

Farmakogenomika v zdravljenju astme

Pharmacogenomics in asthma treatment

Vojko Berce, Uroš Potočnik

Povzetek Med posamezniki obstajajo velike razlike v učinku protiastrmatične terapije, ki so pogojene predvsem z različnim genetskim zapisom. Namen farmakogenomike je poiskati tiste polimorfizme, ki so povezani z vsemi učinki določenega zdravila. Farmakogenomika pri astmi zaenkrat proučuje predvsem vpliv genov, ki kodirajo receptorje za zdravila, komponente postreceptorske signalne transdukcije in transkripcijske dejavnike. Največ raziskav je bilo narejenih na področju farmakogenomike beta2 agonistov. Mutacija Arg/Arg na mestu 16 gena ADRB2, ter mutacije v genih LTC4S, ALOX5 in CRHR1 spremenijo odziv na protiastrmatično terapijo. Cilj farmakogenomike astme pa je poiskati čimbolj učinkovito protiastrmatično zdravilo z čimmanj stranskimi učinki individualno za vsakega posameznika na podlagi njegovega genotipa.

Ključne besede: farmakogenomika, astma, polimorfizmi

Abstract: There are substantial differences in the effect of antiasthmatic therapy between individuals which are dependent on the diversity of the genetic code. The purpose of pharmacogenomics is to find out those polymorphisms, which are connected with all effects of certain drug. For now the pharmacogenomics of asthma above all study the influence of the genes which code for drug receptors, signal transduction components and transcription factors. Most studies were done in the field of pharmacogenomics of beta2 agonists. Gene mutations that are known to alter the response to asthma therapy include Arg/Arg at position 16 in ADRB2 gene, mutations of LTC4S and ALOX5 and CRHR1 variants. The goal of pharmacogenomics is to find out most efficient drug without adverse side effects individually suited for each patient on basis of his genotype.

Key words: pharmacogenomics, asthma, polymorphisms

1 Uvod

Pri zdravljenju astme obstajajo velike razlike v odzivu na terapijo, ki so pogojene tudi z razlikami v genetskem zapisu med zdravljenimi osebami – polimorfizmi. Polimorfizmi posameznega nukleotida (single nucleotide polymorphism – SNP) so najpogostejša oblika polimorfizmov v našem genomu (1). Farmakogenomika preučuje odnos med genotipom in odzivom na terapijo. Namen farmakogenomike je poiskati tiste polimorfizme v našem genomu, ki so povezani z vsemi učinki terapije. Cilj farmakogenomike je stratifikacija bolnikov glede predvidenega odziva na terapijo in stranskih učinkov terapije. Zaenkrat se praktično vse farmakogenomske študije pri astmi ukvarjajo s področjem farmakodinamike in ugotavljajo vpliv genetskega zapisa za receptor ali druge beljakovine, ki sodelujejo v poti delovanja zdravila na sam učinek zdravila (2). V etiopatogenezo astme in v odziv na terapijo se poleg genetskih dejavnikov vpletajo tudi številne druge lastnosti posameznika in vplivi okolja. Komponenta te kompleksnosti je tudi zelo variabilen odziv na terapijo. Verjetno pa vpliv genetskega zapisa predstavlja kar okrog 80% celokupne variabilnosti v odzivu na

protiastrmatično terapijo med posamezniki. Kljub temu s pomočjo farmakogenomike zaenkrat še ne moremo celovito predvideti odziva na protiastrmatično terapijo (3).

Pri zdravljenju astme uporabljamo več skupin zdravil:

- Agoniste beta2 adrenergičnih receptorjev (β agonisti), ki delujejo kot bronhodilatatorji
- Glukokortikoide, ki delujejo protivnetno in jih lahko apliciramo neposredno v dihala ali sistemsko
- Inhibitorje sinteze ali delovanja cisteinil levkotrienov
- Zdravila, ki jih pri nas redko uporabljamo za zdravljenje astme in za katere obstaja malo farmakogenomskih podatkov (teofilin, nedokromil).

Za prve tri skupine zdravil že obstajajo relevantne farmakogenomske študije. Kandidatni geni pri farmakogenomiki astme so predvsem tisti, ki kodirajo receptorje za zdravila, komponente postreceptorske signalne transdukcije in transkripcijske dejavnike. Upoštevati pa moramo tudi gene, ki sodelujejo v metabolizmu tarč posameznega zdravila (2). Najpomembnejši kandidatni geni pri farmakogenomiki astme in njihovi polimorfizmi so prikazani v preglednici 1.

Preglednica 1: Kandidatni geni in polimorfizmi pri farmakogenomiki astme

Table 1: Candidate genes and polymorphisms in the pharmacogenomics of asthma

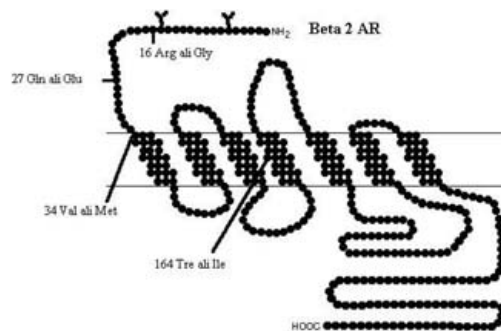
BELJAKOVINA	GEN	GENOTIP	ZDRAVILO	POMEN
Beta2 adrenergični receptor	ADRB2	16 Arg/Arg	Kratkodelujoči beta2 agonisti Dolgodelujoči beta2 agonisti	Boljši akutni učinek zdravila (6) Več poslabšanj astme in tahifilaksija ob dolgotrajni uporabi (7, 8) Brez učinka tudi v kombinaciji s steroidi (8)
Adenilil ciklaza 9	ADCY9	772 Met/Met	Beta2 agonisti in steroidi	Močnejši bronhodilatacijski učinek ob hkratni uporabi steroidov (11)
5-lipooksigenaza	ALOX5	Mikrosatelit (GGGCGG)5	Antagonisti levkotrienskih receptorjev	Dober protivnetni učinek (15)
Levkotrien C4 sintaza	LTC4S	-444 C/C	Antagonisti levkotrienskih receptorjev	Dober protivnetni učinek (16)
CRH receptor	CRHR1 CRHR2	rs242941 rs7793837	Glukokortikoidi Beta2 agonisti	Protivnetni učinek (18) Bronhodilatacijski učinek (12)

2.1 Farmakogenomika agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev pri astmi

Agonisti beta2 adrenergičnih receptorjev delujejo preko beta2 adrenergičnega receptorja (beta2AR), ki je površinski celični receptor združen s proteinom G (slika 1). Največ študij obstaja za vpliv polimorfizma Arg16Gly na učinek beta2 agonistov. Varianta Gly16 je vsaj "in vitro" povezana z zmanjšano aktivnostjo beta2AR (4, 5). V farmakogenomski študiji, ki je zajela 255 bolnikov z blago astmo pa paradoksalno ugotavljajo zmanjšano aktivnost beta2AR in tahifilaksijo po nekajtedenski redni uporabi beta2 agonistov samo pri genotipu Arg/Arg na aminokislinskem mestu 16 v genu za beta2AR. Pri astmatikih s takim genotipom je po koncu obdobja stalne uporabe beta2 agonistov prišlo tudi do pogostejših poslabšanj astme. Ligetov dinamični model kinetike receptorjev zato predpostavlja, da imajo homozigoti Gly/Gly že pred uporabo eksogenih beta2 agonistov zmanjšano aktivnost beta2AR. Genotip Gly/Gly je povezan z večjo »občutljivostjo« receptorja, katerega aktivnost zavirajo že endogeni kateholamini in zato do dodatnega padca aktivnosti ter tahifilaksije po redni uporabi beta2 agonistov ne pride. Pri osebah z genotipom Arg/Arg pa je beta2AR manj občutljiv na endogene kateholamine in do zmanjšanja aktivnosti receptorjev pride šele po dolgotrajni vsakodnevni uporabi beta2 agonistov. V skladu s temi domnevami je tudi ugotovitev, da ob enkratni uporabi beta2 agonistov (bronhodilatacijski test) FEV1 pri astmatikih in neastmatikih bolj poraste pri genotipu Arg/Arg (6). Nekatere študije kažejo, da tudi dolgotrajna uporaba dolgo delujočih beta2 agonistov z vidika pojava rezistence na beta2 agoniste bolj škodi astmatikom z genotipom Arg/Arg (7, 8). Vendar so si rezultati študij o vplivu genotipa na učinek dolgodelujočih beta2 agonistov nasprotujoči. Novejše študije tega vpliva ne potrjujejo (9).

Nekatere študije ugotavljajo tudi vpliv SNP na aminokislinskem mestu 27 (Glu27Gln), vendar je učinek tega SNP, ki se pogosto deduje vezano z SNP Arg16Gly, veliko manj pomemben (10). SNP Arg16Gly

je edini izmed polimorfizmov na področju farmakogenomike astme za katerega že sedaj obstaja dovolj dokazov o vplivu, ki bi ga lahko upoštevali (morali upoštevati?) pri načrtovanju terapije v klinični praksi. Posamezen SNP ali haplotip v enem genu ne more docela pojasniti velikih razlik v odzivu na terapijo z beta2 agonisti. Verjetno bi enigmo farmakogenomike beta2 agonistov lažje razrešili, če bi hkrati analizirali še vpliv polimorfizmov v signalni kaskadi postreceptorskega delovanja agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev in polimorfizmov v genih za proteine, ki sodelujejo pri kontrakciji/relaksaciji gladkih mišic (8). Eden takih polimorfizmov je SNP Met772Ile v genu za adenilil ciklazo tipa 9. Ta encim sodeluje pri signalni transdukciji beta2 agonistov. Aktivira ga protein Gs, ki je pridružen beta2AR. Alel Met 772 ojača signalno transdukcijo in s tem učinek beta2 agonistov, vendar samo ob hkratni terapiji s glukokortikoidi. Verjetno obstaja tudi interakcija med polimorfizmi v genu za beta2AR, polimorfizmom Met772Ile v genu za adenilil ciklazo 9 in uporabo glukokortikoidov pri vplivu na učinek beta2 agonistov (11).



Slika 1: Beta2 adrenergični receptor in nekateri pomembni polimorfizmi

Figure 1: Beta2 adrenergic receptor and some important polymorphisms

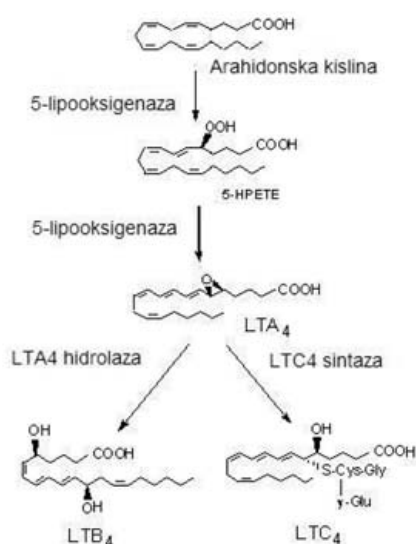
Na 5' koncu gena, ki kodira receptor za CRH (corticotrophin releasing hormone receptor - CRHR2) je pet polimorfizmov, ki v različnih študijah kažejo vpliv na odziv na terapijo z beta2 agonisti. Za polimorfizem rs7793837 ugotavljajo vpliv pri različnih populacijah (12).

Na področju farmakogenomike beta2 agonistov pri astmi ostajajo številna odprta vprašanja. Proučiti je potrebno vpliv genotipa na pojav nekaterih neželenih učinkov beta2 agonistov (predvsem na kardiovaskularni sistem). Z ozirom na široko uporabo dolgodelujočih agonistov beta2 adrenergičnih receptorjev (LABA) je potrebno glede na genotip opredeliti tiste skupine bolnikov, pri katerih lahko dolgotrajna uporaba LABA povzroči toleranco na kratkodelujoče beta2 agoniste ali celo poslabšanje astme (13).

2.2 Farmakogenomika zdravil proti levkotrienom

Levketrieni so produkti metabolizma arahidonske kisline. V patogenezi astme je najbolj raziskana vloga cisteinil levkotrienov (LTC₄, LTD₄ in LTE₄) ter LTB₄. Encim 5-lipooksigenaza (5-LO oziroma ALOX5) je vpleten v sintezo vseh bronhokonstriktornih levkotrienov. Inhibitorji encima 5-LO in antagonisti receptorjev za cisteinil levkotriene se uporabljajo za zdravljenje astme (14). Pot sinteze levkotrienov prikazuje slika 2.

Promotor gena za 5-LO vsebuje številna vezavna mesta za transkripcijske faktorje. Vezavno mesto za transkripcijski dejavnik Sp-1, ki se nahaja 100 baznih parov pred kodonom start je visoko polimorfno mikrosatelitno mesto s 3 do 6 ponovitvami sekvence šestih baznih parov. Večina belcev in afro-američanov ima na tem lokusu 5 ponovitev sekvence – divji tip. Pri kateremkoli drugem številu ponovitev je zmanjšana ekspresija gena za 5-LO in s tem sinteza najpomembnejših levkotrienov. Astmatiki, ki nimajo divjega tipa alela s petimi ponovitvami, so manj dovzetni za delovanje protilevketrienskih zdravil, ker pri njihovi astmi levkotrieni nimajo pomembnejše vloge. Tak genotip ima okrog 6 % astmatikov in ti



Slika 2: Pot sinteze levkotrienov (povzeto po 14, 15, 16)

Picture 2: Leukotriene synthesis pathway (summarised from 14, 15, 16)

bolniki so dejansko neodzivni na zdravljenje z inhibitorji 5-LO. Tudi ob terapiji z zafirlukastom - antagonistom levkotrienskih receptorjev, ugotavljajo učinek samo pri tistih astmatikih, ki imajo vsaj eno kopijo divjega tipa na vezavnem mestu za Sp-1 (15).

Encim LTC₄ sintaza sodeluje pri spajanju glutationa z osnovnim skeletom arahidonske kisline. Polimorfizem na nukleotidnem mestu A-444C v promotorju gena za LTC₄ sintazo vpliva na sintezo vseh cisteinil levkotrienov. Alel 444C omogoči funkcionalno vezavno mesto za aktivatorski protein. Astmatiki s 444C varianto imajo povečano sintezo cisteinil levkotrienov in boljši odziv na zafirlukast. Tudi padec vrednosti dušikovega monoksida (NO) po terapiji z montelukastom je izrazitejši pri homozigotih C/C ali heterozigotih A/C na tem lokusu v primerjavi z genotipom A/A (16).

Domnevamo lahko, da imajo astmatiki z določenimi precej pogostimi polimorfizmi bodisi v genu za 5-LO ali za LTC₄ sintazo manj ugoden odziv na protilevketrienska zdravila. Študij, ki bi preučevale učinek kombinacije teh polimorfizmov pa zaenkrat še ni. Prav tako ni študij, ki bi pojasnile morebitni vpliv genotipa na pojav neželenih stranskih učinkov zdravil proti levkotrienom. Nekaj odstotkov astmatikov, ki prejemajo inhibitorje 5-LO ima povišane aminotransferaze in verjetno je tudi ta pojav genetsko pogojen (17).

2.3 Farmakogenomika glukokortikoidov pri astmi

Razlika v odzivu na inhalacijske kortikosteroide med posamezniki je ponovljiva, zato domnevamo, da zanjo obstaja genetska podlaga. Nekateri študije ugotavljajo, da pri petini astmatikov pride celo do poslabšanja pljučne funkcije po nekajtedenski uporabi inhalacijskih kortikosterooidov. Pri več kot 30% astmatikov pa steroidi nimajo pomembnejšega učinka (1, 18). Asociacijska študija, ki jo je leta 2004 objavil Tantisira s sodelavci je poizkušala povezati številne polimorfizme v genih, ki kodirajo beljakovine vpletene v sintezo in delovanje steroidnih hormonov na eni strani in učinek terapije z inhalacijskimi kortikosteroidi na drugi. V študiji ugotavljajo vpliv nekaterih polimorfizmov v genu, ki kodira receptor za CRH (corticotrophin releasing hormone) – CRHR1. Domnevajo, da ima receptor CRHR1 pomembno vlogo pri regulaciji endogene sinteze steroidnih hormonov. Vpliv na učinek terapije kaže tudi kombinacija alelov v genu za CRHR1 združena v t.i. haplotip GAT. Ta haplotip ima okrog 27% ljudi. Verjetno pa so analizirani polimorfizmi samo v neravnotežju vezave z odseki gena, ki dejansko vplivajo na terapevtski odziv (19).

Podobno kot pri levkotrienih je tudi pri steroidih učinek terapije lahko vezan na aktivnost določene poti sinteze ali delovanja vnetnih mediatorjev na katere zdravilo učinkuje. Ugotavljajo, da je protiastmatski učinek inhalacijskih steroidov vezan na različen vpliv nekaterih interleukinov (IL-13) in receptorjev zanje (IL-4R) pri določenih podskupinah astmatikov. Pri astmatikih z večjo vlogo teh beljakovin je tudi učinek steroidov izrazitejši (20).

Tudi polimorfizem v genu TBX21, ki kodira transkripcijski dejavnik Tbet je povezan z učinkom steroidov pri astmi, vendar je delež astmatikov z redkejšim (minor) alelom zelo majhen in je temu ustrezen tudi splošni pomen tega polimorfizma za terapijo astme v celoti (21).

Neodzivnost na zdravljenje z glukokortikoidi je verjetno posredovana tudi z glukokortikoidnim receptorjem (GR). GR se nahaja v citosolu, po vezavi z ligandom pa se receptor aktivira in pride do translokacije kompleksa v jedro. GR v jedru aktivira prepisovanje genov za protivnetne beljakovine. Hkrati pa GR v jedru inhibira nekatere transkripcijske dejavnike, ki spodbujajo prepisovanje genov za provnetne beljakovine. Obstajata dve obliki GR, kar je posledica alternativnega izrezovanja intronov. Pogostejša oblika GR α deluje protivnetno. GR β pa nima učinka, a zasede vezavna mesta za GR in na ta način deluje dominantno negativno. Pri astmatikih, ki niso odzivni na steroide ugotavljajo povečano razmerje med mRNA za GR β in mRNA za GR α v limfocitih periferne krvi (22, 23).

Verjetno imajo tudi nekateri stranski učinki, ki se lahko pojavijo ob terapiji s sistemskimi (osteoporoza) ali inhalacijskimi (katarakta, glavkom) glukokortikoidi svoj vzrok v genetskem zapisu (2).

3 Zaključek

Cilj farmakogenomike je predvideti terapevtski odziv in morebitne neželene učinke na podlagi predhodnega genetskega testiranja. Pri astmi je vpliv posameznega gena na učinek terapije pogosto maskiran z genskimi interakcijami, lastnostmi osebe (starost, spol, rasa) in dejavniki okolja. Ugotovitve farmakogenomskih študij pri astmi tako veljajo samo za populacijo iz katere vzorec izhaja.

Med dejavniki okolja je predvsem kajenje tisto, ki lahko modificira vpliv polimorfizmov, kar ugotavljamo tudi v primeru beta2 AR. V celoti gledano pa je vpliv genetskega zapisa na učinek terapije prevladujoč in pomembnejši od ostalih vplivov.

Podatki pridobljeni s farmakogenomskimi študijami bodo prispevali k individualizaciji protiastrmatične terapije. Tako bomo lahko na podlagi predhodnega genetskega testiranja posamezno zdravilo usmerili k tistim ciljnim skupinam astmatikov, kjer pričakujemo ugoden terapevtski odziv. Zdravila pa ne bomo uvajali osebam z genotipom, ki je podlaga za pogostejše pojavljanje neželenih učinkov. Verjetno bomo pri genetskem testiranju uporabili nabor nekaj ključnih polimorfizmov, kateri nam bodo pred uvedbo določenega zdravila najbolje predvideli njegove koristi in morebitne stranske učinke. Naloga farmakogenomike je določiti te ključne polimorfizme. Pričakujemo lahko, da bomo genetsko testiranje pred uvedbo protiastrmatičnih zdravil v naslednjih nekaj letih že pričeli uporabljati v klinični praksi.

4 Literatura

1. Wechsler ME, Israel E. How pharmacogenomics will play a role in the management of asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 12-18.
2. Palmer LJ, Silverman ES, Drazen JM, Weiss ST. Pharmacogenomics of asthma treatment. In: Licino J, Wong ML. *Pharmacogenomics: The search for individualized therapies*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag, 2002: 215-234.
3. Palmer LJ, Cookson WOCM. Genomic approaches to understanding asthma. *Genome Res* 2000; 10: 1280-1287.
4. Ligett SB. The pharmacogenetics of beta2-adrenergic receptors: relevance to asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105: 487-492.
5. Tan S, Hall IP, Dewar J et al. Association between beta 2-adrenoreceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitization in moderately severe stable asthmatics. *Lancet* 1997; 350: 995-999.
6. Drazen MJ, Israel E, Boushey HA et al. Comparison of regularly scheduled with as-needed use of albuterol in mild asthma. *Asthma Clinical Research Network. N Engl J Med* 1996; 335: 841-847.
7. Taylor DR. Pharmacogenetics of beta2-agonist drugs in asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006; 31: 247-258.
8. Bhatnagar P, Guleria R, Kukreti R. Pharmacogenomics of beta2-agonist: key focus on signaling pathways. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 919-933.
9. Bleeker ER, Postma DS, Lawrance RM et al. Effect of ADRB2 polymorphisms on response to longacting beta2-agonist therapy: a pharmacogenetic analysis of two randomised studies. *Lancet* 2007 22; 370: 2118-2125.
10. Cho SH, Oh SY, Bahn JW et al. Association between bronchodilating response to short-acting beta-agonist and non-synonymous single-nucleotide polymorphisms of beta-adrenoceptor gene. *Clin Exp Allergy* 2005; 35: 1162-1167.
11. Tantisira KG, Small KM, Litonjua AA et al. Molecular properties and pharmacogenetics of a polymorphism of adenylyl cyclase type 9 in asthma: interaction between beta-agonist and corticosteroid pathways. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1671-1677.
12. , , et al. Association of corticotropin-releasing hormone receptor-2 genetic variants with acute bronchodilator response in asthma. 2008; 18: 373-382.
13. Kelly HW. Risk versus benefit considerations for the beta(2)-agonists. *Pharmacotherapy* 2006; 26: 164S-174S.
14. Drazen JM, Israel E, O'Byrne PM. Treatment of asthma with drugs modifying the leukotriene pathway. *N Engl J Med* 1999; 340: 197-206.
15. Drazen JM, Yandava CN, Dube L et al. Pharmacogenetic association between ALOX5 promotor genotype and the response to anti-asthma treatment. *Nature Genet* 1999; 22: 168-170.
16. Lam BK, Austen KF. Leukotriene C-4 synthase – a pivotal enzyme in the biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 16-19.
17. Sanak M, Simon H-U, Szczeklik A. Leukotriene C4 synthase promoter polymorphism and risk of aspirin-induced asthma. *Lancet* 1997; 350: 1599-1600.
18. . Implications of pharmacogenomics in the current and future treatment of asthma. 2007; 13: 497-505.
19. Tantisira KG, Lake S, Silverman ES et al. Corticosteroid pharmacogenetics: association of sequence variants in CRHR1 with improved lung function in asthmatics treated with inhaled corticosteroids. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 1353-1359.
20. Szeffler SJ. Pediatric asthma: an approach to pharmacogenetics analysis. *Chest* 2003; 123: 434S-438S.
21. Tantisira KG, Hwang ES, Raby BA et al. TBX21: a functional variant predicts improvement in asthma with the use of inhaled corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18099-18104.
22. Hamid QA, Wenzel SE, Hauk PJ et al. Increased glucocorticoid receptor beta in airway cells of glucocorticoid – insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1600-1604.
23. Goleva E, Li LB, Eves PT et al. Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid – insensitive asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 607-616.