

Pracę tę dedykuję

Mojej Żonie, Córce i Rodzicom

Rafał Świechowski

UM79/SSD/2015

**Polimorfizmy i ekspresja wybranych cytochromów u
pacjentów z depresją**

Polymorphisms and expression of selected cytochromes in patients with
depression

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Zakład Biochemii Farmaceutycznej i Diagnostyki Molekularnej

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Promotor: prof. dr hab. n. farm. Ewa Balcerczak

Promotor pomocniczy: dr n. farm. Agnieszka Jeleń

Łódź 2019

*Chciałbym serdecznie podziękować mojej promotor
Pani prof. dr hab. Ewie Balcerczak za opiekę naukową,
cenne wskazówki, pozytywną atmosferę podczas pracy, ale także
za cierpliwość i wiarę w moje możliwości*

*Dziękuję **Panu prof. dr hab. Markowi Mirowskiemu**
za pomoc merytoryczną i motywację do stworzenia tej rozprawy*

*Dziękuję **Pani dr Agnieszce Jeleń** za cenne uwagi oraz
pomoc podczas wykonywania części praktycznej*

Spis treści

Wykaz skrótów	7
Wstęp	10
Część teoretyczna	11
1. Depresja	11
1.1 Epidemiologia	11
1.2 Etiopatogeneza	13
1.2.1 Model biologiczny	14
1.2.2 Modele psychoanalityczne	17
1.2.3 Depresja na tle chorób somatycznych	18
1.3 Diagnostyka zaburzeń depresyjnych	19
1.3.1 Klasyfikacja ICD-10 (ang. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)	19
1.3.2 Rozpoznanie według klasyfikacji ICD-10	20
1.3.3 Rozpoznanie według klasyfikacji DSM-V (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)	21
1.3.4 Testy psychometryczne	22
1.4 Leczenie zaburzeń depresyjnych	24
1.4.1 Leczenie farmakologiczne	25
1.4.2 Leczenie nefarmakologiczne	28
1.5 Depresja lekooporna (ang. treatment-resistant depression, TRD)	29
2. Cytochrom P450	32
2.1 Cytochrom P-450 a stres oksydacyjny	34
2.2 Podrodzina CYP3A	34
2.2.1 Izoenzym CYP3A4	35
2.2.1.1 Polimorfizm <i>CYP3A4*1B</i> (rs2740574)	35
2.2.2 Izoenzym CYP3A5	37

2.2.2.1 Polimorfizm <i>CYP3A5</i> *3 (rs776746).....	37
2.3. Podrodzina <i>CYP2C</i>	38
2.3.1 Izoenzym <i>CYP2C19</i>	38
2.3.1.1 Polimorfizm <i>CYP2C19</i> *2 (rs4244285).....	39
2.4 Regulacja aktywności <i>CYP3A4</i>	39
Część praktyczna.....	41
1. Założenie i cel pracy	41
1.1 Założenie pracy	41
1.2 Cel pracy	42
2. Materiały i metody.....	43
2.1 Materiał.....	43
2.2 Metody.....	45
2.2.1 Izolowanie DNA	45
2.2.2 Izolowanie RNA	46
2.2.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. reverse transcription, RT).....	47
2.2.4 Polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. polymerase chain reaction, PCR)	48
2.2.5 Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism, RFLP).....	51
2.2.6 Elektroforeza w żelu agarozowym.....	52
2.2.7 PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR)	54
2.3 Analiza statystyczna	58
3. Wyniki.....	59
3.1 Ocena polimorfizmów <i>CYP3A4</i> *1 <i>B</i> , <i>CYP3A5</i> *3, <i>CYP2C19</i> *2.....	59
3.1.1 Rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów i równowaga Hardy’ego-Weinberga w grupie kontrolnej i badanej	59
3.1.2 Polimorfizm <i>CYP3A4</i> *1 <i>B</i>	63

3.1.2.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną.....	63
3.1.2.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej	65
3.1.3 Polimorfizm <i>CYP3A5</i> *3	66
3.1.3.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną.....	66
3.1.3.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej	68
3.1.4 Polimorfizm <i>CYP2C19</i> *2.....	69
3.1.4.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną.....	69
3.1.4.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej	71
3.2 Ocena względnego poziomu ekspresji genu <i>CYP3A4</i>	74
3.2.1 Porównanie względnego poziomu ekspresji genu <i>CYP3A4</i> z cechami klinicznymi.....	75
3.2.2 Porównanie względnego poziomu ekspresji genu <i>CYP3A4</i> w zależności od rodzaju genotypu polimorfizmu <i>CYP3A4</i> *1B.....	81
3.2 Podsumowanie wyników	81
Dyskusja	83
Wnioski.....	94
Streszczenie	95
Summary.....	97
Spis rycin	99
Spis tabel.....	101
Piśmiennictwo	102

Wykaz skrótów

AML – (ang. Acute Myeloid Leukemia) ostra białaczka szpikowa

BCAC – (ang. Breast Cancer Association Consortium)

BDI – (ang. Beck Depression Inventory) inwentarz depresji Becka

BDNF – (ang. brain-derived neurotrophic factor) neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

bp – (ang. base pair) par zasad

cDNA – (ang. complementary DNA) komplementarne DNA

CES-D – (ang. Center for Epidemiologic Studies Depression Scale)

CRD – (ang. Chronic Resitance Depression) przewlekła lekooporna depresja

DNA – (ang. deoxyribonucleic acid) kwas deoksyrybonukleinowy

DSM – (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) diagnostyczny i statystyczny podręcznik zaburzeń psychicznych

EM – (ang. efficient metabolizer) osoba z prawidłowym metabolizmem leków

ESM – (ang. European Staging Model) europejski model klasyfikacji stadiów depresji lekoopornej

GBD – (ang. Global Burden of Disease) – globalne obciążenie chorobami

GST – (ang. glutathione S-transferases) transferaza S-glutationowa

HDRS – (ang. Hamilton Depression Rating Scale) skala depresji Hamiltona

HWE – (ang. Hardy-Weinberg equilibrium) równowaga Hardy’ego-Weinberga

ICD – (ang. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems) Międzynarodowa Statystyczna Klasyfikacja Chorób i Problemów Zdrowotnych

IM – (ang. intermediate metabolizer) osoba o obniżonym metabolizmie leków

MAOI – (ang. monoamine oxidase inhibitors) inhibitory monoaminooksydazy

MCP-1 – (ang. Monocyte Chemoattractant Protein 1) białko chemotaktyczne monocytów

mRNA – (ang. messenger RNA) informacyjny, matrycowy RNA

NDRI – (ang. norepinephrine-dopamine reuptake inhibitors) inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny i dopaminy

NRI – (ang. norepinephrine reuptake inhibitor) inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny

OCAC – (ang. Ovarian Cancer Association Consortium)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PCR – (ang. polymerase chain reaction) reakcja łańcuchowa polimerazy

PM – (ang. poor metabolizer) osoba o wolnym metabolizmie leków

PXR – (ang. pregnane X receptor) receptor pregnanu X

RFLP – (ang. restriction fragment length polymorphism) polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

RFT – reaktywne formy tlenu

RNA – (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

RT – (ang. reverse transcription) reakcja odwrotnej transkrypcji

RXR – (ang. retinoid X receptor) receptor retinoidowy X

SNP – (ang. single nucleotide polymorphism) polimorfizm pojedynczego nukleotydu

SNRI – (ang. serotonin norepinephrine reuptake inhibitors) selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny/noradrenaliny

SSRI – (ang. selective serotonin reuptake inhibitors) selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny

TBE – (ang. Tris/Borate/EDTA buffer) bufor Tris/kwas boryny/ EDTA

TeCA – (ang. tetracyclic antidepressants) czteropierścieniowe leki przeciwdepresyjne

TLPD/TCA – (ang. tricyclic antidepressants) trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

TNF- α – (ang. tumor necrosis factor α) czynnik martwicy nowotworów α

TRD – (ang. treatment-resistant depression) depresja lekooporna

TRSM – (ang. Thase and Rush Staging Model) model klasyfikacji stadiów depresji lekoopornej

UM – (ang. ultrarapid metabolizer) osoba z bardzo szybkim metabolizmem leków

WHO – (ang. World Health Organization) Światowa Organizacja Zdrowia

XREM – (ang. xenobiotic response element module) region odpowiedzi na ksenobiotyki

YLD – (ang. Years Lived with Disability) lata przeżyte z niepełnosprawnością

Wstęp

Depresja stała się powszechną chorobą, która dotyka setki milionów ludzi na całym świecie. Dane z 2014 wskazują, że 16% amerykańskiego społeczeństwa miało przynajmniej jeden epizod depresyjny w swoim dotychczasowym życiu [1]. Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia (ang. World Health Organization, WHO), depresja jest najczęściej występującym zaburzeniem psychicznym na świecie [2].

Bardzo ważną kwestią jest szybka diagnostyka i podjęcie właściwego leczenia. Obecnie psychiatria dysponuje środkami, którymi potrafi w znaczny sposób złagodzić objawy chorobowe depresji lub całkowicie je zniwelować. Większość pacjentów ma również możliwość leczenia ambulatoryjnego. Obligatoryjnym wskazaniem do zastosowania leczenia szpitalnego jest nasilenie objawów choroby, które w zależności od stopnia mogą stanowić realne zagrożenie dla życia pacjenta. Niestety nie każda osoba zgłasza się ze swoim problemem do lekarza. Według statystyk około 60 % chorych nie szuka pomocy u specjalisty [3].

Jeden na trzech pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi nie zauważa pozytywnych skutków leczenia pierwszym zastosowanym antydepresantem. Jak wynika z danych klinicznych, znaczna część leczonych, uzyskuje słaby efekt leczniczy, a 20% przejawia widoczne symptomy choroby na dwa lata od momentu diagnozy [4]. Przyczyną tego stanu rzeczy może być specyficzny podtyp depresji nazywany depresją lekooporną, u podstaw której znajdować się mogą zmiany w metabolizmie stosowanych leków. Dużą rolę w poszukiwaniu przyczyn lekooporności zaczyna odgrywać farmakokinetyka oraz farmakogenetyka. Analiza wchłaniania, transportu, biodostępności, metabolizmu i wydalania poszczególnych ksenobiotyków staje się ważnym elementem w badaniu molekularnych podstaw chorób afektywnych. Cały czas trwają badania nad możliwością personalizacji terapii i poprawą skuteczności leczenia.

Celem poniżej pracy była ocena ekspresji genu *CYP3A4* u pacjentów chorych na depresję. Ocenie poddano również częstość występowania wariantów allelicznych: *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Część teoretyczna

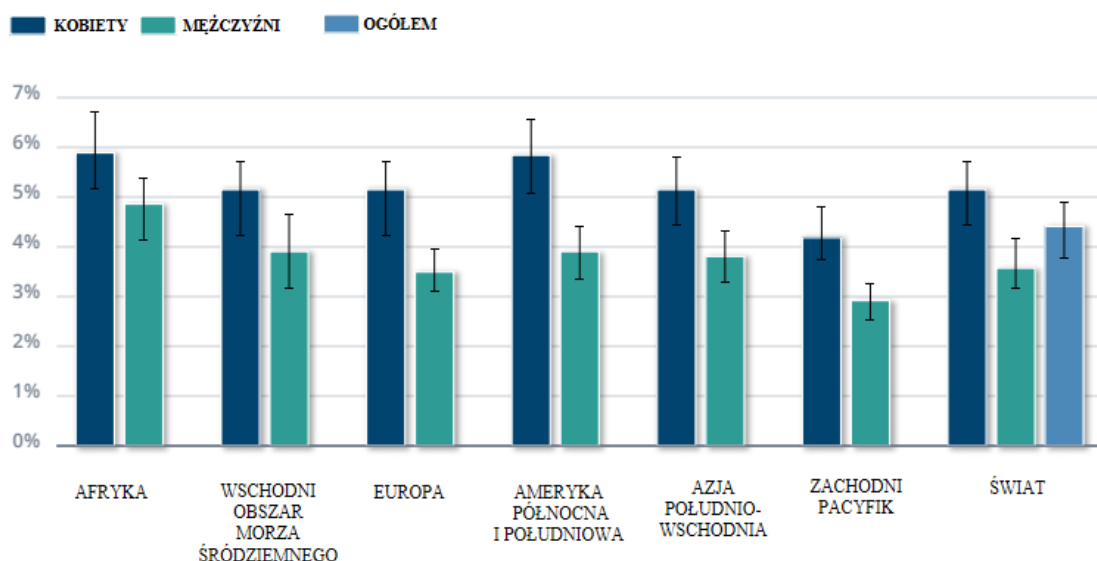
1. Depresja

Depresja to choroba psychiczna należąca do grupy zaburzeń afektywnych, których głównym objawem są zaburzenia nastroju. U chorego obserwujemy permanentne uczucie smutku, brak zdolności do odczuwania radości, uczucie lęku oraz szereg innych objawów występujących indywidualnie [5]. Według danych WHO, zaburzenia depresyjne są główną przyczyną niezdolności do pracy na świecie oraz najczęściej diagnozowanym zaburzeniem psychicznym [6].

1.1 Epidemiologia

Z danych udostępnionych przez GBD (ang. Global Burden of Disease) w 2018 roku wynika, że na depresję cierpi około 264 milionów ludzi na całym świecie. To około 4% całej populacji ludzi [7, 8]. Na depresję częściej chorują kobiety niż mężczyźni. Odsetek chorych kobiet szacuje się na 5,4%, w przypadku mężczyzn wskaźnik ten jest niższy i wynosi 3,6%. Prawie połowa wszystkich chorych zamieszkuje dwa rejony: rejon południowo-wschodniej Azji (27%) oraz rejon zachodniego Pacyfiku (21%). Tak duży odsetek chorych z tych dwóch rejonów świata wynika zapewne z ogromnej liczby ludności państw takich jak Indie i Chiny. Biorąc pod uwagę odsetek chorych względem całej populacji zamieszkującej dany region, najwyższe rozpowszechnienie choroby występuje: w przypadku kobiet w Afryce oraz rejonie Ameryk (w obu przypadkach około 6%), w przypadku mężczyzn w Afryce (około 5%). Najniższe rozpowszechnienie depresji obserwujemy zarówno w przypadku kobiet jak i mężczyzn w rejonie zachodniego Pacyfiku (wynosi odpowiednio 3,1% oraz 2,9%). Geograficzne zróżnicowane rozpowszechnienia zaburzeń depresyjnych przedstawiono na rycinie 1. Statystyki z 2017 roku dotyczące Polski wskazują, że częstość występowania choroby bez podziału na płeć wynosi 5,1% [8].

Rycina 1. Rozpowszechnienie zaburzeń depresyjnych wśród kobiet i mężczyzn w różnych regionach świata wg. WHO [8]



Badania z 2009 i 2014 roku wykazały, że średni współczynnik rozpowszechnienia choroby w ciągu całego życia wśród populacji ogólnej wynosił około 7%. W rzeczywistości współczynnik może być jeszcze wyższy, ze względu na niewystarczającą diagnostykę w państwach słabo rozwiniętych i wykorzystywanie danych pochodzących z nieoficjalnych klasyfikacji diagnostycznych. W poszczególnych regionach częstość występowania depresji waha się znacząco od 3% (Japonia) do 16,2% (Stany Zjednoczone) [1, 9]. Depresja dotyka ludzi w każdym wieku, jednak charakteryzuje ją różna częstotliwość, zależna od grupy wiekowej. Ryzyko zachorowania wzrasta wraz z wiekiem osiągając maksimum w przedziale wiekowym 54-72 lata. Z obserwacji wynika, że problem depresji coraz częściej pojawia się w grupie młodych dorosłych (20-29 lat), ale także w grupie dzieci [8].

Depresja nie tylko upośledza jakość życia pacjenta, ale także wyłącza go z aktywnego funkcjonowania w społeczeństwie. Wartość YLD (ang. Years Lived with Disability) dla zaburzeń depresyjnych to ponad 50 milionów lat. Stanowi to około 7% wszystkich YLD, co sprawia, że zaburzenia depresyjne są jedną z trzech najczęstszych przyczyn obniżających jakość życia. Depresja jest również silnie związana ze zjawiskiem samobójstwa. Z 5-letnich badań wynika, że blisko 15 % pacjentów chorych na depresję podjęło przynajmniej jedną próbę samobójczą. Ryzyko śmierci w wyniku samobójstwa u pacjentów z depresją w ciągu całego życia szacuje się na 6 % [1].

Ryzyko nawrotu choroby jest bardzo wysokie. Pacjenci u których wystąpił epizod depresyjny narażeni są na nawrót choroby z 50-80 % szansą. Ryzyko wzrasta wraz kolejnym epizodem. W przypadku przebytych dwóch epizodów choroby, ryzyko wynosi już 80-90% [10]. Badania przeprowadzone przez Solomon w 2000 wskazują, że z 318 obserwowanych pacjentów, kolejny epizod choroby wystąpił u 64%. Ryzyko nawrotu zwiększało się o 16% z każdym kolejnym epizodem, a zmniejszało wraz z wydłużaniem się okresu remisji [11].

1.2 Etiopatogeneza

Przyczyny depresji nie są do końca poznane. Do szerokiej listy czynników predysponujących oraz mających udział w rozwoju choroby można zaliczyć te ze sfery psychologicznej i ekonomicznej: zły status materialny, negatywne przeżycia z dzieciństwa, neurotyczny typ osobowości, przewlekły stres, niska aktywność w społeczeństwie (brak partnera i przyjaciół, samotność) oraz te ze sfery biologicznej: niezdrowy tryb życia (siedzący tryb życia, źle zbilansowana dieta), choroby przewlekłe, czynniki genetyczne, nadużywanie substancji psychoaktywnych, płeć żeńska [12]. Istotny wpływ czynników genetycznych potwierdzają badania przeprowadzone na bliźniętach oraz analizy rodowodu. Współistnienie choroby u bliźniąt monozygotycznych kształtuje się na poziomie 40-50 %, a w przypadku bliźniąt dizygotycznych na poziomie 25% [9]. W przypadku krewnych I stopnia ryzyko zachorowania wynosi 10-25 %. Wraz ze wzrostem liczby chorych w rodzinie, maleje wiek w którym obserwuje się pierwszy epizod depresyjny [10].

Teorie traktujące o etiologii depresji możemy umownie podzielić na modele: biologiczny i niebiologiczny. Do modelu biologicznego zaliczyć możemy najczęściej cytowaną teorię mono-aminową oraz zyskującą coraz większą popularność teorię zapalną. Najbardziej znane teorie nieoparte o model biologiczny to teoria psychodynamiczna oraz model poznawczo-behawioralny. Warto zaznaczyć, że etiopatogeneza choroby jest bardzo złożona i niewłaściwe wydaje się sprowadzanie przyczyn tej choroby do jednego czynnika. Współczesne koncepcje rozwoju depresji nie tyle odrzucają dotychczasowo poznane model, co niektóre szlaki różnych modeli próbują ze sobą połączyć.

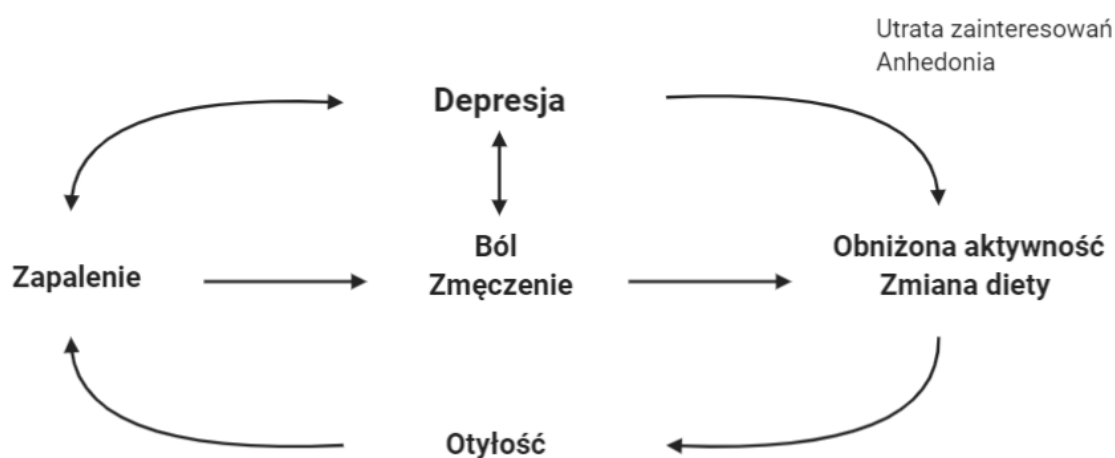
1.2.1 Model biologiczny

Podstawą do stosowania współczesnych leków przeciwdepresyjnych jest teoria monoaminowa, w której dochodzi do zaburzenia neuroprzekątnictwa w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Wskazuje się niedobór katecholamin takich jak noradrenalina i dopamina (Schlidkraut, 1965) oraz na niedobór serotoniny w synapsach komórek nerwowych (Lapin i Oxenkrug, 1969) [9]. Teoria ta oparta została na depresyjnym działaniu związków niszczących aminy, w tym rezerpiny, która łatwo przenika do OUN i zapobiega magazynowaniu się katecholamin w zakończeniach nerwów. Przez przypadek, odkryto również pozytywny wpływ inhibitorów monoaminoooksydazy na poziom serotoniny w synapsach, co również przyczyniło się do utworzenia danego modelu. Wpływ antydepresantów na poziom serotoniny i katecholamin w synapsach został później potwierdzony na modelu zwierzęcym [13]. Kolejnym dowodem na to, że serotonina może mieć istotne powiązanie z depresją są badania nad eliminacją z diety tryptofanu, aminokwasu niezbędnego do syntezy serotoniny. Ścisła dieta ograniczająca podaż tryptofanu nie miała istotnego wpływu na rozwój objawów depresyjnych u zdrowych osób, jednak spowodowała nawrót objawów u osób z remisją choroby, które zakończyły już proces leczenia [13, 14]. U pacjentów z ciężką depresją zaobserwowano również niższy poziom tryptofanu w osoczu krwi. Powiązano to zjawisko z indukcją enzymu rozkładającego tryptofan (indoloamino-2,3-dioxygenazy), który obecny jest w mikrogleju oraz neuronach. Czynniki prozapalne indukują aktywność tego enzymu, co prowadzi do ograniczenia ilości tryptofanu niezbędnego do syntezy serotoniny [15, 16].

W ostatnich latach coraz ważniejsza staje się teoria zapalna depresji. Wpływ czynników zapalnych w etiologii zaburzeń depresyjnych nie budzi już wątpliwości. Rola stresu fizycznego i psychicznego, jako czynnika prowadzącego do rozwoju depresji poprzez mechanizmy biochemiczne i hormonalne, została potwierdzona przez badaczy [16]. Liczne badania wykazują zwiększoną, w grupie pacjentów z depresją, aktywność enzymów takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, mieloperoksydaza, indukowalna syntaza tlenu azotu [17]. Są to enzymy biorące udział w procesie zapalnym, ale także związki, w tym odpowiedzialne za powstawanie reaktywnych form tlenu (RFT). Związki te negatywnie wpływają na tkankę nerwową osłabiając proces neurogenezy i równocześnie nasilając procesy neurodegeneracyjne. Efekt działania tych związków na mózg jest nasilony ze względu na duże zapotrzebowanie tkanki mózgowej

na tlen oraz słabszą ochronę przed działaniem stresu oksydacyjnego wynikającą z niskiego stężenia antyoksydantów [16]. U osób z depresją obserwuje się obniżony poziom cynku i koenzymu Q10, które są naturalnymi antyoksydantami [18]. U chorych stwierdza się również podwyższony poziom cytokin prozapalnych: czynnika martwicy nowotworów α (ang. Tumor necrosis factor α , TNF- α) oraz interleukiny 1 i 6. TNF- α zwiększa zwrotny wychwyt serotoniny oraz indukuje indoloamino-2,3-dioksygenazę, która rozkłada tryptofan, ograniczając tym samym produkcję oraz dostępność serotoniny [17]. Cytokiny prozapalne wpływają również na biodostępność dopaminy. Na modelu zwierzęcym wykazano, iż stymulacja immunologiczna z użyciem interferonu α prowadzi do zmniejszenia stężenia dopaminy oraz jej metabolitów w płynie mózgowo-rdzeniowym. Obniżenie stężenia dopaminy można powiązać z niektórymi objawami depresji takimi jak: brak motywacji, spowolnienie psychoruchowe, zmęczenie [19]. Poszukując źródeł procesu zapalnego prowadzącego do depresji warto zwrócić uwagę na problem otyłości. W ciągu ostatnich dwóch dekad, rozpowszechnienie otyłości oraz powiązanych z nią jednostek chorobowych znacznie wzrosło. Liczne badania wykazują istotny związek pomiędzy otyłością a procesem zapalnym, tym samym na obustronny związek pomiędzy otyłością a depresją [20]. Biała tkanka tłuszczowa produkuje szereg związków biologicznie czynnych zwanych adipokinami, ale także chemokiny i cytokiny prozapalne (interleukinę 6 oraz TNF- α). Białko chemotaktyczne monocytów MCP-1 (ang. Monocyte Chemoattractant Protein 1) powoduje migracje makrofagów oraz limfocytów T do tkanki tłuszczowej, która w odpowiedzi uwalnia cytokiny prozapalne. W mechanizmie tym upatruje się szeroko pojętą aktywację układu immunologicznego, która może być odpowiedzialna za rozwój cukrzycy typu 2, choroby wieńcowej serca, nowotworów oraz także depresji [21].

Rycina 2. Schemat zamkniętego koła otyłość-zapalenie-depresja [18]



Kolejnym argumentem przemawiającym za teorią zapalną jest zaburzenie funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercza u pacjentów ze zdiagnozowaną depresją. Zjawisko to występuje u blisko 50-75 % pacjentów i objawia się podwyższonym stężeniem glikokortykoidów, zmianą profilu ich wydzielania oraz anatomicznym wzrostem objętości przysadki i nadnerczy. Pod względem fizjologicznym jest to proces bardzo podobny do działania przewlekłego stresu. Zjawisko to ma szereg następstw w postaci: osłabienia neurogenezy, zmniejszenia objętości hipokampu, osłabienia funkcji ciała migdałowatego i kory przedczołowej [16].

Powyższe badania wskazują, że zmiany w poziomie serotoniny mogą mieć istotny udział w wywoływaniu objawów depresji, jednak wydaje się, że nie są czynnikiem wystarczającym do rozwoju tej choroby.

U pacjentów chorych na depresję obecne są zmiany anatomiczne w OUN, które manifestują się obniżoną ilością komórek nerwowych oraz osłabionym procesem neurogenezy. Procesowi temu odpowiada zubożona ilość czynnika neurotrofowego pochodzenia mózgowego BDNF (ang. brain-derived neurotrophic factor) [10]. W przypadku depresji jak i innych chorób psychicznych trudno wskazać konkretny obszar mózgu odpowiadający chorobie. W literaturze przedstawiono kilka wyjaśnień takiego stanu rzeczy. Możliwe, że depresja zlokalizowana jest w wielu rejonach mózgu jednocześnie i jest wynikiem zaburzeń molekularnych w neuronach z różnych obszarów mózgu. Drugą możliwością jest istnienie osobnego systemu, który steruje kilkoma rejonami mózgu odpowiedzialnymi za sferę afektywną. Zaburzenia funkcjonowania

tego systemu mogą prowadzić do nieprawidłowej pracy wielu zaangażowanych rejonów mózgu. Mnogość objawów depresji również może wskazywać na wielorejonową genezę tej choroby. Objawy kognitywne mogą być powiązane z nieprawidłowością kory czołowej, anhedonia z brzuszny prążkowiem, natomiast objawy lęku często towarzyszące depresji, z hiperaktywacją ciała migdałowatego. Niestety, jak dotąd nie znaleziono korelacji, pomiędzy wykazywanymi objawami a nieprawidłowością poszczególnych struktur mózgu [22].

1.2.2 Modele psychoanalityczne

Według modelu psychodynamicznego depresja ma swoje źródło w wewnątrzsobowych konfliktach z przeszłości. Zygmun Freud uważał, iż przyczyną zaburzenia jest skumulowanie i skierowanie całej agresji do swojego wnętrza w wyniku czego dochodzi do obniżenia samooceny, poczucia winy, samooskarżeń, a w najgorszym wypadku do samobójstwa. Melanie Klein opracowała teorię relacji z obiektem u podstaw której leży relacja matki z dzieckiem w pierwszym roku życia. W przypadku gdy w relacji dominuje gniew i strach, nad uczuciem miłości, dochodzi wtedy do rozwoju patologicznych mechanizmów reagowania na bodźce, które mogą być również wykorzystywane w dorosłości [23].

Teorie z zakresu modelu poznawczo-behawioralnego zakładają, że osoba chora na depresję wykształciła nieprawidłowe wzorce poznawcze i reagowania. Na danym modelu oparty został rodzaj terapii, który poprzez proces uczenia, ma doprowadzić do zmiany sposobu myślenia i wykluczenia nieprawidłowych zachowań. Model psychodynamiczny charakteryzuje również pojęcie triady depresyjnej. Jest to schemat poznawczy, charakteryzujący osoby chore na depresję, który opiera się na negatywnych myślach o sobie, świecie i przyszłości [23].

1.2.3 Depresja na tle chorób somatycznych

Objawy depresji są często pomijane w przypadku pacjentów leczonych na zaburzenia somatyczne. Ma to niekorzystny wpływ na proces leczenia pierwotnej jednostki chorobowej. Wykazano korelację pomiędzy nasileniem objawów depresji a pogorszeniem stanu zdrowia pacjenta oraz obniżoną skutecznością leczenia choroby somatycznej [16].

Badania wskazują na częstsze występowanie depresji u osób z ciężką chorobą somatyczną w porównaniu do populacji ogólnej. Rozpowszechnienie depresji w takiej grupie wynosi średnio 25% i zależy od jednostki chorobowej [1]. Według danych, objawy dużej depresji ma co druga osoba chorująca na chorobę Parkinsona i ponad 50% pacjentów z zespołami bólowymi. Depresja występuje często u osób chorujących na nowotwory złośliwe, cukrzyce oraz po przebytym zawale serca bądź udarze mózgu [24].

Diagnostyka zaburzeń nastroju u osób chorujących przewlekłe jest bardzo trudna. Objawy niespecyficzne takie jak: bezsenność, zaburzenia apetytu, przewlekłe zmęczenie, mogą wynikać z zaburzeń afektu, ale także występować jako pochodna chorób somatycznych. Objawy powstałe na tle chorób przewlekłych są zazwyczaj łagodniejsze, przy jednoczesnym braku tendencji do częstszego występowania u kobiet. Istnieje błędne przekonanie, że objawy depresyjne są zwykle normalną reakcją pacjenta na chorobę somatyczną. Symptomy ze sfery psychologicznej przypisywane są złemu stanowi fizycznemu pacjenta oraz działaniom ubocznym stosowanych leków [24].

W szczególnych przypadkach, wtórne objawy depresji mogą wynikać z przyjmowania niektórych leków, w tym: leków przeciwpsychotycznych, doustnych środków antykoncepcyjnych, leków steroidowych, benzodiazepin, opioidów i interferonu.

1.3 Diagnostyka zaburzeń depresyjnych

1.3.1 Klasyfikacja ICD-10 (ang. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems)

Opierając się na obowiązującej Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób ICD-10, możemy wyróżnić [25]:

- a. Pojedynczy epizod depresyjny (F32):
 - Łagodny epizod depresyjny (F32.0).
 - Umiarkowany epizod depresyjny (F32.1).
 - Ciężki epizod depresyjny bez objawów psychotycznych (F32.2).
 - Ciężki epizod depresyjny z objawami psychotycznymi (F32.3).
 - Inny epizod depresyjny (F32.8) – w tym depresja atypowa i maskowana.
 - Nieokreślony epizod depresyjny (F32.9).
- b. Zaburzenia depresyjne nawracające (F33) – diagnozowane wtedy gdy w przeszłości wystąpiły przynajmniej dwa, niezależne epizody depresyjne, bez symptomów maniakalnych:
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, obecny epizod łagodny (F33.0).
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, obecny epizod umiarkowany (F33.1).
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, obecny epizod ciężki bez objawów psychotycznych (F33.2).
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, obecny epizod ciężki z objawami psychotycznymi (F33.3).
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, obecnie w remisji (F33.4).
 - Inne zaburzenia depresyjne nawracające (F33.8).
 - Zaburzenia depresyjne nawracające, nieokreślone (F33.9).

1.3.2 Rozpoznanie według klasyfikacji ICD-10

Używając klasyfikacji ICD-10 diagnozę stawia się na podstawie występowania dwóch objawów podstawowych i dwóch objawów towarzyszących przez okres przynajmniej dwóch tygodni [26]:

- a. Objawy podstawowe
 - obniżenie nastroju;
 - anhedonia;
 - brak energii i spadek aktywności fizycznej.
- b. Objawy towarzyszące
 - zaburzenia snu;
 - zmniejszony apetyt;
 - obniżenie samooceny;
 - myśli i czyny samobójcze;
 - pesymistyczny obraz świata;
 - osłabienie koncentracji;
 - uczucie lęku.

1.3.3 Rozpoznanie według klasyfikacji DSM-V (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)

W Stanach Zjednoczonych, podstawowym dokumentem klasyfikującym choroby psychiczne oraz podającym kryteria do postawienia odpowiedniej diagnozy jest Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM). Według obecnie obowiązującej wersji DSM-V, aby rozpoznać epizod dużej depresji muszą być spełnione poniższe kryteria [27]:

- a. Utrzymywanie się pięciu lub większej liczby objawów z poniższej listy (przy czym jednym z objawów musi być anhedonia bądź obniżony nastrój) przez okres co najmniej dwóch tygodni:
 - obniżony nastrój występujący przez większość dnia, odczuwany przez chorego, ale także zauważalny przez jego otoczenie;
 - anhedonia;
 - problemy ze snem (bezsenność bądź nadmierna senność);
 - znacząca zmiana wagi;
 - spowolnienie psychoruchowe odczuwane przez pacjenta oraz zarejestrowane przez otoczenie chorego;
 - brak energii i uczucie ciągłego zmęczenia;
 - niska samoocena z poczuciem winy odczuwana każdego dnia;
 - problemy z utrzymaniem uwagi oraz podejmowaniem decyzji, odnotowane zarówno przez pacjenta jak i otoczenie;
 - natrętne myśli o śmierci, myśli samobójcze bez tendencji do realizacji, planowanie samobójstwa, próba samobójcza.
- b. Objawy powodują cierpienie u pacjenta i utrudniają mu funkcjonowanie w życiu codziennym, zarówno społecznym jak i zawodowym.
- c. Obserwowane symptomy nie wynikają z przyjmowania niektórych substancji i nie są skutkiem ogólnego stanu zdrowia pacjenta.
- d. U pacjenta nie odnotowano stanu manii bądź hipomanii.

1.3.4 Testy psychometryczne

Testy psychometryczne, z których do najpopularniejszych należą: Inwentarz Depresji Becka (ang. Beck Depression Inventory – BDI) oraz Skala Depresji Hamiltona (ang. Hamilton Depression Rating Scale – HDRS), stosowane są do potwierdzenia diagnozy, oceny nasilenia choroby oraz do oceny skuteczności leczenia [28].

Inwentarz depresji autorstwa Aarona Becka jest kwestionariuszem składającym się z 21 pytań testowych dotyczących nastroju, myśli, zachowania, jakości życia oraz uczuć, na które pacjent odpowiada samodzielnie. Każde pytanie posiada 4 możliwe odpowiedzi punktowane od 0 do 3. Oceny stopnia nasilenia objawów dokonuje się po zsumowaniu wszystkich punktów. Wyższy uzyskany wynik świadczy o cięższym epizodzie depresyjnym [29]. Zmiana kryteriów diagnostycznych dla dużej depresji wywołała potrzebę uaktualnienia kwestionariusza Becka. BDI-II to obecnie używana wersja, która powstała w 1996 roku. Inwentarz przeznaczony jest dla osób w wieku 13 lat i powyżej. Zakresy aktualnej wersji przedstawiają się następująco:

- 0–13 brak depresji bądź minimalne objawy;
- 14–19 łagodna depresja;
- 20–28 umiarkowana depresja;
- 29–63 ciężka depresja.

Czułość diagnostyczna inwentarza wynosi 81% a swoistość 92% [30]. Istotną wadą jest możliwość zawyżenia bądź zaniżenia wyniku względem rzeczywistego stanu co najczęściej spowodowane jest samodzielnym wypełnianiem kwestionariusza. Na wynik może również wpłynąć miejsce w którym przeprowadzany jest inwentarz. Pacjenci uzyskują inne wyniki w zależności czy test wypełniany jest w warunkach szpitalnych czy też w domu [31].

Złotym standardem w ocenie nasilenia objawów depresyjnych jest skala depresji Hamiltona. Jej autorem jest Max Hamilton, który przedstawił pierwszą wersję w 1960 roku. Obecnie używana jest 5 wersja, która została zaktualizowana w 1980 roku. Kwestionariusz ten, w przeciwieństwie do Inwentarzu Becka, jest testem obserwacyjnym, który przeprowadzany jest przez lekarza klinicystę. Test występuje w paru wersjach, które różnią się zestawem pytań. Najczęściej używana jest wersja składająca się z 17 pytań, gdzie każdy podpunkt oceniany jest w różnej skali mieszczącej się w przedziale od 0 do 4 punktów. Zakresy do kwestionariusza 17-punktowego przedstawiają się następująco:

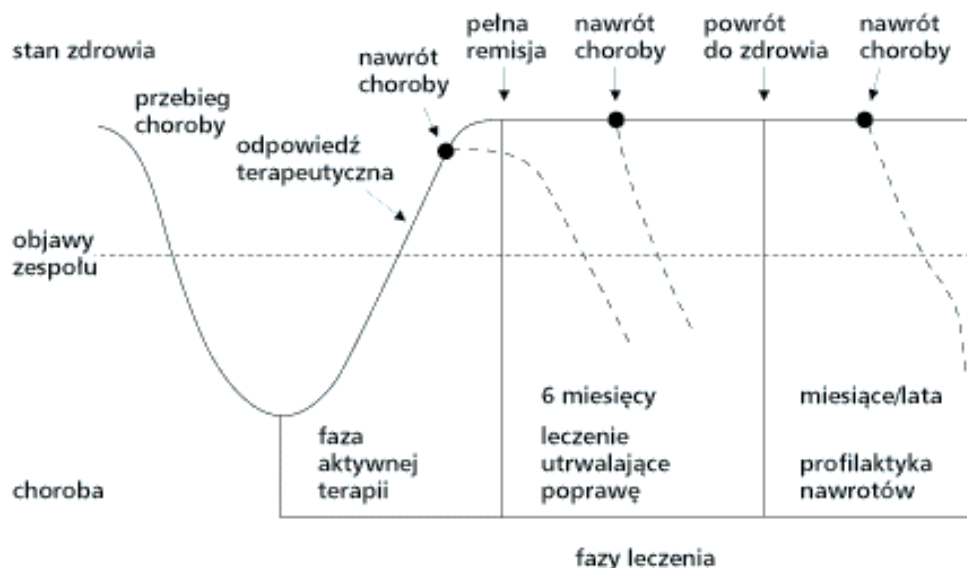
- 0–7 brak zaburzeń depresyjnych;
- 8–12 łagodna depresja;
- 13–17 depresja o nasileniu umiarkowanym;
- 18–29 ciężka depresja;
- 30–52 bardzo ciężka depresja [32].

Do wad danej wersji możemy zaliczyć długi czas przeprowadzania wywiadu, wynosi on około 20 minut. Wersja 17-punktowa coraz częściej zastępowana jest przez wersję 7-punktową, której przeprowadzenie trwa około 3–4 minut. Co ważne, wyniki wersji 7-punktowej są zgodne z wynikami wersji 17-punktowej [33]. Kwestionariusz Hamiltona jest również krytykowany za zbyt dużą ilość pytań dotyczących bezsenności względem innych, bardziej charakterystycznych objawów. W konsekwencji skuteczność leczenia danym antydepresantem może być przeszacowana w sytuacji gdy doszło do poprawy jakości snu, a nasileniu uległy myśli samobójcze [34].

1.4 Leczenie zaburzeń depresyjnych

Trzy główne metody leczenia depresji to: farmakoterapia, terapia elektrowstrząsami oraz psychoterapia. Stosowanie jednej z metod nie wyklucza możliwości stosowania drugiej, co więcej, najlepsze efekty uzyskuje się w leczeniu skojarzonym. Dobór metody leczenia zależy od bardzo wielu czynników, m.in.: wieku pacjenta, nasilenia objawów oraz etiologii zaburzenia. W przypadku reaktywnych form depresji, czyli tych które występują w skutek nagłego, traumatycznego zdarzenia, często wystarczającym postępowaniem okazuje się psychoterapia. Zaburzenia o etiologii endogennej wymagają zastosowania leczenia farmakologicznego [35]. Celem leczenia jest remisja objawów chorobowych i przywrócenie prawidłowego nastroju, często określane jako całkowity wynik ≤ 7 w skali depresji Hamiltona. Jako pozytywną odpowiedź na leczenie określa się $\geq 50\%$ zmniejszenie wyniku w HDRS w stosunku do oceny przeprowadzonej przed wdrożeniem leczenia. Takie tradycyjne podejście ma swoje wady, gdyż znaczna część pacjentów z teoretycznie pozytywną odpowiedzią na leczenie, będzie wciąż wykazywała pewne symptomy choroby, które w znaczący sposób mogą uprzykrzać życie [36]. W przypadku pełnej remisji nie przerywa się od razu procesu terapeutycznego. Przez następne 6 miesięcy stosuje się leczenie utrwalające, a po pełnym powrocie do zdrowia, stosuje się tzw. profilaktykę nawrotów. Jeżeli dojdzie do nawrotu objawów na którymkolwiek z etapów leczenia, należy powrócić do aktywnej terapii [37]. Podstawowy schemat leczenia przedstawiono na rycinie 3.

Rycina 3. Schemat leczenia przeciwdepresyjnego w zapobieganiu nawrotom choroby [38]



1.4.1 Leczenie farmakologiczne

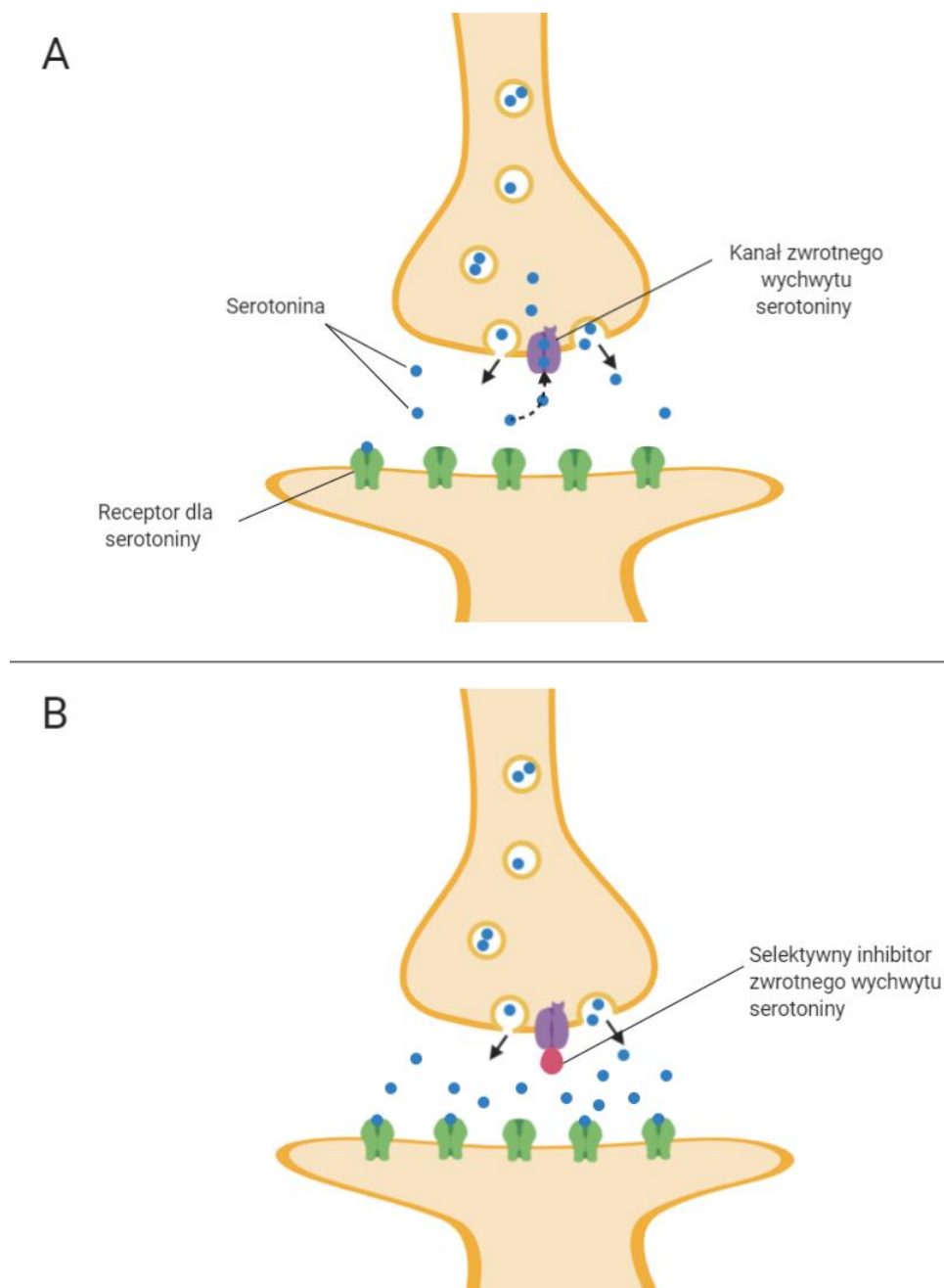
Leczenie farmakologiczne jest najczęściej wybieraną metodą leczenia zaburzeń depresyjnych. Leki stosowane w leczeniu zaburzeń afektywnych należą do różnych grup ksenobiotyków, które możemy podzielić ze względu na mechanizm działania. Wyróżniamy następujące grupy leków [10, 39]:

- a. Trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (ang. tricyclic antidepressants TLPD/TCA) – hamują zwrotny wychwyt noradrenaliny oraz serotoniny, przykłady: imipramina, amitryptylina, klomipramina, doksepina.
- b. Czterocykliczne leki przeciwdepresyjne (ang. tetracyclic antidepressants TeCA) – maprotylina hamuje zwrotny wychwyt noradrenaliny, mianseryna hamuje presynaptyczne receptory α_2 .
- c. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (ang. selective serotonin reuptake inhibitors SSRI) – przykłady: citalopram, fluoksetyna, sertalina, escitalopram, paroksetyna.
- d. Selektywne inhibitory zwrotnego wychwytu serotoniny/noradrenaliny (ang. serotonin norepinephrine reuptake inhibitors SNRI) – przykłady: wenlafaksyna, deswenlafaksyna, milnacipran, duloksetyna.
- e. Inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny (ang. norepinephrine reuptake inhibitor NRI) – przykłady: reboksetyna.
- f. Inhibitory wychwytu zwrotnego noradrenaliny i dopaminy (ang. norepinephrine-dopamine reuptake inhibitors NDRI) – przykłady: bupropion, amineptyna.
- g. Inhibitory monoaminooksydazy (ang. monoamine oxidase inhibitors MAOI) – leki 1 generacji działają nieselektywnie na obie izoformy enzymu, nowe generacje działają selektywnie oraz odwracalnie, przykłady: moklobemid.

Pierwszymi lekami stosowanymi w leczeniu zaburzeń depresyjnych były leki z grupy nieselektywnych inhibitorów monoaminooksydaz. Iproniazid przeznaczony do leczenia pacjentów z gruźlicą, okazał się skutecznym środkiem podnoszącym nastrój oraz stymulującym aktywność pacjentów. Na początku lat 50-tych XX wieku opracowano TLPD, jednak stosowanie tych leków przynosiło wiele skutków ubocznych, m.in.: suchość błon śluzowych, tachykardie, zaburzenia akomodacji oraz snu pod postacią wzmożonej senności, zaburzenia koncentracji i rytmu serca [10, 40]. W latach 80-tych wprowadzono tzw. drugą generację leków przeciwdepresyjnych, którą

stanowią SSRI. Lepsze działanie farmakologiczne oraz zdecydowanie mniejsza liczba skutków ubocznych, spowodowały że pomimo upływu lat, SSRI są jedną z najczęściej przepisywanych grup leków na zaburzenia afektywne [40]. Mechanizm działania leków z grupy SSRI przedstawiony został na rycinie 4.

Rycina 4. Mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI



A – przed podaniem leku, B – po zastosowaniu SSRI

Liczne grupy leków stosowanych jako leki przeciwdepresyjne wskazują na to, że są to środki o zróżnicowanej budowie strukturalnej i różnym mechanizmie działania. Ważnym aspektem terapii jest odpowiedni dobór leku i obserwacja skutków leczenia. Na efekt terapeutyczny stosowania antydepresantów należy poczekać około 2-4 tygodni. W przypadku braku poprawy po tym okresie wskazane jest zwiększenie dawki leku, a jeżeli po 6-8 tygodniach nie zauważa się poprawy, to należy zmienić schemat leczenia (dodanie nowej substancji lub zastosowanie leku o innym mechanizmie działania) [41]. Leczenie farmakologiczne depresji jest procesem intensywnym i długotrwałym. Konieczne jest dalsze przyjmowanie leków przez pół roku od ustąpienia objawów w celu zniwelowania ryzyka nawrotu [10].

Rewolucyjną metodą leczenia depresji okazuje się być stosowanie ketaminy. W anestezjologii ketamina stosowana jest jako środek do znieczulenia przedoperacyjnego [42]. W randomizowanych badaniach z zastosowaniem placebo, ketamina wykazywała silne działanie przeciwdepresyjne w ciągu kilku godzin od podania donosowego. Ketamina działała również na pacjentów w przypadku których inne schematy leczenia nie przynosiły satysfakcjonujących efektów. Do działań niepożądanych wynikających ze stosowania ketaminy możemy zaliczyć: halucynacje, zawroty głowy, nudności, wymioty, bóle głowy [43]. Zanos i wsp., w swoich badaniach z 2016 roku wykazali, że metabolit ketaminy - (2S,6S;2R,6R)-hydroksynorketamina, posiada działanie antydepresyjne ketaminy, jednak nie wykazuje skutków ubocznych [44]. Enancjomer S Ketaminy (Esketamina) w formie areozolu donosowego jest obecnie obiektem badań klinicznych, mającym na celu ocenę stosowania tego środka w skojarzeniu z lekiem przeciwdepresyjnym w zapobieganiu nawrotom choroby u pacjentów z depresją lekooporną [45]. W marcu 2019 roku esketamina została zarejestrowana w Stanach Zjednoczonych jako lek do stosowania w przypadkach depresji lekoopornej.

RFT zdają się odgrywać równie istotną rolę w patogenezie zaburzeń depresyjnych jak ma to miejsce w przypadku procesu starzenia. Z tego też względu, liczne badania kliniczne dotyczą wykorzystania antyoksydantów jako farmakoterapii mającej zwalczać objawy depresji. Naringenina to naturalny, silny antyoksydant występujący w wysokim stężeniu w soku z grejpfruta. Naringenina wykazuje działanie przeciwdepresyjne poprzez zwiększenie poziomu serotoniny, noradrenaliny i BDNF [18]. Badania japońskich naukowców wskazują na pozytywne efekty stosowania minocykliny w skojarzeniu z klasycznymi antydepresantami, która u pacjentów z

depresją psychiatryczną powodowała znaczącą poprawę samopoczucia i złagodzenie objawów. Minocyklina to antybiotyk z grupy tetracyklin, który wykazuje działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne i neuroprotekcyjne [46]. Kurkuma posiada silne właściwości przeciwutleniające. Wysoka dawka stosowana przez 8 tygodni u pacjentów z depresją przyniosła bardzo pozytywne skutki w postaci zmniejszenia objawów chorobowych związanych z obniżonym nastrojem [47].

1.4.2 Leczenie nefarmakologiczne

Najważniejszą, zaliczaną do nefarmakologicznych metod leczenia depresji, szczególnie w ciężkiej, lekoopornej formie tej choroby jest terapia elektrowstrząsami. Wykazuje dużą skuteczność względem pacjentów, u których leczenie farmakologiczne nie przynosi pozytywnych rezultatów. Zabieg przeprowadzany jest w znieczuleniu ogólnym w celu maksymalnego bezpieczeństwa pacjenta. Optymalizacja tej metody leczenia doprowadziła do zminimalizowania skutków ubocznych. Do najczęściej zgłaszanych efektów niepożądanych możemy zaliczyć przejściowe bóle głowy i mięśni. Do kilku dni od zakończenia zabiegu mogą występować krótkotrwałe zaniki pamięci [48].

W leczeniu depresji sezonowej wykazano skuteczność fototerapii jako metody leczenia. Codzienna terapia światłem widzialnym przynosi widoczne efekty u 3/4 pacjentów z depresją sezonową. Odnotowano również korzystne rezultaty w przypadku osób wykazujących objawy dużej depresji [10].

Deprywacja snu, czyli metoda wymuszonej bezsenności okazała się przydatna w łagodzeniu objawów depresji. Przynosi ona pozytywny efekt u prawie połowy pacjentów. Niestety, tylko u niektórych pacjentów efekt terapeutyczny trwa dłużej niż do czasu pełnej regeneracji organizmu [49].

Psychoterapia jest bardzo ważnym procesem w leczeniu depresji. W jej ramach pacjent i jego rodzina powinni zostać zapoznani z przebiegiem, objawami oraz sposobem leczenia depresji. Psychoterapia ma także na celu omawianie z pacjentem sposobu radzenia sobie w sytuacjach stresujących. Polecanym rodzajem terapii dla osób z depresją jest terapia poznawcza. Ten rodzaj psychoterapii ma na celu zmianę zaburzonych wzorców poznawczych chorego na temat własnej osoby, otoczenia i przyszłości. Leczenie terapeutyczne często łączone jest wraz z leczeniem

farmakologicznym w celu zmniejszenia resztkowych objawów oraz minimalizacji ryzyka nawrotu choroby [5].

1.5 Depresja lekooporna (ang. treatment-resistant depression, TRD)

Według danych statystycznych, liczba przypadków depresji odpornej na leczenie ciągle wzrasta. Nie istnieje uniwersalna, przyjęta definicja tego rodzaju depresji [50]. W praktyce klinicznej jest to taki podtyp choroby, w przypadku którego leczenie nie przynosi zamierzonych efektów. O depresji lekoopornej możemy mówić w przypadkach kiedy dwa schematy leczenia, z zastosowaniem odpowiedniej dawki leków, z dwóch różnych grup antydepresantów różniących się mechanizmem działania, nie przyniosły zauważalnych skutków terapeutycznych [51]. W tabeli poniżej przedstawione zostały stadia depresji lekoopornej według modelu TRSM (ang. Thase and Rush Staging Model) [50].

Tabela 1. Stadia depresji lekoopornej według TRSM [44]

Stadium 1	Brak skuteczności terapii przy zastosowaniu przynajmniej jednego schematu leczenia antydepresantem z danej klasy
Stadium 2	Brak skuteczności terapii przy zastosowaniu przynajmniej dwóch schematów leczenia antydepresantami z dwóch klas o różnym mechanizmie działania
Stadium 3	Stadium 2 plus brak odpowiedzi na lek z grupy TCA
Stadium 4	Stadium 3 oraz brak odpowiedzi na lek z grupy MAOI
Stadium 5	Stadium 4 oraz terapia elektrowstrząsami

Model europejski ESM (ang. European Staging Model) uwzględnia również czas leczenia (tabela 2) [52].

Tabela 2. Stadia depresji lekoopornej według ESM [46]

Stadium	Definicja	Czas trwania leczenia
Brak odpowiedzi na leczenie	Oporny na zastosowane leczenie przy użyciu leku z grupy: TCA, SSRI, MAOI, SNRI lub innych.	6-8 tygodni
TRD (ang. Treatment-resistant depression)	Oporny na zastosowane dwa schematy leczenia antydepresantami z dwóch różnych grup	TRD1 12-16 tygodni TRD2 18 -24 tygodni TRD3 24-32 tygodnie TRD4 30-40 tygodni TRD5 36 tygodni do 1 roku
CRD (ang. Chronic Resitance Depression)	Oporny na zastosowanie kilku schematów leczenia z użyciem różnych grup antydepresantów oraz na potencjalizację leczenia (augmentację)	Powyżej 12 miesięcy

Proces augmentacji znacząco różni się od terapii skojarzonej. Terapia skojarzona, inaczej zwana kombinowaną, obejmuje stosowanie dwóch środków farmakologicznych o różnym mechanizmie działania, przeznaczonych do leczenia danej jednostki chorobowej. W przypadku depresji, stosuje się zazwyczaj antydepresanty z dwóch różnych grup w celu zwiększenia efektu terapeutycznego [53]. Augmentacja polega na wspomaganiu działania leku przeciwdepresyjnego innym środkiem, niebędącym antydepresantem, który nie jest przeznaczony w swoim założeniu do leczenia depresji. Celem augmentacji jest przyspieszenie momentu osiągnięcia remisji objawów w przypadku kiedy monoterapia nie przynosi efektu. Najlepiej udokumentowaną skuteczność wykazuje połączenie leku przeciwdepresyjnego z solami litu bądź atypowym lekiem przeciwpsychotycznym [54]. Dołączenie soli litu do leków przeciwdepresyjnych zwiększa trzykrotnie szansę uzyskania pozytywnej odpowiedzi na leczenie w porównaniu do grupy, w której dodaje się placebo. U połowy chorych,

poprawę obserwuje się w ciągu miesiąca, a u niewielkiego odsetka nawet po tygodniu [10]. W piśmiennictwie wskazuje się również na skuteczność schematów leczenia w których dodaje się związki takie jak: hormony tarczycy, hormony płciowe (testosteron, estrogeny), beta-blokery (pindolol), benzodiazepiny [54].

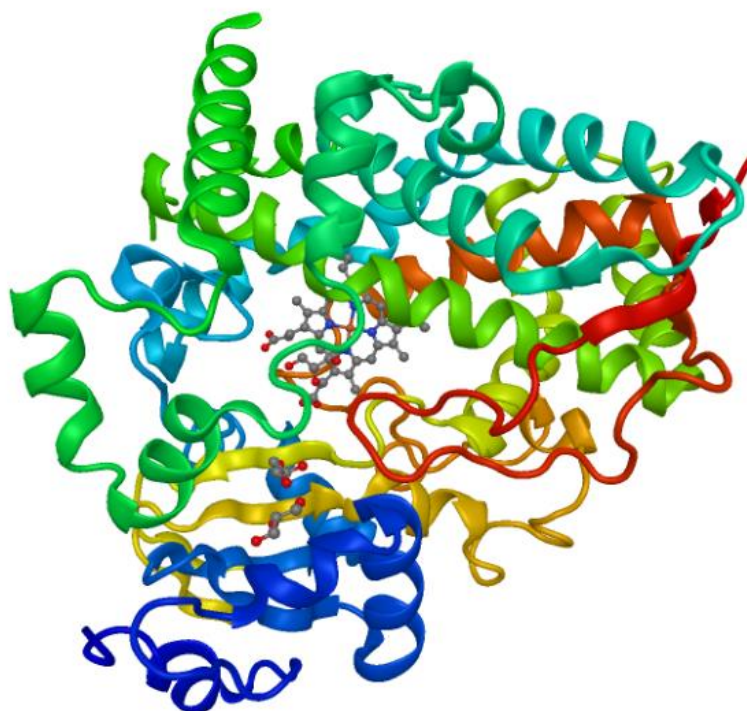
Do potencjalnych przyczyn zjawiska lekooporności u osób chorych na depresję możemy zaliczyć [10]:

- depresje w przebiegu choroby afektywnej dwubiegunowej;
- współistnienie chorób somatycznych;
- niedobór witamin z grupy B i kwasu foliowego;
- współistnienie innych zaburzeń (zaburzenia osobowości, zaburzenia lękowe, uzależnienia);
- rodzinne występowanie chorób afektywnych;
- nieprawidłowo prowadzone leczenie;
- zmiany w metabolizmie leków.

2. Cytochrom P450

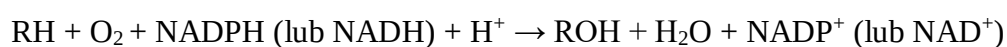
Cytochromy P450 to liczna grupa, heterogennych i wielofunkcyjnych białek o właściwościach monooksygenaz, występująca niemal we wszystkich komórkach jądrazastych ssaków za wyjątkiem tkanki mięśniowej prążkowanej. Największą aktywność białka te wykazują w hepatocytach gdzie zachodzą główne procesy detoksykacji, przewyższa ona łączną aktywność w pozostałych komórkach organizmu [55]. Cytochromy to hemoproteiny transbłonowe o masie 42-63 kDa posiadające w centrum aktywnym atom żelaza, dzięki redukcji którego, są w stanie przyłączyć dwie cząsteczki tlenu [56]. Na rycinie 5 przedstawiono budowę izoenzymu 3A5 cytochromu P450.

Rycina 5. Schemat budowy enzymu CYP3A5 [57]



Ze względu na różnicę w strukturze pierwszorzędowej, cytochromy sklasyfikowane zostały w rodziny i podrodziny. W obrębie rodziny, struktura pierwszorzędowa jest identyczna w co najmniej 40%, w przypadku podrodzin odsetek ten wzrasta do przynajmniej 55%. Poszczególne izoenzymy wykazują 95% homologii [55]. W ludzkim genomie zidentyfikowano 57 genów kodujących 58 izoenzymów cytochromu [58].

Cytochrom P450 katalizuje reakcję hydroksylacji, która przebiega według sumarycznego wzoru [55]:



gdzie RH – substrat, ROH – produkt reakcji

Cytochromy zaangażowane są w bardzo wiele reakcji zachodzących w naszym organizmie. Uczestniczą w metabolizmie związków endogennych np. odpowiadają za biosyntezę cholesterolu oraz związków steroidowych, uczestniczą w przemianach kwasów tłuszczowych i ich pochodnych. Drugą grupę przemian stanowi metabolizm ksenobiotyków wprowadzanych do organizmu, w tym leków, toksyn, kancerogenów [56]. Ze względu na mnogość izoform oraz niską specyficzność substratową tych enzymów, spektrum substratowe jest bardzo szerokie. Za transformacje ponad 90% obecnie stosowanych leków odpowiedzialne są enzymy z rodzin CYP1, CYP2, CYP3. Za metabolizm 80% ksenobiotyków odpowiadają dwie izoformy: CYP3A4 oraz CYP2D6 [59]. Na biotransformacje ksenobiotyków składają się dwie fazy. I faza obejmuje reakcje: hydroksylacji, redukcji, utleniania, hydrolizy. I faza ma zadanie przekształcenie związków w bardziej hydrofilowe oraz bardziej reaktywne. W II fazie biotransformacji, następuje sprzęganie produktów I fazy z substancjami endogennymi: kwasem glukuronowym, siarkowym, octowym, ale też glutationem. Związki po II fazie biotransformacji stają się mniej toksyczne oraz bardziej polarne. Zwiększenie polarności związków ułatwia ich wydalanie wraz z moczem. Reakcje biotransformacji ksenobiotyków prowadzą także do aktywacji proleków. W wyniku przemian I fazy substancje te ulegają przekształceniu w formę aktywną, co pozwala wyzwolić funkcje terapeutyczną [60].

2.1 Cytochrom P-450 a stres oksydacyjny

RFT możemy podzielić na wolne rodniki i cząsteczki nie będące wolnymi rodnikami. Do wolnych rodników zaliczamy: anionorodnik ponadtlenkowy, rodnik hydroperoksyłowy, rodnik hydroksylowy, rodnik peroksyłowy, rodnik alkoksylowy. Wśród RFT nie będących wolnymi rodnikami wymienić można: tlen singletowy, ozon, nadtlenek wodoru [61].

Zaburzenie równowagi pomiędzy indukcją RFT, a działaniem antyoksydantów nazywamy stresem oksydacyjnym. W wyniku stresu oksydacyjnego i działania RFT dochodzi do uszkodzeń i apoptozy komórek, modyfikacji lipidów bądź białek. RFT mogą także oddziaływać na kwasy nukleinowe czego skutkiem mogą być różnego typu mutacje [62]. Tego typu mechanizmy leżą u podłoża wielu chorób. Do wyżej wymienionych chorób związanych z RFT zaliczamy m.in.: różnego typu nowotwory, choroby serca, choroby zapalne (astma, miażdżyca), choroby neurodegeneracyjne (choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, choroba Parkinsona, schizofrenia) [61]. Badania wskazują także na udział RFT w etiologii zaburzeń depresyjnych [63, 64].

Cytochrom P450 generuje RFT w postaci anionorodnika ponadtlenkowego i nadtlenu wodoru. RFT mogą powstawać podczas utleniania substratów i rozpraszania powstającej podczas tego procesu energii. Reakcje taką nazywamy reakcją rozprężania [62]. Ilość powstających RFT zależy w głównej mierze od konkretnego izoenzymu [65], ale także od utlenianego substratu oraz pH środowiska reakcji. Różnice pomiędzy poszczególnymi izoenzymami wynikają z różnic strukturalnych w budowie rejonu odpowiadającego za wiązanie substratów [62]. Jako jedno ze źródeł RFT, aktywność izoenzymów cytochromu P450, może leżeć u podłoża chorób rozwijających się w wyniku stresu oksydacyjnego.

2.2 Podrodzina CYP3A

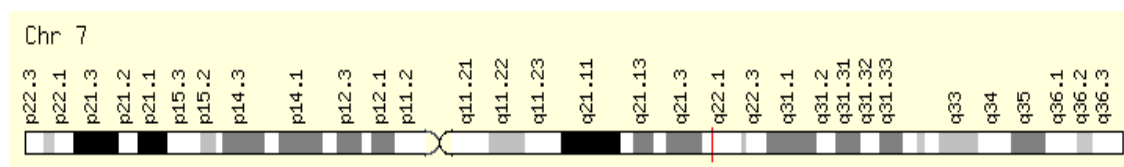
Podrodzina CYP3A stanowi najliczniejszą grupę cytochromów w wątrobie, które odpowiadają za metabolizm około 50% ksenobiotyków. Do przedstawicieli tej podrodziny zaliczamy: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 oraz CYP3A43 [66]. Przetawione izoenzymy charakteryzuje różnica w ekspresji. Najliczniej występującym w naszym organizmie izoenzymem, a zarazem najlepiej poznanym z podrodziny CYP3A jest CYP3A4. CYP3A7 występuje w dużych ilościach w życiu płodowym, a jego aktywność

zanika stopniowo po narodzinach. CYP3A43 wykazuje niską ekspresję oraz cechuje go niska aktywność kataliczna. CYP3A5 posiada bardzo zbliżone spektrum substratowe do CYP3A4 [66, 67].

2.2.1 Izoenzym CYP3A4

CYP3A4 występuje głównie w wątrobie i jelicie cienkim. Stanowi 60% wszystkich cytochromów P450 obecnych w wątrobie. Dodatkowo, enzym ten stanowi 30% puli wszystkich enzymów białkowych w tym narządzie. CYP3A4 praktycznie nie wykazuje aktywności w życiu płodowym. Wykazuje małą aktywność w tkankach takich jak: płuca, jelito grube, żołądek, prostata, mózg. W przeciwieństwie do innych cytochromów nie występuje w jądrach oraz tarczycy [55]. Gen kodujący cytochrom CYP3A4 zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 7 w regionie 7q22.1 (rycina 6). Składa się z 27,592 bp oraz zawiera 13 eksonów [68].

Rycina 6. Lokalizacja genu *CYP3A4* [56]



2.2.1.1 Polimorfizm *CYP3A4*1B* (rs2740574)

Polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (ang. Single Nucleotide Polymorphism, SNP) nazywamy zjawisko zmiany pojedynczego nukleotydu w sekwencji genu pomiędzy dwoma osobnikami bądź w przypadku jednego osobnika, między jego dwoma chromosomami, która występuje w populacji z częstością większą niż 1 %. W przypadku gdy polimorfizm występuje w sekwencji kodującej genu, dochodzi do zmiany struktury i funkcji produktu białkowego. Skutkiem zmiany pojedynczego nukleotydu w sekwencji niekodującej może być zmiana poziomu ekspresji genu. Ostatecznie, polimorfizmy mogą wpływać na aktywność enzymatyczną cytochromów co może oznaczać problemy w uzyskaniu efektu terapeutycznego. Możliwa jest również sytuacja, gdzie dany polimorfizm genu nie będzie miał istotnego wpływu na funkcjonowanie kodowanego przez niego białka. W przypadku podrodzin cytochromów gdzie poszczególne izoenzymy mają podobną specyficzność substratową,

może dochodzić do zjawiska gdzie dany izoenzym przejmuje funkcje drugiej i nie zauważa się negatywnych skutków polimorfizmu [69].

Ze względu na występujące, genetycznie uwarunkowane różnice w metabolizmie ksenobiotyków, możemy wyróżnić następujące grupy pacjentów [70]:

- osoby o wolnym metabolizmie leków (ang. poor metabolizer, PM);
- osoby o obniżonym metabolizmie leków (ang. intermediate metabolizer, IM);
- osoby z prawidłowym metabolizmem leków (ang. efficient metabolizer, EM);
- osoby z bardzo szybkim metabolizmem leków (ang. ultrarapid metabolizer, UM).

W przypadku osób oznaczonych jako PM może dochodzić do kumulacji leku i tym samym osiągnięcia dawki toksycznej, co będzie przekładało się na występowanie nasilonych objawów niepożądanych. Jednak w przypadku proleków, skuteczność leczenia u takich osób może być niska ze względu na obniżoną możliwość przekształcenia związku do formy aktywnej, która wykazuje efekt terapeutyczny. Osoby opisane jako UM wymagają zwykle większej dawki leku aby osiągnąć efekt terapeutyczny. Dochodzi u nich do szybszej przemiany związku w nieaktywny metabolit, który następnie wydalany jest z organizmu [70].

Zidentyfikowano kilkanaście wariantów polimorficznych genu *CYP3A4*. Jednym z najczęściej opisywanych w literaturze jest polimorfizm rs2740574, który odpowiada za powstawanie allelu *CYP3A4*1B*. Wpływ polimorfizmu na aktywność cytochromu *CYP3A4* nie jest do końca znany. Niektóre prace badawcze wskazują na zwiększenie ekspresji genu poprzez ograniczenie przyłączania represorów transkrypcji. Kodowany w ten sposób enzym wykazuje wyższą aktywność metaboliczną [71, 72]. Część źródeł mówi o niewielkim wpływie tego polimorfizmu na ekspresję genu *CYP3A4* [66], a jeszcze inne dane wskazują na obniżenie poziomu ekspresji genu *CYP3A4* [73]. *CYP3A4*1B* występuje z różną częstotliwością w poszczególnych grupach etnicznych. Dla populacji kaukaskiej częstość ta wynosi 2-9%. Największą częstotliwością występowania charakteryzuje się populacja Afroamerykanów (54%), najmniejszą natomiast populacja azjatycka, gdzie zmutowany allel nie występuje [74].

2.2.2 Izoenzym CYP3A5

Izoenzym CYP3A5 to białko o masie 52,5 kDa składające się z 502 aminokwasów. Gen *CYP3A5* kodujący to białko, zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 7 w regionie 7q22.1. Sekwencja białka CYP3A5 pokrywa się w 80% z sekwencją izoenzymu CYP3A4. Oba izoenzymy wykazują również bardzo podobną swoistość substratową [75].

CYP3A5 wykazuje ekspresję głównie w wątrobie, ale także w takich narządach jak: jelito cienkie, płuca, nerki, piersi oraz prostata [76]. Gen *CYP3A5* jest wysoce polimorficzny, do tej pory zidentyfikowano blisko 30 polimorfizmów. Prawidłowa wersja izoenzymu jest kodowana przez allel *CYP3A5*1* [75]. Allel *CYP3A5*2* jest uznawany za nie w pełni funkcjonalny i występuje on tylko w przypadku 1% ludzi rasy białej. *CYP3A5*4* i *CYP3A5*5* to kolejne dwie rzadkie mutacje, które według doniesień naukowych występują z częstotliwością poniżej 1%, jedynie w populacji chińskiej. Skutkiem tych mutacji jest zmniejszenie aktywności izoenzymu CYP3A5. Allele *CYP3A5*6* i *CYP3A5*7* odpowiedzialne są za produkcję niestabilnej formy białka, które nie spełnia swojej funkcji. Występują głównie w populacji Afroamerykanów (odpowiednio 17% i 10% częstotliwości występowania). Według różnych danych, w populacji kaukaskiej oraz azjatyckiej te dwa allele nie występują wcale bądź z bardzo małą częstotliwością. Najczęściej występującym zmutowanym allelem jest *CYP3A5*3* [75, 77].

2.2.2.1 Polimorfizm *CYP3A5*3* (rs776746)

Polimorfizm pojedynczego nukleotydu w pozycji 6986, w postaci zamiany adeniny na guaninę (6986A>G), powoduje zmiany w splicingu mRNA. Alternatywny splicing powoduje zmianę ramki odczytu, co skutkuje powstaniem niedojrzałego kodonu terminacyjnego. Powstające w tym procesie białko pozbawione jest swoich funkcji [75]. Allel *CYP3A5*3* występuje u blisko 85-95% populacji kaukaskiej, 60-70% populacji azjatyckiej, a najrzadziej w przypadku Afroamerykanów 27-50% [78]. Osoby z genotypem AA (*CYP3A5*1/*1*) oraz AG (*CYP3A5*1/*3*) wykazują ekspresję izoenzymu CYP3A5, przy czym w drugim przypadku aktywność enzymatyczna białka jest niższa. Homozygoty zmutowane GG (*CYP3A5*3/*3*) nie posiadają funkcjonalnej formy białka [75].

2.3. Podrodzina CYP2C

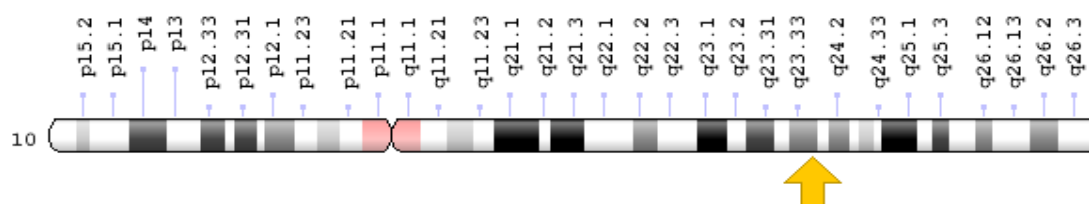
U ludzi zidentyfikowano następujące izoenzymy z rodziny CYP2C: CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19. Te 4 izoenzymy są odpowiedzialne za metabolizm 20% obecnie wykorzystywanych leków. Najwyższa ekspresja tych enzymów występuje w wątrobie, z wyjątkiem izoenzymu CYP2C18, który wykazuje ekspresję tylko na poziomie mRNA. Poza wątrobą, enzymy te występują również w nerkach, jelicie grubym, sercu, mózgu oraz płucach [79]. Izoenzym CYP2C8 ma znikomy udział w metabolizmie ksenobiotyków, charakterystyczna jest jego wysoka ekspresja w nerkach. CYP2C9 odgrywa główną rolę w metabolizmie ksenobiotyków. Zaangażowany jest m.in. w metabolizm niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz w przemianę warfaryny, leku stosowanego w terapii przeciwzakrzepowej [55].

2.3.1 Izoenzym CYP2C19

Izozym CYP2C19 kodowany jest przez gen *CYP2C19*, który zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 10 w pozycji 23.33 (10q23.33) (rycina 7). Białko to bierze udział w metabolizmie wielu, klinicznie istotnych leków. Metabolizuje m.in. proguanil (lek przeciwmalaryczny), warfarynę (antykoagulant), cyklofosfamid (lek przeciwnowotworowy), clopidogrel (lek przeciwplatek), leki działające jako inhibitory pompy protonowej oraz również leki stosowane w leczeniu zaburzeń depresyjnych (amitryptylina, klomipramina, imipramina, trimipramina, citalopram, escitalopram, sotalina, doksepina) [80].

W piśmiennictwie opisano ponad 69 wersji polimorficznych genu *CYP2C19*. Większość tych zmian to polimorfizmy pojedynczego nukleotydu regionu kodującego genu *CYP2C19* [81]. Allele *CYP2C19*2*, *CYP2C19*3* oraz *CYP2C19*17* odgrywają kluczową rolę w warunkowaniu efektywności terapii. Warianty *CYP2C19*2*, **3* odpowiadają za obniżoną aktywność enzymu, natomiast *CYP2C19*17* powoduje zwiększenie aktywności cytochromu. Homozygoty dzikie, czyli osoby posiadające dwa prawidłowe allele *CYP2C19*1* uznawane są za efektywnych metabolizerów (EM) [82]. Allel *CYP2C19*2* występuje we wszystkich grupach etnicznych, *CYP2C19*3* głównie w populacji azjatyckiej, a *CYP2C19*17* u ludzi pochodzenia europejskiego [83].

Rycina 7. Lokalizacja genu *CYP2C19* [84]



2.3.1.1 Polimorfizm *CYP2C19**2 (rs4244285)

W przypadku tego polimorfizmu dochodzi do zamiany guaniny na adeninę w pozycji 681 w eksonie 5 (681G>A), co skutkuje zmianą ramki odczytu i powstaniem skróconego, nieprawidłowego białka [82]. Allel ten jest najczęściej występującym defektem izoenzymu *CYP2C19* we wszystkich populacjach. Występowanie allelu *CYP2C19**2 związane jest z fenotypem słabego metabolizera (PM). Rozpowszechnienie fenotypu PM, wynikającego z obecności mutacji (681G>A) w genie *CYP2C19* różni się w zależności od populacji. W przypadku populacji kaukaskiej i afrykańskiej wynosi 2-5%, w przypadku populacji azjatyckiej około 15% [85]. Według innych danych z piśmiennictwa, odsetek ten dla populacji azjatyckiej może wynosić nawet 29-35% [80].

2.4 Regulacja aktywności *CYP3A4*

Cytochrom *CYP3A4* indukowany jest przez bardzo szeroką grupę ligandów (tabela 3). Indukcja *CYP3A* wzmacnia metabolizm dostarczonych substratów, co może skutkować osłabioną odpowiedzią na stosowane leki, ale może także wywołać proces zapalny wątroby. Ligandy te przyłączają się do receptora pregnanu X (PXR) [86]. PXR jest receptorem jądrowym, którego główną funkcją jest regulacja ekspresji enzymów odpowiedzialnych za metabolizm i usuwanie substancji, które stanowią również swoisty ligand dla danego receptora. Receptor ten występuje głównie w wątrobie, nerkach, jelicie cienkim oraz grubym. Po przyłączeniu liganda do receptora PXR, następuje jego aktywacja, w skutek czego łączy się on z receptorem retinoidowym X (RXR), tworząc heterodimer PXR-RXR. Następnie dimer ten, łączy się ze specyficzną, docelową sekwencją DNA. W przypadku genu *CYP3A4*, kodującego cytochrom 3A4 sekwencją docelową są regiony odpowiedzi na ksenobiotyki: XREM (ang. xenobiotic response element module) oraz ER6, których rolą jest bezpośrednia indukcja procesu transkrypcji

[87]. Receptor PXR ma również wpływ na drugą fazę biotransformacji leku poprzez regulację ekspresji enzymu S-transferazy glutationowej (GST), uczestniczącego w procesie sprzęgania produktów z glutationem [88].

Tabela 3. Przykładowe substraty cytochromu CYP3A4 z grupy leków stosowanych w leczeniu depresji, inhibitory oraz induktory [89, 90]

Substraty	• TCA (amitryptylina, imipramina, klomipramina); • SSRI (citalopram, sertalina, fluoksetyna); • SNRI (trazodon, wenlafaksyna); • pozostałe leki przeciwdepresyjne (mirtazapina, nefazodon, reboksetyna, bupropion); • leki przeciwpsychotyczne (kwetiapina).
Induktory	• stabilizatory nastroju; • barbiturany; • glikokortykosteroidy; • dziurawiec zwyczajny; • niektóre antybiotyki.
Inhibitory	• blokery kanału wapniowego; • antybiotyki makrolidowe; • aozolowe leki przeciwgrzybiczne; • inhibitory proteazy; • sok grejpfrutowy.

Część praktyczna

1. Założenie i cel pracy

1.1 Założenie pracy

Wśród substratów metabolizowanych przez kompleks cytochromów p450 możemy odnaleźć wiele substancji stosowanych w leczeniu zaburzeń depresyjnych. Zmiany w sekwencji nukleotydów genów, kodujących białka z kompleksu p450 mogą prowadzić do zwiększenia bądź zmniejszenia, a nawet zaniku aktywności poszczególnych cytochromów. Polimorfizmy wybranych w pracy cytochromów mogą mieć znaczący wpływ na proces leczenia pacjentów cierpiących na depresję, ale nie tylko. Etiologia zaburzeń depresyjnych pozostaje nie do końca wyjaśniona. Z wielu przedstawionych do tej pory teorii na temat etiologii choroby najczęściej zwolenników posiadają teorie modelu biologicznego: teoria monoaminowa oraz teoria zapalna. Zgodnie z jednym z założeń teorii zapalnej u osób chorujących na depresję, stwierdza się podwyższony poziom enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie RFT. U pacjentów chorych na zaburzenia depresyjne za stres oksydacyjny odpowiadają zbyt duże ilości generowanych RFT, ale także obniżony potencjał antyoksydacyjny. Cytochromy są bezpośrednio związane ze zjawiskiem stresu oksydacyjnego. Zmiany genetyczne w obrębie genów kodujących te białka mogą brać udział w patogenezie zaburzeń depresyjnych.

Wybór cytochromów do pracy badawczej opierał się o ich spektrum substratowe. W pracy uwzględniono te cytochromy, które odgrywają kluczową rolę w metabolizmie obecnie stosowanych leków przeciwdepresyjnych. Stosowane w badanej grupie leki znajdują się na liście substratowej ocenianych cytochromów: CYP3A4/5 (doksepina, wenlafaksyna, kwetiapina, mirazapina, citalopram, fluoksetyna, trazodon), CYP2C19 (agomelatyna, sertalina, escitalopram, citalopram, wenlafaksyna).

1.2 Cel pracy

- Ocena częstości występowania wariantów allelicznych *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* w grupie pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne nawracające oraz w grupie osób zdrowych
- Ocena względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* oraz powiązanie go z wariantem polimorficznym *CYP3A4*1B*
- Poszukiwanie korelacji pomiędzy poszczególnymi allelami i genotypami wybranych polimorfizmów i badanymi cechami:
 - wiekiem oraz płcią pacjenta;
 - wiekiem w momencie zachorowania;
 - nasileniem objawów choroby przed wdrożeniem leczenia;
 - skutecznością terapii.
- Poszukiwanie korelacji pomiędzy relatywnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami:
 - wiekiem oraz płcią pacjenta;
 - wiekiem w momencie zachorowania;
 - nasileniem objawów choroby przed wdrożeniem leczenia;
 - skutecznością terapii.

2. Materiały i metody

2.1 Materiał

Materiał do badań stanowił materiał resztkowy – krew pełna pozostała po badaniach diagnostycznych pacjentów szpitala im. Józefa Babińskiego w Łodzi, chorujących na zaburzenia depresyjne nawracające. Przekazany materiał nie zawierał danych osobowych pacjentów, nie zostały one nigdy ujawnione na potrzeby badań przeprowadzonych w powyższej rozprawie doktorskiej. Do grupy badanej włączono 72 kobiety i 36 mężczyzn. Mediana wieku w grupie wynosiła 51 lat. Z krwi pacjentów wyizolowano 108 prób DNA oraz 38 prób RNA. Materiał kontrolny stanowiło DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej pobranej od zdrowych osób (n=93). Pozostałe cechy charakteryzujące grupę badaną oraz kontrolną przedstawiono w tabeli 4. Do grupy badanej włączono 72 kobiety i 36 mężczyzn. Mediana wieku w grupie wynosiła 51 lat. Z krwi pacjentów wyizolowano 108 prób DNA oraz 38 prób RNA. Materiał kontrolny stanowiło DNA wyizolowane z leukocytów krwi obwodowej pobranej od zdrowych osób (n=93). Pozostałe cechy charakteryzujące grupę badaną oraz kontrolną przedstawiono w tabeli 4.

Pacjenci zostali zdiagnozowani przez lekarzy psychiatrów z Kliniki Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Diagnoza została postawiona zgodnie z kryteriami ICD-10 (F33.0-F33.8). Stopień nasilenia objawów depresji został oceniony na podstawie 17 punktowego kwestionariusza Hamiltona i przedstawiony w formie punktowej. Skuteczność leczenia obrazuje różnica między ilością punktów w skali Hamiltona uzyskaną przez pacjenta po zakończeniu cyklu leczenia a ilością punktów przed wdrożeniem leczenia. Pacjenci leczeni byli pojedynczymi lekami bądź kombinacją leków przeciwdepresyjnych z różnych grup. Stosowano takie leki jak: mianseryna, doksepina, wenlafaksyna, agomelatyna, kwetiapina, mirtazapina, trazodon oraz szereg leków z grupy selektywnych inhibitorów zwrotnego wychwyty serotoniny (sertalina, escitalopram, citalopram, fluoksetyna).

Opierając się o 17 punktową wersję kwestionariusza Hamiltona (rozdział 1.3.4 części teoretycznej), podział pacjentów z grupy badanej pod względem nasilenia objawów wyglądał następująco:

- pojedyncze symptomy depresji – 1 pacjent;
- łagodna depresja – 6 pacjentów;
- depresja o nasileniu umiarkowanym – 20 pacjentów;
- ciężka depresja – 63 pacjentów;
- bardzo ciężka depresja – 15 pacjentów.

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym w Łodzi (numer zgody RNN/566/08/KB) i w odniesieniu do zasad Deklaracji Helsińskiej.

Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej

Badana cecha		Grupa badana (n=108)	Grupa kontrolna (n=93)
Płeć	K	72	57
	M	36	36
Wiek (lata)	Mediana	51	40
	Minimum	17	20
	Maximum	63	54
	IQR	13	12
Wiek w momencie diagnozy (lata)	Mediana	44	—
	Minimum	14	—
	Maximum	61	—
	IQR	16	—
HDRS (punkty)	Średnia	22,1	—
	SD	6,8	—
Zmiana HDRS (punkty)	Średnia	15,4	—
	SD	6,5	—
% zmiany HDRS (%)	Mediana	71	—
	Minimum	0	—
	Maximum	100	—
	IQR	28	—

SD – odchylenie standardowe, IQR – rozstęp międzykwartylowy

HDRS to liczba punktów w skali Hamiltona opisująca stopień nasilenia choroby.

Zmiana HDRS dotyczy różnicy punktów w skali Hamiltona przed i po zakończeniu leczenia

% zmiany HDRS = (Zmiana HDRS/HDRS)*100%

2.2 Metody

2.2.1 Izolowanie DNA

Izolowanie DNA z krwi obwodowej wykonano metodą kolumnkową przy użyciu zestawu „Blood Mini” (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) zgodnie z załączoną instrukcją.

Do 1,5 ml probówki typu Eppendorf odpiępowano 400 µl krwi pełnej, a następnie dodano 200 µl roztworu do lizy erytrocytów (roztwór LE). Całość mieszano

do uzyskania przejrzystości roztworu, po czym próbkę zwirowano przy 12 000 obr/min w czasie 3 minut. Supernatant odrzucono, a do pozostałej zawartości dodano 100 μ l buforu TRIS i wymieszano przez pipetowanie. Do tak przygotowanej próbki dodano 200 μ l buforu lizującego LT zawierającego sole chaotropowe umożliwiające wiązanie DNA ze złożem krzemionkowym oraz 20 μ l proteiny K (600 U/ml). Enzym ten ma zadanie usunąć zanieczyszczenia białkowe oraz inaktywować obecne w roztworze DNazy. Próbę wymieszano i inkubowano przez 30 minut w 37°C. Następnie przeniesiono roztwór do minikolumny i wirowano przez 1 minutę przy 12 000 obr/min. Obecne w roztworze DNA wiąże się ze złożem krzemionkowym zawartym w kolumnie. Po zakończeniu wirowania, wyjęto mini kolumnę z próbówki, wylano przesącz oraz z powrotem umieszczono mini kolumnę w pustej próbówce. Dodano 500 μ l roztworu płuczącego A1 bezpośrednio na złożę krzemionkowe i wirowano przez 1 minutę przy 12 000 obr/min. Mini kolumnę przeniesiono do nowej próbówki, dodano 400 μ l roztworu płuczącego A1 i wirowano przez 2 minuty przy 12 000 obrotów. Kolumnę przeniesiono do nowych, docelowych probówek typu Eppendorf i dodano 200 μ l buforu TRIS, podgrzanego wcześniej do temperatury 75°C. Próbę inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej w celu całkowitej elucji materiału ze złoża, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 12 000 obr./min. Uzyskany materiał DNA przechowywano w zamrażarce (-20°C) do momentu dalszych analiz.

2.2.2 Izolowanie RNA

Materiał w postaci RNA izolowano z użyciem zestawu „Total RNA Mini” (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska) zgodnie z zaleceniami załączonymi przez producenta.

Do próbówki typu Eppendorf o pojemności 2 ml odmierzone 1000 μ l krwi pełnej, a następnie dodano 800 μ l fenozolu (mieszania soli chaotropowych i fenolu) i dokładnie wymieszano poprzez pipetowanie. Fenozol powoduje lizę komórek i inaktywuje obecne w roztworze endogenne rybonukleazy tak aby nie trawiły izolowanego materiału. Roztwór inkubowano przez 5 minut w 50°C. Następnie do mieszaniny dodano 200 μ l chloformu w celu ekstrakcji zanieczyszczeń białkowych, ale także w celu rozdzielenia DNA i RNA. Po 3 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej oraz wirowaniu przy 12 000 obr/min przez 10 minut dochodzi do rozdzielenia trzech faz. RNA zgromadzone jest w fazie wodnej znajdującej się na górze. Po pobraniu całego supernatantu do osobnej próbówki, dodano następnie 250 μ l

izopropanolu w celu wytrącenia RNA. Następnie całość przebiegała podobnie jak w przypadku protokołu izolacji DNA. 3-krotne wirowanie przy 12 000 obr/min wraz z płukaniem roztworem płuczącym A1 w celu oczyszczenia znajdującego się na złożu RNA z resztek detergentów oraz białek. Elucję przeprowadzono z wykorzystaniem 50 μ l czystej, jałowej, wolnej od RNaz wody. RNA przechowywano w temperaturze (-80°C) do momentu dalszych analiz.

Stężenie oraz czystość RNA oceniano przy użyciu aparatu NanoPhotometer UV/VIS (*Implen*, Niemcy). Aby określić stężenie próby wykonano pomiar absorpcji przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Przy tej długości fali, kwasy nukleinowe wykazują maksimum absorpcji wiązki światła. Zdolność pochłaniania światła w zakresie UV wynika z obecności wiązań podwójnych oraz heteroatomów w pierścieniach zasad nukleotydowych. Stężenie RNA zapisano w $\text{ng}/\mu\text{l}$.

W celu oceny czystości wyizolowanego materiału aparat wykonuje trzy pomiary przy różnych długościach fali: 230 nm, 260 nm, 280 nm, a następnie wylicza dwa współczynniki 260/280 oraz 260/230. Współczynnik 260/280 określa czystość preparatu RNA pod względem zanieczyszczenia białkami, których maksimum absorpcji przypada na długość fali $\lambda = 280$ nm. Za czyste RNA przyjmuje się wartości w przedziale 1,8-2,0. Wartości $<1,8$ świadczą o obecności białek w roztworze RNA. Współczynnik 260/230 określa stopień zabrudzenia próbki przez odczynniki stosowane w procesie izolacji. Za czyste RNA uznaje się to o współczynniku 260/230 wynoszącym 1,8-2,0.

2.2.3 Reakcja odwrotnej transkrypcji (ang. reverse transcription, RT)

Przepisanie informacji z RNA na cDNA (ang. complementary DNA) przeprowadzono przy użyciu zestawu „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit” (*Applied Biosystems*, Massachusetts, USA) zgodnie z protokołem producenta.

W pierwszej kolejności sporządzono mieszaninę reakcyjną w której na jedną próbkę składało się:

- 2,0 μ l buforu reakcyjnego 10X RT buffer;
- 2,0 μ l uniwersalnego startera oligo (dT)₂₃ (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$);
- 0,8 μ l roztworu deoksyrybonukleotydów 25X dNTP Mix (10mM);
- 1,0 μ l odwrotnej transkryptazy MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/ μ l);
- 1,0 μ l inhibitora RNaz.

Tak przygotowaną mieszaninę wymieszano poprzez worteksowanie i rozpipetowano w równej objętości 6,8 μ l do sterylnych 200 μ l probówek. Następnie całość mieszaniny uzupełniono jałową, wolną od RNAz wodą oraz RNA w stosunku zależnym od stężenia wcześniej wyizolowanego RNA, tak aby w każdej probówce reakcyjnej była identyczna masa RNA. Przyjęto, że w każdej probówce powinno znajdować się 0,18 μ g RNA co daje stężenie 0,009 μ g/ μ l RNA w każdej badanej próbce przy końcowej objętości reakcyjnej 20 μ l. Próbkę wymieszano i zwirowano, reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-rad, Kalifornia, USA). Po zakończeniu reakcji, cDNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Tabela 5. Profil termiczny reakcji odwrotnej transkrypcji

Parametr	Etap1	Etap 2	Etap 3	Etap 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Czas (min.)	10	120	5	∞

2.2.4 Polimerazowa reakcja łańcuchowa (ang. polymerase chain reaction, PCR)

W przebiegu części eksperymentalnej zoptymalizowano a następnie przeprowadzono 5 typów jakościowej reakcji PCR. Wykonano trzy amplifikacje genomowego DNA w celu namnożenia fragmentów genów: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP2C19*, które następnie posłużyły do analizy polimorfizmów *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*, namnażanie fragmentu genu *CYP3A4*, z użyciem starterów wybranych do oceny ekspresji genów oraz przepisanego cDNA. Wykonano również powielanie fragmentu genu *GAPDH* (gen metabolizmu podstawowego) dla każdego przepisanego cDNA w celu oceny poprawności przeprowadzonej reakcji odwrotnej transkrypcji.

Do amplifikacji DNA w celu oceny polimorfizmów: *CYP3A4*1B*, *CYP2C19*2* oraz do oceny jakościowej ekspresji genów *CYP3A4* i *GAPDH* użyto polimerazy DreamTaq (*Thermo Scientific Fisher*, Massachusetts, USA). Dokładne składniki mieszanin reakcyjnych zamieszczono w Tabeli 6. Do każdej przedstawionej mieszaniny reakcyjnej dodano 1 µl materiału genetycznego w postaci DNA. W celu namnożenia fragmentu genu *CYP3A5* użyto gotowego mixu reakcyjnego PCR Super Master Mix (*Bimake.com*, Houston, USA). Skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próby wyglądał następująco:

- 10 µl mixu reakcyjnego 2x PCR Super Master Mix;
- 0,5 µl Forward primer (10 µM);
- 0,5 µl Reverse Primer (10 µM);
- 8,0 µl jałowej wody;
- 1,0 µl matrycy w postaci DNA.

Tabela 6. Składniki mieszanin reakcyjnych dla PCR

	10x DreamTaq q Buffer	MgCl ₂ (25mM)	F primer	R primer	dNTP mix (10mM)	DreamTaq polymerase (5U/µl, 500U)	H ₂ O
<i>CYP3A4*1B</i>	2,5 µl	0,5 µl	0,4 µl	0,4 µl	1,2 µl	0,3 µl	18,7 µl
<i>CYP2C19*2</i>	3,5 µl	0,7 µl	0,7 µl	0,7 µl	0,4 µl	0,2 µl	12,8 µl
<i>CYP3A4 exp</i>	3,5 µl	1,0 µl	0,7 µl	0,7 µl	0,4 µl	0,2 µl	12,5 µl
<i>GAPDH</i>	3,5 µl	0,7 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,4 µl	0,2 µl	13,2 µl

Wszystkie reakcje przeprowadzono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (*Bio-rad*, Kalifornia, USA). Po zakończeniu reakcji próby przechowywano w temperaturze 4°C do momentu wizualizacji produktów w żelach agarozowych. Profil termiczny reakcji oraz użyte startery przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Profil termiczny PCR oraz wykorzystane sekwencje starterowe

Starter	Sekwencja	Liczba cykli	Profil termiczny	Wielkość produktu
F <i>CYP3A4*1B</i>	5' GGA ATG AGG ACA GCC ATA GAG ACA AGG GGA 3'	30	D 95°C, 60 sekund H 60°C, 90 sekund E 72°C, 120 sekund	385 bp
R <i>CYP3A4*1B</i>	5' CCT TTC AGC TCT GTG TTG CTC TTT GCT G 3'			
F <i>CYP3A5*3</i>	5' CAT CAG TTA GTA GAC AGA TGA 3'	40	D 94°C, 60 sekund H 55°C, 60 sekund E 72°C, 60 sekund	293 bp
R <i>CYP3A5*3</i>	5' GGT CCA AAC AGG GAA GAA ATA 3'			
F <i>CYP2C19*2</i>	5' CAA CCA GAG CTT GGC ATA TTG 3'	30	D 94°C, 60 sekund H 59°C, 60 sekund E 72°C, 60 sekund	300 bp
R <i>CYP2C19*2</i>	5' CAC AAA TAC GCA AGC AGT CAC 3'			
F <i>GAPDH</i>	5' TGG TAT CGT GGA AGG ACT C ATG AC 3'	30	D 94°C, 50 sekund H 58°C, 50 sekund E 72°C, 60 sekund	188 bp
R <i>GAPDH</i>	5' ATG CCA GTG AGC TTC CCG TTC CAG C 3'			
F <i>CYP3A4 exp</i>	5' AGT CTT TCC ATT CCT CAT CC 3'	30	D 95°C, 60 sekund H 60°C, 90 sekund E 72°C, 120 sekund	180 bp
R <i>CYP3A4 exp</i>	5' TGC TTT TGT GTA TCT TCG AG 3'			

D – denaturacja

H – hybrydyzacja

E – elongacja

2.2.5 Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism, RFLP)

Obecność alleli *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* oceniono przy użyciu metody RFLP. Metoda ta opiera się na analizie różnej długości fragmentów DNA powstałych w wyniku trawienia produktu reakcji PCR specyficznym enzymem restrykcyjnym. W wyniku mutacji dochodzi do powstania bądź zaniku miejsca restrykcyjnego, które rozpoznawane jest przez stosowany enzym. Następnie odczytuje się charakterystyczne wzory prążkowe specyficzne dla danego genotypu [91]. Zastosowane enzymy oraz ich charakterystykę przedstawiono w tabeli 8. Matrycą do reakcji RFLP był produkt PCR o znanej wielkości, wcześniej zweryfikowany na podstawie rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym (elektroforezę opisano w rozdziale 2.2.6). Amplikon poddano całonocnemu trawieniu, a powstałe fragmenty rozdzielono w żelu agarozowym.

Tabela 8. Stosowane enzymy restrykcyjne

Polimorfizm	Enzym	Rozpoznawana sekwencja	Długość fragmentów restrykcyjnych
<i>CYP3A4*1B</i>	<i>MboII</i>	5'-GAAGA(N)8-3' 3'-CTTCT(N)7-5'	AA (*1A/*1A) – 175, 169, 41 bp GG (*1B/*1B) – 210, 175 bp AG (*1A/*1B) – 210, 175, 169, 41 bp
<i>CYP3A5*3</i>	<i>SspI</i>	5'-...AATATT...-3' 3'-...TTATAA...-5'	AA (*1/*1) – 148, 125, 20 bp GG (*3/*3) – 168, 125 bp AG (*1/*3) – 168, 148, 125, 20 bp
<i>CYP2C19*2</i>	<i>SmaI</i>	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	GG (*1/*1) – 200, 100 bp AA (*2/*2) – 300 bp GA (*1/*2) – 300, 200, 100 bp

Wszystkie reakcje trawienia przeprowadzono w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-rad, Kalifornia, USA). Po zakończeniu reakcji próby przechowywano w temperaturze 4°C do momentu wizualizacji produktów w żelach agarozowych. Profile termiczne reakcji oraz składy mieszanin reakcyjnych przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Profil termiczny RFLP oraz skład mieszaniny reakcyjnej

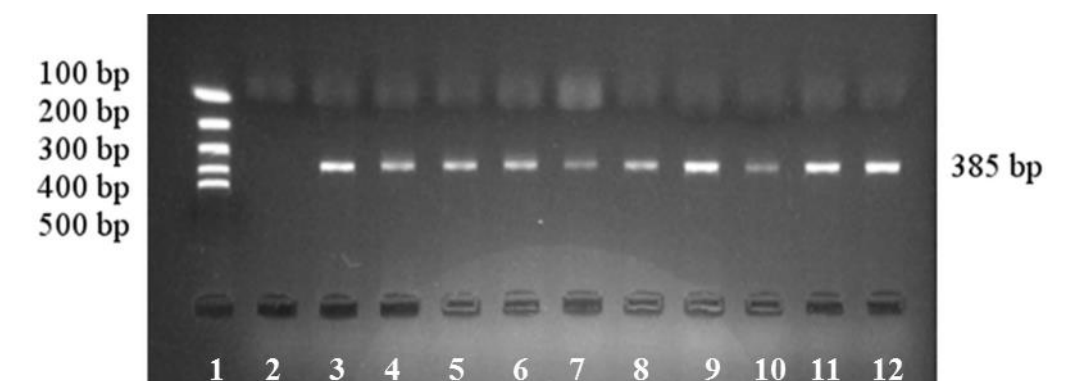
Polimorfizm	Mieszanina reakcyjna	Profil termiczny
<i>CYP3A4*1B</i>	MboII (EURx, Gdańsk Polska) – 0,1 µl Bufor – 2,0 µl Woda jałowa – 1,9 µl DNA – 16,0 µl	37°C, 16 godzin
<i>CYP3A5*3</i>	<i>SspI</i> (NewEngland Biolabs, Ipswich UK) – 0,2 µl Bufor – 2,0 µl Woda jałowa – 1,8 µl DNA – 16,0 µl	37°C, 16 godzin
<i>CYP2C19*2</i>	<i>SmaI</i> (EURx, Gdańsk, Polska) – 0,2 µl Bufor – 2,0 µl Woda jałowa – 1,8 µl DNA – 16,0 µl	25°C, 16 godzin

2.2.6 Elektroforeza w żelu agarozowym

Wizualizacje produktów reakcji PCR i RFLP przeprowadzono w żelu agarozowym. Produkty reakcji PCR oraz RFLP dla *CYP2C19*2* uwidoczniono w 2% żelu agarozowym. W celu uzyskania żelu o stężeniu 2%, dodano 0,7 g agarozy do 35 ml 0,5X buforu TBE (108 g Tris, 55 g kwasu bornego, 9,3 g wersenianu dwusodowego na 1L buforu) Produkty reakcji po RFLP dla polimorfizmów *CYP3A4*1B* i *CYP3A5*3* wymagały żelu o wyższej zawartości agarozy (4%, 1,4g agarozy, 35 ml 0,5X buforu TBE), ze względu na małe różnice w wielkości uzyskanych w wyniku trawienia fragmentów DNA. W celu przygotowaniu żelu, roztwór podgrzewano do momentu całkowitego rozpuszczenia agarozy. Substancją stosowaną w celu wizualizacji prążków DNA był bromek etydy (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Do ciepłego, płynnego żelu dodawano 2 µl bromku etydy i mieszano delikatnie, uważając aby nie napowietrzyć

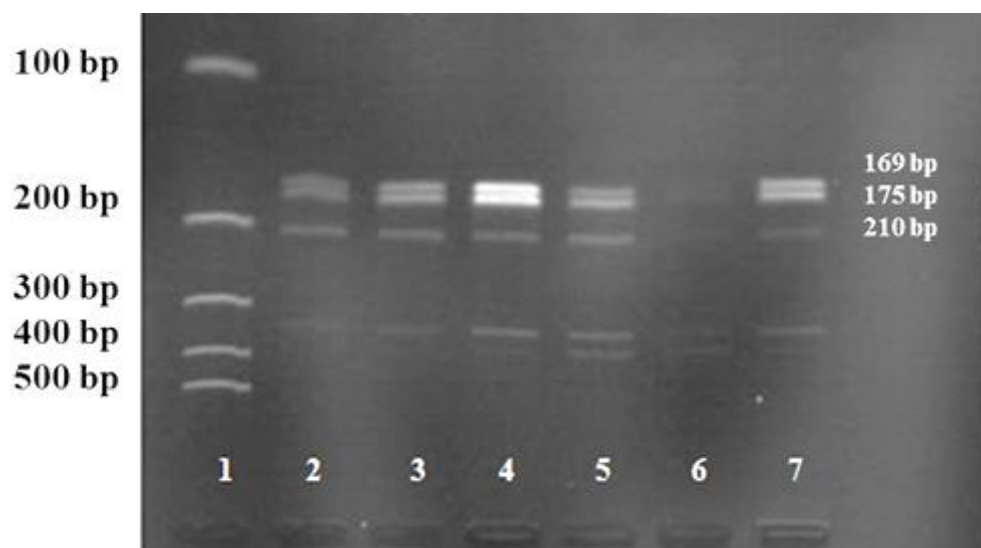
żelu. Następnie zawartość kolby wylewano na sanki elektroforetyczne i zostawiono żel na 10 minut do zastygnięcia. 4 µl produktu po PCR bądź 7 µl produktu po trawieniu mieszano z 2 µl roztworu obciążającego. Stosowano wzorzec masy molekularnej składający się z 5 prążków o wielkości: 100, 200, 300, 400, 500 par zasad firmy DNA-Gdańsk (*DNA-Gdańsk*, Gdańsk, Polska). Następnie całość przenoszono do studzienek w żelu agarozowym. Produkty po reakcji PCR rozwijano przez 5 minut przy napięciu 110 V, a następnie zwiększano napięcie do 130 V i prowadzono elektroforezę przez 12 minut. Produkty po reakcji RFLP rozwijano przez 10 minut przy napięciu 100 V, następnie 40 minut przy napięciu 120 V. Żele oglądano pod światłem UV, a obraz rejestrowano przy użyciu transiluminatora MiniBis (*DNR Bio-Imaging Systems*, Jerozolima, Izrael). Aparat obsługiwano przy użyciu komputerowego oprogramowania GelCapture wersja 2.6 tej samej firmy. Przykładowe rozdziały produktów po reakcjach PCR oraz RFLP przedstawiono na rycinach 8 i 9.

Rycina 8. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu *CYP3A4*



1 – wzorzec masy molekularnej, 2 – kontrola negatywna, 3-12 – produkt reakcji PCR

Rycina 9. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu *CYP3A4*1B*



1 – wzorzec masy molekularnej, 2-5,7 – heterozygota (genotyp AG)

2.2.7 PCR w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR)

Do oceny ekspresji genu *CYP3A4* zastosowano metodę Real-Time PCR. Dzięki zastosowaniu barwników fluorescencyjnych metoda pozwala na śledzenie przyrostu amplikonu w czasie rzeczywistym. W badaniu zastosowano niespecyficzny barwnik SYBR Green, który emituje nawet tysiąckrotnie silniejszą wiązkę światła podczas przyłączania się do podwójnej helisy DNA niż pozostając niezwiązany w roztworze. Poziom fluorescencji jest wprost proporcjonalny do ilości materiału genetycznego znajdującego się w próbce reakcyjnej. Po reakcji Real-time PCR krzywej amplifikacji odczytano wartość Ct. Jest to cykl reakcji w którym wartość fluorescencji przekracza próg graniczny, czyli próg fluorescencji tła. Im niższa wartość Ct, tym większa początkowa ilość materiału genetycznego w próbce. Wartość Ct możemy również zdefiniować jako moment w którym reakcja wkracza w fazę logarytmicznego wzrostu.

Reakcje Real-time PCR przeprowadzono na aparacie Rotor-Gene 6000 (*Qiagen Corbett*, Hilden, Niemcy). Do analizy zastosowano gotowy mix reakcyjny SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ (*Sigma-Aldrich*, Missouri, USA). W jednej próbówce reakcyjnej znajdowało się odpowiednio:

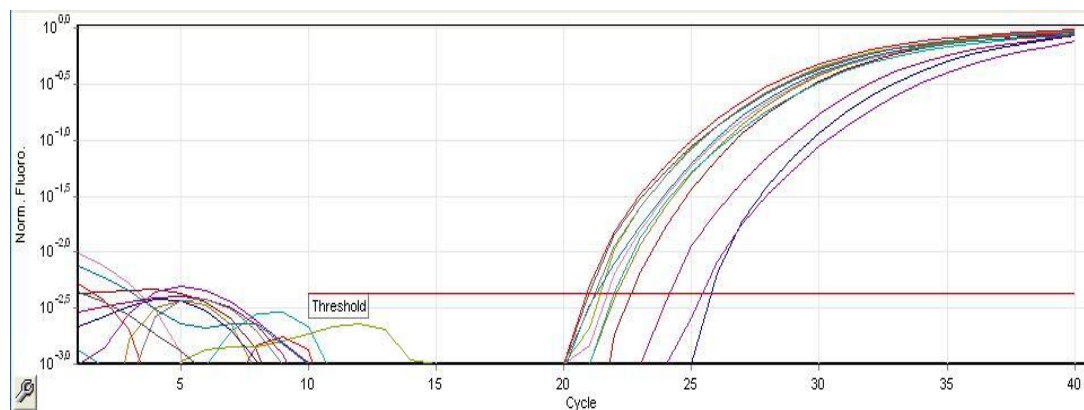
- 7,5 µl mixu reakcyjnego SYBR® Green JumpStart™ Taq ReadyMix™;
- 0,7 µl Forward primer (10 µM);
- 0,7 µl Reverse Primer (10 µM);
- 6,1 µl jałowej wody;
- 1,0 µl cDNA.

W celu oceny względnej poziomu ekspresji genu *CYP3A4*, równolegle do reakcji dla genu badanego, prowadzono analizę genu metabolizmu podstawowego (ang. housekeeping gene) *GAPDH*. Reakcję dla każdej badanej próby przeprowadzono w trzech powtórzeniach dla genu badanego i trzech dla genu referencyjnego celem zapewnienia większej dokładności oznaczenia. Do każdego eksperymentu dodawano również kontrole negatywne w celu kontroli czystości reagentów. Profil termiczny reakcji wyglądał następująco:

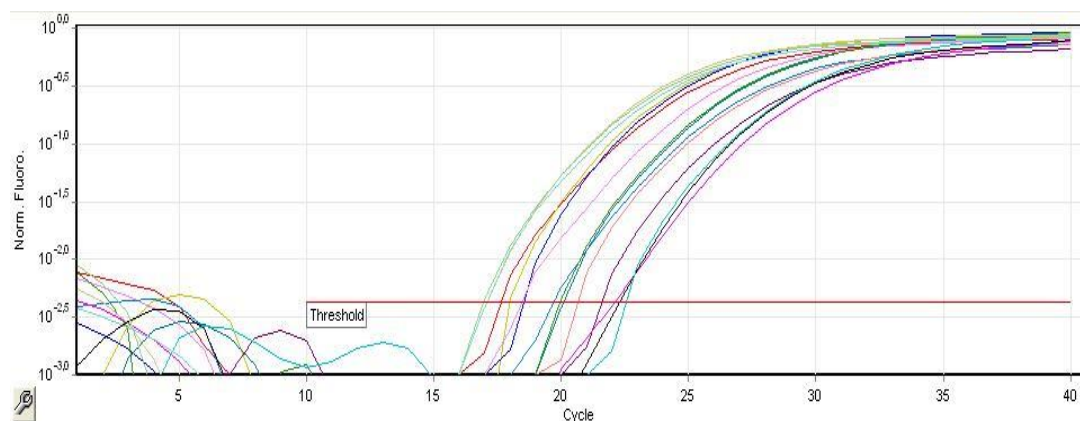
- Wstępna denaturacja: 95°C, 10 minut;
- Denaturacja: 95°C, 15 sekund;
- Annealing: 59°C, 30 sekund;
- Elongacja: 72°C, 20 sekund.

Reakcja składała się z 40 cykli. Na końcu każdego eksperymentu wykonano krzywą topnienia dla wszystkich prób. W tym celu stopniowo podgrzewano mieszaniny reakcyjne od 70°C do 95°C. W momencie denaturacji produktu następuje gwałtowny spadek poziomu fluorescencji, co przedstawione jest na wykresie w postaci piku. Obecność więcej niż jednego piku może świadczyć o namnożeniu niespecyficznych produktów. Produkty tej samej reakcji, z tymi samym starterami, powinny wykazywać niemalże identyczną temperaturę topnienia. Przykładowe krzywe topnienia oraz wykresy amplifikacji dla genu badanego oraz referencyjnego, przedstawiono odpowiednio na rycinie 10,11,12 i 13.

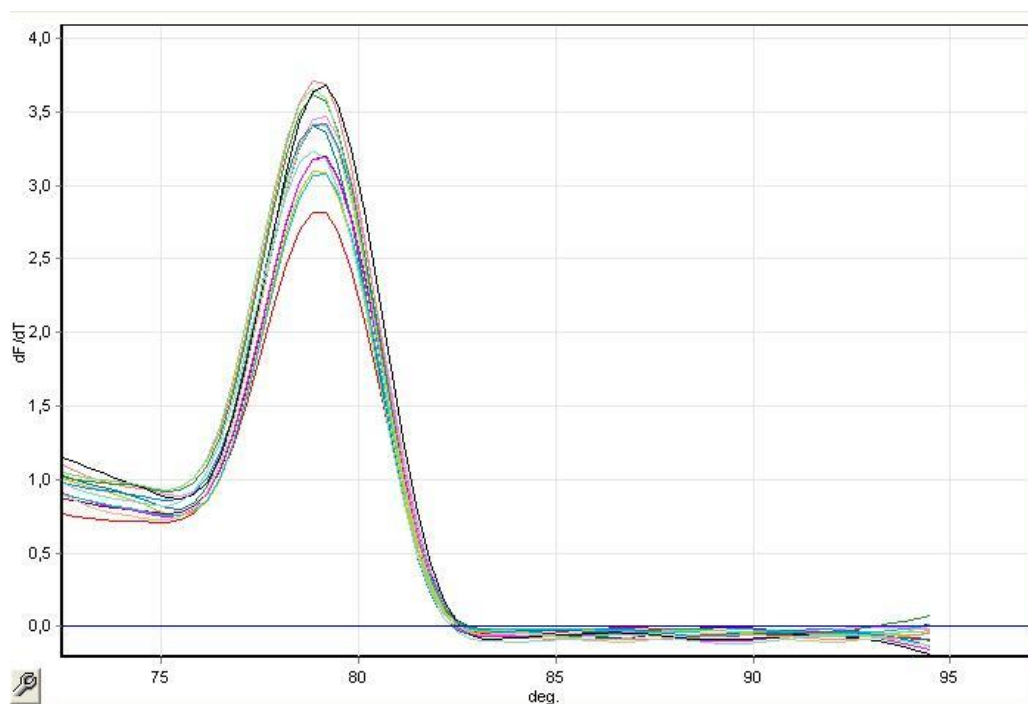
Rycina 10. Przykładowa krzywa amplifikacji fragmentu genu badanego *CYP3A4*



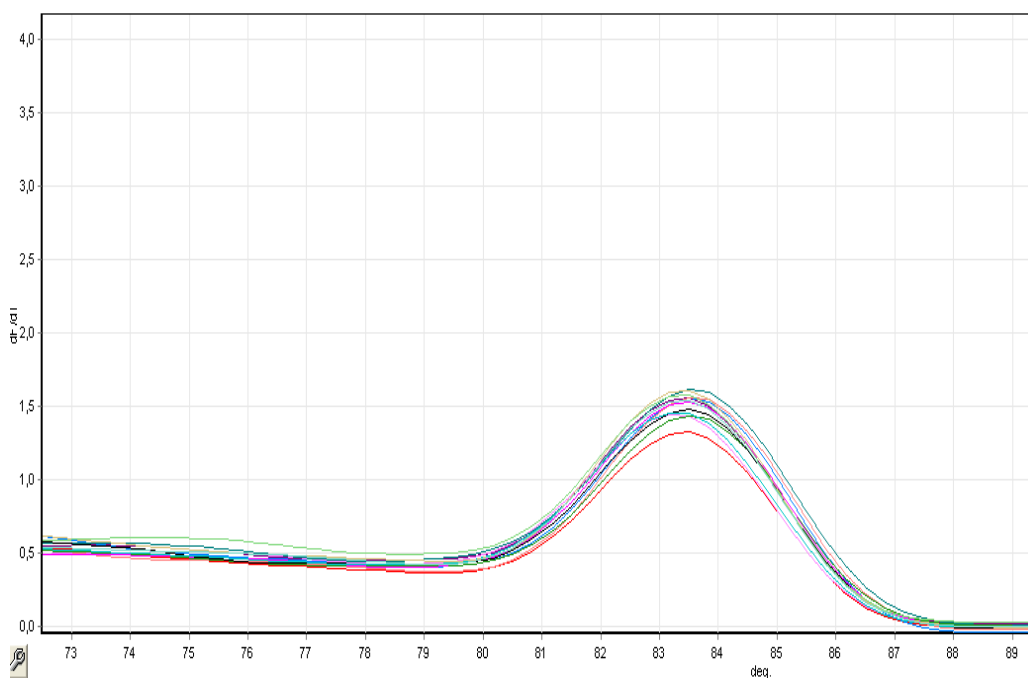
Rycina 11. Przykładowa krzywa amplifikacji fragmentu genu referencyjnego *GAPDH*



Rycina 12. Przykładowa krzywa topnienia dla powielonego fragmentu genu badanego *CYP3A4*



Rycina 13. Przykładowa krzywa topnienia dla powielonego fragmentu genu referencyjnego *GAPDH*



Pierwszym etapem w matematycznej ocenie względnej ekspresji genu *CYP3A4* było obliczenie z jaką wydajnością zachodziły reakcje zarówno dla genu badanego jak i referencyjnego. Od wydajności obu reakcji zależało dobranie odpowiedniego modelu matematycznego służącego do obliczenia względnej ekspresji genu. Wydajność reakcji została wyznaczona na podstawie sporządzonych dla obu genów krzywych standardowych. W celu sporządzenia krzywych standardowych przygotowano szereg siedmiu rozcieńczeń ($10^1 - 10^7$ krotnie rozcieńczonych) produktu reakcji PCR o znanym stężeniu DNA. Dla rozcieńczonych produktów przeprowadzono reakcję Real-time PCR. Po odczytaniu wartości Ct, sporządzono krzywe standardowe dla obu genów i na podstawie nachylenia krzywych, obliczono wydajność reakcji. Wydajności dla obu genów przedstawiały się następująco:

- *GAPDH* – 89%;
- *CYP3A4* – 103,5%.

Ze względu na różnicę w wydajnościach tych dwóch reakcji, do obliczenia relatywnego poziomu ekspresji wybrano model matematyczny zaproponowany przez Michaela W. Pfaffla.

2.3 Analiza statystyczna

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie STATISTICA 13.1 (Statsoft Inc.). We wszystkich testach za poziom istotności przyjęto wartość 0,05.

W celu oceny zgodności rozkładu genotypów oraz alleli analizowanych polimorfizmów z prawem Hardy’ego-Weinberga wykorzystano test Chi-kwadrat. Ten sam test wykorzystano do oceny różnic w rozkładzie genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną i kontrolną w przypadku polimorfizmów *CYP2C19*2* i *CYP3A4*1B*. Porównanie częstości występowania zmutowanego allelu *CYP3A5*3* pomiędzy grupą kontrolną a grupą badaną oceniono z wykorzystaniem testu V-kwadrat. Zgodność rozkładu cech ciągłych z rozkładem normalnym sprawdzono przy użyciu testu Shapiro-Wilka. W przypadku zgodności rozkładu cechy z rozkładem normalnym, do oceny zależności między daną cechą a obecnością allelu zmutowanego w grupie badanej, stosowano test t Studenta oraz analizę ANOVA dla grup niezależnych. W przypadku braku takiej zgodności, stosowano test nieparametryczny U Manna-Whitneya oraz ANOVA Kruskala Wallisa. Do oceny zależności pomiędzy względnym poziomem

ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami w postaci ciągłej wykorzystano macierze korelacji Pearsona i Spearmana. Do porównania wartości względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* w zależności od rodzaju genotypu polimorfizmu *CYP3A4*1B* wykorzystano test t Studenta. Test t Studenta wykorzystano również do oceny zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a płcią oraz stopniem nasilenia objawów.

Do przeprowadzenia analizy statystycznej wykorzystano wartość liczbową parametru % zmiany HDRS.

3. Wyniki

3.1 Ocena polimorfizmów *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*

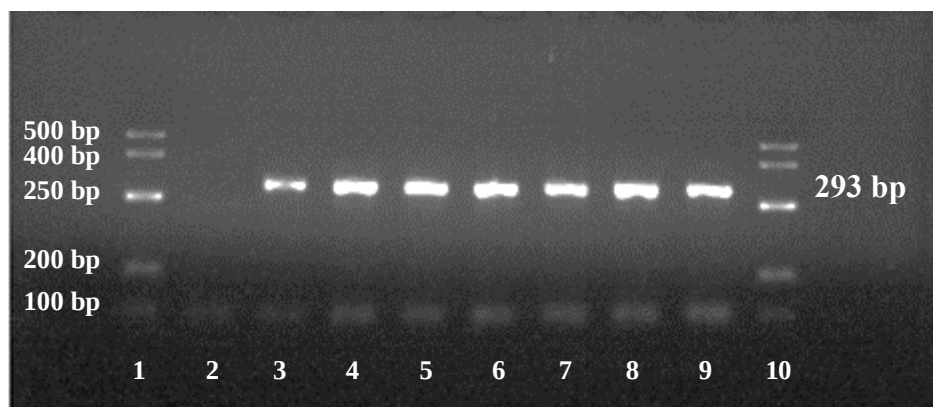
3.1.1 Rozkład częstości występowania poszczególnych genotypów i równowaga Hardy’ego-Weinberga w grupie kontrolnej i badanej

Analizę częstości występowania badanych alleli przeprowadzano dla różnej liczby prób DNA. Dla polimorfizmu:

- *CYP3A4*1B* określono genotyp dla 102 prób w grupie badanej oraz 90 prób w grupie kontrolnej.
- *CYP3A5*3* określono genotyp dla 105 prób w grupie badanej oraz 93 prób w grupie kontrolnej.
- *CYP2C19*2* określono genotyp dla 102 prób w grupie badanej oraz 93 prób w grupie kontrolnej.

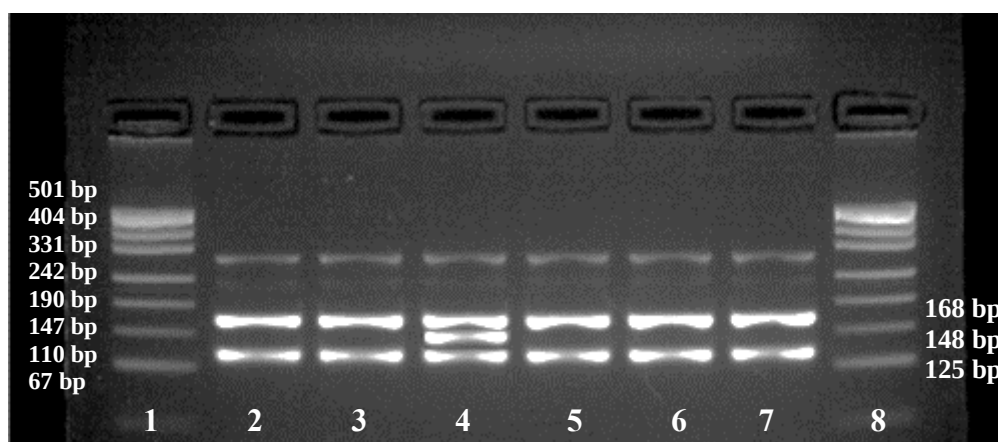
Różnice te wynikają z problemów z namnażaniem wybranych fragmentów genów w niektórych próbach bądź trudności z uzyskaniem wzoru prążkowego po procesie trawienia, który powala na jednoznaczną interpretację. Kolejno na rycinach 14,15,16,17 przedstawiono przykładowe rozdziały elektroforetyczne dla ocenianych genów *CYP3A5* i *CYP2C19*. Przykładowe rozdziały elektroforetyczne dla badanego genu *CYP3A4* przedstawiono w rozdziale 2.2.6.

Rycina 14. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla fragmentu genu *CYP3A5*



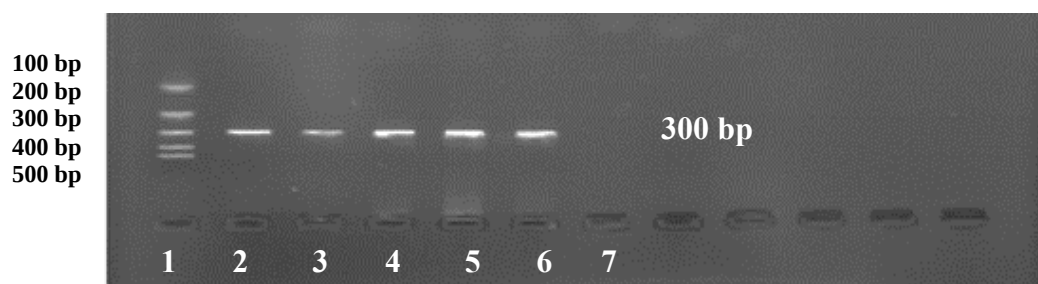
1,10 – wzorzec masy molekularnej, 2 – kontrola negatywna, 3-9 – próby badane

Rycina 15. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu *CYP3A5**3



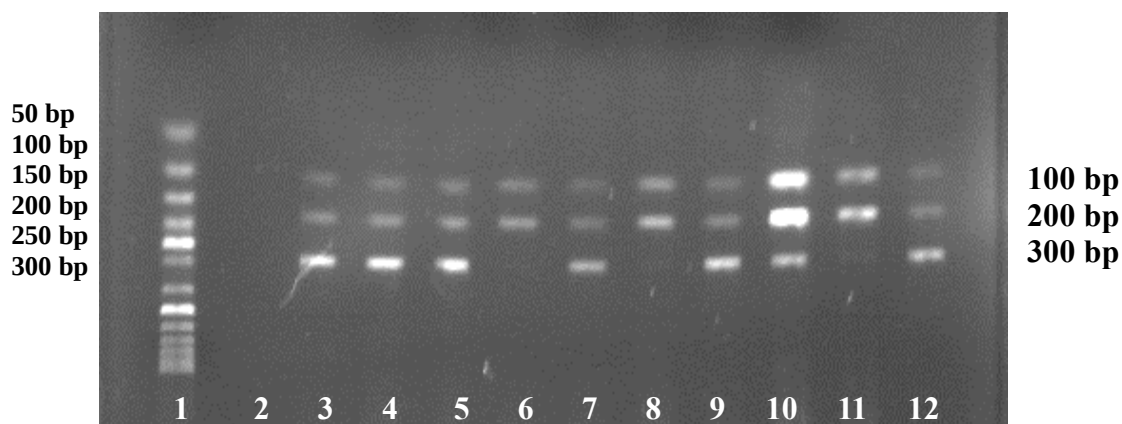
1,8 – Wzorzec masy molekularnej, 2,3,5,6,7 – homozygota zmutowana, 4 – heterozygota

Rycina 16. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla fragmentu genu *CYP2C19*



1 – wzorzec masy molekularnej, 2-6 – próby badane, 7 – kontrola negatywna

Rycina 17. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu *CYP2C19*2*



1 – wzorzec masy molekularnej, 3,4,5,7,9,10,12 – heterozygota, 6,8,11 – homozygota dzika

Przy użyciu testu Chi-kwadrat oceniono różnicę między obserwowaną a oczekiwaną częstością genotypów dla badanych polimorfizmów. Test Chi-kwadrat nie wykazał statystycznie istotnych odstępstw od równowagi Hardy’ego-Weinberga (ang. Hardy-Weinberg equilibrium, HWE) w grupie badanej oraz kontrolnej dla badanych polimorfizmów *CYP3A5*3*, *CYP2C19*2*. Stwierdzono odstępstwo od równowagi H-W w rozkładzie genotypów analizowanego polimorfizmu *CYP3A4*1B*, zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. Przyczyną tego zjawiska mógł być m.in.: błąd z próby

wynikający ze zbyt małej populacji uwzględnionej w badaniu, istnienie czynnika, który sprawia, że osobnicy z konkretnym genotypem mają większą szansę na włączenie do badania, bądź też błąd w genotypowaniu. Część prób została powtórzonych w celu sprawdzenia potencjalnego błędu w określaniu genotypu. Wyniki były zgodne z pierwszymi oznaczeniami. Dokładne wyniki genotypowania oraz wartości testów statystycznych dla grupy kontrolnej i badanej przedstawiono odpowiednio w tabeli 11 i 12.

Tabela 10. Rozkład genotypów i alleli w grupie kontrolnej oraz zgodność z HWE

Polimorfizm	Genotyp	n (%)	Częstość Allelu A	Częstość Allelu G	H-W* n (%)	p**
<i>CYP3A4*1B</i>	AA	5 (5,6)	0,46	0,54	18,7 (20,8)	<0,001
	GA	72 (80,0)			44,6 (49,6)	
	GG	13 (14,4)			26,7 (29,7)	
<i>CYP3A5*3</i>	AA	0 (0,0)	0,01	0,99	0 (0,0)	0,958
	GA	1 (1,0)			1 (1,0)	
	GG	92 (99,0)			92 (99,0)	
<i>CYP2C19*2</i>	GG	63 (67,7)	0,17	0,83	64,6 (69,5)	0,237
	GA	29 (31,2)			25,8 (27,7)	
	AA	1 (1,1)			2,6 (2,8)	

* wartość oczekiwana częstości genotypów wynikająca z Prawa Hardy'ego – Weinberga

** test Chi-kwadrat

Tabela 11. Rozkład genotypów i alleli w grupie badanej oraz zgodność z HWE

Polimorfizm	Genotyp	n (%)	Częstość Allelu A	Częstość Allelu G	H-W* n (%)	p**
<i>CYP3A4*1B</i>	AA	0 (0,0)	0,41	0,59	17,3 (17,0)	<0,001
	AG	84 (82,4)			49,4 (48,4)	
	GG	18 (17,6)			35,3 (34,6)	
<i>CYP3A5*3</i>	AA	0 (0,0)	0,06	0,94	0,3 (0,3)	0,534
	AG	12 (11,4)			11,3 (10,8)	
	GG	93 (88,6)			93,3 (88,9)	
<i>CYP2C19*2</i>	GG	76 (74,6)	0,14	0,86	75,1 (73,6)	0,446
	GA	23 (22,5)			24,9 (24,4)	
	AA	3 (2,9)			2,1 (2,0)	

* wartość oczekiwana częstości genotypów wynikająca z Prawa Hardy'ego – Weinberga

** test Chi-kwadrat

3.1.2 Polimorfizm *CYP3A4*1B*

3.1.2.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną

Sprawdzono czy istnieje statystycznie istotna różnica w częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną dla polimorfizmu *CYP3A4*1B*. Przy użyciu testu Chi-kwadrat nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w rozkładzie genotypów ($p=0,050$). Dystrybucja alleli, która została oceniona z wykorzystaniem testu chi kwadrat, również nie różniła się statystycznie pomiędzy grupami. W grupie badanej z większą częstością występował genotyp homozygoty zmutowanej oraz zaobserwowano tendencję do częstszego występowania zmutowanego allela *CYP3A4*1B*. W grupie badanej, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej, nie zaobserwowano żadnej homozygoty dzikiej. Szczegółowe dane zostały przedstawione w tabeli 12 oraz na rycinie 18.

Tabela 12. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu *CYP3A4*1B* w grupie badanej oraz kontrolnej

Grupa	Genotyp	n (%)	Allel G n (%)	Allel A n (%)
Badana	AA (*1A/*1A)	0 (0,0)	obecny 102 (100,0)	obecny 84 (82,4)
	AG (*1A/*1B) GG (*1B/*1B)	84 (82,4) 18 (17,6)	nieobecny 0 (0,0)	nieobecny 18 (17,6)
Kontrolna	AA (*1A/*1A)	5 (5,6)	obecny 85 (94,4)	obecny 77 (85,6)
	AG (*1A/*1B) GG (*1B/*1B)	72 (80,0) 13 (14,4)	nieobecny 5 (5,6)	nieobecny 13 (14,4)
		$p=0,050^*$	$p=0,050^{**}$	$p=0,547^*$

* test Chi-kwadrat

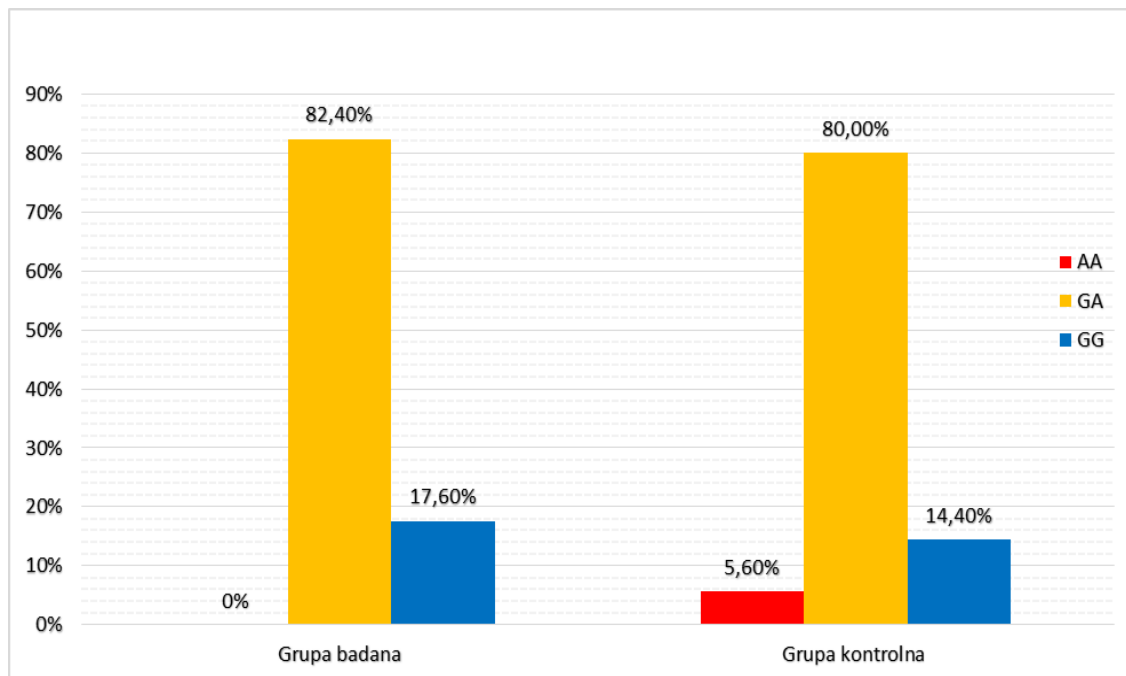
** test Chi-kwadrat z poprawką Yatesa

AA – homozygota dzika

AG – heterozygota

GG – homozygota zmutowana

Rycina 18. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu *CYP3A4*1B* w grupie badanej oraz kontrolnej



3.1.2.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allelelem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej

Przy użyciu testu Chi-kwadrat, nie wykazano statystycznie istotnej zależności pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów oraz obecnością allelela *CYP3A4*1B* a analizowanymi cechami klinicznymi. Nie wykazano również związku pomiędzy występowaniem poszczególnych genotypów oraz obecnością allelela *CYP3A4*1B* a wiekiem i płcią pacjentów. Dokładne wyniki analizy przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Zależność pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorfizmu *CYP3A4*1B* a badanymi cechami

Badana cecha	Genotyp	Średnia	Mediana	p
Wiek pacjenta	AG	48,3	51	0,262**
	GG	44,6	50	
Wiek w momencie diagnozy	AG	42,3	45	0,417**
	GG	38,8	38	
HDRS	AG	22,3	22	0,938*
	GG	22,2	22	
Zmiana HDRS	AG	15,4	15	0,755*
	GG	15,8	16	
% zmiany HDRS	AG	0,69	0,73	0,934**
	GG	0,72	0,70	
Badana cecha	Genotyp	K (n)	M (n)	p
Płeć	AG	54	29	0,437***
	GG	14	5	

*test t Studenta

** test U Manna-Whitney'a

*** test V-kwadrat

3.1.3 Polimorfizm *CYP3A5**3

3.1.3.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Przy użyciu testu V-kwadrat wykazano statystycznie istotną różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów oraz dystrybucji allela *CYP3A5**3 pomiędzy grupą badaną a kontrolną. W obu grupach nie zaobserwowano występowania homozygoty dzikiej AA. Allel *CYP3A5**3 został zidentyfikowany u wszystkich badanych zarazem w grupie osób chorych na depresję, jak i grupie kontrolnej. Statystycznie istotna różnica dotyczyła dystrybucji genotypu GA oraz allelu A. W grupie badanej zidentyfikowano więcej osób z genotypem GA w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,034$). Dane zamieszczono w tabeli 14 a rozkład genotypów zobrazowano na rycinie 19.

Tabela 14. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu *CYP3A5**3 w grupie badanej oraz kontrolnej

Grupa	Genotyp	n (%)	Allel G n (%)	Allel A n (%)
Badana	AA (*1/*1) AG (*1/*3) GG (*3/*3)	0 (0,0) 12 (11,4) 93 (88,6)	obecny 105 (100,0)	obecny 12 (11,4)
			nieobecny 0 (0,0)	nieobecny 93 (88,6)
Kontrolna	AA (*1/*1) AG (*1/*3) GG (*3/*3)	0 (0,0) 1 (1,1) 92 (98,9)	obecny 93 (100,0)	obecny 1 (1,1)
			nieobecny 0 (0,0)	nieobecny 92 (98,9)
		p=0,034*	—	p=0,034*

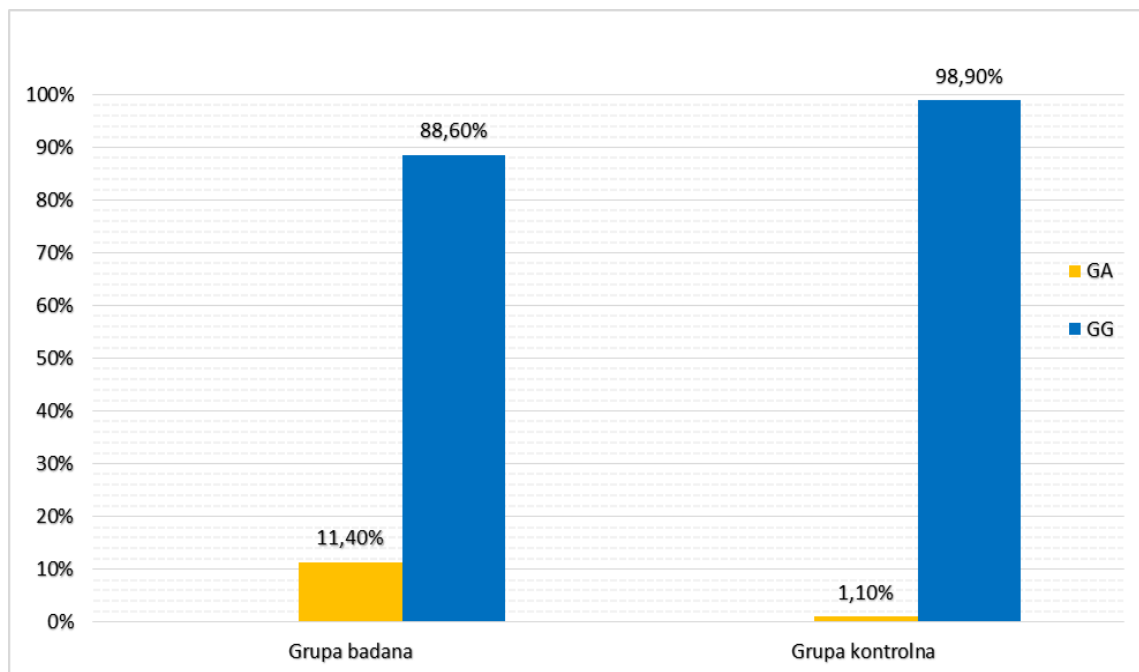
* test V-kwadrat

AA – homozygota dzika

AG – heterozygota

GG – homozygota zmutowana

Rycina 19. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu CYP3A5*3 w grupie badanej oraz kontrolnej



3.1.3.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allelelem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej

Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu nieparametrycznego U Manna-Whitney'a wykazała statystycznie istotną zależność pomiędzy wiekiem pacjenta w momencie pojawienia się pierwszych objawów chorobowych a poszczególnym genotypem oraz obecnością allelela dzikiego *CYP3A5*1*. Średnia wieku pacjentów będącymi heterozygotami, posiadających jeden prawidłowy allel była o 7 lat wyższa ($p=0,034$) względem pacjentów z dwoma wariantami allelelu *CYP3A5*3*. W przypadku pozostałych cech klinicznych nie zaobserwowano związku. Nie wykazano również zależności pomiędzy poszczególnym genotypem oraz obecnością allelela *CYP3A5*3* a wiekiem i płcią pacjentów. Szczegółowe dane z analiz zamieszczono w tabeli 15.

Tabela 15. Zależność pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorfizmu *CYP3A5*3* a badanymi cechami

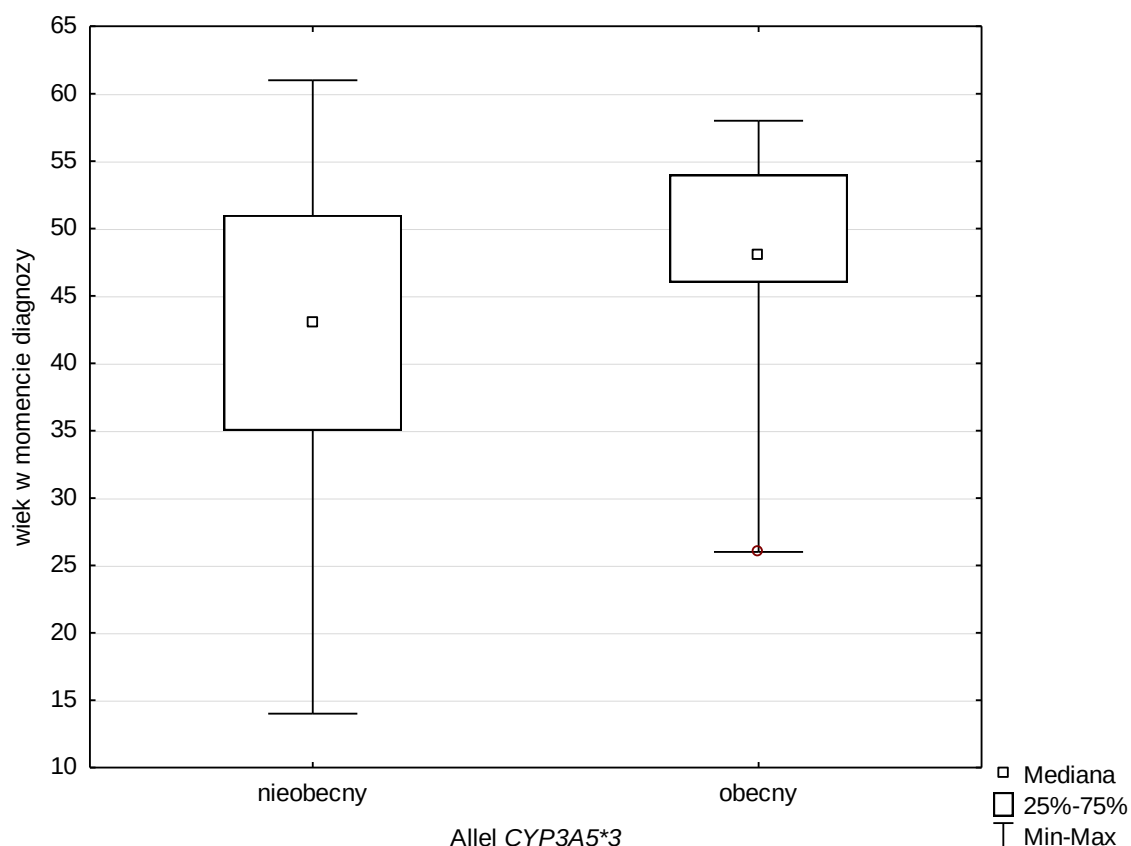
Badana cecha	Genotyp/Allel	Średnia	Mediana	p
Wiek pacjenta	AG	51,5	54	0,263**
	GG	47,3	51	
Wiek w momencie diagnozy	AG	48,4	48	0,034**
	GG	41,3	43	
	A obecny	48,4	48	0,034**
	A nieobecny	41,3	43	
HDRS	AG	25,8	25	0,401*
	GG	22,0	21	
Zmiana HDRS	AG	18,1	21	0,538*
	GG	15,2	15	
% zmiany HDRS	AG	0,70	0,58	0,643**
	GG	0,69	0,71	
Badana cecha	Genotyp	K (n)	M (n)	p
Płeć	AG	8	4	0,947***
	GG	62	31	

*test t Studenta

** test U Manna-Whitney'a

*** test Chi-kwadrat z poprawką Yatesa

Rycina 20. Zależność pomiędzy obecnością allele *CYP3A5**3 a wiekiem w momencie postawienia diagnozy



3.1.4 Polimorfizm *CYP2C19**2

3.1.4.1 Porównanie rozkładu częstości występowania genotypów oraz alleli pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Rozkład genotypów oraz alleli dla polimorfizmu *CYP2C19**2 nie różnił się istotnie pomiędzy grupą osób chorych na depresję a grupą osób zdrowych. W grupie badanej osoby z genotypem GG (homozygota dzika) stanowiły o 7% więcej, niż w przypadku grupy osób zdrowych. Różnica ta była jednak statystycznie nieistotna ($p=0,287$). Wszystkie dane przedstawiono w tabeli numer 16 oraz na rycinie 21.

Tabela 16. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu *CYP2C19**2 w grupie badanej oraz kontrolnej

Grupa	Genotyp	n (%)	Allel G n (%)	Allel A n (%)
Badana	GG (*1/*1)	76 (74,5)	obecny 99 (97,0)	obecny 26 (25,5)
	AG (*1/*2) AA (*2/*2)	23 (22,5) 3 (3,0)	nieobecny 3 (3,0)	nieobecny 76 (74,5)
Kontrolna	GG (*1/*1)	63 (67,7)	obecny 92 (98,9)	obecny 30 (32,3)
	AG (*1/*2) AA (*2/*2)	29 (31,2) 1 (1,1)	nieobecny 1 (1,1)	nieobecny 63 (67,7)
		p=0,287*	p=0,680**	p=0,297*

* test Chi-kwadrat

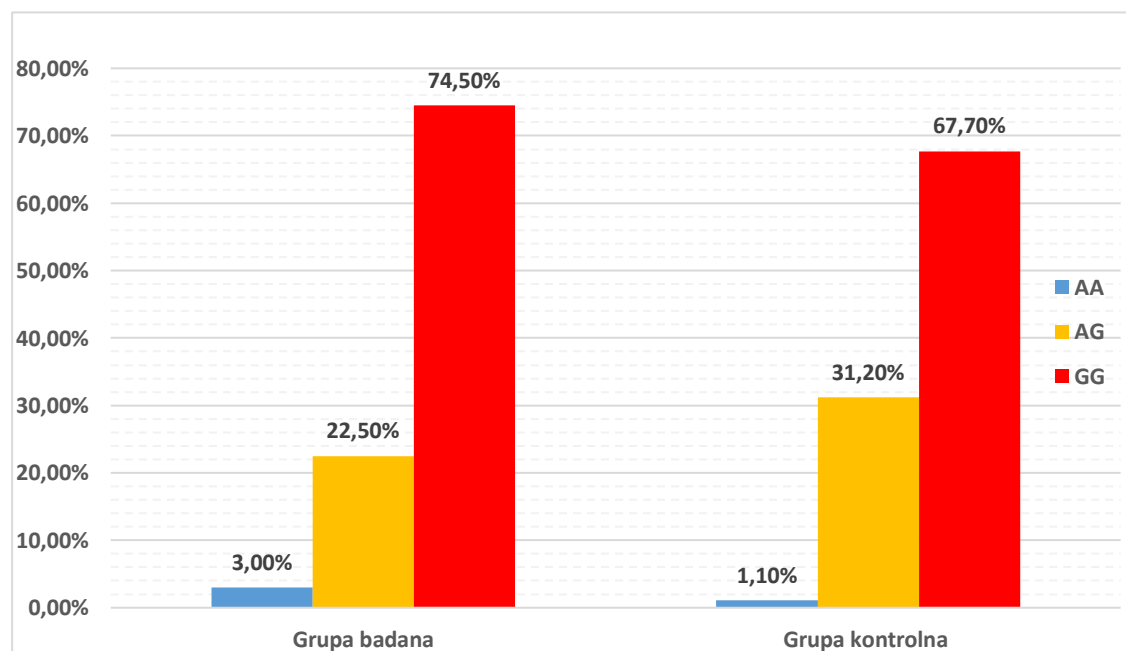
** test Chi kwadrat z poprawką Yatesa

GG – homozygota dzika

AG – heterozygota

AA – homozygota zmutowana

Rycina 21. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu *CYP2C19**2 w grupie badanej oraz kontrolnej



3.1.4.2 Ocena zależności pomiędzy genotypem/allelelem a poszczególnymi cechami klinicznymi w grupie badanej

Analiza statystyczna wykazała statystycznie istotne zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu *CYP2C19*2* a % zmiany HDRS. Pacjenci z przynajmniej jednym allelelem *CYP2C19*2* uzyskiwali statystycznie lepsze rezultaty leczenia ($p=0,027$). Zależność ta została zilustrowana na rycinie 22. Nie wykazano statystycznie istotnej zależności pomiędzy genotypem a % zmiany HDRS. Zaobserwowano jednak tendencje do uzyskiwania lepszych rezultatów leczenia w przypadku homozygot zmutowanych. Wykazano istotnie statystyczną zależność pomiędzy poszczególnym genotypem polimorfizmu *CYP2C19*2* a płcią pacjentów. W przypadku obu płci najczęściej występował genotyp GG (homozygota dzika). U kobiet homozygota dzika stanowiła 79,40% wszystkich genotypów, u mężczyzn o prawie 15 % mniej (64,70%). Pacjenci o genotypie heterozygoty stanowili 35,30% wszystkich mężczyzn z grupy badanej gdzie w odniesieniu do kobiet udział ten wynosił jedynie 16,20%. U kobiet zanotowano również trzy przypadki osób posiadających dwa allelele *CYP2C19*2*. W przypadku mężczyzn nie zaobserwowano występowania homozygoty zmutowanej. Procentowy udział poszczególnych genotypów w przypadku obu płci został przedstawiony na rycinie 23. Wszystkie dane dotyczące polimorfizmu *CYP2C19*2* zostały zebrane i przedstawione w tabeli 17.

Tabela 17. Zależność pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu *CYP2C19**2 a badanymi cechami

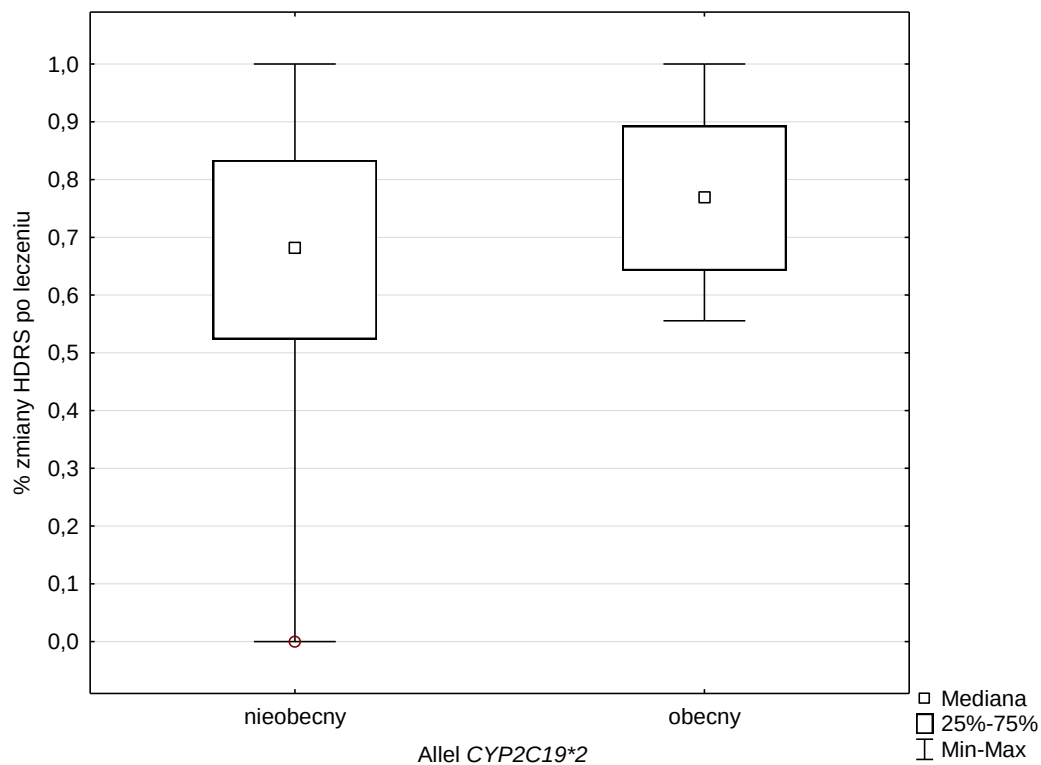
Badana cecha	Genotyp/Allel	Średnia	Mediana	p
Wiek pacjenta	GG	47,7	51	0,623*
	AG	49,9	51	
	AA	43,0	46	
Wiek w momencie diagnozy	GG	41,7	44	0,748*
	AG	43,8	47	
	AA	42,0	45	
HDRS	GG	22,4	22	0,828*
	AG	21,7	21	
	AA	21,0	21	
Zmiana HDRS	GG	14,9	14	0,515*
	AG	16,5	16	
	AA	17,3	15	
% zmiany HDRS	GG	0,66	0,68	0,073*
	AG	0,77	0,77	
	AA	0,82	0,71	
	A obecny A nieobecny	0,77 0,66	0,77 0,68	0,027****
Badana cecha	Genotyp	K (n)	M (n)	p
Płeć	GG	54	22	0,039**
	AG	11	12	
	AA	3	0	

* test Kruskala-Wallis'a

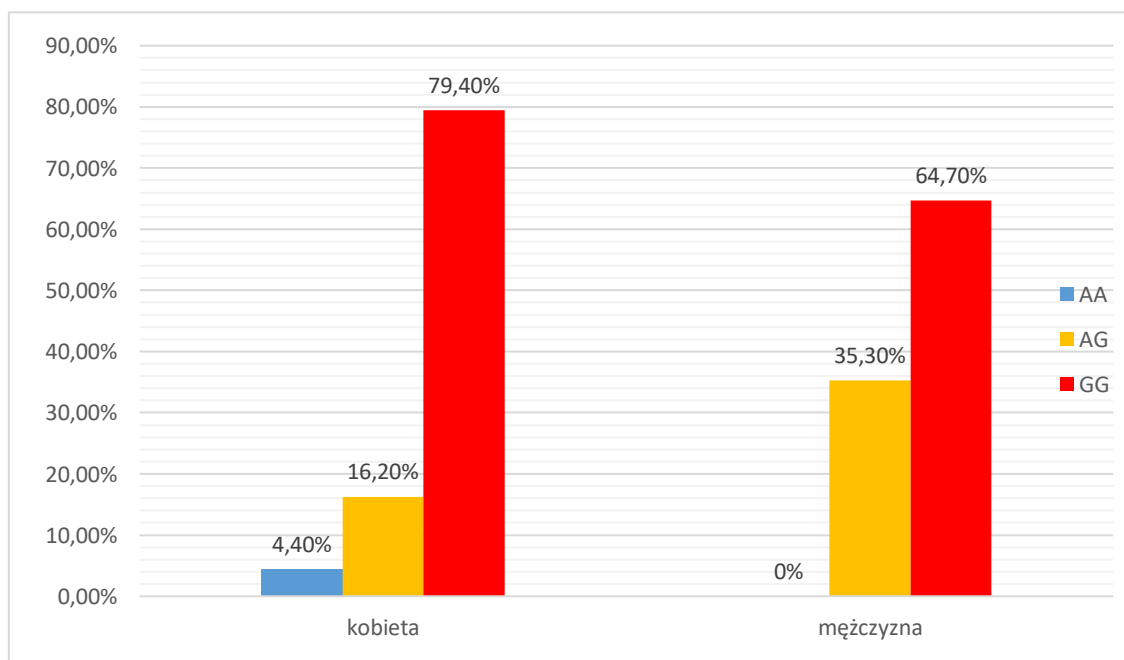
** test Chi-kwadrat

*** test U Manna-Whitney'a

Rycina 22. Zależność pomiędzy obecnością allela *CYP2C19**2 a efektywnością leczenia wyrażoną w postaci % zmiany HDRS



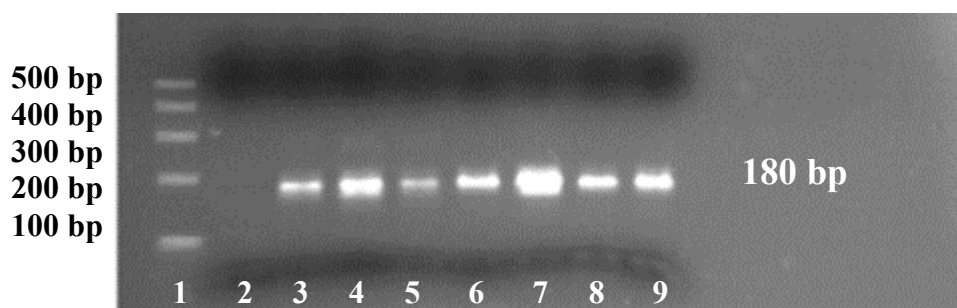
Rycina 23. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu *CYP2C19**2 w podgrupach badanych kobiet i mężczyzn



3.2 Ocena względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4*

Ocenę względnego poziomu ekspresji wykonano dla 38 pacjentów. Pierwszą przeprowadzoną analizą była ocena jakościowa ekspresji genu *CYP3A* przy użyciu metody PCR. Warunki reakcji przedstawiono w rozdziale 2.2.4. We wszystkich 38 próbach wykazano obecność ekspresji genu *CYP3A4*. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktów reakcji jakościowej dla genu *CYP3A4* przedstawiono na rycinie 24.

Rycina 24. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji jakościowej dla fragmentu genu *CYP3A4*



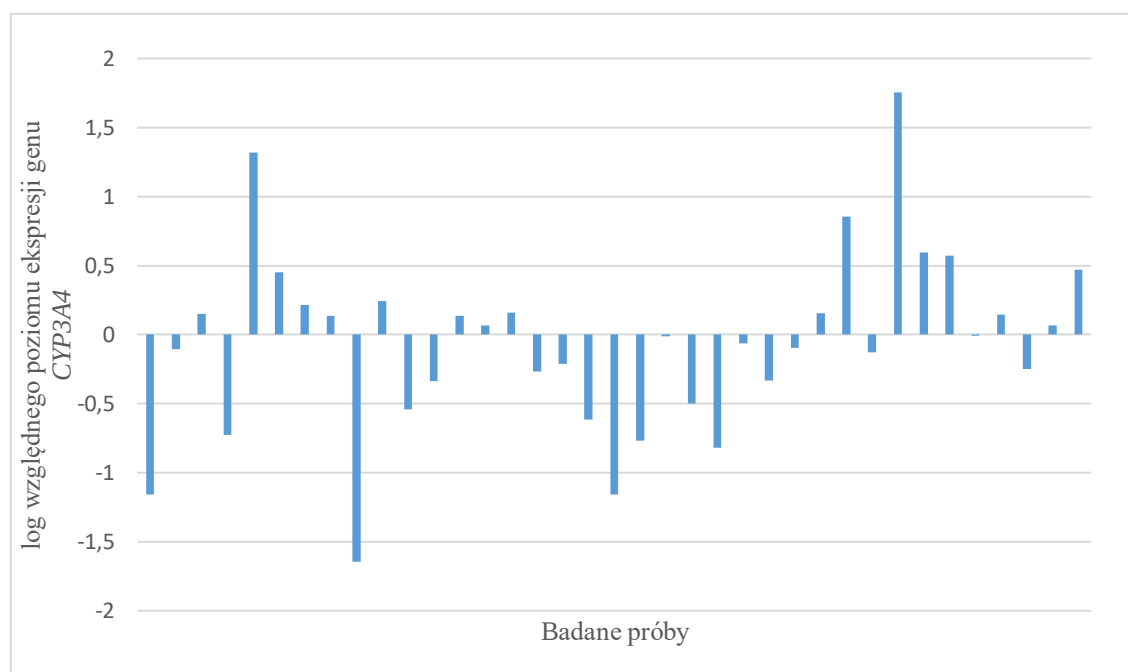
1 – wzorec masy molekularnej, 2 – kontrola negatywna, 3-9 – próby badane

Po przeprowadzeniu analizy jakościowej przystąpiono do oceny ilościowej. Pierwszym etapem było wyznaczenie średnich wartości C_t dla genu referencyjnego oraz genu badanego dla wszystkich prób. Sporządzono również krzywe standardowe dla obu reakcji w celu wyliczenia wydajności co pozwoliło dobrać model Michaela W. Pfaffla jako matematyczne narzędzie oceny względnej ekspresji genu (patrz rozdział 2.2.7). Poziom względnej ekspresji oznaczono jako R , do obliczeń statystycznych oraz sporządzenia wykresów użyto zlogarytmowanej wartości R ($\log R$). Wartości $R > 1$ wskazują na wyższy poziom ekspresji genu badanego w stosunku do genu referencyjnego, analogicznie wartości $R < 1$ przemawiają za wyższym poziomem ekspresji genu referencyjnego w danej próbce w stosunku do genu badanego. Statystyki opisowe dotyczące wartości względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* przedstawiono w tabeli 18. Po odrzuceniu wartości odstających, do analiz wykorzystano 37 prób. Na rycinie 25 przedstawiono względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* w postaci zlogarytmowanej.

Tabela 18. Wartość względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4*

	Liczba N	Mediana	Minimum	Maksimum	Rozstęp międzykwartyłowy
R <i>CYP3A4</i>	37	0,976387	0,022771	57,147447	0,988935

Rycina 25. Log względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4*



3.2.1 Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* z cechami klinicznymi

Sprawdzono zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a cechami klinicznymi takimi jak: wiek w momencie diagnozy, HDRS, zmiana HDRS po leczeniu oraz % zmiany HDRS po leczeniu. W przypadku wszystkich analizowanych parametrów nie wykazano istotnych statystycznie zależności w odniesieniu do wartości względnego poziomu ekspresji genu. Nie wykazano istotnych różnic we względnym poziomie ekspresji genu *CYP3A4* w zależności od wieku pacjentów. Oceniono również zależność pomiędzy płcią pacjentów a względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4*. Test t-studenta nie wykazał istotnie statystycznych różnic pomiędzy grupą kobiet i mężczyzn ($p=0,909$). Wyniki analizy przedstawiono w tabeli 19 oraz na rycinach 26, 27, 28, 29 i 30.

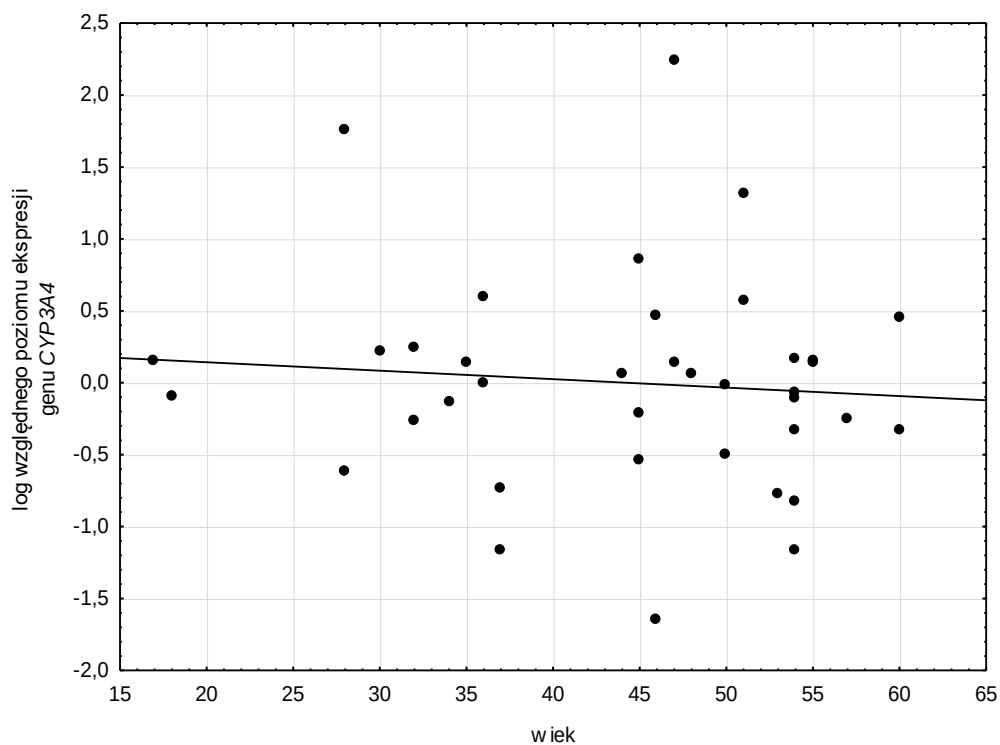
Tabela 19. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami

Badana cecha	R	p
Wiek pacjenta	-0,129*	0,446
Wiek w momencie diagnozy	-0,063*	0,712
HDRS	-0,264**	0,125
Zmiana HDRS	-0,194**	0,264
% zmiany HDRS	-0,012*	0,946

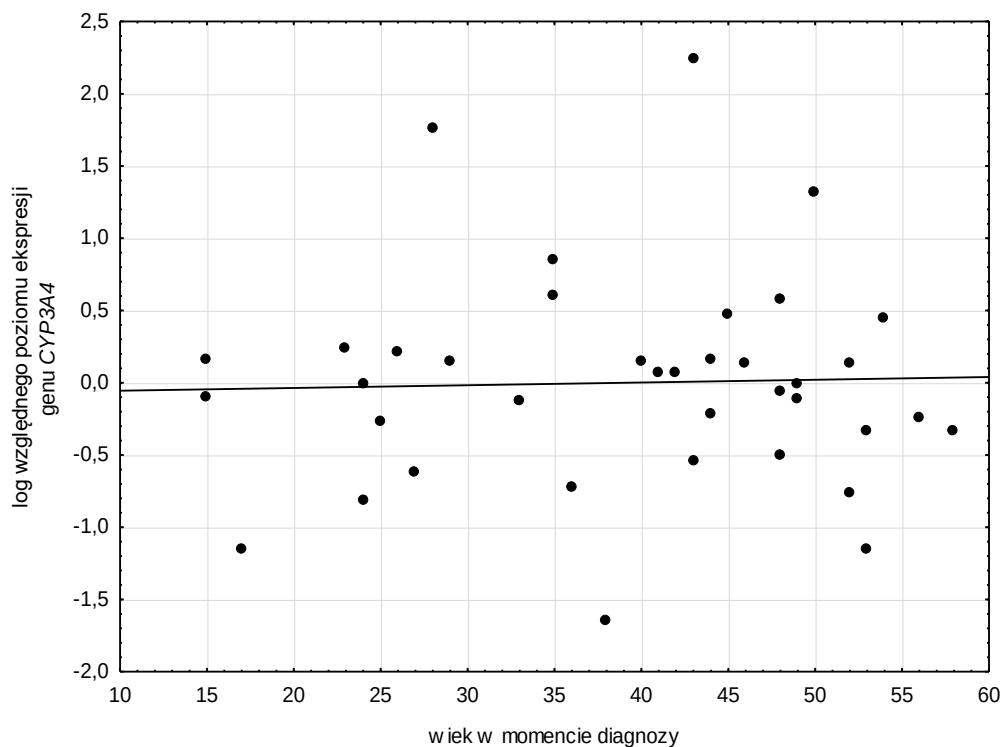
* współczynnik korelacji Spearmana

** współczynnik korelacji Pearsona

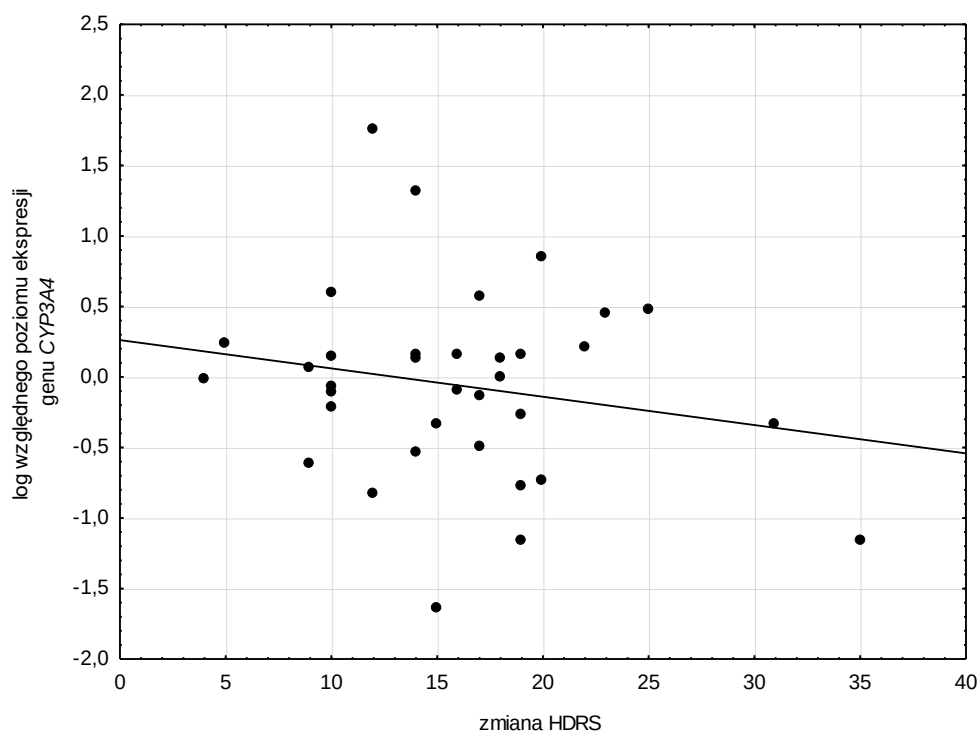
Rycina 26. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a wiekiem pacjenta



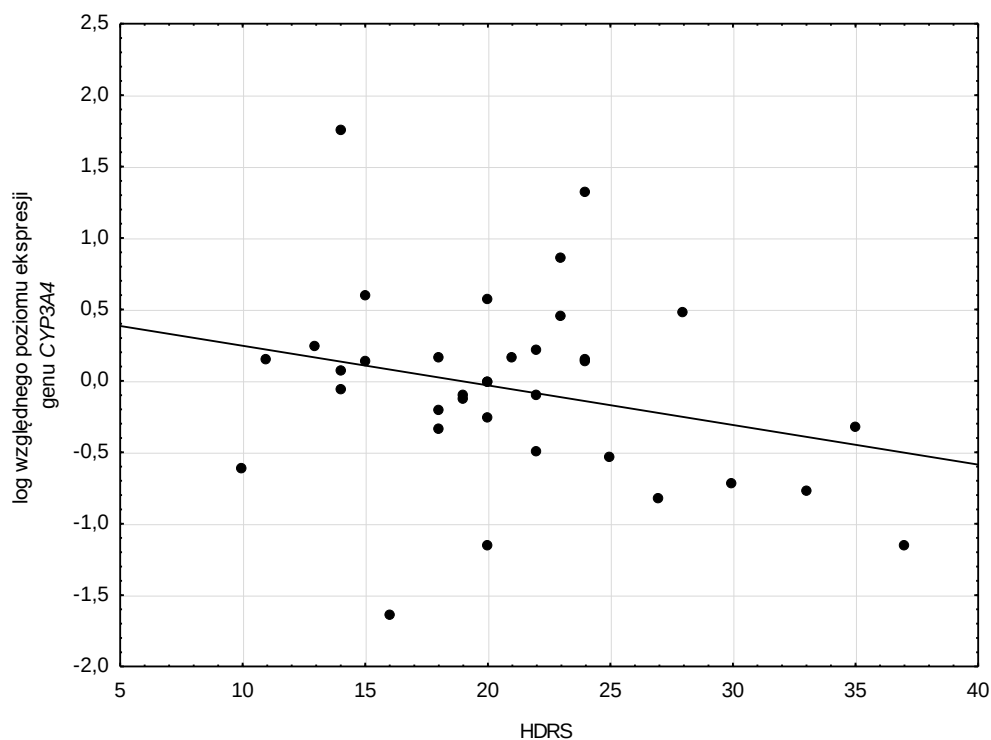
Rycina 27. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a wiekiem pacjenta w momencie diagnozy



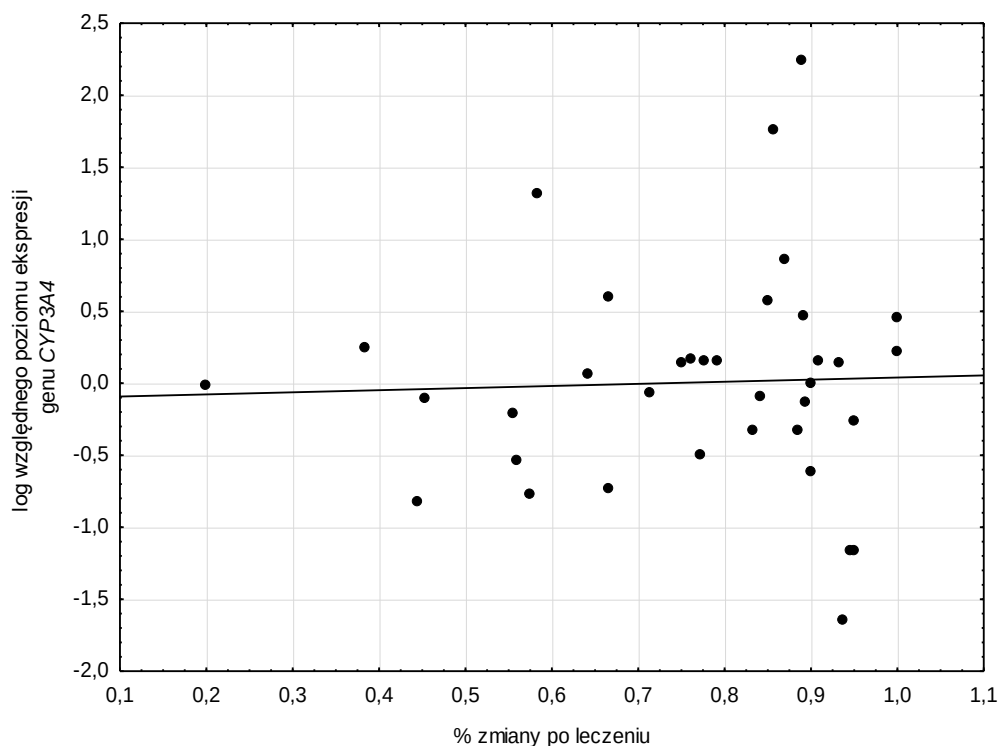
Rycina 28. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a HDRS



Rycina 29. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a zmianą HDRS



Rycina 30. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a % zmiany HDRS



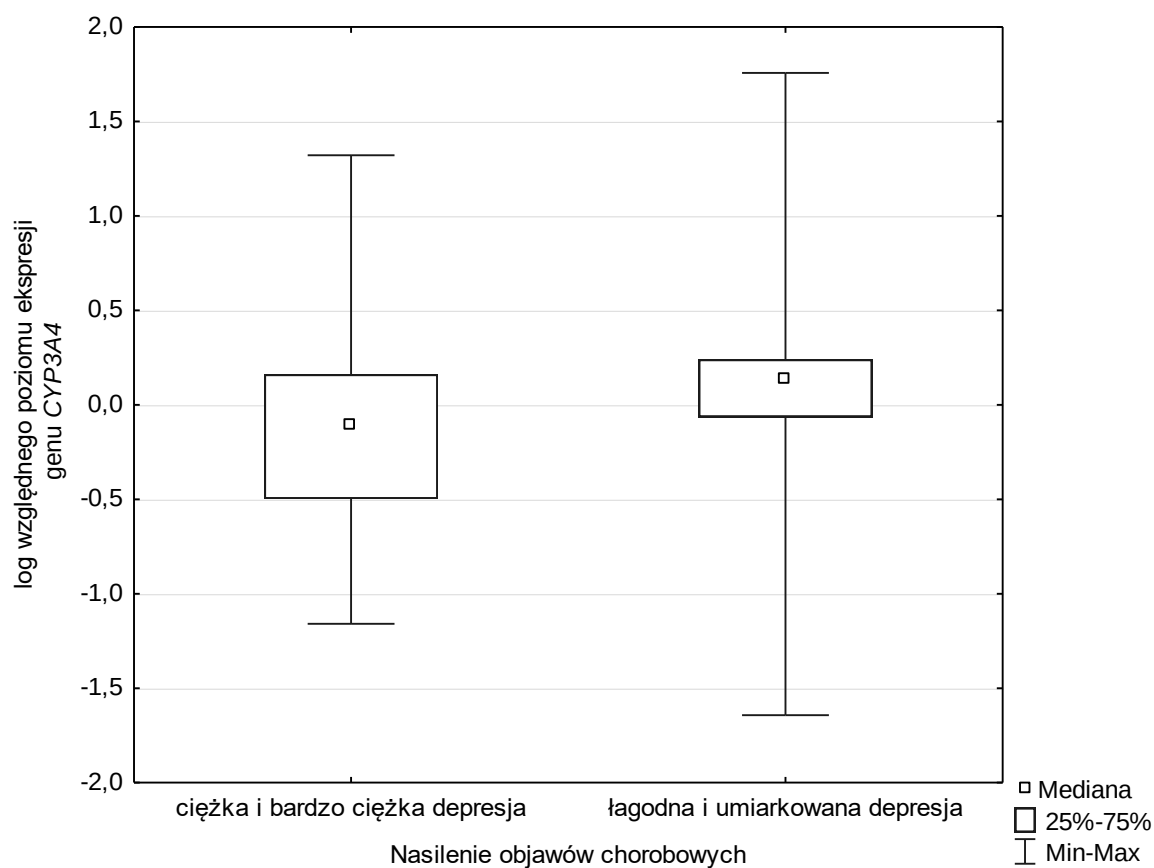
Opierając się o klasyfikacje nasilenia objawów zaburzeń depresyjnych z 17 punktowej skali Hamiltona (rozdział 1.3.4 części teoretycznej) sprawdzono zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a nasileniem objawów depresyjnych. Według klasyfikacji grupa badana, u której oceniono względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* składała się z:

- 2 pacjentów z łagodną depresją;
- 7 pacjentów z depresją o umiarkowanym nasileniu;
- 22 pacjentów z ciężką depresją;
- 4 pacjentów z bardzo ciężką depresją;
- 1 pacjenta z brakującymi danymi klinicznymi.

Ze względu na małe liczebności poszczególnych grup, analizę statystyczną wykonano po połączeniu 4 grup w 2 większe. Jedną grupę stanowili pacjenci z łagodną i umiarkowaną depresją (9 pacjentów), drugą pacjenci z ciężką i bardzo ciężką depresją (26 pacjentów). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic we względnym

poziomie ekspresji genu *CYP3A4* pomiędzy tymi dwoma grupami ($p= 0,515$). Na rycinie 31 zaprezentowano różnice we względnym poziomie ekspresji genu *CYP3A4* w zależności od nasilenia objawów.

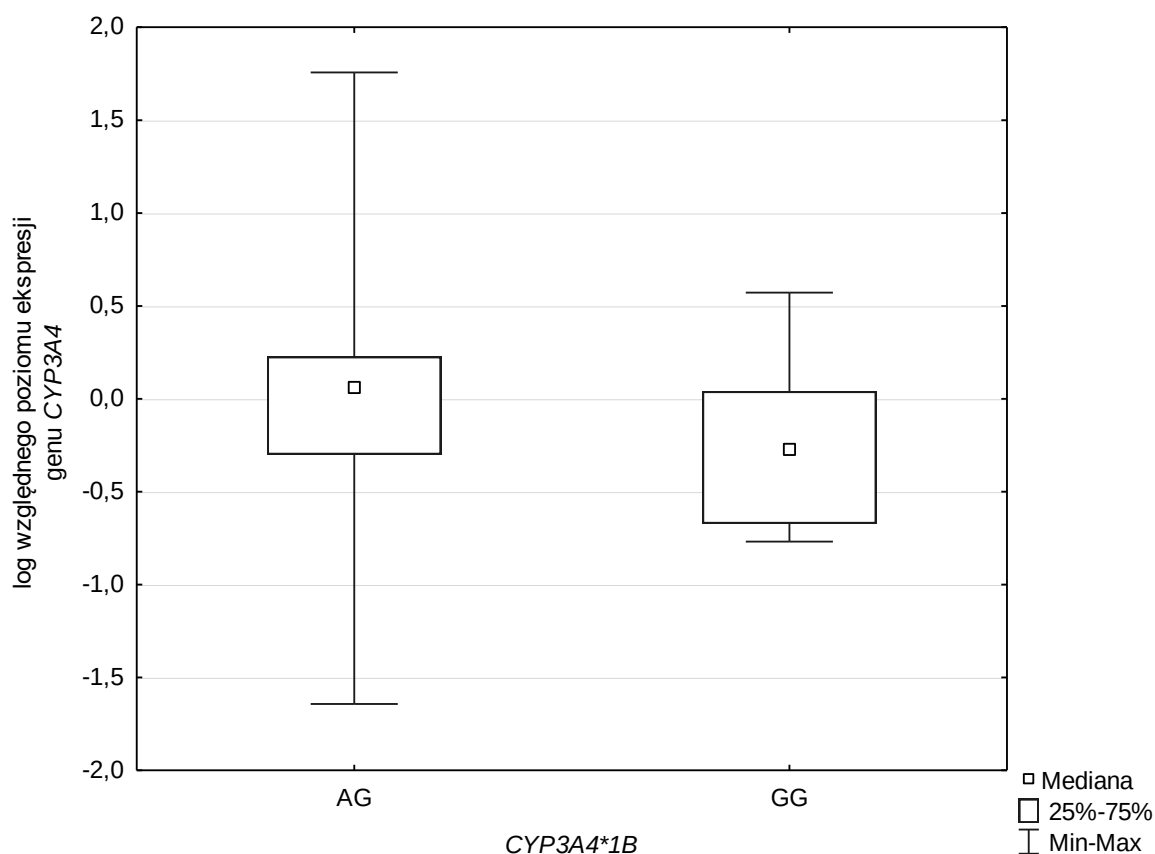
Rycina 31. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* w zależności od nasilenia objawów depresji



3.2.2 Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* w zależności od rodzaju genotypu polimorfizmu *CYP3A4*1B*

Wykonano analizę statystyczną mającą na celu sprawdzenie zależności pomiędzy rodzajem genotypu *CYP3A4*1B* a wartością względną ekspresji genu *CYP3A4*. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w poziomach ekspresji w zależności od rodzaju genotypu ($p = 0,350$). Wyniki przedstawiono na rycinie 32.

Rycina 32. Związek pomiędzy polimorfizmem *CYP3A4*1B* a względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4*



3.2 Podsumowanie wyników

Uzyskane w pracy wyniki wskazują na statystycznie istotną różnicę w częstości występowania poszczególnych genotypów oraz dystrybucji allela *CYP3A5*3* pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Allel *CYP3A5*3* występował rzadziej w grupie kontrolnej w porównaniu do grupy badanej. Nie stwierdzono istotnie statystycznych różnic w częstości występowania allela *CYP3A4*1B* oraz *CYP2C19*2* pomiędzy grupą badaną i kontrolną. Dla polimorfizmu *CYP3A5*3* wykazano statystycznie istotną zależność pomiędzy poszczególnym genotypem i dystrybucją allelu dzikiego a wiekiem w

momencie diagnozy. Pacjenci z genotypem *CYP3A5**3/*3 byli diagnozowani w młodszy wieku w porównaniu do pacjentów z genotypem *CYP3A5**1/*3. Analiza statystyczna potwierdziła zależność pomiędzy obecnością allele *CYP2C19**2 a skutecznością leczenia wyrażoną jako % zmiany HDRS. Pacjenci z przynajmniej jednym allele *CYP2C19**2 mieli lepsze rezultaty leczenia. Nie wykazano statystycznie istotnych związków pomiędzy pozostałymi danymi klinicznymi a analizowanymi wariantami polimorficznymi. Potwierdzono statystycznie istotny związek pomiędzy rozkładem poszczególnych genotypów polimorfizmu *CYP2C19**2 a płcią. Nie potwierdzono zależności pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami klinicznymi. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* nie różnił się istotnie w zależności od płci i wieku pacjenta. Nie wykazano wpływu polimorfizmu *CYP3A4**1B na względny poziom ekspresji genu *CYP3A4*.

Dyskusja

Depresja jest najczęściej występującą chorobą psychiczną w populacji ogólnej. Aktualne dane wskazują na około 264 miliony chorych na całym świecie [7]. W zestawieniu dotyczącym niepełnosprawności i śmiertelności wynikającej z obecności choroby, depresja umieszczona została na 9 miejscu zaraz za takimi jednostkami jak zawał serca i udar mózgu [92]. Problem depresji jest o tyle poważniejszy, że nawet leczona choroba może trwać kilka lat. Wynika to często z nieodpowiednio dobranej terapii farmakologicznej bądź nawrotów choroby. Leki przeciwdepresyjne są leczeniem pierwszego rzutu, jednakże często dochodzi do sytuacji, że pacjenci nie reagują na pierwszy schemat leczenia, ani na jego modyfikacje. Niestety, nie istnieją uniwersalne wytyczne postępowania w przypadku pacjentów ze zdiagnozowaną depresją lekooporną [92, 93]. Stąd coraz więcej prac naukowych dotyczy poznania przyczyn lekooporności, potencjalizacji leczenia i jak najlepszej indywidualizacji farmakoterapii.

W przeprowadzonych badaniach dystrybucja alleli była zgodna z równowagą HWE w przypadku polimorfizmów genów *CYP3A5* i *CYP2C19* w grupie osób chorych na depresję jak i w grupie kontrolnej. W przypadku polimorfizmu genu *CYP3A4* za pomocą testu Chi-kwadrat wykazano odstępstwo od równowagi HWE zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. Częstości genotypów i allela *CYP2C19*2* w grupie kontrolnej nie różniły się od wyników uzyskanych dla populacji kaukaskiej [94] oraz polskiej [95]. Natomiast częstości wariantów polimorficznych *CYP3A5*3* i *CYP3A4*1B* w grupie kontrolnej różniły się od wyników uzyskanych dla populacji polskiej oraz kaukaskiej. Allel *CYP3A5*3* w grupie kontrolnej występował z częstością 0,99 w odniesieniu do populacji polskiej (0,94) [96] i populacji kaukaskiej (0,92-0,94) [96, 97]. Częstość allelu *CYP3A4*1B* w grupie kontrolnej wynosiła natomiast 0,49 i w odniesieniu do populacji kaukaskiej (0,02-0,09) znacząco się różniła [74, 97]. Przyczyną tak dużej różnicy może być błąd próby wynikający ze zbyt małej liczby osób uwzględnionej w badaniu bądź istnienie czynnika, który sprawił, że osoby z określonym genotypem miały większą szansę na zakwalifikowanie się do grupy kontrolnej. Uzyskane częstości występowania badanych alleli w grupie kontrolnej różnią się od wyników badań przeprowadzonych dla populacji afrykańskiej i azjatyckiej. Allel *CYP3A5*3* w populacji afrykańskiej występuje z niższą częstością (0,18-0,29) [75, 97] w odniesieniu do grupy kontrolnej uwzględnionej w tym badaniu (0,99). Częstość występowania zmutowanego allelu genu *CYP3A5* wzrasta wraz z odległością od

równika [75]. Wariant alleliczny *CYP3A4*1B* jest praktycznie nieoznaczany w populacji azjatyckiej (0,001-0,004), natomiast wysoka częstość jego występowania jest charakterystyczna dla populacji afrykańskiej (0,62-0,76) [71, 74, 97].

Kolejnym etapem pracy była analiza porównawcza częstości występowania wariantów polimorficznych badanych genów w grupie osób chorych na depresję w odniesieniu do grupy osób zdrowych. W powyższej pracy allel *CYP3A5*3* był obecny u wszystkich przebadanych osób zarówno w grupie badanej jak i kontrolnej. *CYP3A5*3* występował z częstością 0,99 dla grupy kontrolnej i 0,92 dla grupy badanej. Allel *CYP3A5*3* odpowiada za obniżoną aktywność cytochromu 3A5. W przypadku genotypu **3/*3* (homozygota zmutowana), gen *CYP3A5* nie wykazuje ekspresji [66]. Analiza statystyczna wykazała istotną różnicę w rozkładzie częstości genotypów i dystrybucji dzikiego allelu *CYP3A5*1* pomiędzy grupą osób chorych na depresję a osobami zdrowymi ($p=0,034$). W grupie osób chorych na depresję częściej w porównaniu do grupy kontrolnej identyfikowano genotyp **1/*3* (heterozygota). W grupie kontrolnej natomiast większy odsetek, w porównaniu do grupy badanej, stanowiły osoby z genotypem **3/*3*. Z wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że genotyp **3/*3* może być związany z mniejszym ryzykiem zachorowania na zaburzenia depresyjne, a obecność przynajmniej jednego allela prawidłowego *CYP3A5*1* zwiększa ryzyko zachorowania. Przy zachowanej aktywności białka może dochodzić do zwiększonej generacji RFT, na których udział w rozwoju depresji wskazuje duża ilość prac [62, 63, 98]. Niestety w piśmiennictwie nie znaleziono podobnych badań, które oceniałyby rozkład poszczególnych genotypów badanego polimorfizmu u pacjentów z depresją. Wyniki powyższej analizy można porównać z pracą Du i wsp., którzy ocenili zależność pomiędzy polimorfizmami genów *CYP3A4* i *CYP3A5* a występowaniem schizofrenii [99]. Zespół badawczy nie znalazł statystycznie istotnej zależności pomiędzy polimorfizmem *CYP3A5*3* a występowaniem schizofrenii. Natomiast analizowany w tej samej pracy haplotyp *CYP3A4*1G-CYP3A5*3* występował istotnie częściej w grupie osób chorych na schizofrenie (65,7%) w odniesieniu do grupy osób zdrowych (53,9%). Cytochromy 3A4 i 3A5 biorą udział w katabolizmie serotoniny [100], której zmiany w przekazywaniu podaje się jako jedną z przyczyn rozwoju depresji i schizofrenii. Ze względu na podobny model etiologiczny tych dwóch jednostek chorobowych, porównanie uzyskanych wyników jest zasadne. Katabolizm serotoniny w grupie osób z genotypem (**1/*3*) może być zwiększony ze

względem na zachowaną aktywność białka w porównaniu do grupy osób z genotypem (*3/*3).

Wpływ allele *CYP3A5**3 na predyspozycje do zachorowania został zweryfikowany także w innych chorobach. Wang i wsp. wykazali istotny statystyczny związek pomiędzy występowaniem allele *CYP3A5**3 a zachorowaniem na ostrą i przewlekłą białaczkę szpikową oraz na nowotwór złośliwy jelita grubego [101]. Związek ten dotyczył w szczególności populacji azjatyckiej i kaukaskiej. Przywołana metaanaliza wykazała różnice pomiędzy dystrybucją genotypów (*1/*1) i (*3/*3), nie wskazując na istotne różnice pomiędzy (*1/*3) i (*3/*3). Podobne wyniki uzyskano w badaniach dotyczących ryzyka rozwoju raka prostaty [102]. Przeprowadzona metaanaliza wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju raka prostaty w populacji afrykańskiej w przypadku obecności zmutowanego allele *CYP3A5**3. Statystyczna zależność została potwierdzona w modelu (*1/*1) vs. (*1/*3) + (*3/*3). Autorzy obu metaanaliz jako wyjaśnienie dla związku pomiędzy obecnością allele *CYP3A5**3 a rozwojem chorób nowotworowych, podają fakt obniżonego metabolizmu potencjalnych kancerogenów przez cytochrom 3A5. Natomiast brak związku pomiędzy występowaniem allele *CYP3A5**3 a rozwojem raka jajnika w populacji polskiej wykazał zespół Fiszer-Maliszewska i wsp. [103]. Allel zdaje się więc nie pełnić funkcji protekcyjnej w przypadku nowotworów jajnika tak jak wydaje się to mieć w miejsce w powyższym badaniu w przypadku pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi.

Podczas analizy polimorfizmu *CYP3A4**1B nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w rozkładzie genotypów pomiędzy grupą badaną i grupą kontrolną. Stwierdzono jedynie tendencje do częstszego występowania allele *CYP3A4**1B w grupie osób chorych na depresję. Polimorfizm *CYP3A4**1B charakteryzuje się zamianą adeniny na guaninę w pozycji -392 regionu promotorowego, a jego rola w regulacji aktywności białka nie jest do końca poznana. W badaniach przeprowadzonych przez Ali i wsp. [104], dotyczących ostrej białaczki szpikowej (ang. acute myeloid leukemia, AML), stwierdzono statystycznie istotną różnicę w częstości występowania heterozygot AG pomiędzy grupą osób chorych na AML (21,6 %) a grupą osób zdrowych (2,8 %). Allel *CYP3A4**1B występował z częstością 33,8 % w grupie chorych na AML i 2,8% w przypadku osób zdrowych. Analiza ta potwierdza wcześniejsze badania, gdzie Voso i wsp. [105] określili ryzyko rozwoju AML dla osób posiadających przynajmniej jeden allel *CYP3A4**1B jako 3-krotnie wyższe w porównaniu do osób z genotypem

*CYP3A4**1/*1 (homozygota dzika). W piśmiennictwie wielu autorów poszukuje związku pomiędzy polimorfizmem *CYP3A4**1*B*, a zwiększoną podatnością na zachorowanie na nowotwór prostaty. Metaanaliza uwzględniająca 11 prac eksperymentalnych przeprowadzona przez Zhou i wsp. [106], wskazuje na istotny statystycznie związek pomiędzy nosicielami allelu *CYP3A4**1*B* (genotypy *1*A*/*1*B* + *1*B*/*1*B*) a zachorowalnością na nowotwór prostaty wśród populacji afrykańskiej. Analiza nie potwierdziła takiej zależności dla populacji kaukaskiej i azjatyckiej. Badania wskazują także na potencjalny udział polimorfizmu *CYP3A4**1*B* w patogenezie nowotworu jajnika. Inny wielośrodkowy zespół badawczy, po analizie 16 prac eksperymentalnych z różnych części świata, wykazał zależność pomiędzy obecnością allelu *CYP3A4**1*B* a zwiększoną zapadalnością na nowotwór jajnika [107]. Według naukowców z OCAC (ang. Ovarian Cancer Association Consortium) polimorfizm *CYP3A4**1*B* może wpływać na rozwój raka jajnika poprzez obniżenie ekspresji genu *CYP3A4* i zmniejszenie aktywności białka tym samym zmniejszając metabolizm estrogenów, których podwyższone stężenie może mieć wpływ na rozwój nowotworu jajnika [108]. Enzymy cytochromu P450 biorą udział w biotransformacji kancerogenów do elektrofilowych metabolitów, które mogą wchodzić w interakcje z białkami i cząsteczkami DNA [109]. Stanowi to podstawę do poszukiwania związku pomiędzy zwiększoną aktywnością cytochromów a rozwojem niektórych typów nowotworów.

Rozkład genotypów polimorfizmu *CYP2C19**2 pomiędzy grupą osób z zaburzeniami depresyjnymi a grupą osób zdrowych nie wykazał istotnych różnic. W obu grupach najczęściej występującym wariantem był genotyp *1/*1 (homozygota dzika). W grupie osób cierpiących na depresję częstość występowania genotypu *1/*1 i *1/*2 wynosiła odpowiednio 74,5 % do 22,5% a w grupie osób zdrowych odpowiednio 67,7% do 31,1%. Różnica ta nie była statystycznie istotna. W 2009 roku Justenhoven i wsp. [110] poddali analizie związek pomiędzy wariantami allelicznymi (*2, *3, *17) genu *CYP2C19* a występowaniem nowotworu piersi. Zespół badaczy wykazał iż allel *CYP2C19**17 związany jest z niższą zapadalnością na nowotwór piersi. Cytochrom 2C19 bierze udział w metabolizmie estrogenów, które są potwierdzonym czynnikiem ryzyka rozwoju nowotworu piersi. Pacjenci z wariantem *CYP2C19**17 uznawani są za ultra szybkich metabolizerów (UM). Obniżone ryzyko rozwoju nowotworu piersi powiązane jest z przyspieszonym metabolizmem estrogenów przez enzym. Rozkład

genotypów dla polimorfizmu *CYP2C19**2 w grupie osób chorych na raka piersi (*1/*1=73%, *1/*2=24,3%, *2/*2=2,7%) był niemalże identyczny z tym jaki udało się uzyskać w powyższej pracy w grupie osób chorych na depresję (*1/*1=74,5%, *1/*2=22,5%, *2/*2=3%). W obu przypadkach nie udowodniono istotnej roli wariantu *CYP2C19**2 w patogenezie choroby. Polonikov i wsp. wskazuje na protekcyjny udział zmutowanego allelu *CYP2C19**2 w chorobie niedokrwiennej serca [111]. Odwrotne wyniki uzyskali Zhang i wsp. [112], którzy wykazali, że w przypadku osób z chorobą niedokrwinną serca i wariantem allelicznym *CYP2C19**2 istnieje wyższe ryzyko wystąpienia powikłań, niż w przypadku osób nie posiadających allelu *CYP2C19**2.

Kolejnym etapem pracy była ocena zależności pomiędzy genotypami/allelami badanych polimorfizmów a danymi klinicznymi. Przy użyciu narzędzi statystycznych wykazano istotną różnicę pomiędzy genotypem pacjenta oraz dystrybucją dzikiego allelu *CYP3A5**1 a wiekiem w momencie diagnozy ($p=0,034$). Pacjenci z genotypem *3/*3, byli diagnozowani w młodszym wieku, średnio o 7 lat wcześniej niż pacjenci z genotypem *1/*3. Niższy wiek w momencie diagnozy można odnieść do wcześniejszego wystąpienia objawów chorobowych. Należy jednak podchodzić do tego z pewnym dystansem, ze względu na to, że nie zawsze pacjent musi zgłosić się do lekarza do razu po wystąpieniu pierwszych niepokojących symptomów. W obszernych badaniach przeprowadzonych przez zespół naukowców należących do Breast Cancer Association Consortium (BCAC) [113] wykazano związek pomiędzy polimorfizmem rs10235235 A>G, zlokalizowanym w niekodującym regionie w locus 7q22.1 (locus podrodziny genów *CYP3A*) a ryzykiem rozwoju nowotworu piersi. Wariant polimorficzny rs10235235 nie miał wpływu na wiek w momencie rozwinęcia nowotworu. Wykazano jednak, iż rzadki allel G polimorfizmu rs10235235 odgrywa protekcyjną rolę w przypadku kobiet, u których pierwsza miesiączka pojawiła się po 15 roku życia. Mechanizm wczesnego występowania nowotworów piersi u kobiet, które szybciej zaczęły miesiączkować wynika prawdopodobnie z dłuższej ekspozycji na estrogeny. Protekcyjna rola tego wariantu wynika zapewne ze zwiększenia ekspresji genów (*CYP3A4/5*) znajdujących się w tym samym locus.

W przypadku polimorfizmu *CYP3A4**1*B* i *CYP2C19**2 nie wykazano statystycznie istotnej zależności pomiędzy genotypem pacjenta i dystrybucją alleli a wiekiem w momencie postawienia diagnozy. Kadlubar i wsp. [114] wykazali związek pomiędzy występowaniem allelu *CYP3A4**1*B* a wiekiem pacjenta w którym występuje

okres pokwitania, wymieniany jako jeden z czynników ryzyka rozwoju nowotworu piersi. W badaniach dotyczących drżenia samoistnego, Alonso-Navarro i wsp. [115] wskazali na niższy wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby w przypadku osób z genotypem *CYP2C19**1/*2 jednak związek ten nie był statystycznie istotny. Genotyp *1/*2 występował istotnie częściej w grupie osób chorych na drżenie samoistne co wskazuje na zwiększone ryzyko rozwoju choroby w przypadku osób z genotypem *1/*2. W powyższych badaniach przeprowadzonych na grupie osób chorych na zaburzenia depresyjne nie stwierdzono wpływu wariantów polimorficznych *CYP3A4**1*B* i *CYP2C19**2 na wcześniejsze występowanie epizodów depresyjnych.

Analiza statystyczna związku pomiędzy wariantami polimorficznymi *CYP3A4**1*B*, *CYP3A5**3 i *CYP2C19**2 a stopniem nasilenia objawów depresji, przedstawionym jako liczba punktów w skali HDRS, nie wykazała istnienia jakiegokolwiek zależności. Największą różnicę w liczbie punktów w skali HDRS pomiędzy poszczególnymi genotypami/allelami odnotowano dla polimorfizmu *CYP3A5**3. Osoby z genotypem *1/*3 miały średnio o niecałe 4 punkty w skali HDRS więcej w odniesieniu do osób z genotypem *3/*3. W przypadku polimorfizmu *CYP2C19**2 oraz *CYP3A4**1*B*, średnie różnice w skali HDRS były niewielkie i mieściły się w zakresie do 2 punktów. Wyniki powyższej pracy można bezpośrednio odnieść do badań przeprowadzonych na populacji szwedzkiej, gdzie Sim i wsp. ocenili zależność pomiędzy polimorfizmem genu *CYP2C19* a nasileniem objawów depresyjnych [116]. Osoby z genotypem *CYP2C19**2/*2 miały istotnie statystycznie niższe natężenie objawów choroby w odniesieniu do osób z genotypem *CYP2C19**1/*1. Po dodatkowym podziale grupy badanej względem płci i wieku okazało się, że w przypadku mężczyzn oraz osób poniżej 73 roku życia, różnice w nasileniu objawów pomiędzy tymi dwoma genotypami były jeszcze większe. W przypadku kobiet nie wykazano istotnie statystycznie zależności pomiędzy genotypem a nasileniem objawów depresji. Autorzy wskazują na potencjalny udział cytochromu *CYP2C19* w metabolizmie serotoniny i neurosteroidów jako przyczynę wyżej wymienionej zależności. Genotyp *CYP2C19**2/*2 związany jest z fenotypem słabego metabolizera przez co katabolizm serotoniny może być w tym przypadku obniżony. Wysokie stężenia serotoniny są powiązane z łagodzeniem objawów ze spektrum zaburzeń depresyjnych [40, 117]. Istnieje kilka możliwych przyczyn uzyskania innych wyników w powyższej pracy, niż te, które zostały przedstawione przez Sim i wsp. W badaniach

przeprowadzonych na populacji szwedzkiej uwzględniono 1416 osób znajdujących się w Szwedzkim Rejestrze Bliźniąt. Do weryfikacji nasilenia objawów depresji użyto skali CES-D (ang. Center for Epidemiologic Studies Depression Scale), która przeznaczona jest do samodzielnego wypełnienia przez pacjenta. W powyższych badaniach oceniono polimorfizm u 102 pacjentów. Oceny nasilenia objawów depresji dokonywał lekarz przy użyciu kwestionariusza Hamiltona. Sim i wsp. wskazali również na potencjalnie różny efekt polimorfizmu *CYP2C19*2* w zależności od fenotypu zaburzeń depresyjnych [116]. W innych badaniach oceniających wpływ polimorfizmów genów kodujących cytochromy na stopień nasilenia objawów chorobowych Rebbeck i wsp. [118] analizowali związek pomiędzy polimorfizmami wybranych cytochromów a stopniem złośliwości raka prostaty. W badaniach uwzględniono ocenę polimorfizmu *CYP3A*1B* i *CYP3A5*3*, jednakże nie potwierdzono ich wpływu na stopień złośliwości nowotworu prostaty. Wykazano jednak istotny wpływ polimorfizmu genu *CYP3A43* na stopień złośliwości raka prostaty, wyrażany w stopniach skali Gleasona. U osób u których w przeszłości zdiagnozowano łagodny przerost prostaty i które posiadały przynajmniej jeden zmutowany allel, nowotwór prostaty cechował się niższym stopniem złośliwości.

Ostatnim etapem analizy wariantów polimorficznych *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* *CYP2C19*2* była ocena zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami i dystrybucją alleli a skutecznością leczenia. Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy obecnością allela *CYP2C19*2* a skutecznością terapii. Pacjenci z przynajmniej jednym allelem *CYP2C19*2* uzyskiwali statystycznie lepsze rezultaty leczenia w stosunku do pacjentów u których allel ten nie występował. Zależność ta nie została potwierdzona w odniesieniu do poszczególnych genotypów. Może to wynikać z małej liczby pacjentów o genotypie **2/*2* (n=4). Mrazek i wsp. [119] ocenili wpływ wariantów polimorficznych *CYP2C19*2* na tolerancję citalopramu oraz osiągnięcie remisji depresji przy stosowaniu tego związku. Pacjenci z allelem *CYP2C19*2*, który związany jest z fenotypem IM wykazywali wyższy wskaźnik remisji choroby w przypadku tolerancji citalopramu. Pod pojęciem tolerancja leku należy rozumieć brak występowania działań niepożądanych przy stosowaniu preparatu. Podobne badania przeprowadzili Bousman i wsp. [120], którzy ocenili wpływ polimorfizmów genu *CYP2C19* na tolerancję i odpowiedź na stosowanie escitalopramu/citalopramu. Badania przeprowadzono na grupie pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowanymi zaburzeniami depresyjnymi i lękowymi. Pacjenci z fenotypem PM odznaczali się niższą

tolerancją na escitalopram/citalopram w stosunku osób z prawidłowym bądź szybkim metabolizmem leków. Od fenotypu metabolizera zależała również ilość występujących skutków ubocznych, która rosła wraz z osłabieniem efektywności metabolizera. W tym samym badaniu nie wykazano wpływu fenotypu metabolizera na odsetek pacjentów, którzy pozytywnie odpowiedzieli na leczenie. Wskazano jednak na szybsze osiągnięcie pozytywnej odpowiedzi związanej ze stosowaniem escitalopramu/citalopramu w przypadku pacjentów o fenotypie szybkiego i ultra szybkiego metabolizera. Wyniki metaanalizy przeprowadzonej przez Fabbri i wsp. [121] wskazują na większe prawdopodobieństwo remisji depresji i uzyskanie lepszych wyników leczenia escitalopramem/citalopramem w przypadku osób o fenotypie PM w odniesieniu do osób o fenotypie EM. Na potwierdzenie istniejących w piśmiennictwie sprzecznych wyników badań należy przytoczyć analizę wykonaną przez Hodgson i wsp. [122], gdzie autorzy nie wykazali istotnie statystycznego związku pomiędzy polimorfizmem *CYP2C19*2* a efektywnością leczenia zaburzeń depresyjnych. W prezentowanym w pracy badaniu citalopram był jednym z wielu stosowanych leków przeciwdepresyjnych, dlatego istnieją pewne ograniczenia w możliwości porównania otrzymanych wyników do danych z piśmiennictwa. Dostępne są również badania oceniające wpływ polimorfizmu *CYP2C19*2* na działanie substancji z grupy innych leków niż SSRI. Taranu i wsp. [123] nie wykazali istotnego wpływu fenotypu metabolizera na odpowiedź na leczenie oraz indukcje remisji przy użyciu wenlafaksyny. Podobne wyniki otrzymał zespół Zhang i wsp. [71], który w grupie 175 pacjentów z populacji również nie wykazał związku pomiędzy polimorfizmem *CYP2C19*2* a wywołaniem remisji, stosując w tym celu wenlafaksynę.

Przeprowadzone w tej pracy badania nie wykazały istotnie statystycznego związku wariantów polimorficznych *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* ze skutecznością leczenia. W piśmiennictwie trudno o dane z badań oceniających skuteczność leczenia antydepresantami w zależności od dystrybucji alleli *CYP3A4*1B* i *CYP2C19*2*. Polimorfizmy te są jednak przedmiotem oceny w przypadku wielu innych jednostek chorobowych. Metaanaliza przeprowadzona przez Shi i wsp. [124] przedstawia wpływ poszczególnych genotypów polimorfizmu *CYP3A4*1B* na dobową dawkę takrolimusu u pacjentów po przeszczepie nerki. Pacjenci z genotypem **1A/*1A* (homozygota dzika) wymagali mniejszej dawki leku w odniesieniu do masy ciała w porównaniu z nosicielami allelu *CYP3A4*1B*. Wyniki te mogą potwierdzać założenia niektórych grup

badawczych na temat zwiększonej aktywności cytochromu 3A4 u pacjentów z allelem *CYP3A4*1B* [71, 72]. Podobne badania, ale uwzględniające wpływ polimorfizmu *CYP3A5*3* na dawkę takrolimusu zostały przeprowadzone przez zespół Kan i wsp. [125]. Pacjenci wykazujący ekspresję genu *CYP3A5* (*1/*1 oraz *1/*3) metabolizowali lek bardziej wydajnie i wymagali wyższych dawek niż pacjenci z genotypem *3/*3. Zależność ta została potwierdzona na populacji kaukaskiej i azjatyckiej. Ocenie poddano również ryzyko odrzutu narządu. Uzyskane wyniki wskazują na wyższe prawdopodobieństwo odrzutu narządu u osób z zachowaną ekspresją genu *CYP3A5*. Zależność ta została potwierdzona tylko dla populacji azjatyckiej. Wynikać to może z większej częstości występowania genotypów *1/*1 i *1/*3 związanych z zachowaną ekspresją genu *CYP3A5* w populacji azjatyckiej. Badania Gor i wsp. [126] wskazują na niższy wskaźnik przeżywalności u kobiet z nowotworem jajnika i genotypem *CYP3A4*1A/*1B* w odniesieniu do genotypu *CYP3A4*1A/*1A* przy stosowaniu terapii opartej na cyklofosfamidzie. Przyczyn tego zjawiska upatruje się w wolniejszym metabolizmie cyklofosfamidu do aktywnej formy. Hipoteza ta zakłada zmniejszenie aktywności cytochromu 3A4 w związku z występowaniem allela *CYP3A4*1B*. Wyniki otrzymane w powyższych badaniach na grupie pacjentów z depresją nie wskazują na istotny wpływ polimorfizmu *CYP3A4*1B* i *CYP3A5*3* na skuteczność farmakoterapii. Może to wynikać z grupy leków, które były stosowane u pacjentów chorych na depresję i są w głównym stopniu metabolizowane przez izoenzym *CYP2C19*.

Ostatnim etapem części praktycznej pracy była ocena względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4* u pacjentów chorych na depresję oraz odniesienie uzyskanych wyników do cech klinicznych pacjenta. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* w zbadanych próbach był zróżnicowany. Analiza statystyczna nie wykazała żadnych istotnych związków pomiędzy poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* nie zależał również od płci i wieku pacjenta. W badaniach nad pacjentami po przeszczepie wątroby, którzy leczeni byli takrolimusem, Wang i wsp. [127] wykazali istotnie statystyczną zależność pomiędzy poziomem ekspresji genów kodujących enzymy z kompleksu cytochromu P450 a stężeniem takrolimusu w surowicy. Poziom ekspresji genów *CYP3A5* *CYP4A11* i *CYP2B6* ujemnie korelował ze stężeniem takrolimusu w surowicy pacjentów. Tego typu ocena może być użyteczna przy doborze odpowiedniego leku oraz ustalaniu dawki terapeutycznej. W powyższej pracy nie oceniano stężenia leków przeciwdepresyjnych w

surowicy osób chorych na depresję. Rodriguez-Antona i wsp. [128] dokonali oceny ekspresji genu *CYP3A4* u pacjentów z chłoniakiem T-komórkowym. Wysoka ekspresja genu *CYP3A4* w tkance nowotworowej była powiązana z niższym wskaźnikiem pełnej remisji. Uzyskane wyniki zostały potwierdzone na linii komórkowej, gdzie komórki cechowały się wyższą opornością na działanie chemioterapeutyków. Ocena poziomu ekspresji genu *CYP3A4* może okazać się przydatna w identyfikacji pacjentów z wysokim ryzykiem niepowodzenia farmakoterapii w schizofrenii. Tóth i wsp. [129] wykazali, że pacjenci z normalną bądź wysoką ekspresją genu *CYP3A4* potrzebują prawie dwukrotnie wyższej dawki klozapiny na kilogram masy ciała w odniesieniu do pacjentów z niskim poziomem ekspresji genu *CYP3A4*.

Część prac dostępnych w piśmiennictwie wskazuje na niską użyteczność oznaczeń poziomu ekspresji genów cytochromów we krwi obwodowej. Zespół Haas i wsp. [130] porównał poziom ekspresji *CYP3A4* mRNA w krwi obwodowej oraz aktywność enzymatyczną cytochromu 3A4 po indukcji rifampicyną. Poziom ekspresji genu *CYP3A4* mierzony w krwi obwodowej słabo korelował z aktywnością enzymatyczną cytochromu 3A4. W podobnych badaniach dokonano analizy porównawczej pomiędzy poziomem ekspresji 17 genów kodujących różne izoenzymy cytochromu P450 a poziomem ekspresji tych samych genów w wątrobie [131]. Statystycznie istotną korelację pomiędzy poziomami ekspresji genu w wątrobie i krwi obwodowej stwierdzono jedynie dla izoenzymu CYP4B1. W powyższej pracy z uwagi na rodzaj jednostki chorobowej względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* oceniono w materiale genetycznym wyizolowanym z leukocytów krwi obwodowej. Ocena ekspresji genu w konkretnych narządach jest możliwa wtedy kiedy fragment tkanki pobierany jest w celach diagnostycznych bądź jest usuwany w przypadku wystąpienia zmian nowotworowych. Alternatywą mogą okazać się badania przeprowadzane na liniach komórkowych. Przeprowadzone w powyższej pracy badania wskazują na brak użyteczności analizy ekspresji genu *CYP3A4* w ocenie prognostycznej skuteczności terapii pacjentów z depresją.

Poznanie dokładnej etiologii zaburzeń depresyjnych prawdopodobnie przyczyni się do rozwoju nowych, lepszych metod terapeutycznych oraz pozwoli z większą pewnością ocenić ryzyko rozwoju tej choroby. Obecnie odpowiedź na leczenie farmakologiczne jest bardzo zróżnicowana. Szczególnie pacjenci z TRD są narażeni na długotrwałe leczenie, które przez długi okres może nie przynosić korzystnych efektów. Dostosowanie odpowiedniego schematu leczenia u pacjenta z TRD może trwać nawet kilka lat. Zastosowanie genotypowania oraz oceny poziomów ekspresji badanych genów w celu ustalenia fenotypu metabolizera może znacząco zmniejszyć ilość podejmowanych prób leczenia.

Wnioski

- Różnice w częstości występowania poszczególnych wariantów genotypów dla polimorfizmu *CYP3A5**3 między grupą pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi a grupą osób zdrowych wskazują na możliwość wpływu genotypu *3/*3 na zmniejszenie ryzyka zachorowania na depresję.
- Genotyp *CYP3A5**3/*3 może predysponować do wystąpienia pierwszego epizodu depresyjnego w młodszym wieku.
- Występowanie allelu *CYP2C19**2 związane jest z lepszą odpowiedzią na leczenie.
- Zmiany względnego poziomu ekspresji genu *CYP3A4*, nie mają związku z cechami klinicznymi takimi jak: wiek w momencie diagnozy, nasilenie objawów (HDRS), skuteczność terapii (zmiana HDRS, % zmiany HDRS).

Przeprowadzone w powyższej pracy badania wskazują na potencjalną, protekcyjną rolę wariantu *CYP3A5**3/*3 w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Brak aktywności funkcjonalnego białka w grupie osób zdrowych może ograniczać generowanie RFT, ale także ograniczać katabolizm serotoniny. W powyższym badaniu pacjenci z przynajmniej jednym allelem *CYP2C19**2 uzyskiwali lepsze rezultaty leczenia. Obecność allela *CYP2C19**2 związana jest z obniżoną zdolnością metabolizmu leków. U osób o fenotypie IM/PM aktywne formy leków nie są tak skutecznie metabolizowane i dłużej wykazują swoje działanie. Rola polimorfizmu *CYP2C19**2 może okazać się kluczowa w przewidywaniu skuteczności leczenia farmakologicznego u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi.

Streszczenie

Na całym świecie na depresję cierpi ponad 264 milionów ludzi. Jest to najczęściej występujące zaburzenie psychiczne, które częściej dotyka kobiety niż mężczyzn. Do objawów depresji należą: obniżenie nastroju, anhedonia, brak energii, zaburzenia snu oraz zmiany apetytu. Niestety nie każda osoba odczuwająca wyżej wymienione objawy zgłasza się ze swoim problemem do lekarza. Według statystyk około 60 % chorych nie szuka pomocy u specjalisty. Etiologia zaburzeń depresyjnych wciąż nie jest do końca poznana. Najbardziej prawdopodobne modele rozwoju choroby to teoria monoaminowa, związana z zaburzeniem neuroprzekąźnictwa w ośrodkowym układzie nerwowym oraz teoria zapalna. U osób z depresją obserwuje się wzrost stężenia enzymów odpowiedzialnych za generowanie reaktywnych form tlenu. Znaczny odsetek pacjentów uzyskuje słaby efekt leczniczy, a 20% z nich ma symptomy choroby nawet po dwóch latach od momentu postawienia diagnozy. Przyczyną słabych efektów leczenia może być podtyp kliniczny depresji nazywany depresją lekooporną. Przyczyn tego zjawiska poszukuje dział nauki nazywany farmakogenetyką.

Cytochromy P450 to grupa białek enzymatycznych, która zaangażowana jest w wiele reakcji zachodzących w naszym organizmie. Jedną z ich funkcji jest metabolizm ksenobiotyków wprowadzanych do organizmu, w tym leków, toksyn, kancerogenów. Polimorfizmy genów kodujących cytochromy mogą prowadzić do powstania zmienionego strukturalnie białka, które będzie wykazywało zmniejszoną bądź zwiększoną aktywność. Zmiany aktywności białka mają istotny wpływ na metabolizm stosowanych leków, ale mogą również odgrywać znaczącą rolę w patogenezie niektórych chorób, w tym też zaburzeń depresyjnych.

Celem pracy była ocena ekspresji genu *CYP3A4* u pacjentów chorych na depresję oraz ocena częstości występowania wariantów allelicznych: *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* w grupie badanej w porównaniu do grupy kontrolnej.

Materiał do badań stanowiło 108 prób DNA i 38 prób RNA wyizolowanych z leukocytów krwi obwodowej pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne nawracające (ICD-10, F33.0-F33.8) oraz 93 próby DNA pochodzące od osób zdrowych.

W celu oceny ekspresji genu *CYP3A4* w grupie osób chorych na zaburzenia depresyjne zastosowano metodę Real-time PCR. Do oceny częstości występowania poszczególnych genotypów polimorfizmów *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* oraz *CYP2C19*2* w grupie badanej jak i kontrolnej zastosowano metodę RFLP.

W grupie osób zdrowych zaobserwowano zwiększoną częstość występowania dzikiego allelu *CYP3A5*1* w porównaniu z grupą osób chorych na depresję. W grupie osób chorych na depresję częściej identyfikowano genotyp **1/*3* (11,4%) w porównaniu do grupy kontrolnej (1,1%). Wykazano istotnie statystyczną zależność pomiędzy częstością występowania poszczególnych genotypów i alleli polimorfizmu *CYP3A5*3*, a wiekiem w momencie diagnozy pacjenta. Pacjenci z genotypem **3/*3*, byli diagnozowani w młodszym wieku, średnio o 7 lat wcześniej niż pacjenci z genotypem **1/*3*. Wykazano istotny statystycznie związek pomiędzy obecnością allela *CYP2C19*2*, a skutecznością terapii. Pacjenci z przynajmniej jednym allelem *CYP2C19*2* uzyskiwali statystycznie lepsze rezultaty leczenia w stosunku do pacjentów u których allel ten nie występował. Względny poziom ekspresji genu *CYP3A4* u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi był zróżnicowany. Analiza statystyczna nie wykazała żadnych istotnych związków pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu *CYP3A4* a badanymi cechami.

Przedstawione w pracy wyniki wskazują na możliwą protekcyjną rolę genotypu *CYP3A5*3/*3* w rozwoju zaburzeń depresyjnych. Genotyp *CYP3A5*3/*3* może także odpowiadać za wystąpienie pierwszych objawów choroby w młodszym wieku. Uzyskane wyniki wskazują również na potencjalny wpływ występowania allelu *CYP2C19*2* na odnotowywanie lepszych rezultatów leczenia. Zmiany ekspresji względnego poziomu genu *CYP3A4* nie mają istotnego wpływu na rozwój, przebieg i skuteczności leczenia depresji.

Summary

Over 264 million people suffer from depression worldwide. It is the most common mental disorder that affects more women than men. The symptoms of depression include: depressed mood, anhedonia, lack of energy, sleep disorders and changes in appetite. Unfortunately, not all people who experience the mentioned symptoms report their problem to a physician. According to statistics, about 60% of patients do not seek help from a psychiatrist. The etiology of depressive disorders is still not fully understood. The most likely models of disease development are monoamine theory, related to disturbance of neurotransmission in central nervous system, and inflammatory model. There is an increased concentration of enzymes responsible for generating reactive oxygen species in patients with depression. A large percentage of patients achieve a weak therapeutic effect, and 20% of them have symptoms of the disease even two years after the diagnosis. The reason of weak treatment effectiveness may be the clinical subtype of depression called Treatment-resistant depression. A branch of science called pharmacogenetics is looking for reasons for this phenomenon.

Cytochromes P450 is a group of enzymatic proteins involved in many reactions in body. One of their functions is the metabolism of xenobiotics introduced into our body, including drugs, toxins and carcinogens. Polymorphisms of genes encoding cytochromes may lead to the formation of a structurally altered protein that can show reduced or increased activity. Changes in protein activity have a significant impact on the metabolism of the used drugs, but may also play a significant role in the pathogenesis of some diseases, including depressive disorders.

The aim of the study was to assess the expression of the *CYP3A4* gene in patients with depression and to assess the incidence of allelic variants: *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* and *CYP2C19*2* in the study group compared to the control group.

Material for the study consisted of 108 DNA and 38 RNA samples isolated from peripheral blood leukocytes from patients suffering from recurrent depressive disorders (ICD-10 F33.0-F33.8) and 93 DNA samples derived from healthy individuals.

Real-time PCR was used to assess *CYP3A4* gene expression in a group of patients with depressive disorders. The RFLP method was used to assess the incidence

of individual genotypes of *CYP3A4*1B*, *CYP3A5*3* and *CYP2C19*2* polymorphisms in the study and control groups.

In the healthy group, an increased frequency of the wild *CYP3A5*1* allele was observed compared to the group of patients with depression. In the group of patients suffering from depression, the genotype **1/*3* (11.4%) was more often identified compared to the control group (1.1%). A statistically significant correlation between the incidence of individual genotypes and alleles of the *CYP3A5*3* polymorphism and age at diagnosis was demonstrated. Patients with the genotype **3/*3* were diagnosed at a younger age, on average 7 years earlier than patients with the genotype **1/*3*. A statistically significant relationship between the presence of the *CYP2C19*2* allele and the efficacy of the treatment was demonstrated. Patients with at least one *CYP2C19*2* allele achieved statistically better results compared to patients who did not have this allele. The relative level of *CYP3A4* expression in patients with depressive disorders was differentiated. Statistical analysis did not show any significant correlation between the relative level of *CYP3A4* expression and the examined clinical features.

The results presented in the paper show a possible protective role of the *CYP3A5*3/*3* genotype in the development of depressive disorders. On the other hand, the *CYP3A5*3/*3* genotype may be responsible for the occurrence of first symptoms of disease at younger age. The results also show the potential impact of the *CYP2C19*2* allele on better outcomes. Changes in the relative level of the *CYP3A4* gene expression do not have a significant impact on the development, course of disease and efficacy of depression treatment.

Spis rycin

Rycina 1. Rozpowszechnienie zaburzeń depresyjnych wśród kobiet i mężczyzn w różnych regionach świata wg. WHO [8]	12
Rycina 2. Schemat zamkniętego koła otyłość-zapalenie-depresja [18]	16
Rycina 3. Schemat leczenia przeciwdepresyjnego w zapobieganiu nawrotom choroby [38]	24
Rycina 4. Mechanizm działania leków przeciwdepresyjnych z grupy SSRI	26
Rycina 5. Schemat budowy enzymu CYP3A5 [57]	32
Rycina 6. Lokalizacja genu <i>CYP3A4</i> [56]	35
Rycina 7. Lokalizacja genu <i>CYP2C19</i> [84]	39
Rycina 8. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla genu <i>CYP3A4</i> ...	53
Rycina 9. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu <i>CYP3A4*1B</i>	54
Rycina 10. Przykładowa krzywa amplifikacji fragmentu genu badanego <i>CYP3A4</i>	56
Rycina 11. Przykładowa krzywa amplifikacji fragmentu genu referencyjnego <i>GAPDH</i>	56
Rycina 12. Przykładowa krzywa topnienia dla powielonego fragmentu genu badanego <i>CYP3A4</i>	57
Rycina 13. Przykładowa krzywa topnienia dla powielonego fragmentu genu referencyjnego <i>GAPDH</i>	57
Rycina 14. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla fragmentu genu <i>CYP3A5</i>	60
Rycina 15. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu <i>CYP3A5*3</i>	60
Rycina 16. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu PCR dla fragmentu genu <i>CYP2C19</i>	61
Rycina 17. Przykładowy rozdział elektroforetyczny produktu po trawieniu dla polimorfizmu <i>CYP2C19*2</i>	61
Rycina 18. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu <i>CYP3A4*1B</i> w grupie badanej oraz kontrolnej	64
Rycina 19. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu <i>CYP3A5*3</i> w grupie badanej oraz kontrolnej	67

Rycina 20. Zależność pomiędzy obecnością allele <i>CYP3A5*3</i> a wiekiem w momencie postawienia diagnozy	69
Rycina 21. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu <i>CYP2C19*2</i> w grupie badanej oraz kontrolnej.....	70
Rycina 22. Zależność pomiędzy obecnością allele <i>CYP2C19*2</i> a efektywnością leczenia wyrażoną w postaci % zmiany HDRS	73
Rycina 23. Częstość występowania poszczególnych genotypów dla polimorfizmu <i>CYP2C19*2</i> w podgrupach badanych kobiet i mężczyzn	73
Rycina 24. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji jakościowej dla fragmentu genu <i>CYP3A4</i>	74
Rycina 25. Log względnego poziomu ekspresji genu <i>CYP3A4</i>	75
Rycina 26. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a wiekiem pacjenta.....	77
Rycina 27. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a wiekiem pacjenta w momencie diagnozy	77
Rycina 28. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a HDRS	78
Rycina 29. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a zmianą HDRS	78
Rycina 30. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a % zmiany HDRS	79
Rycina 31. Względny poziom ekspresji genu <i>CYP3A4</i> w zależności od nasilenia objawów depresji	80
Rycina 32. Związek pomiędzy polimorfizmem <i>CYP3A4*1B</i> a względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i>	81

Spis tabel

Tabela 1. Stadia depresji lekoopornej według TRSM [44]	29
Tabela 2. Stadia depresji lekoopornej według ESM [46]	30
Tabela 3. Przykładowe substraty cytochromu CYP3A4 z grupy leków stosowanych w leczeniu depresji, inhibitory oraz induktory [89, 90]	40
Tabela 4. Charakterystyka grupy badanej i kontrolnej	45
Tabela 5. Profil termiczny reakcji odwrotnej transkrypcji	48
Tabela 6. Składniki mieszanin reakcyjnych dla PCR	49
Tabela 7. Profil termiczny PCR oraz wykorzystane sekwencje starterowe	50
Tabela 8. Stosowane enzymy restrykcyjne	51
Tabela 9. Profil termiczny RFLP oraz skład mieszaniny reakcyjnej	52
Tabela 10. Rozkład genotypów i alleli w grupie kontrolnej oraz zgodność z HWE	62
Tabela 11. Rozkład genotypów i alleli w grupie badanej oraz zgodność z HWE	62
Tabela 12. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu <i>CYP3A4*1B</i> w grupie badanej oraz kontrolnej	63
Tabela 13. Zależność pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorfizmu <i>CYP3A4*1B</i> a badanymi cechami	65
Tabela 14. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu <i>CYP3A5*3</i> w grupie badanej oraz kontrolnej	66
Tabela 15. Zależność pomiędzy poszczególnymi wariantami polimorfizmu <i>CYP3A5*3</i> a badanymi cechami	68
Tabela 16. Częstość występowania poszczególnych genotypów oraz alleli dla polimorfizmu <i>CYP2C19*2</i> w grupie badanej oraz kontrolnej	70
Tabela 17. Zależność pomiędzy poszczególnymi genotypami polimorfizmu <i>CYP2C19*2</i> a badanymi cechami	72
Tabela 18. Wartość względnego poziomu ekspresji genu <i>CYP3A4</i>	75
Tabela 19. Zależność pomiędzy względnym poziomem ekspresji genu <i>CYP3A4</i> a badanymi cechami	76

Piśmiennictwo

- [1] Bentley SM, Pagalilauan GL, Simpson SA. Major Depression. *Medical Clinics of North America* 2014; 98: 981–1005.
- [2] Vilhelmsson A. The devil in the details: public health and depression. *Front public Heal* 2014; 2: 192.
- [3] Bilikiewicz A, Landowski J, Radziwiłowicz P. Zaburzenia afektywne. In: *Reperytorium psychiatria*. Warszawa: PZWL, 2003, pp. 88–108.
- [4] Berlim MT, Turecki MG. Using psychostimulants for treating residual symptoms in major depression. *J Psychiatry Neurosci* 2007; 32: 304.
- [5] Kaplan H, Sadock B, Sadock V. Zaburzenia afektywne. In: Sidorowicz S (ed) *Psychiatria kliniczna*. Wrocław: Urban & Partner, 2004, pp. 152–177.
- [6] Ferrari AJ, Charlson FJ, Norman RE, et al. Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS Med* 2013; 10: e1001547.
- [7] James SL, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 Diseases and Injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* 2018; 392: 1789–1858.
- [8] Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva: World Health Organization; 2017.
- [9] Kiyohara C, Yoshimasu K. Molecular epidemiology of major depressive disorder. *Environ Health Prev Med* 2009; 14: 71–87.
- [10] Rybakowski J. Zaburzenia afektywne. In: Jarema M (ed) *Psychiatria*. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2016, p. 150.
- [11] Solomon DA. Multiple Recurrences of Major Depressive Disorder. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 229–233.
- [12] Schaakxs R, Comijs HC, van der Mast RC, et al. Risk Factors for Depression: Differential Across Age? *Am J Geriatr Psychiatry* 2017; 25: 966–977.
- [13] Cowen PJ, Browning M. What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry* 2015; 14: 158–60.
- [14] Ruhé HG, Mason NS, Schene AH. Mood is indirectly related to serotonin, norepinephrine and dopamine levels in humans: a meta-analysis of monoamine depletion studies. *Mol Psychiatry* 2007; 12: 331–359.
- [15] Wichers MC, Koek GH, Robaey G, et al. IDO and interferon- α -induced depressive symptoms: a shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Mol Psychiatry* 2005; 10: 538–544.
- [16] Gałecki P, Talarowska M. Inflammatory theory of depression. *Psychiatr Pol* 2018; 52: 437–447.
- [17] Catena-Dell’Osso M, Bellantuono C, Consoli G, et al. Inflammatory and

- neurodegenerative pathways in depression: a new avenue for antidepressant development? *Curr Med Chem* 2011; 18: 245–55.
- [18] Maurya PK, Noto C, Rizzo LB, et al. The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 2016; 65: 134–144.
 - [19] Felger JC, Alagbe O, Hu F, et al. Effects of interferon-alpha on rhesus monkeys: a nonhuman primate model of cytokine-induced depression. *Biol Psychiatry* 2007; 62: 1324–33.
 - [20] Shelton RC, Miller AH. Inflammation in depression: is adiposity a cause? *Dialogues Clin Neurosci* 2011; 13: 41–53.
 - [21] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 772–783.
 - [22] Pandya M, Altinay M, Malone DA, et al. Where in the brain is depression? *Curr Psychiatry Rep* 2012; 14: 634–42.
 - [23] Gabbard G. *Psychodynamic Psychiatry in Clinical Practice*. 4th editio. American Psychiatric Publishing, 205AD.
 - [24] Dudek D, Siwek M. Współistnienie chorób somatycznych i depresji. *Psychiatria* 2007; 4: 17–24.
 - [25] Klasyfikacja ICD-10 [online], <https://icd.who.int/browse10/2016/en> [dostęp z dnia 21.06.2019 r.]
 - [26] Pużyński S. Choroby afektywne. In: Bilikiewicz A (ed) *Psychiatria, podręcznik dla studentów medycyny*. Warszawa: Wydawnictwo lekarskie PZWL, 2006, pp. 375–380.
 - [27] American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM–5)*, 2013.
 - [28] Hedlund J, Viewig B. The Hamilton rating scale for depression: a comprehensive review. *J Oper Psychiatry* 1979; 10: 149–165.
 - [29] Rose U, March S, Ebener M, et al. Cut-off values for the applied version of the Beck Depression Inventory in a general working population. *J Occup Med Toxicol* 2015; 10: 24.
 - [30] Beck AT, Steer RA, Ball R, et al. Comparison of Beck Depression Inventories-IA and-II in Psychiatric Outpatients. *J Pers Assess* 1996; 67: 588–597.
 - [31] Bowling A. Mode of questionnaire administration can have serious effects on data quality. *J Public Health (Bangkok)* 2005; 27: 281–291.
 - [32] HAMILTON M. A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1960; 23: 56–62.
 - [33] McIntyre R, Kennedy S, Bagby RM, et al. Assessing full remission. *J Psychiatry Neurosci* 2002; 27: 235–9.
 - [34] Bagby RM, Ryder AG, Schuller DR, et al. The Hamilton Depression Rating Scale: Has the Gold Standard Become a Lead Weight? *Am J Psychiatry* 2004;

161: 2163–2177.

- [35] Duval F, Lebowitz BD, Macher J-P. Treatments in depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2006; 8: 191–206.
- [36] Ionescu DF, Rosenbaum JF, Alpert JE. Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2015; 17: 111–26.
- [37] Chen J, Hu S. Individualized Treatment Strategy for Depressive Disorder. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1180: 219–232.
- [38] Schemat zapobiegania nawrotom depresji [online] <https://www.mp.pl/artykuly/14990,leki-przeciwdepresyjne-w-zapobieganiu-nawrotom-depresji-przeglad-systematyczny,1> [dostęp z dnia 11.07.2019 r.]
- [39] Linde K, Kriston L, Rucker G, et al. Efficacy and Acceptability of Pharmacological Treatments for Depressive Disorders in Primary Care: Systematic Review and Network Meta-Analysis. *Ann Fam Med* 2015; 13: 69–79.
- [40] Yohn CN, Gergues MM, Samuels BA. The role of 5-HT receptors in depression. *Mol Brain* 2017; 10: 28.
- [41] Preskorn SH. Treatment Options for the Patient Who Does Not Respond Well to Initial Antidepressant Therapy. *J Psychiatr Pract* 2009; 15: 202–210.
- [42] Gulec H, Sahin S, Ozayar E, et al. Ketamine–propofol sedation in circumcision. *Brazilian J Anesthesiol (English Ed)* 2015; 65: 367–370.
- [43] Kraus C, Rabl U, Vanicek T, et al. Administration of ketamine for unipolar and bipolar depression. *Int J Psychiatry Clin Pract* 2017; 21: 2–12.
- [44] Zanos P, Moaddel R, Morris PJ, et al. NMDAR inhibition-independent antidepressant actions of ketamine metabolites. *Nature* 2016; 533: 481–486.
- [45] Badania kliniczne Esketaminy [online] <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02782104?term=ESKETINTRD3003> [dostęp z dnia 12.07.2019 r.]
- [46] Miyaoka T, Wake R, Furuya M, et al. Minocycline as adjunctive therapy for patients with unipolar psychotic depression: An open-label study. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2012; 37: 222–226.
- [47] Lopresti AL, Maes M, Maker GL, et al. Curcumin for the treatment of major depression: A randomised, double-blind, placebo controlled study. *J Affect Disord* 2014; 167: 368–375.
- [48] Kirsch DL, Nichols F. Cranial Electrotherapy Stimulation for Treatment of Anxiety, Depression, and Insomnia. *Psychiatr Clin North Am* 2013; 36: 169–176.
- [49] Giedke H, Schwärzler F. Therapeutic use of sleep deprivation in depression. *Sleep Med Rev* 2002; 6: 361–77.
- [50] McIntyre RS, Filteau M-J, Martin L, et al. Treatment-resistant depression: Definitions, review of the evidence, and algorithmic approach. *J Affect Disord* 2014; 156: 1–7.

- [51] Al-Harbi KS. Treatment-resistant depression: therapeutic trends, challenges, and future directions. *Patient Prefer Adherence* 2012; 6: 369–88.
- [52] Ruhé HG, van Rooijen G, Spijker J, et al. Staging methods for treatment resistant depression. A systematic review. *J Affect Disord* 2012; 137: 35–45.
- [53] Lam RW, Kennedy SH, Grigoriadis S, et al. Canadian Network for Mood and Anxiety Treatments (CANMAT) Clinical guidelines for the management of major depressive disorder in adults. *J Affect Disord* 2009; 117: S26–S43.
- [54] Barowsky J, Schwartz TL. An Evidence-Based Approach to Augmentation and Combination Strategies for: Treatment-Resistant Depression. *Psychiatry (Edgmont)* 2006; 3: 42–61.
- [55] Wiśniewska A, Mazerska Z. Izoenzymy cytochromu P450 w metabolizmie związków endo- i egzogennych. *Postepy Biochem* 2009; 55: 259–271.
- [56] Isin EM, Guengerich FP. Complex reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 2007; 1770: 314–329.
- [57] Hsu M-H, Johnson EF. Active-site differences between substrate-free and ritonavir-bound cytochrome P450 (CYP) 3A5 reveal plasticity differences between CYP3A5 and CYP3A4. *J Biol Chem* 2019; 294: 8015–8022.
- [58] Bernhardt R. Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *J Biotechnol* 2006; 124: 128–145.
- [59] Purnapatre K, Khattar SK, Saini KS. Cytochrome P450s in the development of target-based anticancer drugs. *Cancer Lett* 2008; 259: 1–15.
- [60] Mathijssen RHJ, van Schaik RHN. Genotyping and phenotyping cytochrome P450: Perspectives for cancer treatment. *Eur J Cancer* 2006; 42: 141–148.
- [61] Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. In: *Advances in Pharmacology*. Academic Press Inc., 2015, pp. 35–84.
- [62] Veith A, Moorthy B. Role of cytochrome P450s In the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Current Opinion in Toxicology* 2018; 7: 44–51.
- [63] Bansal Y, Kuhad A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Curr Neuropsychopharmacol* 2016; 14: 610–618.
- [64] Czarny P, Gałęcki P, Śliwiński T. Stres oksydacyjny oraz uszkodzenia i naprawa DNA w zaburzeniach depresyjnych. *Farmakoter w Psychiatr i Neurol* 2015; 31: 243–249.
- [65] Harskamp J, Britz-McKibbin P, Wilson JY. Functional Screening of Cytochrome P450 Activity and Uncoupling by Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* 2012; 84: 862–866.
- [66] Lolodi O, Wang Y-M, Wright WC, et al. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery. *Curr Drug Metab* 2017; 18: 1095–1105.
- [67] He H, Nie Y-L, Li J-F, et al. Developmental regulation of CYP3A4 and CYP3A7

- in Chinese Han population. *Drug Metab Pharmacokinet* 2016; 31: 433–444.
- [68] Charakterystyka genu CYP3A4 [online] <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP3A4> [dostęp z dnia 02.09.2019 r.]
 - [69] Cichocki M. *Biochemiczne i molekularne podstawy biotransformacji ksenobiotyków*. Poznań: Wydawnictwo naukowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, 2015.
 - [70] Niedzielska E, Wójcik D, Doroszko A, et al. Rola polimorfizmu genetycznego w metabolizmie leków stosowanych w leczeniu dzieci z ostrymi białaczkami. *Acta Haematol Pol* 2007; 38: 37–46.
 - [71] Shi W-L, Tang H-L, Zhai S-D. Effects of the CYP3A4*1B Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics of Tacrolimus in Adult Renal Transplant Recipients: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2015; 10: e0127995.
 - [72] Amirimani B, Ning B, Deitz AC, et al. Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant. *Environ Mol Mutagen* 2003; 42: 299–305.
 - [73] Albekairy A, Alkatheri A, Fujita S, et al. Cytochrome P450 3A4*1B as pharmacogenomic predictor of tacrolimus pharmacokinetics and clinical outcome in the liver transplant recipients. *Saudi J Gastroenterol* 2013; 19: 89–95.
 - [74] Klein K, Zanger UM. Pharmacogenomics of Cytochrome P450 3A4: Recent Progress Toward the “Missing Heritability” Problem. *Front Genet* 2013; 4: 12.
 - [75] Lamba J, Hebert JM, Schuetz EG, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for CYP3A5. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 555–8.
 - [76] Suarez-Kurtz G, Vargens DD, Santoro AB, et al. Global pharmacogenomics: distribution of CYP3A5 polymorphisms and phenotypes in the Brazilian population. *PLoS One* 2014; 9: e83472.
 - [77] Park JY, Cha YJ, Kim KA. CYP3A5*3 polymorphism and its clinical implications and pharmacokinetic role. *Transl Clin Pharmacol* 2014; 22: 03–07.
 - [78] Jakovski K, Kapedanovska Nestorovska A, Labacevski N, et al. *Frequency of the most common CYP3A5 polymorphisms in the healthy population of the Republic of Macedonia* [online] <http://www.cypalleles.ki.se> [dostęp z dnia 5.09.2019 r.]
 - [79] Chen Y, Goldstein J. The Transcriptional Regulation of the Human CYP2C Genes. *Curr Drug Metab* 2012; 10: 567–578.
 - [80] Scott SA, Sangkuhl K, Shuldiner AR, et al. PharmGKB summary: very important pharmacogene information for cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 19. *Pharmacogenet Genomics* 2012; 22: 159–65.
 - [81] Shirasaka Y, Chaudhry A, McDonald M, et al. Interindividual variability of CYP2C19-catalyzed drug metabolism due to differences in gene diplotypes and cytochrome P450 oxidoreductase content. Epub ahead of print 2015.
 - [82] Zhou B, Song Z, Qian M, et al. Functional Polymorphisms in the CYP2C19 Gene Contribute to Digestive System Cancer Risk: Evidence from 11,042 Subjects. *PLoS One* 2013; 8: e66865.

- [83] Vu NP, Nguyen HTT, Tran NTB, et al. CYP2C19 genetic polymorphism in the Vietnamese population. *Ann Hum Biol* 2019; 46: 491–497.
- [84] CYP2C19 gene - Genetics Home Reference – NIH [online] <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/CYP2C19#location> [dostęp z dnia 11.10.2019 r.]
- [85] Dehbozorgi M, Kamalidehghan B, Hosseini I, et al. Prevalence of the CYP2C19*2 (681 G>A), *3 (636 G>A) and *17 (-806 C>T) alleles among an Iranian population of different ethnicities. *Mol Med Rep* 2018; 17: 4195–4202.
- [86] Ratajewski M, Walczak-Drzewiecka A, Sałkowska A, et al. Aflatoxins upregulate CYP3A4 mRNA expression in a process that involves the PXR transcription factor. *Toxicol Lett* 2011; 205: 146–153.
- [87] Kliewer SA, Goodwin B, Willson TM. The Nuclear Pregnane X Receptor: A Key Regulator of Xenobiotic Metabolism. *Endocr Rev* 2002; 23: 687–702.
- [88] Falkner KC, Pinaire JA, Xiao GH, et al. Regulation of the rat glutathione S-transferase A2 gene by glucocorticoids: involvement of both the glucocorticoid and pregnane X receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 60: 611–9.
- [89] Ogu CC, Maxa JL. Drug interactions due to cytochrome P450. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 2000; 13: 421–3.
- [90] Badyal DK, Dadhich AP. CYTOCHROME P450 AND DRUG INTERACTIONS. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 248–259.
- [91] Ota M, Fukushima H, Kulski JK, et al. Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. *Nat Protoc* 2007; 2: 2857–2864.
- [92] Smith K. Mental health: a world of depression. *Nature* 2014; 515: 181.
- [93] Davies P, Ijaz S, Williams CJ, et al. Pharmacological interventions for treatment-resistant depression in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. Epub ahead of print 2019.
- [94] Strom CM, Goos D, Crossley B, et al. Testing for variants in CYP2C19: population frequencies and testing experience in a clinical laboratory. Epub ahead of print 2012.
- [95] Petrović J, Pešić V, Lauschke VM. Frequencies of clinically important CYP2C19 and CYP2D6 alleles are graded across Europe. *Eur J Hum Genet*. Epub ahead of print 2019.
- [96] Adler G, Łoniewska B, Parczewski M, et al. *Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants*. 2009.
- [97] National Library of Medicine [online], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp> [dostęp z dnia 12.12.2019 r.]
- [98] Stefanatos R, Sanz A. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Lett* 2018; 592: 743–758.
- [99] Du J, Xu Y, Duan S, et al. A case-control association study between the CYP3A4 and CYP3A5 genes and schizophrenia in the Chinese Han population. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 2009; 33: 1200–1204.

- [100] Jia Y, Yu X, Zhang B, et al. No association between polymorphisms in three genes of cytochrome p450 family and paranoid schizophrenia in northern Chinese Han population. *Eur Psychiatry* 2004; 19: 374–376.
- [101] Wang BS, Liu Z, Xu WX, et al. CYP3A5*3 polymorphism and cancer risk: A meta-analysis and meta-regression. *Tumor Biol* 2013; 34: 2357–2366.
- [102] Liang Y, Han W, Yan H, et al. Association of CYP3A5*3 polymorphisms and prostate cancer risk: A meta-analysis. *J Cancer Res Ther* 2018; 14: 463.
- [103] Fiszer-Maliszewska Ł, Łaczmański Ł, Dolińska A, et al. Polymorphisms of abcb1, cyp3a4 and cyp3a5 genes in ovarian cancer and treatment response in poles. *Anticancer Res* 2018; 38: 1455–1459.
- [104] Ali GT, Al-Azhary NM, Mokhtar DA. Frequency and prognostic significant of CYP3A4-A-290G polymorphism in acute myeloid leukemia. *J Adv Res* 2014; 5: 657–61.
- [105] Voso MT, Fabiani E, D'Alo' F, et al. Increased risk of acute myeloid leukaemia due to polymorphisms in detoxification and DNA repair enzymes. *Ann Oncol* 2007; 18: 1523–1528.
- [106] Zhou LP, Yao F, Luan H, et al. CYP3A4*1B polymorphism and cancer risk: A HuGE review and meta-analysis. *Tumor Biol* 2013; 34: 649–660.
- [107] Pearce CL, Near AM, Van Den Berg DJ, et al. Validating genetic risk associations for ovarian cancer through the international Ovarian Cancer Association Consortium. *Br J Cancer* 2009; 100: 412–420.
- [108] Jeon SY, Hwang KA, Choi KC. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2016; 158: 1–8.
- [109] Wahlang B, Falkner KC, Cave MC, et al. Role of Cytochrome P450 Monooxygenase in Carcinogen and Chemotherapeutic Drug Metabolism. In: *Advances in Pharmacology*. Academic Press Inc., 2015, pp. 1–33.
- [110] Justenhoven C, Hamann U, Pierl CB, et al. CYP2C19*17 is associated with decreased breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 115: 391–396.
- [111] Polonikov A, Kharchenko A, Bykanova M, et al. Polymorphisms of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 and risk of coronary heart disease in Russian population. *Gene* 2017; 627: 451–459.
- [112] Zhang Y ying, Zhou X, Ji W jie, et al. Association between CYP2C19*2/*3 Polymorphisms and Coronary Heart Disease. *Curr Med Sci* 2019; 39: 44–51.
- [113] Johnson N, Dudbridge F, Orr N, et al. Genetic variation at CYP3A is associated with age at menarche and breast cancer risk: A case-control study. *Breast Cancer Res*; 16. Epub ahead of print 2014.
- [114] Kadlubar FF, Berkowitz GS, Delongchamp RR, et al. The CYP3A4*1B variant is related to the onset of puberty, a known risk factor for the development of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 327–31.
- [115] Alonso-Navarro H, Martínez C, García-Martín E, et al. CYP2C19 polymorphism

- and risk for essential tremor. *Eur Neurol* 2006; 56: 119–123.
- [116] Sim SC, Nordin L, Andersson TML, et al. Association between CYP2C19 polymorphism and depressive symptoms. *Am J Med Genet Part B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153: 1160–1166.
 - [117] Hen R, Nautiyal KM. Serotonin receptors in depression: From A to B. *F1000Research*; 6. Epub ahead of print 2017.
 - [118] Rebbeck TR, Rennert H, Walker AH, et al. Joint effects of inflammation and androgen metabolism on prostate cancer severity. *Int J Cancer* 2008; 123: 1385–1389.
 - [119] Mrazek DA, Biernacka JM, O’Kane DJ, et al. CYP2C19 variation and citalopram response. *Pharmacogenetics and Genomics* 2011; 21: 1–9.
 - [120] Bousman CA, Rao C, Uppugunduri S, et al. Influence of CYP2C19 Metabolizer Status on Escitalopram/Citalopram Tolerability and Response in Youth With Anxiety and Depressive Disorders. Epub ahead of print 2019
 - [121] Fabbri C, Tansey KE, Perlis RH, et al. Effect of cytochrome CYP2C19 metabolizing activity on antidepressant response and side effects: Meta-analysis of data from genome-wide association studies. *Eur Neuropsychopharmacol* 2018; 28: 945–954.
 - [122] Hodgson K, Tansey K, Dernovsek MZ, et al. Genetic differences in cytochrome P450 enzymes and antidepressant treatment response.[Erratum appears in J Psychopharmacol. 2015 Apr;29(4):456 Note: Belsy, Sarah [corrected to Belsey, Sarah]; PMID: 25744619]. *J Psychopharmacol* 2014; 28: 133–141.
 - [123] Taranu A, Colle R, Gressier F, et al. Should a routine genotyping of CYP2D6 and CYP2C19 genetic polymorphisms be recommended to predict venlafaxine efficacy in depressed patients treated in psychiatric settings? *Pharmacogenomics* 2017; 18: 639–650.
 - [124] Shi WL, Tang HL, Zhai S Di. Effects of the CYP3A4 δ 1B genetic polymorphism on the pharmacokinetics of tacrolimus in adult renal transplant recipients: A meta-analysis. *PLoS One*; 10. Epub ahead of print 3 June 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0127995.
 - [125] Khan AR, Raza A, Firasat S, et al. CYP3A5 gene polymorphisms and their impact on dosage and trough concentration of tacrolimus among kidney transplant patients: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. Epub ahead of print 2020.
 - [126] Gor PP, Su HI, Gray RJ, et al. Cyclophosphamide- metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: A retrospective cohort study. *Breast Cancer Res*; 12. Epub ahead of print 2010.
 - [127] Wang J, Li K, Zhang X, et al. The correlation between the expression of genes involved in drug metabolism and the blood level of tacrolimus in liver transplant recipients. *Sci Rep*; 7. Epub ahead of print 2017.
 - [128] Rodríguez-Antona C, Leskelä S, Zajac M, et al. Expression of CYP3A4 as a predictor of response to chemotherapy in peripheral T-cell lymphomas. *Blood*

2007; 110: 3345–3351.

- [129] Tóth K, Csukly G, Sirok D, et al. Potential Role of Patients' CYP3A-Status in Clozapine Pharmacokinetics. *Int J Neuropsychopharmacol* 2017; 20: 529–537.
- [130] Haas CE, Brazeau D, Cloen D, et al. Cytochrome P450 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes as a predictor of enzyme induction. *Eur J Clin Pharmacol* 2005; 61: 583–593.
- [131] Furukawa M, Nishimura M, Ogino D, et al. Cytochrome P450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* 2004; 95: 520–529.

Wykaz publikacji

1. **R.Świechowski**, A. Jeleń, M. Mirowski, M. Talarowska, P. Gałęcki, J. Pietrzak, D. Wodziński, E. Balcerczak. "Estimation of *CYP3A4*1B* single nucleotide polymorphism in patients with recurrent Major Depressive Disorder." *Mol Genet Genomic Med* 2019; 7(6): e669. **IF: 2.448.**
2. **R. Świechowski**, E. Balcerczak, M. Żebrowska, A. Jeleń (2015). „Ocena ekspresji genu *ABCC1* kodującego białko MRP1 u osób chorych na depresję.; *Folia Medica Lodziensia*, 2015, 42/2:107-122.
3. D. Wodziński, A. Wosiak, J. Pietrzak, **R. Świechowski**, A. Jeleń, E. Balcerczak "Does the expression of the *ACVR2A* gene affect the development of colorectal cancer?" *Genet Mol Biol* 2019; 42(1): 32-39. **IF: 2.127.**
4. J.Pietrzak, M. Mirowski, A. Jeleń, **R. Świechowski**, D. Wodziński, K. Niebudek, E. Balcerczak. "Decreased *MMP1* gene expression in acute myeloid leukaemia." *Mol Biol Rep* 2019; 46: 2293-2298. **IF: 2.107.**

Wykaz doniesień zjazdowych i nagród

1. **Rafał Świechowski**, Agnieszka Jeleń, Damian Wodziński, Jacek Pietrzak, Ewa Balcerczak: Ocena Polimorfizmu *CYP3A4*1B* u pacjentów cierpiących na zaburzenia depresyjne nawracające. International Conference of Natural and Medical Sciences: Young scientists, PhD Students and Students, 2017.
2. Jacek Pietrzak, Radosław Reczulski, Damian Wodziński, **Rafał Świechowski**, Agnieszka Jeleń, Marek Mirowski. Inhibition of key cancerogenesis proteolytic enzymes – metalloproteinases in patients with acute myeloid leukaemia by ions of selected metals. XXI Gliwice Scientific Meetings, 2017.
3. **Rafał Świechowski**, Jacek Pietrzak, Damian Wodziński. Expression of *ABCC1* gene in patients with depression. 54th Polish and 12th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2016.

4. Damian Wodziński, Jacek Pietrzak, **Rafał Świechowski**. Expression of *ABCG2* gene in gastric ulcers and gastric cancer. 54th Polish and 12th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2016.
5. Jacek Pietrzak, Damian Wodziński, **Rafał Świechowski**. Metalloproteinases activity of serum of patients with chronic lymphatic leukaemia. 54th Polish and 12th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2016.
6. Jakub Rutkowski, **Rafał Świechowski**, Agnieszka Jeleń. The influence of polymorphism at position 2677 of the *ABCB1* gene encoding a multidrug resistance protein (P-gp) on pharmacological treatment efficacy in patients with depression. 10th Warsaw International Medical Congress for Young Scientists, 2014
7. Agnieszka Jeleń, Jakub Rutkowski, **Rafał Świechowski**. Investigation of selected polymorphism of *ABCB1* gene in predisposition to depression development. 52th Polish and 10th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2014
8. Jakub Rutkowski, **Rafał Świechowski**, Agnieszka Jeleń. Ocena polimorfizmu 2677 genu *ABCB1* (*MDR1*) kodującego białko oporności wielolekowej P-gp u osób chorych na depresję. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studentów Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu. 2013.
9. Jakub Rutkowski, **Rafał Świechowski**, Agnieszka Jeleń, Karolina Nowakowska. „Evaluation of the *ABCB1* (*MDR1*) G2677T polymorphism encoding the multidrug resistance protein P-gp in patients with depression, 2013.

Nagrody i wyróżnienia

I miejsce w sesji psychiatrii i psychologii – Expression of *ABCC1* gene in patients with depression. 4th Polish and 12th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2016.

I miejsce w sesji psychiatrii i psychologii – Investigation of selected polymorphism of *ABCB1* gene in predisposition to depression development. 52th Polish and 10th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2014.

I miejsce w sesji psychiatrii i psychologii – Investigation of selected polymorphism of *ABCB1* gene in predisposition to depression development. 52th Polish and 10th International Juvenes Pro Medicina Conference, 2014.

II miejsce wśród doniesień ustnych – Ocena polimorfizmu 2677 genu *ABCB1* (*MDR1*) kodującego białko oporności wielolekowej P-gp u osób chorych na depresję. I Ogólnopolska Konferencja Naukowa Studentów Medycyny Laboratoryjnej w Sosnowcu. 2013.

Łódź, dn. 26.02.2020 r.

Rafał Świechowski

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

al. Tadeusza Kościuszki 4, 90-419 Łódź,

Zakład Biochemii Farmaceutycznej

i Diagnostyki Molekularnej

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że jestem wyłącznym twórcą, w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim (Dz. U. z 1994 r. Nr 24, poz. 83), rozprawy doktorskiej pt: „**Polimorfizmy i ekspresja wybranych cytochromów u pacjentów z depresją**”.

Równocześnie wyrażam zgodę na nieodpłatne udostępnienie wymienionej pracy Bibliotece Głównej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. W tym celu zobowiązuję się przekazać pracę w formie pisemnej oraz w formie elektronicznej (plik formatu PDF na oznaczonej zgodnie z wymogami Rektora Uniwersytetu płycie CD) dla celów archiwizacyjnych.

Podpis