

De rol van het Cytochroom P450-systeem op de kinetiek van geneesmiddelen, in het bijzonder van psychofarmaca

F.A.J.T.M. van den BERGH¹, M.A.M. BON¹, H. KRAAN² en I. VERMES¹

Het cytochroom P450-enzymstelsel speelt een belangrijke rol in de biotransformatie van endogene stoffen, zoals galzuren, steroïden, prostaglandines en vetzuren. Deze verzameling van haembevattende enzymen, afgekort tot CYP450 (P van pigment) dankt haar naam aan het karakteristieke spectrale absorptie-maximum van 450 nm van de koolmonoxidevorm van gereduceerd cytochroom. Het endoplasmatisch reticulum van de levercel bevat verscheidene elektronentransportsystemen die, in tegenstelling tot de ademhalingsketen, tot oxidatie leiden welke niet is gekoppeld aan fosforylering. Een van deze systemen, gezeteld in de microsomale fractie, bevat het flavoproteïne NADPH-cytochroom P450-reductase en cytochroom P450. Naast endogene stoffen katalyseert dit systeem tevens de hydroxylering van allerlei exogene stoffen zoals bij de detoxificatie van psychofarmaca (1-4). Kenmerkend voor beide enzymen is hun induceerbaarheid onder invloed van barbituraten en andere geneesmiddelen.

Een tweede elektronentransportsysteem bevat de flavoproteïnen cytochroom b5-reductase en cytochroom b5. Dit systeem katalyseert vooral de vorming van onverzadigde vetzuren.

Omzetting van geneesmiddelen

De biotransformatie van geneesmiddelen is onder te verdelen in twee fasen: fase 1 (oxidatie- en reductie-reacties) en fase 2 (conjugatiestappen). In fase 1 zijn reacties zoals oxidatie, reductie, oxygenering en hydroxylering verantwoordelijk voor de eerste stap in de omzetting van lipofiele geneesmiddelen. Het merendeel van deze enzymen behoort tot het CYP450-systeem. Hierbij ontstaan reactieproducten die als substraat dienen voor de tweede fase: conjugatie met glucuronzuur, sulfaat en/of glutathion. De aldus gevormde, beter in water oplosbare metabolieten worden vervolgens via de nieren uitgescheiden. Op deze wijze beïnvloeden vorming, concentratie en klaring van de actieve componenten dus, naast dosering en

therapie-trouw van de patiënt, de werkzaamheid van het geneesmiddel. Er bestaat een sterke intra-individuele variatie in de metabole omzettingssnelheid. Deze wordt veroorzaakt door (tijdelijk optredende) remming en inductie van de enzymstelsels. Naast leeftijd, co-medicatie en ziekte wordt de activiteit van sommige enzymen sterk beïnvloed door dieet, alcoholgebruik en roken (5). Interindividuele variatie bestaat eveneens en berust op het veelvuldig voorkomen van genetische mutanten resulterend in soms grote verschillen in eiwitexpressie en katalytische activiteit. Dergelijke frequent voorkomende mutaties worden betiteld als genetische polymorfismen. Als gevolg onderscheidt men drie fenotypes. Naast de normale extensive metabolizers (EM) zijn er de poor metabolizers (PM): ten gevolge van meestal autosomaal recessief optredende mutaties vertoont de homozygote mutant een sterk verlaagde omzettingssnelheid van het geneesmiddel die daardoor in sterk verhoogde spiegels in het bloed aantoonbaar is. De ultra-extensive metabolizers (UEM) vertonen door versterkte enzymexpressie juist een hogere omzettingssnelheid met als gevolg lagere spiegels. Dit laatste polymorfisme is autosomaal dominant aanwezig (6).

P450-subfamilies

Ofschoon tientallen CYP-families bekend zijn, zijn slechts een beperkt aantal betrokken bij de omzetting van geneesmiddelen, zoals antidepressiva, antipsychotica, β -blokkers en cardiaca. De klinisch meest relevante families staan weergegeven in tabel 1. Voor een uitgebreider overzicht, zie (7). Hun nomenclatuur is gebaseerd op een combinatie van letters en cijfers: Het eerste cijfer geeft de familieklasse weer, de hoofdletter de subfamilie en het tweede cijfer het individuele gen. Zo codeert bijvoorbeeld CYP2D6 voor de familie CYP-2, met subfamilie D en isovorm 6. Om onderscheid te maken tussen wild type en de talrijke mutaties is recent een nieuwe nomenclatuur voorgesteld die orde moet scheppen in de oude verwarrende naamgeving voor CYP2D6 (8). De verschillende allelen worden daarbij onderscheiden door toevoeging van een asterisk, een arabisch cijfer voor het specifieke allel (lees: de hoofdmutatie) en een letter voor aanvullende submutaties. Het betreffende allel wordt cursief aangegeven. Zo codeert bijvoorbeeld het allel *CYP2D6*3* voor een frameshift mutatie in het 2D6-gen die in de homozygote vorm in een deficiënt debrisoquine hydroxylase resulteert.

Ziekenhuis Medisch Spectrum Twente¹ en Twents Psychiatrisch Ziekenhuis², Enschede

Correspondentie: Dr. F.A.J.T.M. van den Bergh, Laboratorium Medisch Spectrum Twente, Postbus 50 000, 7500 KA Enschede. Ingekomen: 18.02.99

Tabel 1. Overzicht van klinisch relevante CYP450-enzym-families en hun meest karakteristieke reacties

Familie	karakteristieke reactie	substraten o.a.
CYP1A	benzopyreen-hydroxylering	caffeine, clozapine, paracetamol, theofylline
CYP2C	steroïdhydroxylering	antidepressiva, o.a. amitriptyline en clomipramine barbituraten, clonazepam, fluoxetine, omeprazol warfarine, tolbutamide, diclofenac
CYP2D	debrisoquine-hydroxylering	antidepressiva, o.a. nortriptyline, clomipramine en selectieve serotonine heropnameremmers (SSRI's) antipsychotica, o.a. thioridazine en haloperidol β-blokkers, zoals propranolol en penbutolol
CYP2E	ethanol oxidatie	ethanol, paracetamol, caffeine, halothaan
CYP3A	steroïdhydroxylering	cortisol, testosteron, cocaïne, benzodiazepines, fluoxetine, rifampicine, cyclosporine

Fenotypering, genotypering en hun klinische relevantie

Uit bovenstaande volgt dat zowel genotype als externe factoren van invloed kunnen zijn op de omzettingssnelheid en dus op het bereiken van een optimale dosering. De klinische consequenties van een PM-fenotype zijn hogere concentraties aan werkzame stof, mogelijk toxische bijwerkingen en overdreven respons op normdoseringen, terwijl verhoogde enzymactiviteit bij het UEM-fenotype gepaard gaat met relatieve onderdosering en verminderde respons. Fenotypering was tot enige jaren geleden de enige methode hierin inzicht te verwerven en problemen bij het instellen van de dosering te voorkomen. Hierbij wordt aan de patiënt een proefdosing debrisoquine, mefenytoïne of andere stof toegediend, waarvan bekend is dat deze specifiek wordt omgezet door één bepaald enzymstelsel. De metabole ratio van de uitgangsstof en zijn hydroxymetabooliet, gemeten in plasma of urine, is daarbij een maat voor de omzettingssnelheid in de patiënt. Het kwantitatief urine verzamelen, bijvoorbeeld ten behoeve van de instelling op antidepressiva bij psychiatrische patiënten, verloopt echter vaak problematisch. Ook het frequent uitvoeren van venapuncties en kostbare spiegelbepalingen zijn niet aantrekkelijk. Genotypering biedt daarentegen een aantal duidelijke voordelen: eenmalige bepaling bij de patiënt waarvoor slechts 200 µl veneus bloed nodig is, geen storende invloeden van co-medicatie, snel en goedkoop. Het prospectief genotyperen levert met name bij veel gebruikte psychofarmaca belangrijke voorspellende informatie voor de plasmaspiegels in relatie tot de therapeutische bandbreedte. Deze bandbreedte is vaak smal.

Tabel 2. Overzicht van enkele belangrijke substraten voor CYP2D6 en CYP2C19

	CYP2D6	CYP2C19
anti-arrhythmica, antihypertensiva en β-blokkers o.a.	propranolol timolol flecaïne metoprolol debrisoquine	propranolol timolol urapidil
anti-epileptica, anxiolytica o.a.		fenytoïne mefenytoïne (desmethyl)- diazepam
tricyclische antidepressiva o.a.	amitriptyline clomipramine desipramine nortriptyline	amitriptyline clomipramine imipramine
antipsychotica o.a.	clozapine haloperidol flufenazine thioridazine	
selectieve serotonine heropname remmers (SSRI's)	fluoxetine (desmethyl) citalopram fluvoxamine	fluoxetine citalopram
diversen o.a.	amfetamine codeïne tramadol XTC	barbituraten omeprazol proguanil warfarine tolbutamide

Tabel 3. Veel voorkomende genetische polymorfismen in CYP2D6

Naam	Mutatie	Allelfrequentie in de kaukasische bevolking (%)
<i>CYP2D6*1</i>	geen	
<i>CYP2D6*2</i>	diverse substituties	30
<i>CYP2D6*3</i>	frameshift	5
<i>CYP2D6*4</i>	splicing defect	10-20
<i>CYP2D6*5</i>	gen deletie	4
Ultra-extensive metabolizers	genduplicatie of versterkte expressie	1-7

Aan de hand van enkele voorbeelden zal dit nader worden toegelicht.

Genotypering van CYP2D6

Een groot aantal psychofarmaca worden geheel of gedeeltelijk door het enzym debrisoquine 4-hydroxylase ofwel CYP2D6 omgezet (tabel 2). Het enzym wordt gecodeerd door een 4378 bp tellend gen, dat gelegen is op chromosoom 22 en negen exonen kent. Tabel 3 toont een overzicht van de meest belangrijke mutaties. Binnen de Kaukasische bevolking is 35-43% heterozygote drager van een mutant allel, waardoor 5-10% ervan ten gevolge van homozygotie of compound heterozygotie volledig deficiënt is voor het enzym (2,5). Zie ook de bijgevoegde casus (tabel 4).

Tabel 4. Casus

Een vrouw, geboren in 1950, wordt reeds 20 jaar wegens klachten van ernstige depressie behandeld in het Twents Psychiatrisch Ziekenhuis te Enschede. Behandeling met een scala aan antidepressiva heeft nauwelijks enig resultaat. Op een dosering met het tricyclisch antidepressivum nortryptiline van 150 mg/dag ontwikkelt zij een abnormaal hoge plasmaspiegel van 223 µg/l (normaal 50-175) zonder adequate respons. Ook behandeling met lithiumcarbonaat resp. tranlycypromine biedt geen soelaas. In 1996 volgt klinische opname. Patiënte reageert daarbij goed op elektroconvulsieve therapie. Om recidieven tegen te gaan wordt zij enige tijd daarna niettemin opnieuw met nortryptiline behandeld, waarop zij niet goed reageert. Daarom wordt in 1997 fluoxetine toegevoegd, een selectieve serotonine heropname remmer (selective serotonin reuptake inhibitor, SSRI). Inmiddels vond genotypering plaats en bleek zij homozygoot voor het *CYP2D6*4*-allel, dus een paar metabolizer voor het debrisoquine hydroxylase enzymstelsel. Onmiddellijk werd hierop de combinatie dosering van nortryptiline en fluoxetine gestaakt. Beide middelen worden door het *CYP2D6*-stelsel gemetaboliseerd. Aangezien SSRI's eveneens substraat zijn voor het *CYP2D6* systeem en de afbraak van nortryptiline sterk competitief remmen, ontstaat ernstig risico op bijverschijnselen o.a. in de vorm van hyperthermie, bewegingsstoornissen, extrapyramidale reacties en convulsies. Patiënte is hierop opnieuw aangemeld voor elektroconvulsieve therapie.

Dit leidt bijvoorbeeld bij dosering met nortryptiline tot een gemiddelde metabole ratio (d.i. de verhouding nortryptiline/10-hydroxynortryptiline in urine) van 1,7 bij extensive metabolizers tegenover 3,8 bij poor metabolizers. In welke mate het metabolisme vertraagd wordt, is afhankelijk van het relatieve belang van deze metabole weg voor het betreffende substraat. Indien andere CYP-wegen bij de eliminatie betrokken zijn, zal de mutatie minder effect op de eliminatie sorteren.

In de literatuur zijn verschillende methoden ontwikkeld om de belangrijkste mutaties met eenvoudige DNA-technieken op te sporen (3,8,9). Hierover is in dit tijdschrift reeds door Van der Weide gerapporteerd (3). Met behulp van geschikte primers wordt het exogedeelte rond de mutatie via PCR geamplificeerd en de producten met behulp van geschikte restrictie-enzymen geknipt. Na scheiding van de brokstukken met behulp van elektroforese ontstaan restrictieprofielen die karakteristiek zijn voor het wilde type, heterozygoot en homozygoot. Zowel de *CYP2D6*3* als de *CYP2D6*4* mutatie zijn op deze wijze te detecteren. Detectie van het "deleted" gen *CYP2D6*5* wordt door ons uitgevoerd volgens Johansson (9) met een z.g. long PCR op een fragment van 6000 bp. Door de gezamenlijke detectie van *CYP2D6*3*, *CYP2D6*4* en *CYP2D6*5* is ca. 95% op te sporen van alle PM-genotypen zoals die voor *CYP2D6* bij de Nederlandse bevolking voorkomen. Screening van 133 patiënten, afkomstig uit twee verschillende psychiatrische klinieken, die alle voor hun depressie werden behandeld, leverde een allereerste frequentie op voor de *CYP2D6*3*-mutatie van 3% en voor de *CYP2D6*4*-mutatie van 15%, hetgeen goed overeenkomt met in de literatuur opgegeven waarden (9). In een studie naar het voorkomen van genetische polymorfismen in

een populatie waar de ziekte van Parkinson door postmortaal onderzoek werd bevestigd (12), bleek de *CYP2D6*4*-mutatie significant vaker te worden gevonden in de groep van overleden patiënten met M.Parkinson (35,3% n=51), vergeleken bij nog levende patiënten (18,6% n=137) en gezonde controlepersonen (20,6% n=97). De opvallende relatie tussen overlevingsduur en het voorkomen van de mutatie suggereert een mogelijke associatie met de snelle progressie van de ziekte van Parkinson.

Sommige individuen dragen 2 of meer kopieën van een functioneel *CYP2D6* allel op één DNA-streng waardoor zij een verhoogde enzymactiviteit vertonen (UEM type). Deze afwijking is eveneens met behulp van long PCR op te sporen (9-11). Door amplificatie van een fragment van 3,5 kb lang, volgens een gemodificeerde methode van Johanson (1998, unpublished) waarbij tevens als controle op de amplificatie een fragment van 5 kb van het gehele gen wordt geproduceerd, zijn wij in staat het UEM-genotype vast te stellen. Het voorkomen van het UEM-type ligt binnen de Nederlandse populatie ergens tussen 1 en 7% (9). In de door ons gescreende psychiatrische patiënten (n=55) hebben wij deze mutatie in homozygote vorm echter tot op heden nog niet kunnen aantonen. Juist bij poliklinisch behandelde psychiatrische patiënten is deze laatste genotypering interessant. Bij onvoldoende respons op het antidepressivum en het vermoeden van onderdosering kan door genotypering onderscheid gemaakt worden tussen slechte "compliance", welke frequent voorkomt, en versnelde omzetting van het medicament bij UEM.

Genotypering van *CYP2C19*

Ook van het *CYP2C19*-enzym, mefenytoïne 4-hydroxylase, dat verantwoordelijk is voor de omzetting van een aantal tricyclische antidepressiva en barbituraten (tabel 2) komen verschillende vormen voor.

De prevalentie van de PM-vorm in de Kaukasische bevolking is ongeveer 3-5%, in het negroïde ras ca. 4%, terwijl deze in de Aziatische bevolking 13-23% bedraagt (4,13). Hieraan ten grondslag liggen twee mutaties: *CYP2C19*2* (ook wel m1 genaamd) betreft een G→A omzetting in exon 5 van het gen, die resulteert in een "splice defect". Dit allel maakt 75-80% uit van de defecte allelen in Kaukasiërs en Japanners (13). De *CYP2C19*3* (ook wel m2 genaamd) mutatie veroorzaakt in exon 4 een premature stop; dit allel is verantwoordelijk voor de overige 20% van de allel afwijkingen doch is tot nu toe alleen gesignaleerd bij Aziaten. Methodes voor genotypering zijn beschreven (14,15) die eveneens gebruik maken van eenvoudige technieken zoals PCR-amplificatie en restrictieanalyse. De mutatie m1 bleek in ons laboratorium goed aantoonbaar. In een Nederlandse populatie van 106 gezonde personen vonden wij een allereerste frequentie van ongeveer 16,5%, overeenkomend met een homozygootfrequentie voor de *CYP2C19*2* mutant van 3%, hetgeen goed overeenstemt met de beschreven waarde van 3-5% in het Kaukasische ras (16). Ofschon de mutatie dus niet zeldzaam is, vindt deze analyse op dit moment in ons laboratorium geen klinische toepassing.

Samenvattend

Door middel van merendeels eenvoudige DNA-technieken kan genotypering worden uitgevoerd op de meest voorkomende CYP2D6- en CYP2C19-mutaties. Hierdoor is klassificatie mogelijk in PM-, EM- en UEM-fenotype, hetgeen in een aantal gevallen een belangrijke voorspellende waarde heeft voor de te verwachte respons op medicatie. Naast de voordelen van de keuze van het juiste geneesmiddel in de juiste dosering, voorkomt dit de weken vergende instelperiode, het optreden van nare bijwerkingen en het risico van verkeerde co-medicatie. Een dergelijke pretherapeutische genotypering leidt echter niet in alle gevallen tot het beoogde resultaat: de vaak uitgebreide co-medicatie waarbij meerdere stoffen via meerdere enzymsystemen worden omgezet, leidt dan tot complexe interacties. Gevoegd bij de invloed van allerlei externe factoren op aanbod, omzetting en klaring, zoals bijvoorbeeld roken, voedingsgewoonten en ziekten zoals leverfunctiestoornissen, blijkt het plaatje minder rooskleurig dan het soms lijkt. Elders in dit tijdschrift (Van der Weide, J. 1999) zal hierop nader worden ingegaan.

Literatuur

1. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22: 1-21.
2. Dahl M-L, Bertilsson L. Genetically variable metabolism of antidepressants and neuroleptic drugs in man. *Pharmacogenetics* 1993; 3: 61-70.
3. Van der Weijde J, Leusink D. Opsporing van trage en snelle metaboliseerders van psychofarmaca met behulp van PCR. *Ned T Klin Chem* 1994; 19: 149-152.
4. Linder MW, Prough RA, Valdes Jr. R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem* 1997; 43: 254-266.
5. Van der Weide J, Steijns LSW. Cytochrom-P450 afhankelijk genesmiddelmetabolisme: invloed van genetische aanleg, co-medicatie, zikete, dieet en roken op CYP-activiteit. *Ned T Klin Chem* 1996; 21: 290-296.
6. Coutts RT. Polymorphism in the metabolism of drugs, including antidepressant drugs: comments on phenotyping. *J Psychiatr Neurosci* 1994; 19: 30-44.
7. Gonzalez FJ, Skoda RC, Dimura S, Umeno M, Zanger UM, Nebert DW et al. Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquin metabolism. *Nature* 1988; 331: 442-446.
8. Daly AK, Brockmüller J, Broly F, Eichelbaum M, Evans WE, Gonzalez FJ, Huang J-D et al. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 193-201.
9. Johansson I, Lundqvist E, Dahl M-L, Ingelman-Sundberg M. PCR-based genotyping for duplicated and deleted CYP2D6 genes. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 351-355.
10. Lovlie R, Daly AK, Molven A, Idle JR, Steen VM. Ultrarapid metabolizers of debrisoquine: characterization and PCR-based detection of alleles with duplication of the CYP2D6 gene. *FEBS letters* 1996; 392: 30-34.
11. Steijns LSW, Van der Weijde J. Ultrarapid drug metabolism: PCR-based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem* 1998; 14: 914-917.
12. Esselink RAJ, Bon MAM, Ballering LAP, Jansen Steur ENH, De Vos RAI, Vermes I. Genotypering van Cytochrom P450 2D6 bij de ziekte van Parkinson. *Ned T Klin Chem* (abstract) 1997; 22: 138.
13. De Morais SMF, Wilkinson GR, Blaisell J et al. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in Japanese. *Molecular pharmacology* 1994; 46: 594-598.
14. Goldstein JA, Blaisdell J. Genetic tests which identify the principal defects in CYP2C19 responsible for the polymorphism in mephenytoin metabolism. *Methods in enzymology* 1996; 272: 210-218.
15. Masimirembwa C, Bertilsson L, Johansson I, Hasler JA, Ingelman-Sundberg M. Phenotyping and genotyping of S-mephenytoin (cytochrome P450 2C19) in a Shona population of Zimbabwe. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 57: 656-661.
16. Ward SA, Goto F, Nakamura K, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. S-mephenytoin 4-hydroxylase is inherited as an autosomal recessive trait in Japanese families. *Clin Pharmacol Ther* 1987; 42: 96-99.

Ned Tijdschr Klin Chem 1999; 24: 223-228

Genotypering bij psychiatrische behandeling: is het echt bruikbaar?

J. van der WEIDE¹, M.J.M. van WEELDEN² en L.S.W. STEIJNS¹

De enzymen van het cytochrom-P450 (CYP) systeem zijn betrokken bij het oxidatieve metabolisme van een groot aantal geneesmiddelen, waaronder veel psychofarmaca. Sommige CYP-enzymen zijn gene-

tisch polymorf, er komen mutante allelen voor die doorgaans resulteren in een afwijkende enzymactiviteit. Het gevolg is dat de metabole capaciteit van het CYP-systeem van persoon tot persoon vaak sterk varieert. Er wordt onderscheid gemaakt tussen trage, normale en snelle metaboliseerders.

Van de CYP-enzymen is CYP2D6 het beste onderzocht. In 1990 is de eerste genetische variant gekarakteriseerd: een allel met diverse puntmutaties, resulterend in een niet-actief enzym (1). Inmiddels zijn meer dan 50 mutante CYP2D6-allelen in kaart gebracht (2,3). De allelen zijn op grond van hun

Klinisch Chemisch Laboratorium¹ en Apotheek², Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Ermelo

Correspondentie: Dr. J. van der Weide, Psychiatrisch Ziekenhuis Veldwijk, Klinisch Chemisch Laboratorium, Postbus 1000, 3850 BA Ermelo.
Ingekomen: 13.01.99