva novo odkrita vpliva sta se v model uvrstila tudi polimorfizma 70C>A na genu za UGT1A4 in 372A>G na genu za UGT2B7. Pri bolnikih s polimorfizmom 70C>A je bila koncentracija HAL višja za $0,091 \mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$, pri tistih s prisotnim polimorfizmom 372A>G pa nižja za $0,039 \mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$. Izjemen pomen fenotipa izoencima CYP2D6 pri metabolizmu HAL se je še enkrat pokazal na modelu za napovedovanje koncentracij MET2. Te lahko dokaj dobro napovemo le s poznavanjem normiranih koncentracij HAL in fenotipa CYP2D6 ($R^2 = 0,797$). Bolniki s fenotipom PM imajo $0,172 \mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$ višje koncentracije MET2, bolniki s fenotipom IM pa $0,117 \mu\text{g/L} \cdot \text{teden}$ višje koncentracije od tistih s fenotipom EM ali UM. Pri ostalih dveh modelih multiple linearne regresije (HAL-G, MET1) se je, kot

edini dovolj velik vpliv na dane koncentracije, v model uvrstila le normirana plazemska koncentracija HAL. Pri obeh dveh modelih je R^2 zelo nizek.

Naši rezultati razkrivajo precej novih statistično pomembnih vplivov na metabolizem HAL. O nobenem izmed testiranih UGT polimorfizmov v literaturi nismo našli podatka, da bi že kdaj raziskovali njihov vpliv na metabolizem HAL, čeprav se zdi, da je njihov učinek velik. Najpomembnejše je odkritje vpliva SNP UGT1A4 70C>A na koncentracije HAL in MET2, ki se kaže tudi kot poslabšanje negativnih psihopatoloških simptomov nosilcev.

6. LITERATURA

1. M. Picchioni M., M. Murray R., Schizophrenia, *BMJ*, julij 2007, 335, 91–95
2. http://www.nimh.nih.gov/health/topics/schizophrenia/index.shtml#part_145426 (25. 11. 2015)
3. Koprivšek J., Čelofiga A., Psihiatrični utrinki: zbornik prispevkov / prvi Psihiatrični dnevi za zdravnike specialiste in specializante splošne in družinske medicine, Maribor, 2.–3. december 2011, Univerzitetni klinični center, Oddelek za psihiatrijo. Maribor, 2012, 31–43
4. Hulegar Ashok A., Baugh J., K. Yeragani V., Paul Eugen Bleuler and the origin of the term schizophrenia (SCHIZOPRENIEGRUPPE), *Indian Journal of Psychiatry*, januar–marec 2012, 54(1), 95–96
5. Tomori M., Zihel S., Psihiatrija, *Littera picta*, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Ljubljana, 1999
6. <http://www.pb-idrija.si/zdravljenje-in-pomoc/katere-bolezni-zdravimo/shizofrenija> (25. 11. 2015)
7. Rang H. P., Dale M. M., Rang and Dale's Pharmacology, 7th-edition, Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Luis, Sydney, Toronto, Elsevier, 2012, 553–563
8. Seeman P, Atypical antipsychotics: mechanism of action, *Canadian journal of psychiatry*, 2002, 41(1), 27–38
9. Rang H. P., Dale M. M., Pharmacology, 5th-edition, Edinburg, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Luis, Sydney, Toronto, Elsevier, Churchill Livingstone, 2003, 525–530
10. Tiwari K. A., Deshpande N. S., Genetic susceptibility to tardive dyskinesia in chronic schizophrenia subjects: III. Lack of association of CYP3A4 and CYP2D6 gene polymorphisms, *Schizophrenia Research*, junij 2005, 75(1), 21–26
11. Žvan V., Osnove psihofarmakoterapije, *Obzornik zdravstvene nege*, 1987, 21, 287–296
12. Drago A., Giegling I., No Association of a Set of Candidate Genes on Haloperidol Side Effects, *Plos one* 7 (10): e44853. doi:10.1371/journal.pone.0044853, oktober 2012
13. <http://www.drugs.com/ppa/haloperidol.html> (15. 03. 2016)
14. Kudo S., Ishizaki T., Pharmacokinetics of Haloperidol, An Update, *Clinical Pharmacokinetics*, december 1999, 37(6), 435–456
15. Kato Y., Nakajima M., Human UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in haloperidol glucuronidation and quantitative estimation of their contribution, *Drug metabolism and disposition*, februar 2012, 40(2), 240–248
16. Shin J-G, Khadidjatou K., Potent inhibition of CYP2D6 by haloperidol metabolites:

- stereoselective inhibition by reduced haloperidol, *British Journal of Clinical Pharmacology*, januar 2001, 51(1), 45–52
17. Roh H-K., Chung J-Y., Plasma concentrations of haloperidol are related to CYP2D6 genotype at low, but not high doses of haloperidol in Korean schizophrenic patients, *British Journal of Clinical Pharmacology*, september 2001, 52(3), 265–271
 18. Yukawa E., Hokazono T., Population Pharmacokinetics of Haloperidol Using Routine Clinical Pharmacokinetic Data in Japanese Patients, *Clinical Pharmacokinetics* 2002, 41(2), 153–159
 19. Avent KM., DeVoss JJ., Cytochrome P450-mediated metabolism of haloperidol and reduced haloperidol to pyridinium metabolites, *Chemical research in toxicology*, julij 2006, 19(7), 914–920
 20. Fang J., MyKay G., In Vitro Characterization of the Metabolism of Haloperidol Using Recombinant Cytochrome P450 Enzymes and Human Liver Microsomes, *Drug metabolism and disposition*, december 2001, 29(12), 1638–1643
 21. De Leon J., Glucuronidation enzymes, genes and psychiatry, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, marec 2003, 6(1), 57–72
 22. Georges Wermuth C., Aldous D., *The Practice of Medicinal Chemistry*, 4th-edition, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, Elsevier, 2015, 375–374
 23. Holthe M., Rakvåg N. T., Sequence variations in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7 (*UGT2B7*) gene: identification of 10 novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) and analysis of their relevance to morphine glucuronidation in cancer patients, *The Pharmacogenomics Journal*, 2003, 3, 17–26
 24. Panagiotidis G., Arthur W. H., Depot Haloperidol Treatment in Outpatients With Schizophrenia on Monotherapy: Impact of CYP2D6 Polymorphism on Pharmacokinetics and Treatment Outcome, *Therapeutic drug monitoring*, avgust 2007, 29(4), 417–422
 25. <http://www.krka.si/sl/zdravila-in-izdelki/zdravila-na-recept/haldol-depoinjekcije/1337/#title> (15.3.2016)
 26. <http://www.krka.si/sl/zdravila-in-izdelki/zdravila-na-recept/haldoltablete/1335/#title> (15. 3. 2016)
 27. <http://www.medsafe.govt.nz/profs/datasheet/h/Haldolinj.pdf> (15. 3. 2016)
 28. <http://www.krka.si/sl/zdravila-in-izdelki/zdravila-na-recept/haldol-inj/1336/#title> (15. 3. 2016)
 29. Brown S. C., Farmer G. R., Pharmacokinetic Factors in the Adverse Cardiovascular Effects of Antipsychotic Drugs, *Clinical Pharmacokinetics*, 2004, 43(1), 33–56
 30. Ghosh C., Marchi N., Cellular localization and functional significance of CYP3A4 in the human epileptic brain, *Epilepsia*, marec 2011, 52(3), 562–71

31. Lamba JK., Lin YS., Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54 (10), 1271–1297
32. Zahari Z., Salleh MR., Influence of CYP2D6 polymorphisms on symptomatology and side-effects of patients with schizophrenia in Malaysia, *The Malaysian Journal of Medical Sciences*, 2009, 16(3), 12–20
33. Brinkmann U., Eichelbaum M., Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1, *The Pharmacogenomics Journal*, 2001, 1, 59–64
34. Iwaki K., Sakaeda T., Haloperidol is an inhibitor but not substrate for MDR1/P-glycoprotein, *The Journal of pharmacy and pharmacology*, december 2006, 58(12), 1617–1622
35. Licinio J., Wong M., *Pharmacogenomics: The Search for Individualized Therapies*, WILEY-VCH, Weinheim, Nemčija, 2002, 159–171
36. Olson K. C., Dellinger R. W., Functional Characterization of Low-Prevalence Missense Polymorphisms in the UDP-Glucuronosyltransferase 1A9 Gene, *Drug metabolism and disposition*, 2009, 37(10), 1999–2007
37. Innocenti F, Liu W., SNP discovery and functional assessment of variation in the UDP-glucuronosyltransferase 2B7(UGT2B7) gene, *Pharmacogenetics and Genomics*, 2008, 18(8), 683–687
38. Singkham N., Towanabut S., Influence of the UGT2B7 -161C>T polymorphism on the population pharmacokinetics of lamotrigine in Thai patients, *European journal of clinical pharmacology*, 2013, 69(6), 1285–1291
39. Romero-Lorca A., Novillo A., Impacts of the Glucuronidase Genotypes UGT1A4, UGT2B7, UGT2B15 and UGT2B17 on Tamoxifen Metabolism in Breast Cancer Patients, *Plos One*, 2015, 10(7)
40. Ehmer U., Vogel A., Variation of hepatic glucuronidation: Novel functional polymorphisms of the UDP-glucuronosyltransferase UGT1A4, *Hepatology*, 2004, 39(4), 970–977
41. Villeneuve L., Girard H., Novel functional polymorphisms in the UGT1A7 and UGT1A9 glucuronidating enzymes in Caucasian and African-American subjects and their impact on the metabolism of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin and flavopiridol anticancer drugs, *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, oktober 2003, 307(1), 117–128
42. Wang Q., Zhao L., Effects of UGT2B7 Genetic Polymorphisms on Serum Concentrations of Valproic Acid in Chinese Children With Epilepsy Comedicated With Lamotrigine, *Therapeutic drug monitoring*, 2016, 38(3), 343–349
43. Kastelic M., Koprivsek J., MDR1 gene polymorphisms and response to acute risperidone treatment, *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, marec 2010,

34 (2), 387–392

44. Fang J., Song J., In vitro characterization of the oxidation of a pyridinium metabolite of haloperidol by human placenta: the effect of smoking, *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, 2012, 15(4), 538–547
45. Kalqutkar AS., Taylor TJ., Assessment of the contributions of CYP3A4 and CYP3A5 in the metabolism of the antipsychotic agent haloperidol to its potentially neurotoxic pyridinium metabolite and effect of antidepressants on the bioactivation pathway, *Drug metabolism and disposition*, 2003, 31(3), 243–249
46. Pan L., Vander Stichele R., Effects of smoking, CYP2D6 genotype, and concomitant drug intake on the steady state plasma concentrations of haloperidol and reduced haloperidol in schizophrenic inpatients, *Therapeutic drug monitoring*, 1999, 21(5), 489–497
47. <http://www.zdravila.net/navodilo.php?navodilo=s-002974.pdf&dir=smpc> (2. 2. 2017)
48. Bakken G. V., Molden E., Metabolism of the active metabolite of quetiapine, N-desalkylquetiapine in vitro, *Drug metabolism and disposition*, 2012, 40(9), 1778–1784
49. Potkin S. G., Thyrum P. T., Alva G., The safety and pharmacokinetics of quetiapine when coadministered with haloperidol, risperidone, or thioridazine, *Journal of clinical psychopharmacology*, 2002, 22(2), 121–130
50. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165964265> (2. 11. 2016)
51. Chong S.-A., Tan E.-C., Smoking and tardive dyskinesia: lack of involvement of CYP1A2 gene, *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 2003, 28(3), 185–189
52. <https://www.pharmgkb.org/pathway/PA165111375> (2. 11. 2016)
53. Bošković M., Grabnar I., Vloga vitamina E in omega-3 polinenasičenih maščobnih kislin pri omejevanju oksidativnih poškodb pri zdravljenju shizofrenije s haloperidolom: doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2013
54. Kay SR., Fiszbein A., The The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia, *Schizophrenia Bulletin*, 1987, 13(2), 261–276
55. <https://msu.edu/course/sw/840/stocks/pack/axisv.pdf> (20. 6. 2017)
56. <http://www.waombudsman.org/files/2013/09/AIMS-Test-Abnormal-Involuntary-Movement-Test.pdf> (20. 6. 2017)
57. Simpson GM., Angus JW., A rating scale for extrapyramidal side effects, *Acta psychiatrica Scandinavica. Supplementum.*, 1970, 212, 11–9
58. Barnes TR., A Rating Scale for Drug-Induced Akathisia, *British Journal of Psychiatry*, 1989, 154, 672–676