

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

**Dottorato di ricerca
in Fisiopatologia epato-digestiva**

Ciclo XXI

**FARMACOGENETICA DELLA RISPOSTA ALLA
TERAPIA CON INIBITORI DI POMPA
PROTONICA IN SOGGETTI CON ESOFAGITE
DA REFLUSSO:
RUOLO DEI POLIMORFISMI DEL GENE
DEL CITOCROMO P450 (CYP) 2C19.**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Francesco Di Mario

Tutor:

Chiar.mo Prof. Alberto Pilotto

Dottoranda: Dr.ssa Marilisa Franceschi

2006-2008

INDICE

RIASSUNTO	3
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE	7
La malattia da reflusso gastroesofageo	8
Gli inibitori di pompa protonica (IPP)	11
La farmacogenetica	15
Il sistema enzimatico del citocromo P450	18
SCOPO DELLA TESI	23
MATERIALI E METODI	24
Disegno dello studio	24
Popolazione	24
Criteri di inclusione ed esclusione	25
Diagnosi endoscopica	26
Infezione da Helicobacter pylori e istologia	26
Trattamenti	27
Tecnica per lo studio dei polimorfismi	27
Analisi dei genotipi	33
Analisi statistica	35
RISULTATI	37
Caratteristiche generali della popolazione	37

Caratteristiche genetiche della popolazione	40
DISCUSSIONE	45
BIBLIOGRAFIA	49

RIASSUNTO

Introduzione: Gli inibitori della pompa protonica (IPP) sono metabolizzati principalmente dalla sottofamiglia del citocromo P450 (CYP) 2C19. Due polimorfismi di singolo nucleotide (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) C⁸⁰⁶→T (rs12248560) e G⁶⁸¹→A (rs4244285) nel gene CYP2C19 identificano gli alleli CYP2C19*17 e CYP2C19*2 che sembrano avere un ruolo nella farmacocinetica degli IPP, farmaci utilizzati nelle malattie acido-correlate.

Scopo: Valutare in soggetti caucasici affetti da esofagite da reflusso l'impatto delle varianti CYP2C19*17 e CYP2C19*2 sulla efficacia clinica degli IPP lansoprazolo, pantoprazolo e rabeprazolo.

Materiali e metodi: sono stati arruolati 196 pazienti (97 uomini e 99 donne, età media=74.9 anni, range=29-96 anni) con diagnosi endoscopica di esofagite da reflusso. I pazienti sono stati trattati con dosi standard di tre inibitori di pompa protonica, lansoprazolo, pantoprazolo, rabeprazolo per 8 settimane. L'analisi degli SNPs rs12248560 e rs4244285 è stata effettuata in cieco, prima del trattamento. La guarigione dell'esofagite è stata valutata endoscopicamente.

Risultati: dopo 8 settimane di terapia, 168/196 pazienti (85.7%) sono risultati guariti, mentre 28/196 (14.3%) non hanno risposto alla terapia con IPP. Analizzando i risultati per gli alleli CYP2C19*17, i pazienti wild-type (wt) presentano una percentuale di guarigione (81.0%) significativamente inferiore rispetto ai pazienti con genotipo wt/*17 (92.5%) o *17/*17 (100.0%) (p=0.020). Nessun differenza significativa è emersa nella risposta terapeutica analizzando i genotipi dell'allele CYP2C19 *2.

Suddividendo i soggetti in base al trattamento eseguito, nei pazienti trattati con lansoprazolo, ma non pantoprazolo o rabeprazolo, la presenza del genotipo wt/wt (54.8%) si associa ad una risposta terapeutica significativamente inferiore rispetto ai soggetti con genotipo wt/*17 (83.3%) o *17/*17 (100%) (p=0.035). L'analisi della regressione logistica ha confermato che i pazienti con il genotipo wt/wt del CYP2C19*17 presentano un rischio significativo di mancata guarigione dell'esofagite (OR = 3.286, IC95% 1.191-9.063, p = 0.022). In particolare tale rischio è significativo nei soggetti trattati con lansoprazolo (OR = 4.667, IC 95% 1.132-19.241, p = 0.033), ma non con pantoprazolo o rabeprazolo.

Conclusioni: la sostituzione di un nucleotide (SNP) C⁻⁸⁰⁶→T nella regione del promotore del gene del CYP2C19 che identifica l'allele *17 può influenzare l'efficacia clinica del lansoprazolo nei pazienti con esofagite da reflusso. In questa popolazione caucasica, meno rilevante sembra essere il ruolo dei polimorfismi del CYP2C19*2. L'analisi di questi genotipi del gene CYP2C19 può essere utile per identificare sottogruppi di pazienti con differente risposta clinica alla terapia con alcuni IPP.

ABSTRACT

Introduction: Proton pump inhibitors (PPIs), commonly utilized in the treatment of acid-related diseases, are mainly metabolized by the cytochrome P450 (CYP) 2C19 gene. Two single nucleotide polymorphisms (SNP) C⁻⁸⁰⁶→T (rs12248560) and G⁶⁸¹→A (rs4244285) in the CYP2C19 gene identifies CYP2C19*17 and CYP2C19*2 alleles involved in PPI pharmacokinetics.

Aim: to evaluate the impact of the CYP2C19*17 and CYP2C19*2 alleles on the clinical efficacy of the PPIs, i.e lansoprazole, pantoprazole and rabeprazole, in patients with reflux esophagitis.

Methods: 196 patients (97 men, 99 women, mean age 74.9 years, range 29-96 years) with endoscopic diagnosis of reflux esophagitis were treated for eight weeks with standard doses of lansoprazole, pantoprazole and rabeprazole. Before treatment, rs12248560 and rs4244285 SNPs analysis were performed in blinded fashion. Esophagitis healing of the was evaluated endoscopically.

Results: After eight weeks of therapy, 168/196 (85.7%) patients were healed while 28/196 (14.3%) patients were un-healed. Wild-type (wt/wt) patients for CYP2C19*17 allele had a healing rate (81.0%) significantly lower than wt/*17 (92.5%) or *17/*17 (100.0%) patients (p = 0.020).

No significant differences in the healing rate of esophagitis were found among different CYP2C19 *2 genotypes. Dividing patients according to treatments, patients treated with lansoprazole, but not in pantoprazole and rabeprazole, the presence of wt/wt genotype (54.8%) was associated with lower healing rate of esophagitis compared to wt/*17 (83.3%) or *17/*17 (100%) genotypes (p=0.035).

Regression logistic analyses confirmed that wt/wt CYP2C19*17 genotype had high risk for failure treatment of esophagitis (OR = 3.286, IC95% 1.191-9.063, p = 0.022). In particular such risk was significant in lansoprazole patients (OR = 4.667, IC 95% 1.132-19.241, p = 0.033), but not in pantoprazole and rabeprazole.

Conclusions: The SNP C⁻⁸⁰⁶→T in the promoter region of the CYP2C19 gene related to *17 allele may influence the clinical efficacy of lansoprazole in reflux esophagitis patients. In our Caucasian population, CYP2C19*2 polymorphisms role seems to be less important.

The genotype analysis of CYP2C19 may be useful to identify patients subgroups with different clinical therapy response to any PPI.

INTRODUZIONE

La malattia da reflusso gastroesofageo (MRGE) è la più importante e diffusa patologia acido correlata. Gli inibitori della pompa protonica (IPP) sono farmaci con potente azione inibente la secrezione acida gastrica e sono i farmaci di prima scelta nel trattamento della MRGE. Essi sono metabolizzati a livello epatico, da parte del sistema enzimatico del citocromo P450 (CYP), e i polimorfismi del CYP2C19 sembrano influenzare la farmacocinetica, la farmacodinamica e la risposta clinica degli IPP. Le differenze di farmacocinetica e farmacodinamica tra gli IPP influenzano la velocità e il grado di soppressione acida determinando una possibile alterazione della efficacia clinica¹. La maggior parte degli studi che valutano l'influenza del CYP2C19 sulla farmacocinetica e farmacodinamica degli IPP sono stati condotti in popolazioni asiatiche geneticamente differenti dalle popolazioni caucasiche². Attualmente non ci sono studi clinici in popolazioni caucasiche che abbiamo valutato l' influenza delle due varianti alleliche *2 e *17 del CYP 2C19 sulla farmacodinamica dei differenti IPP nelle malattie acido-correlate.

Scopo di questo lavoro è stato quello di valutare l'influenza dei polimorfismi *2 *17 del CYP2C19 sulla efficacia terapeutica degli IPP in una popolazione caucasica di pazienti con esofagite da reflusso.

La malattia da reflusso gastroesofageo

La Malattia da Reflusso Gastro-Esofageo (MRGE) è definita come la presenza di sintomi tipici (pirosi epigastrica e/o retrosternale e rigurgito acido) o atipici (dolore toracico non cardiaco e/o sintomi di pertinenza ORL o pneumologica) associati o meno a lesioni endoscopiche esofagee dovuti al reflusso patologico del contenuto acido gastrico nell'esofago distale³.

Lo spettro clinico della MRGE comprende quadri clinici lievi caratterizzati da sporadici episodi di bruciore allo stomaco e/o rigurgito acido, senza esofagite, sino ad aspetti più severi di infiammazione cronica della mucosa con esofagite erosiva ed ulcerazioni, a volte complicate da stenosi e sanguinamento. Si parla di esofagite da reflusso quando il reflusso provoca in esofago delle lesioni della mucosa esofagea, in genere erosioni e piccole ulcere, che possono essere viste con l'esame endoscopico. Nel caso il reflusso acido non abbia causato erosioni o ulcerazioni, si parla di NERD (Non-erosive Reflux Disease)⁴. Solo il 40% dei pazienti con MRGE presenta un'esofagite all'endoscopia. Nel restante 60% dei pazienti con sintomi da MRGE l'endoscopia non mostrerà nessuna lesione.

L'esofagite in genere si ha quando il reflusso in esofago è più intenso. La presenza dunque di esofagite è indice di una malattia più severa. Nella maggioranza delle persone con MRGE il reflusso è in grado di provocare sintomi ma non lesioni.

La causa del reflusso è in genere una diminuzione del tono del cardias (lo sfintere esofageo inferiore, LES), cioè la valvola che separa l'esofago dallo stomaco, in seguito all'assunzione di sostanze diverse, come cibi grassi, nicotina, caffeina, agrumi, alcolici ed anche alcuni tipi di farmaci; in casi più rari è dovuta al prolungato

ristagno del bolo nello stomaco, per via di discinesie (disturbi motori, alterata peristalsi) che rallentano il normale svuotamento dello stesso; altre volte la causa è da ricercare nell'assunzione di pasti troppo abbondanti; infine sono predisponenti tutte quelle condizioni che determinano un aumento della pressione gastrica, come l'obesità e la gravidanza.

Anche l'età viene considerata un fattore di rischio indipendente, probabilmente per il fatto che la popolazione anziana presenta tassi di prevalenza più elevati per alcuni fattori di rischio che predispongono alla patologia da reflusso, quali la difficoltà a mantenere una posizione eretta dopo i pasti, frequenti ernie iatali⁵, tempo di transito ritardato di sostanze potenzialmente nocive all'esofago (come bisfosfonati, FANS, ed altri farmaci)⁶, comorbidità (BPCO, obesità, ecc)⁷ e infezione da *Helicobacter pylori*⁸. Uno studio di epidemiologia della MRGE condotto negli USA, sulla popolazione generale della contea di Olmsted in Minnesota ha rilevato che i sintomi "tipici" da MRGE erano presenti nel 44% degli abitanti con una frequenza di almeno un episodio al mese e nel 20% con una frequenza settimanale⁹.

I dati dell'esperienza statunitense sembrano in accordo con i risultati emersi da uno studio osservazionale italiano condotto su 5136 pazienti frutto di una collaborazione fra 2376 medici di medicina generale (MMG) e 132 specialisti gastroenterologi che ha segnalato che circa il 20% dei pazienti che si rivolgevano all'ambulatorio del proprio medico di medicina generale riferiva la presenza di pirosi almeno una volta la settimana. Il 57.2% di questi pazienti presentava all'esordio della MRGE contemporaneamente sia pirosi che rigurgito¹⁰.

In uno studio osservazionale condotto in 5387 pazienti anziani ambulatoriali osservati da 133 MMG, 764 pari al 14.2% riportavano sintomi da reflusso con una maggior prevalenza nel sesso maschile (320 uomini, 444 femmine, $p=0.027$)¹¹.

Oltre ai sintomi classici esofagei, la MRGE può presentarsi, infatti, con una grande varietà di sintomi extraesofagei o atipici, difficili da valutare. La manifestazione di sintomi atipici, come il dolore al torace, o sintomi extraesofagei a livello faringeo e laringeo (raucedine, laringite, irritazione corde vocali), polmonare (tosse cronica, asma) e i disturbi del sonno, spesso comportano difficili diagnosi differenziali^{12,13,14,15,16}. In particolare, Pilotto et al. hanno dimostrato che la prevalenza di sintomi tipici (bruciore retrosternale e rigurgito acido) diminuisce con l'età e questi sintomi sono assenti nel 55% dei pazienti con esofagite di età > 65 anni e nel 75% dei pazienti ultraottantacinquenni. Anche la prevalenza di dolore addominale e sintomi di indigestione diminuiscono con l'età. Al contrario, altri sintomi (anoressia, perdita di peso, anemia, vomito, e disfagia), anche se solo occasionalmente osservati nell'adulto, aumentano con l'età e sono presenti in circa il 40% dei pazienti di età >65 anni ed in oltre il 65% di quelli con età superiore a 85 anni¹⁷.

Queste peculiarità cliniche della MRGE nell'anziano comportano che i pazienti con forma erosiva sono significativamente più anziani rispetto ai pazienti con forma non erosiva. E' stato infatti riportato che l'esofagite erosiva è più frequente nei pazienti con più di 60 anni rispetto ai pazienti con età inferiore (81% vs 47%) nonostante la frequenza e la severità della pirosi fosse simile nei due gruppi¹⁸.

Nella terapia delle patologie acido-correlate è importante un'efficace e duratura soppressione della secrezione acida gastrica. Gli inibitori della pompa

protonica (IPP) attualmente sono i farmaci di scelta. Gli IPP al momento disponibili sono preparazioni dotate di rivestimento gastroresistente che ha un'azione protettiva nei confronti della degradazione acida a livello gastrico in modo da consentirne l'assorbimento intestinale. I principi attivi appartenenti a questa classe sono: omeprazolo, lansoprazolo, pantoprazolo, rabeprazolo ed esomeprazolo. Il trattamento della fase acuta della MRGE è attualmente ben codificato con alte percentuali di guarigione (> 90% ad 8 settimane nella esofagite) ai dosaggi ottimali di 20-30-40 mg. Esiste un gradiente di efficacia in rapporto al dosaggio dai 15 ai 40 mg dimostrato per i vari IPP; dosi maggiori di 40 mg non aumentano ulteriormente l'efficacia come dimostrato per il lansoprazolo incrementando la dose da 30 a 60 mg. Nelle manifestazioni atipiche della malattia sono generalmente necessari dosaggi elevati di IPP (40mg) per un periodo più prolungato (8-12 settimane) potendosi avere falsi insuccessi iniziali. Poiché è noto che la MRGE è una malattia cronica con tendenza alle recidive, gli IPP sono indicati con un trattamento nel lungo termine che va effettuato in varie modalità (continuativo, intermittente, al bisogno) in relazione alla gravità del quadro clinico e al differente andamento della malattia nel singolo paziente.

Gli inibitori della pompa protonica

Tipologia, composizione chimica, meccanismo d'azione e metabolismo

Gli inibitori della pompa protonica (IPP) sono i farmaci più attivi nel controllo della secrezione acida gastrica, e sono più efficaci degli antagonisti del recettore H₂ dell'istamina.

Sono derivati benzimidazoli sostituiti che inibiscono profondamente la secrezione acida tramite legame alla pompa protonica nella cellula parietale gastrica, sotto forma di profarmaci inattivi, con un pKa di circa 4,0 (basi deboli).^{19 20}

Questi farmaci sono idrosolubili, ma vengono inattivati dall'acido gastrico, e quindi disponibili in formulazioni orali gastroresistenti (granuli sensibili al pH). Il meccanismo d'azione richiede due protonazioni: la prima permette l'accumulo del farmaco a livello dei canalicoli secretori della cellula parietale; la seconda porta alla formazione della specie attiva che instaura ponti disolfuro con i gruppi sulfidrilici della pompa protonica, inibendola.

Dopo l'assorbimento si concentrano negli spazi acidi, ovvero nel canalicolo secretorio della cellula parietale gastrica; in tali condizioni di acidità, subiscono riorganizzazioni strutturali a sulfenamidi che si legano in modo covalente per mezzo di ponti sulfidrilici, alla subunità alfa dell'ATPasi H⁺/K⁺ della cellula parietale; le sulfenamidi si legano soltanto alle pompe protoniche in fase attiva, dato che le pompe inattive non sono disponibili a questi farmaci; hanno una lunga durata di azione perchè il ripristino della secrezione acida dipende dalla sintesi, da parte della cellula parietale, di nuove ATPasi H⁺/K⁺. Essi sono ampiamente metabolizzati nel fegato.

Lo specifico meccanismo d'azione e le caratteristiche chimiche che lo sottendono rendono ragione della lunga durata d'azione nonostante la breve emivita, della selettività d'azione e del buon profilo di sicurezza di questa classe di farmaci. L'efficacia del farmaco è direttamente proporzionale all'attività della pompa protonica, maggiore dopo i pasti e questo ne condiziona il tempo di somministrazione. La somministrazione continuativa determina un fenomeno di

reclutamento dell'enzima inattivo che amplifica l'efficacia del farmaco: su questa base l'uso occasionale dà risultati meno efficaci.

Nonostante gli IPP siano una classe omogenea, alcune differenze di pKa (3,9-5,0) e di farmacocinetica, come biodisponibilità, emivita e metabolismo, potrebbero condizionare la risposta clinica. Lansoprazolo e pantoprazolo hanno la maggiore biodisponibilità e raggiungono le più alte concentrazioni plasmatiche. Nel confronto diretto, presentano simili pKa1 (3,83), ma diverse pKa2 (0,62 vs 0,11) e questo si traduce in una maggiore attivazione metabolica del lansoprazolo.

La pKa2, maggiore per il lansoprazolo, non è solo la principale determinante della percentuale di attivazione, ma è anche considerata responsabile della stabilità nel tempo dell'inibizione della secrezione acida. Il rabeprazolo ha la più veloce insorgenza di effetto da mettere in relazione alla più alta pKa1, responsabile di una più veloce conversione del profarmaco.

Gli IPP hanno un centro chirale e a eccezione dell'esomeprazolo (enantiomero S dell'omeprazolo), sono miscele racemiche in cui la configurazione più attiva non è sempre la stessa: S per omeprazolo e pantoprazolo, R per rabeprazolo, entrambe per lansoprazolo. Questo si traduce in una farmacocinetica stereoselettiva: tutti gli IPP, a eccezione del rabeprazolo, subiscono un metabolismo epatico a opera del CYP450, ma l'isoforma CYP2C19, il cui fenotipo distingue metabolizzatori rapidi e metabolizzatori lenti, ha come substrato principale l'enantiomero R²¹. La farmacocinetica può essere ulteriormente influenzata dall'età del paziente e da patologie renali ed epatiche, con conseguente eventuale necessità di aggiustamento posologico.

Tabella 1. Caratteristiche farmacocinetiche degli inibitori di pompa protonica.

	Esomeprazolo	Lansoprazolo	Omeprazolo	Pantoprazolo	Rabeprazolo
Stereoisomeria	S(-)-omeprazolo	Racemo	Racemo	Racemo	Racemo
Tmax (h)	1-3.5	1.2-2.1	1.6	2-4	3-5
Emivita (t1/2, h)	1.2-1.5	1.5	0.5-1	1.9	0.7-1.5
Biodisponibilità (f,%)	64	80	30-40	77	52
Metabolismo epatico: isoenzimi del CYP450	3A4 >2C19	3A4 =2C19	2C19>3A4	2C19>3A4	Non enzimatico
(CL ml/min)	160-330	400-650	400-650	400-620	90-225
Effetto dell'età	CL ↔ T1/2 ↔	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↔ T1/2 ↔	CL ↓ T1/2 ↑
Insufficienza renale	-- --	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↔ T1/2 ↔	CL ↔ T1/2 ↔	-- T1/2 ↔
Insufficienza epatica	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↓ T1/2 ↑	CL ↓ T1/2 ↑

Tmax = tempo per raggiungere la massima concentrazione plasmatica
 ↑ aumento, ↓ riduzione, ↔ nessuna variazione significativa.

La farmacogenetica

La farmacogenetica nasce intorno agli anni cinquanta quando i ricercatori cominciarono a pensare che anche la risposta ai farmaci potesse essere regolata, almeno in parte, dai geni e che la variabilità di reazione a un certo principio attivo da parte di individui diversi non fosse altro che il risultato delle differenze genetiche. Soggetti diversi rispondono in modo diverso allo stesso farmaco; tali differenze sono legate al grande numero di proteine che intervengono nella risposta alla terapia farmacologica. Ogni proteina è prodotta da una specifica sequenza del DNA, il gene; la maggior parte dei geni presenta caratteristiche diverse in individui diversi.

La farmacogenetica studia le variazioni inter-individuali nella sequenza del DNA in relazione alla risposta ai farmaci. L'applicazione pratica delle conoscenze, provenienti dalla ricerca in farmacogenetica, consiste nella possibilità di predire la risposta di un paziente ad un certo farmaco sulla base di un test genetico di routine, per arrivare ad un'individualizzazione della terapia, "il farmaco giusto al paziente giusto".

Le varianti polimorfiche in farmacogenetica vengono ricercate nei geni responsabili del metabolismo, del trasporto, dell'assorbimento, della distribuzione e dell'escrezione del farmaco nonché in quei geni che producono le proteine dei recettori del farmaco stesso.

Con i test di farmacogenetica è possibile identificare molte variazioni nella struttura dei geni che codificano per enzimi del metabolismo dei farmaci, per proteine trasportatrici o proteine bersaglio (recettori, canali ionici, enzimi) di farmaci e correlarle alle variazioni inter-individuali nella risposta agli xenobiotici,

individuando vari fattori genetici predittivi di tossicità e di risposta terapeutica al trattamento farmacologico. Un paziente con un metabolismo rapido, per esempio, può richiedere dosi più elevate e più frequenti per raggiungere le concentrazioni terapeutiche; invece un paziente con un metabolismo lento può avere bisogno di dosi più basse e meno frequenti per evitare la tossicità, specialmente nel caso di farmaci con un ristretto margine di sicurezza.

Inoltre, identificando gli individui che con molta probabilità possono manifestare una reazione avversa ad uno specifico trattamento farmacologico, i test di farmacogenetica aiutano il medico nella scelta del farmaco e della dose ottimale per il singolo paziente, evitando un lungo processo di aggiustamento della terapia e il rischio di tossicità. Analogamente, questi test sono potenzialmente utili nella selezione dei pazienti che con maggiore probabilità beneficiano dal punto di vista terapeutico di uno specifico trattamento farmacologico.

Il destino dei farmaci nell'organismo (*farmacocinetica*) e i loro effetti terapeutici e tossici (*farmacodinamica*) sono regolati da processi complessi ai quali partecipano, cooperando, numerose proteine deputate al trasporto e al metabolismo dei farmaci, o coinvolte nel loro meccanismo di azione, a loro volta codificate da geni diversi. Nell'uomo si ritiene che la maggioranza dei geni contenga variazioni casuali della sequenza nucleotidica tra i diversi individui, sviluppatasi nel corso dell'evoluzione; quando tali variazioni avvengono nella sequenza codificante o regolatoria possono portare all'inserzione di un aminoacido diverso a livello di una specifica posizione nella proteina e conseguentemente a modificazioni della sua funzione o influenzare i meccanismi di trascrizione e traduzione, modulando quindi i livelli di espressione dei prodotti genici (mRNA e proteine).

Le variazioni nella sequenza del DNA che sono presenti almeno nell'1% della popolazione sono definite polimorfismi. Tali polimorfismi genici danno luogo a enzimi con diversi livelli di attività metabolica o a recettori con diversa affinità per il farmaco, modificando la risposta farmacologica di un individuo. Le variazioni genetiche riguardano più spesso un singolo nucleotide e sono pertanto definite polimorfismi a singolo nucleotide (SNP), ma possono interessare anche più nucleotidi o anche ampi tratti di DNA: si tratta ad es. di sostituzioni, inserzioni, delezioni, amplificazioni e traslocazioni. Esse si riferiscono a tratti monogenici, cioè a polimorfismi di un singolo gene codificante una proteina coinvolta nel metabolismo di un farmaco o nel suo effetto che causano risposte individuali variabili ai farmaci.

Un numero relativamente piccolo di enzimi farmaco-metabolizzanti (DMEs) è responsabile del metabolismo della maggior parte delle terapie farmacologiche oggi impiegate nell'uso clinico. Esiste un ristretto numero di polimorfismi rilevanti nell'ambito di questi enzimi, e molti di loro danno origine ad un mancato effetto terapeutico o ad un'esagerata risposta clinica al farmaco.

I polimorfismi genetici negli DMEs danno origine alla formazione di quattro sottogruppi di individui che hanno diversità apprezzabili nella loro capacità di metabolizzare i farmaci per ciascun metabolita attivo o inattivo. I quattro sottogruppi sono:

- metabolizzatori poveri o lenti (*Poor Metabolizer* - PMs): sono persone con deficienze nel metabolismo (che possiedono quindi una capacità d'attivazione dei farmaci estremamente ridotta o assente). I PM presentano una mutazione in entrambi gli alleli del gene (due alleli non attivi).

- metabolizzatori intermedi (*Intermediate Metabolizer* - IM) presentano un allele normale ed uno attivo del gene e possono richiedere, per un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico inferiore alla norma.
- metabolizzatori estensivi (*Extensive Metabolizer* - EMs): sono persone dotate di un normale metabolismo farmacologico. Di solito presentano due alleli attivi del gene.
- ultra metabolizzatori (*Ultra-Metabolizer* - UMs): sono persone con un'aumentata espressione dei geni coinvolti nel metabolismo dei farmaci, a causa della quale possono richiedere, per un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico superiore alla norma. Gli UM presentano tre o più alleli attivi, a causa di una duplicazione di un allele attivo.

Dosi standard di farmaco con una curva dose-risposta ripida o un range terapeutico ristretto possono produrre reazioni farmacologiche avverse, tossicità, o diminuita efficacia nei PMs. Dosi standard di farmaco, quando assunte da UMs, possono essere incapaci di produrre l'effetto desiderato.

Il sistema enzimatico del citocromo P450

Organizzazione genetica

Con il termine citocromo P450 (CYP450) si intende una superfamiglia enzimatica di emoproteine presente in tutte le forme viventi, dai batteri ai mammiferi (sono note più di 7700 distinte macromolecole di tipo CYP)²², appartenente alla sottoclasse enzimatica delle ossidasi a funzione mista (o monoossigenasi)²³. I citocromi P450 sono i maggiori attori coinvolti nella detossificazione dell'organismo, essendo in

grado di agire su una gran numero di differenti substrati, sia esogeni (farmaci e tossine di origine esterna) che endogeni (prodotti di scarto dell'organismo). Spesso prendono parte a complessi con funzione di catena di trasporto di elettroni, noti come sistemi contenenti P450. I singoli enzimi componenti la famiglia dei CYP sono identificati attraverso il comune acronimo seguita da un numero indicante la famiglia (>40% di omologia di sequenza), una lettera in maiuscolo che definisce la sottofamiglia (>55% di omologia di sequenza) ed un secondo numero arabo che specifica il singolo gene²⁴ (es. CYP1A1). Di seguito, preceduto da un asterisco, un ulteriore terzo numero identifica la specifica famiglia di alleli. Nell'uomo sono state sinora identificati almeno 63 geni codificanti per isoforme del citocromo P450, di cui 57 geni completi e 5 pseudogeni, divisi in 18 famiglie e 43 sottofamiglie, espressi nel fegato ed in altri tessuti come il tratto gastrointestinale, i reni, i polmoni, la cute ed il sistema nervoso centrale²⁵. Le funzioni svolte dai CYP nell'uomo sono di ossidazione ed eliminazione di sostanze endogene, come la bilirubina derivante dal metabolismo dell'emoglobina, e di sostanze esogene, come inquinanti e farmaci, ma comprendono anche la regolazione dei livelli di concentrazione degli ormoni steroidei, come gli estrogeni ed il testosterone, la biosintesi del colesterolo ed il metabolismo della vitamina D. Un'ulteriore funzione svolta dal citocromo CYP a livello della barriera ematoencefalica è l'autoregolazione vascolare. Nella grande maggioranza dei casi una singola isoforma di CYP può presentare specificità multiple e catalizzare l'ossidazione di più substrati diversi, anche con differenti tipi di reazioni.

Gli enzimi codificati dalla superfamiglia dei CYP rappresentano il principale strumento di detossificazione dell'organismo per i farmaci, e costituiscono una delle maggiori cause alla base della variabilità del rapporto dose\risposta in soggetti

differenti che assumono lo stesso farmaco²⁶. Il differente grado di risposta può infatti derivare, oltre che da fattori fisiologici come l'età, il sesso e lo stato di salute dell'individuo, da una differente velocità di metabolizzazione del principio attivo, derivante a sua volta da un polimorfismo genetico nel CYP. Un più lento smaltimento della molecola farmacologicamente attiva può portare ad una sua eccessiva permanenza nell'organismo, e quindi al manifestarsi di effetti collaterali dovuti al sovradosaggio, mentre un'eccessiva attività del citocromo aumenta la velocità di smaltimento del farmaco e può portare ad una diminuzione del suo effetto o anche alla mancanza di effetti clinici.

Di tutte le isoforme enzimatiche di citocromo P450 finora individuate, solo una piccola porzione comprendente gli enzimi CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2 e CYP2E1 agisce nel metabolismo dei farmaci²⁷; fra queste l'isoforma più attiva è il CYP3A4, che costituisce circa il 30% dei citocromi P450 espressi nel fegato ed è responsabile del metabolismo del 50% dei farmaci attualmente esistenti²⁸. Nella fase I dell'eliminazione di composti xenobiotici da parte dell'organismo, i substrati della reazione sono rappresentati principalmente da molecole lipofile in cui l'attacco di ossigeno aumenta l'idrofilicità e favorisce l'azione dei successivi enzimi detossificanti ed il conseguente smaltimento.

È importante sottolineare che molti farmaci possono avere un effetto induttivo o inibitore dell'attività di una o più isoforme di citocromo P450, e questi fenomeni sono alla base, nella maggior parte dei casi, degli effetti compromettenti sull'azione terapeutica e degli effetti di tossicità derivanti dall'assunzione contemporanea di differenti principi attivi. Un effetto di inibizione dovuto ad interazioni fra due farmaci si manifesta quando entrambi sono substrati di una stessa isoforma di

citocromo P450; in questo caso, il farmaco che presenta una minore affinità di legame sarà smaltito in un tempo superiore rispetto al caso in cui sia assunto singolarmente, provocando un effetto di sovradosaggio e quindi il manifestarsi di effetti collaterali tossici. Allo stesso modo, un farmaco può essere in grado di indurre, nel tempo, un aumento nella concentrazione e nell'attività di una o più isoforme di citocromo P450, diminuendo quindi il tempo di permanenza nell'organismo dei farmaci che ne sono substrati, e di conseguenza la loro azione terapeutica. L'effetto induttivo si manifesta più lentamente rispetto all'inibizione, in quanto agisce a livello di trascrizione genica e necessita quindi di maggior tempo per evidenziarsi²⁹.

I polimorfismi

L'enzima polimorfico CYP2C19 costituisce circa il 4 % degli isoenzimi del CYP450 a livello epatico. E' stato evidenziato che circa il 3-5 % dei Caucasiche e l'8-23 % degli Orientali è privo di tale isoenzima in seguito ad una mutazione genetica.

Il CYP2C19 catalizza il metabolismo degli antidepressivi imipramina, amitriptilina, clomipramina, citalopram e moclobemide, così come quello del diazepam, del desmetildiazepam, dell'omeprazolo, del proguanil, e della mefenitoina (che viene utilizzata quale marker nei test di fenotipizzazione insieme all'omeprazolo).

L'attività dell'enzima sembra essere sensibile all'età. Questo potrebbe spiegare l'aumento delle concentrazioni plasmatiche di citalopram, metabolizzato appunto dal CYP2C19, nei soggetti anziani rispetto ai più giovani.

In particolare, nell'esone 5 la mutazione di una singola base, sostituzione di una guanina con una adenina ($G^{681} \rightarrow A$), denominata allele *2 (CYP2C19 *2), provoca

un alterazione del sito di splicing dell'esone risultante nel fenomeno dell' "exon skipping" (letteralmente "salto dell'esone"). Come risultato abbiamo la trascrizione di un RNA messaggero senza un esone e quindi causa la produzione di una proteina inattiva. I soggetti portatori dell'allele *2 (genotipo omozigote A/A, o eterozigote G/A) sono metabolizzatori lenti-intermedi (PM) a causa della produzione di una proteina inattiva, mentre i soggetti wild-type (genotipo omozigote G/G) sono metabolizzatori rapidi ³⁰. Le frequenze di queste tre gruppi manifestano una variazione a livello interetnico. L'espressione del fenotipo PM è molto comune nei soggetti asiatici (23%) e relativamente poco comune nei caucasici (1.2% al 3.8%)^{31,32}.

Recentemente è stata identificato un altro polimorfismo³³, rappresentato dalla sostituzione di una citosina con una timina nella regione 5' del gene (C⁻⁸⁰⁶→T), denominato allele *17 (CYP2C19 *17). I soggetti portatori di questo allele (genotipo omozigote T/T, o eterozigote C/T) presentano una maggiore attività enzimatica e sono quindi considerati metabolizzatori rapidi, mentre i soggetti wild-type (genotipo omozigote C/C) sono considerati metabolizzatori lenti.

SCOPO DELLA TESI

Valutare in soggetti caucasici affetti da esofagite da reflusso l'impatto delle varianti CYP2C19*17 e CYP2C19*2 sulla efficacia clinica degli IPP lansoprazolo, pantoprazolo e rabeprazolo.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Questo è uno studio randomizzato in aperto, in un singolo centro, che ha incluso soggetti che consecutivamente sono stati sottoposti a una endoscopia delle prime vie digestive. Lo studio è stato condotto in base alla Dichiarazione di Helsinki e le linee guida per la buona pratica clinica. Tutti i pazienti hanno dato il loro consenso informato prima della partecipazione allo studio. Il protocollo è stato approvato dal comitato etico dell'Ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza" di San Giovanni Rotondo.

Popolazione

Sono stati considerati per l'inclusione nello studio pazienti affetti da esofagite da reflusso diagnosticata mediante endoscopia delle alte vie digestive (EGDS) eseguita presso il Centro di Endoscopia dell'ospedale "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo durante il periodo gennaio 2006-agosto 2008 e che soddisfacevano i criteri di inclusione.

A tutti i soggetti, al momento dell'endoscopia, dopo aver ottenuto il consenso informato, è stato effettuato un prelievo di sangue periferico di 4 ml dal quale purificare il DNA genomico. Ai fini della ricerca ogni campione è stato identificato in maniera univoca da un numero progressivo. Per motivi logistici di laboratorio i prelievi sono stati congelati a -80°C e processati a blocchi di 8 campioni.

Criteri di inclusione ed esclusione

I criteri di inclusione sono stati i seguenti: (1) età >18 anni e (2) diagnosi endoscopica di esofagite di grado A-D secondo la classificazione di Los Angeles³⁴.

I criteri di esclusione sono stati: storia di sindrome di Zollinger-Ellison, stenosi pilorica, precedente chirurgia del esofago e/o tratto gastrointestinale (ad eccezione di appendicectomia e colecistectomia) e tumori gastrointestinali maligni. Inoltre dallo studio sono stati esclusi coloro che avevano assunto antiacidi, sucralfato, procinetici, H2-bloccanti, e / o IPP per più di 7 giorni nelle quattro settimane precedenti l'inizio dello studio.

Durante la visita, sono stati registrati i dati demografici, l'anamnesi, la sintomatologia clinica, l'uso di farmaci antiinfiammatori non steroidei (FANS), e la terapia antisecretoria.

All'inizio dello studio è stata eseguita l'endoscopia per diagnosticare l'esofagite in fase acuta (criteri di inclusione). Dopo 2 mesi di trattamento, una seconda endoscopia è stata ripetuta per valutare la guarigione dell'esofagite. Tutti i pazienti sono stati esaminati durante la terapia per registrare gli effetti collaterali e per la conta delle compresse. La compliance è stata definita buona quando più del 90% delle compresse erano state assunte dal paziente. Gli eventi avversi sono stati indagati dallo sperimentatore per valutare il rapporto di casualità con il farmaco specificando la correlazione come certa, probabile, possibile, improbabile.

Diagnosi endoscopica

La diagnosi endoscopica di esofagite è stata definita e graduata secondo la classificazione di Los Angeles: Grado A una o più lesioni di lunghezza inferiore ai 5 mm, non estesa tra la sommità di due pliche mucose; Grado B una o più lesioni di lunghezza superiore a i 5 mm non estesa tra la sommità di due pliche mucose; Grado C lesione mucosa continua tra la sommità di due o più pliche continue con estensione minore del 75% della circonferenza esofagea; Grado D una o più lesioni mucose con estensione maggiore del 75% della circonferenza dell'esofago. Pazienti con eritema diffuso e/o fragilità dell'esofago inferiore sono stati esclusi.

La diagnosi di esofago di Barrett è stata posta in presenza di segni endoscopici (epitelio colonnare) con conferma istologica della presenza in esofago di mucosa gastrica con metaplasia intestinale.

La diagnosi di ernia jatale è stata posta quando la linea Z e la piega gastrica si estendono per circa 2 cm o più dallo iato diaframmatico³⁵.

Infezione da *Helicobacter pylori* e istologia

Durante l'endoscopia, sono state effettuate sei biopsie, tre all'antro gastrico e tre al corpo gastrico. Due biopsie sono state utilizzate per l'analisi istologica della mucosa gastrica, mentre una biopsia dell'antro e una del corpo sono state utilizzate per il Test rapido all'ureasi (CLO test, West Delta Pty Ltd, Western Australia). Per l'esame istologico, i campioni biopistici sono stati fissati in formalina neutra tamponata e incorporati in paraffina. Le sezioni sono state colorate con ematossilina-

eosina e con il Giemsa modificato per la determinazione dell'*Helicobacter pylori* e valutate secondo la classificazione di Sydney³⁶.

I pazienti sono stati considerati *H pylori* negativi se l'esame istologico ed il test rapido all'ureasi erano negativi, e considerati *H pylori* positivi se l'istologia e/o il test rapido all'ureasi erano positivi.

Trattamenti

I pazienti inclusi nello studio sono stati assegnati consecutivamente a uno dei seguenti regimi terapeutici per due mesi: lansoprazolo 30 mg una volta al giorno; pantoprazolo 40 mg una volta al giorno, rabeprazolo 20 mg una volta al giorno. Tutti gli IPP sono stati assunti al mattino a digiuno prima di colazione. La randomizzazione è stata effettuata da un elenco creato dal computer in blocchi di tre con un rapporto di 1:2:1.

Tecnica per lo studio dei polimorfismi

I polimorfismi di sequenza sono tratti del DNA i cui alleli, di uguale lunghezza, differiscono per variazioni della sequenza a livello di un singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphism*, SNP). La sostituzione nucleotidica può introdurre o eliminare un sito di riconoscimento per una specifica nucleasi di restrizione. Quindi, digerendo con uno specifico enzima la sequenza di DNA che include il sito polimorfico, amplificata mediante Polymerase Chain Reaction (PCR), si determineranno frammenti di lunghezze diverse, i cosiddetti polimorfismi per il sito di restrizione (RFLP). Gli RFLP sono ereditabili e trasmessi di generazione in

generazione come caratteri codominanti, e possono perciò essere utilizzati come marcatori genetici.

Le metodiche di biologia molecolare impiegate per lo studio degli RFLP comprendono quindi:

1. estrazione del DNA da linfociti di sangue periferico;
2. amplificazione della regione polimorfica del gene di interesse tramite PCR;
3. digestione dell' amplificato con specifici enzimi di restrizione;
4. tipizzazione dei frammenti di DNA ottenuti mediante elettroforesi su gel di agarosio.

Estrazione del DNA

Il DNA genomico è stato purificato da sangue periferico congelato mediante il QIamp96 DNA blood Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) che utilizza le proprietà selettive di legame di una particolare membrana in gel-silice.

La metodica della PCR

La reazione a catena della polimerasi (PCR), messa a punto da Kary Mullis nel 1986³⁷, è una tecnica ampiamente impiegata in molti campi della biologia e della medicina; in particolare viene utilizzata per la diagnosi di malattie ereditarie, malattie infettive, nei test per il confronto di *fingerprints* genetici, test di paternità, per il clonaggio di geni e per lo studio dei polimorfismi. Si tratta di una metodica di biologia molecolare che permette di amplificare selettivamente determinate sequenze bersaglio presenti in un campione di DNA. Sperimentalmente, la PCR richiede l'allestimento di un miscela di reazione che nella sua configurazione base comprende:

- 1) IL CAMPIONE DI DNA da amplificare;
- 2) DUE *PRIMERS*, senso e antisenso, costituiti da brevi sequenze oligonucleotidiche sintetiche (lunghe 15-30 nucleotidi) che vengono utilizzate come inneschi (*primers*, appunto) e si legano a sequenze fiancheggianti la regione da amplificare. La scelta della lunghezza e della temperatura di *melting* (T_m) dei *primers* deve essere effettuata con cura. *Primers* troppo corti tenderanno a legarsi in più punti in un filamento esteso di DNA, e ciò potrebbe portare alla sintesi di copie di DNA non specifiche. Per contro, *primers* troppo lunghi aumenterebbero la temperatura di *melting*, definita come la temperatura al di sotto della quale i *primers* aderiscono al campione di DNA e al di sopra della quale se ne dissociano; se risulta troppo alta può discostarsi dalla temperatura ottimale della DNA polimerasi determinandone una minore attività ed efficienza;
- 3) L'ENZIMA DNA POLIMERASI. Normalmente viene utilizzata una DNA polimerasi termostabile che è stata ottenuta dal batterio *Thermos aquaticus* e viene denominata Taq.
- 4) I QUATTRO DESOSSIRIBONUCLEOTIDI (dNTP) con i quali viene costruito il nuovo filamento di DNA; si tratta di desossiribonucleotidi trifosfato di cui esistono quattro tipi, denominati in base alla diversa base azotata che li caratterizza: adenina (dATP), timina (dTTP), citosina (dCTP) e guanina (dGTP);
- 5) UN TAMPONE che fornisce alla DNA polimerasi l'ambiente adatto per operare, e che è specifico per la polimerasi utilizzata;
- 6) IONI MAGNESIO, che possono essere già presenti nel tampone. Gli ioni magnesio Mg^{++} (sotto forma di $MgCl_2$), sono necessari alla DNA polimerasi per poter operare.

Il dosaggio di ognuno di questi elementi varia a seconda del tipo di PCR effettuata e delle caratteristiche della regione di DNA da amplificare. Una volta allestita, la miscela di reazione viene sottoposta ad una procedura di amplificazione, per mezzo di un termocicizzatore, un apposito strumento capace di variare la temperatura dei campioni. Ognuno dei cicli sequenziali a cui viene sottoposta la miscela di reazione è costituito da tre passaggi:

- 1) DENATURAZIONE della doppia elica di DNA per effetto di elevate temperature (solitamente circa 93-95°C), con conseguente separazione dei due filamenti;
- 2) APPAIAMENTO (*annealing*) in cui i *primers* si legano alle due regioni che fiancheggiano la regione da amplificare (generalmente a 50-70°C);
- 3) ESTENSIONE in cui la polimerasi si lega ai *primers* ed inizia la sintesi del filamento complementare al DNA stampo (in genere a circa 68-72°C).

I filamenti di DNA neosintetizzati nei vari cicli agiscono da stampo per l'ulteriore sintesi di DNA; dopo circa 30 cicli, i prodotti della PCR comprenderanno, oltre al DNA di partenza, circa 105 copie della sequenza bersaglio specifica, un quantitativo facilmente visualizzabile come banda discreta di dimensioni specifiche, sottoponendo l'amplificato ad elettroforesi su gel di agarosio.

Per aumentare ulteriormente la specificità di una reazione di PCR può essere utile impiegare sostanze addizionali oltre a quelle strettamente necessarie perchè l'amplificazione abbia luogo. Alcuni solventi come il dimetil-solfossido (DMSO) sembrano ridurre il *reannealing* inter- e intra-filamento che si può avere successivamente alla fase di denaturazione del DNA. La PCR presenta molte caratteristiche che la rendono una tecnica molto diffusa in quanto è veloce (l'amplificazione di un frammento di DNA può avvenire in poche ore) ed

estremamente sensibile è infatti in grado di amplificare delle sequenze a partire da quantità minime di DNA bersaglio. Per ridurre questa possibilità è importante che in laboratorio vi sia la separazione fisica delle fasi di estrazione del DNA, PCR e post-PCR. E' opportuno inoltre allestire un controllo negativo (un campione con la stessa miscela di reazione degli altri ma senza il DNA) per ogni amplificazione effettuata.

Enzimi di restrizione

Gli enzimi di restrizione sono enzimi di origine batterica in grado di tagliare (digerire) una molecola di DNA a doppia elica in corrispondenza di specifiche sequenze di basi, dette sequenze di riconoscimento o siti di restrizione. In genere queste sequenze sono palindromi, ovvero sequenze nucleotidiche a simmetria binaria che, se lette in direzione 5' → 3', presentano la stessa sequenza di basi sia su un elica che sull'altra. Questi enzimi riconoscono specifiche sequenze di DNA, ma operano il taglio in siti posti a distanze variabili dalla sequenza di riconoscimento. In biologia molecolare gli enzimi di restrizione sono di importanza fondamentale. Infatti una molecola di DNA, ottenuta da amplificazione con PCR, che manchi di una particolare sequenza di riconoscimento, non potrà essere tagliata dal rispettivo enzima di restrizione e risulterà immune alla sua azione degradante, rendendosi in tal modo facilmente riconoscibile. Per contro se una molecola di DNA presenta uno o più siti di restrizione verrà di conseguenza digerita in più frammenti, ognuno con una lunghezza e quindi un peso molecolare specifici. Questi frammenti potranno poi essere facilmente identificati tramite separazione con corsa elettroforetica su gel di agarosio. E' possibile anche creare delle mutazioni in punti ben precisi della sequenza di DNA (mutagenesi sito diretta) in modo da poter creare uno nuovo sito di

restrizione. Per attuare questa tecnica, si esegue una PCR utilizzando oligonucleotidi, che fungono da primer, contenenti la mutazione desiderata. Al termine del primo ciclo di PCR quindi si avranno sequenze di DNA che avranno un filamento con la mutazione (quello contenente il primer con mutazione) e il filamento originario, con sequenza wild type. Dopo 25 cicli il rapporto tra filamenti con mutazione e filamenti senza è di 8 milioni a 1, quindi quasi l'intera soluzione è costituita da amplimeri mutati.

Elettroforesi su gel di agarosio

L'elettroforesi consiste nella migrazione di molecole, macromolecole o complessi di macromolecole cariche sotto l'azione di un campo elettrico generato da un erogatore di corrente e passante attraverso una soluzione tampone. I frammenti di DNA, in condizioni di pH neutro, possedendo gruppi fosfato sono carichi negativamente e vanno verso l'anodo passando attraverso le maglie del gel. La velocità della migrazione dipende dal peso molecolare dei vari frammenti: i frammenti a più alto peso molecolare migrano più lentamente rispetto a quelli a più basso peso molecolare. Il gel viene preparato a partire da polveri di amido, quali l'agarosio. Il gel viene così preparato: una volta pesato, l'agarosio viene sciolto nel tampone, portato ad ebollizione e successivamente raffreddato a circa 50°C; si aggiunge direttamente il colorante Bromuro di Etidio (EtBr) (concentrazione finale di 0.5 g/ml) e si versa su un supporto elettroforetico nel quale è stato inserito un pettine che serve per la formazione dei pozzetti all'interno del gel. A temperatura ambiente il gel polimerizza in 15 minuti.

Il gel polimerizzato viene inserito nella camera elettroforetica contenente il tampone per l'elettroforesi che ha un determinato pH e una forza ionica costante. Al campione di DNA viene aggiunto un colorante (blu di bromofenolo, xilene cianolo) che permette, ad occhio nudo, di monitorare la migrazione del DNA nel gel. Si caricano in ogni pozzetto da 2 a 30 µl di amplificato (a seconda della profondità del pozzetto che viene regolata in base al volume del gel); inoltre in uno dei pozzetti viene caricato un ladder allelico, cioè una miscela di alleli di peso molecolare noto, che verrà fatta migrare nello stesso gel.

In genere la corsa viene effettuata ad un voltaggio costante (max 120v). Una volta avvenuta la corsa elettroforetica le bande del DNA vengono visualizzate agli UV tramite grazie all'EtBr che si intercala tra la doppia elica ed emette fluorescenza con un massimo a 302 nm.

Analisi dei genotipi

Per quanto riguarda l'identificazione dell'allele CYP2C19*2 sono state usate le condizioni già descritte in letteratura³⁰ brevemente per l'amplificazione sono stati usati i primer forward (AAT TAC AAC CAG AGC TTG GC) e reverse (TAT CAC TTT CCA TAA AAG CAA G) con una concentrazione di 10 pmoli in buffer 1x (100mM NTPs, 1.5 mM MgCl₂ e 1U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) in un volume finale di 25 µl. Il protocollo di amplificazione effettuato con il Thermal Cycler Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 prevede 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45'' sec, annealing a 55°C per 45'' ed estensione a

72°C per 45''. La visualizzazione degli ampimeri, la cui dimensione attesa è di 168 bp, viene effettuata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%).

Analisi mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) –

Con questa tecnica i diversi alleli vengono identificati in quanto la presenza della A⁶⁸¹ introduce il sito di restrizione riconosciuto dall'enzima Sma I, abolito dalla presenza del nucleotide *wild-type* G⁶⁸¹. La reazione di digestione è stata ottenuta incubando 5 µl del prodotto di PCR con 4U di enzima Sma I ed il relativo buffer (1X) con un volume finale di 10 µl. Dopo incubazione a 25°C per 18 ore, i prodotti di digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 4%. La presenza dell'ampimero non digerito (168 bp) identifica l'allele A, mentre la presenza dell'ampimero diviso in due frammenti (120 e 49 bp) identifica l'allele G.

Per l'identificazione dell'allele CYP2C19*17, il polimorfismo C⁻⁸⁰⁶ → T non introduce né abolisce alcun sito di restrizione per cui, con la mutagenesi sito diretta mediata da primer, è stato creato un sito di restrizione. L'amplificazione della sequenza mutata è stata ottenuta utilizzando un primer reverse di mutagenesi (GCG CAT TAT CTC TTA CAT CAG gGA T) ed un primer normale forward (CAT CTC TGG GGC TGT TTT CCT TA). In particolare, con il primer reverse è stata introdotta una citosina al posto della timina (T⁻⁸⁰²), in modo da creare un sito di restrizione per l'enzima Bts I. I primer sono stati usati con una concentrazione di 10 pmoli in buffer 1x, 100mM NTPs, 1.5 mM MgCl₂, DMSO (5%) e 1U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), in un volume finale di 25 µl. Il protocollo di amplificazione effettuato con il Thermal Cycler Applied Biosystems GeneAmp

PCR System 9700 prevede 35 cicli con una temperatura di denaturazione di 94°C per 45'' sec, annealing a 55°C per 45'' ed estensione a 72°C per 45''. La visualizzazione degli amplimeri, la cui dimensione attesa è di 209 bp, viene effettuata mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio (2%).

Analisi mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) -

Grazie all'introduzione del nucleotide "g", la presenza della C⁻⁸⁰⁶ introduce un secondo sito di restrizione riconosciuto dall'enzima Bts I, abolito invece dalla presenza del nucleotide T nella stessa posizione. La reazione di digestione è stata ottenuta incubando 5 µl del prodotto di PCR con 4U di enzima Bts I ed il relativo buffer (1X) con un volume finale di 10 µl. Dopo incubazione a 50°C per 16 ore, i prodotti di digestione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 3%. La presenza di due siti di restrizione produce tre frammenti (108, 75 e 26 bp) identificando l'allele *wild-type* (C), mentre la presenza di un solo sito di restrizione, che produce solo due frammenti (134 e 75 bp), identifica l'allele T.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS) per le variabili qualitative e come frequenza percentuale sul totale per quelle quantitative. L'analisi delle differenze tra gruppi in caso di normalità della distribuzione dei dati è stata eseguita mediante analisi della varianza ad una via (ANOVA). Nel caso in cui la verifica di normalità della distribuzione dei dati sia risultata negativa è stato

impiegato il test di Kruskal-Wallis. Lo studio delle differenze tra gruppi e variabili di tipo qualitativo dicotomico è stata effettuata mediante chi- quadrato di Pearson.

Per entrambi i loci è stato verificato l'equilibrio di Hardy-Weinberg. Brevemente, le frequenze genotipiche osservate nei gruppi di studio sono state confrontate con le frequenze attese nella popolazione in equilibrio tramite il software Arlequin, Ver. 2000 ³⁸ che usa l'algoritmo di Guo e Levene ³⁹. Le differenze nella distribuzione delle frequenze genotipiche ed alleliche, fra i gruppi di studio, sono state analizzate con il test del chi-quadrato di Pearson. Il confronto delle frequenze dei singoli genotipi ed alleli è stato effettuato con il test esatto di Fisher con due gradi di libertà, con l'opzione per la stima del rischio relativo (odds ratio, OR) e relativo intervallo di confidenza (CI) al 95%.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate mediante il pacchetto di software statistico SPSS versione 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Caratteristiche generali della popolazione

Dei 202 pazienti valutabili, 6 pazienti sono stati esclusi in quanto non è stato possibile identificarne il genotipo. Lo studio è stato pertanto condotto in 196 pazienti (97 uomini, 99 donne, età media=74.9 anni, range=29-96 anni) con diagnosi endoscopica di esofagite da reflusso.

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi in base al trattamento: 51 pazienti (M=29, F=22, età media=73.28 ±15.98 anni, range=30-96 anni) hanno ricevuto lansoprazolo 30 mg/die, 94 pazienti (M=47, F=47, età media=77.96 ±8.32 anni, range=56-93 anni) pantoprazolo 40 mg/die e 51 pazienti (M=30, F=21, età media=70.91 ± 12.64 anni, range=29-93 anni) rabeprazolo 20 mg/die. I pazienti in pantoprazolo avevano un'età più anziana rispetto sia ai pazienti in lansoprazolo (p=0.022) che in rabeprazolo (p=0.0001). Nessuna differenza significativa è emersa tra i tre trattamenti per quanto riguardava le caratteristiche endoscopiche e cliniche dei pazienti studiati (Tabella 2).

Tabella 2 - Caratteristiche cliniche e demografiche del campione esaminato suddiviso per tipo di trattamento.

	Lansoprazolo	Pantoprazolo	Rabeprazolo	p
Numero pazienti	51	94	51	--
Maschi	29	47	30	--
Femmine	22	47	21	--
Età media (anni)	73.28 ±15.98	77.96 ± 8.32	70.91 ± 12.64	0.027
Intervallo di età (anni)	30 - 96	56 - 93	29 - 93	
Grado dell'esofagite (n, %)				
Grado A	9 (17.6)	21 (22.3)	11 (21.6)	0.795
Grado B	25 (49.0)	53 (56.4)	32 (62.7)	0.376
Grado C-D	17 (33.3)	20 (21.3)	8 (15.7)	0.092
Ernia jatale (n, %)	36 (70.6)	59 (62.8)	35 (68.6)	0.586
Dimensione ernia (in cm)	2.53 ± 1.97	2.14 ± 2.01	2.52 ± 2.11	0.252
Infezione Helicobacter pylori (n, %)	21 (41.2)	50 (54.9)*	21 (41.2)	0.161

*Per 3 pazienti questo dato non è disponibile.

Dopo 8 settimane di terapia, 168/196 pazienti (85.7%) sono risultati guariti mentre 28/196 (14.3%) non hanno risposto alla terapia con IPP. In particolare la guarigione dell'esofagite è stata ottenuta nel 66.7% dei soggetti in terapia con lansoprazolo, nel 91.5% in quelli in terapia con pantoprazolo e 94.1% in quelli con rabeprazolo. I pazienti in lansoprazolo hanno ottenuto una guarigione significativamente più bassa rispetto ai soggetti in pantoprazolo e rabeprazolo (p=0.0001).

La tabella 3 mostra le caratteristiche demografiche, endoscopiche e cliniche dei pazienti studiati suddivisi in base alla risposta terapeutica. I pazienti non guariti dopo 8 settimane di terapia erano significativamente più giovani (68.6 ± 16.8 vs 76.0 ± 11.5 , p =

0.025) e *H. pylori* negativi (25.0% vs 53.9%, $p = 0.007$) rispetto a quelli che avevano risposto alla terapia. In tre soggetti, nel gruppo del pantoprazolo, non era disponibile il dato sull'infezione da *H. pylori*. Nessuna differenza significativa è stata trovata tra responders e non responders per quanto riguardava il sesso, il grado dell'esofagite, la presenza e le dimensioni dell'ernia jatale.

Tabella 3 - Caratteristiche cliniche e demografiche del campione esaminato.

	Risposta terapeutica		p	Tutti
	Si	No		
Numero pazienti	168	28	-	196
Maschi	81 (48.2)	16 (57.1)	0.504	97
Femmine	87 (51.8)	12 (42.9)	0.504	99
Età media (anni)	76.0 ± 11.5	68.6 ± 16.8	0.025	74.9 ± 12.6
Intervallo di età (anni)	29 - 96	30 - 92	-	29 - 96
Grado dell'esofagite (n, %)				
Grado A	37 (22.0)	4 (14.3)	0.499	41
Grado B	93 (55.4)	17 (60.7)	0.751	110
Grado C-D	38 (22.6)	7 (25.0)	0.971	45
Ernia jatale (n, %)	107 (63.7)	22 (78.6)	0.186	129
Dimensione ernia (in cm)	2.2 ± 2.0	3.0 ± 2.3	0.118	2.4 ± 2.0
Infezione <i>Helicobacter pylori</i> (n, %)	89 (53.9)*	7 (25.0)	0.007	96
Terapia (n, %)				
Lansoprazolo	34 (66.7)	17 (33.3)	--	51
Pantoprazolo	86 (91.5) ¹	8 (8.5)	--	94
Rabeprazolo	48 (94.1) ²	3 (5.9)	--	51

¹Lansoprazolo vs Pantoprazolo e ² Lansoprazolo vs Rabeprazolo: analisi PP: $P = 0.0001$,

*Per 3 pazienti questo dato non è disponibile

Caratteristiche genetiche della popolazione

Il campione esaminato stratificato per trattamento è risultato in equilibrio di Hardy-Weinberg sia per il polimorfismo CYP2C19 *2 (p=0.394) che per il *17 (p=0.832). La tabella 4 riporta le distribuzioni genotipiche nei tre gruppi. Non abbiamo riscontrato nessuna differenza statisticamente significativa nella distribuzione dei genotipi G/G, G/A, A/A del CYP2C19*2 e C/C, C/T, T/T del CYP2C19*17 fra i tre gruppi di trattamento.

Tabella 4 - Caratteristiche genetiche del campione esaminato.

Genotipo	Lansoprazolo		Pantoprazolo		Rabeprazolo		Tutti	
	(N = 51)		(N = 94)		(N = 51)		(N = 196)	
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
CYP2C19*2 [#]								
G/G	36	(70.6)	66	(70.2)	42	(82.4)	144	(73.5)
G/A	14	(27.5)	24	(25.5)	8	(15.7)	46	(23.5)
A/A	1	(2.0)	4	(4.3)	1	(2.0)	6	(3.1)
CYP2C19*17 [^]								
C/C	31	(60.8)	60	(63.8)	30	(58.8)	121	(61.7)
C/T	18	(35.3)	30	(31.9)	19	(37.3)	67	(34.2)
T/T	2	(3.9)	4	(4.3)	2	(3.9)	8	(4.1)

[#]Equilibrio di Hardy-Weinberg: p = 0.394, [^]Equilibrio di Hardy-Weinberg: p = 0.832

La tabella 5 riporta la distribuzione dei polimorfismi CYP2C19*2 e CYP2C19*17 in base alla risposta terapeutica. Per quanto riguarda il polimorfismo CYP2C19*2, non è stata rilevata nessuna differenza significativa nella risposta terapeutica in base al genotipo. Tuttavia è stata riscontrata una guarigione del 100% nei pazienti omozigoti per l'allele mutato (A/A). Diversamente, il polimorfismo CYP2C19*17 presenta una risposta terapeutica differente, infatti i pazienti wild-type (wt) hanno una percentuale di guarigione (81.0%)

significativamente più bassa rispetto ai pazienti con genotipo wt/*17 (92.5%) o *17/*17 (100.0%) ($p = 0.020$).

Tabella 5 - Distribuzione dei genotipi CYP2C19*2 e CYP2C19*17 in base alla risposta terapeutica.

Genotipo	Risposta terapeutica				p	OR (95% IC)
	Si		No			
	n	(%)	n	(%)		
CYP2C19*2[#]						
G/G	126	(87.5)	18	(12.5)	0.252	0.600 (0.260 – 1.378)
G/A	36	(78.3)	10	(21.7)	0.146	2.037 (0.880 – 4.732)
A/A	6	(100)	-	-	0.597	0.000 (0.000 – 3.842)
CYP2C19*17[^]						
C/C	98	(81.0)	23	(19.0)	0.020	3.286 (1.228 – 8.774)
C/T	62	(92.5)	5	(7.5)	0.055	0.372 (0.139 – 0.997)
T/T	8	(100.0)	-	-	0.604	0.000 (0.000 – 2.836)

[#]Equilibrio di Hardy-Weinberg: $p = 0.117$ (Si) e $p = 0.548$ (No)

[^]Equilibrio di Hardy-Weinberg: $p = 0.673$ (Si) e $p = 1.000$ (No)

Suddividendo i soggetti in base al trattamento abbiamo riscontrato che solo i pazienti in terapia con Lansoprazolo wt/wt (54.8%) hanno una risposta terapeutica di guarigione significativamente minore rispetto ai soggetti con genotipo wt/*17 (83.3%) o *17/*17 (100%) ($p=0.035$) (Tabella 6).

Tabella 6 - Distribuzione dei genotipi CYP2C19*2 e CYP2C19*17 in base alla risposta terapeutica suddivisi per principio attivo.

Genotipo	Lansoprazolo (N = 51)					Pantoprazolo (N = 94)					Rabeprazolo (N = 51)							
	Risposta terapeutica				p	OR (95% IC)	Risposta terapeutica				p	OR (95% IC)	Risposta terapeutica				p	OR (95% IC)
	Si		No				Si		No				Si		No			
	n	(%)	n	(%)			n	(%)	n	(%)			n	(%)	n	(%)		
CYP2C19*2																		
G/G	25	(69.4)	11	(30.6)	0.532	0.660 (0.194 – 2.228)	60	(90.1)	6	(9.1)	1.000	1.300 (0.277 – 5.973)	41	(97.6)	1	(2.4)	0.077	0.085 (0.010 – 0.761)
G/A	8	(57.1)	6	(42.9)	0.508	1.773 (0.516 – 6.148)	22	(91.7)	2	(8.3)	1.000	0.970 (0.210 – 4.590)	6	(75.0)	2	(25.0)	0.061	14.000 (1.540 – 122.330)
A/A	1	(100.0)	-	-	-	-	4	(100.0)	-	-	-	-	1	(100.0)	-	-	-	-
CYP2C19*17																		
C/C	17	(54.8)	14	(45.2)	0.035	4.667 (1.191 – 17.882)	54	(90.0)	6	(10.0)	0.706	1.778 (0.382 – 8.124)	27	(90.0)	3	(10.0)	0.259	-
C/T	15	(83.3)	3	(16.7)	0.073	0.271 (0.071 – 1.065)	28	(93.3)	2	(6.7)	1.000	0.690 (0.151 – 3.231)	19	(100.0)	-	-	-	-
T/T	2	(100.0)	-	-	-	-	4	(100.0)	-	-	-	-	2	(100.0)	-	-	-	-

La tabella 7 mostra la analisi di regressione logistica per i singoli fattori che possono influenzare la risposta terapeutica.

I pazienti wt/wt per il CYP2C19*17 presentano un rischio maggiore di fallimento terapeutico nella guarigione dell'esofagite (OR = 3.286, IC95% 1.191-9.063, p = 0.022) e in particolare nei soggetti in terapia con lansoprazolo (OR= 4.667, IC 95% 1.132-19.241, p = 0.033).

In questo studio, la risposta terapeutica degli IPP nella malattia da reflusso gastroesofageo è stata migliore nei pazienti più anziani (OR= 0.961, IC 95% 0.934-0.989, p=0.006) ed in quelli H. pylori positivi (OR = 0.285, IC 95% 0.115-0.706, p=0.007).

Valutando i pazienti per tipo di trattamento viene confermata l'associazione tra una minore risposta terapeutica ed il genotipo wt/wt del CYP2C19*17 solo nei pazienti in terapia con lansoprazolo. Inoltre nel gruppo trattato con lansoprazolo si è riscontrata una migliore risposta terapeutica con l'aumentare dell'età (OR = 0.955, IC 95% 0.918-0.994, p = 0.025).

Infine con l'analisi della regressione logistica non è stata trovata nessuna associazione tra il polimorfismo CYP2C19*2 e risposta terapeutica indipendentemente dal tipo di trattamento.

Tabella 7 – Analisi di regressione logistica per i singoli fattori che possono influenzare la risposta terapeutica.

Variabile	Principio attivo									Tutti		
	Lansoprazolo (n = 51)			Pantoprazolo (n = 94)			Rabeprazolo (n = 51)					
	p	OR	(95% IC)	p	OR	(95% IC)	p	OR	(95% IC)	p	OR	(95% IC)
Età (anni)	0.025	0.955	(0.918 – 0.994)	0.171	0.943	(0.867 – 1.026)	0.963	0.998	(0.919 – 1.083)	0.006	0.961	(0.934 – 0.989)
Severità dell'esofagite	0.260	0.614	(0.262 – 1.436)	0.249	1.953	(0.625 – 6.101)	0.259	3.214	(0.423 – 24.200)	0.455	1.261	(0.686 – 2.317)
Presenza di ernia jatale	0.201	2.545	(0.608 – 10.654)	0.460	1.868	(0.356 – 9.807)	0.940	0.909	(0.076 – 10.821)	0.145	2.037	(0.783 – 5.300)
Dimensioni ernia jatale (in cm)	0.366	1.150	(0.850 – 1.557)	0.378	1.166	(0.829 – 1.642)	0.142	1.479	(0.878 – 2.492)	0.068	1.196	(0.987 – 1.450)
Infezione <i>Helicobacter pylori</i>	0.077	0.308	(0.083 – 1.137)	0.200	0.376	(0.084 – 1.680)	-	-	-	0.007	0.285	(0.115 – 0.706)
CYP2C19*2												
G/G	0.516	0.660	(0.189 – 2.310)	0.757	1.300	(0.246 – 6.872)	0.057	0.085	(0.007 – 1.072)	0.238	0.600	(0.257 – 1.401)
G/A	0.378	1.773	(0.497 – 6.324)	0.971	0.970	(0.182 – 5.162)	0.042	14.000	(1.095 – 178.997)	0.103	2.037	(0.865 – 4.796)
A/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CYP2C19*17												
C/C	0.033	4.667	(1.132 – 19.241)	0.497	1.778	(0.338 – 9.340)	-	-	-	0.022	3.286	(1.191 – 9.063)
C/T	0.072	0.271	(0.066 – 1.122)	0.662	0.690	(0.131 – 3.641)	-	-	-	0.056	0.372	(0.134 – 1.027)
T/T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DISCUSSIONE

È noto che gli IPP hanno una struttura chimica affine ed uno stesso meccanismo d'azione, con differenze farmacocinetiche, farmacodinamiche e metaboliche. Essi sono farmaci molto importanti per il trattamento delle patologie acido-correlate, per l'eradicazione dell'*H pylori*, per la prevenzione e la cura della gastropatia da FANS.

I fattori che determinano l'efficacia degli IPP sono l'area sottesa alla curva (AUC) dei profarmaci, la loro emivita di attivazione a pH 1 nei canalicoli acidi delle cellule parietali ed il legame covalente della forma ciclica sulfonamidica con i gruppi SH della cisterna, presente nella pompa protonica. I tre fattori sono simili per i vari IPP e quindi ne deriva una simile potenza ed efficacia antisecretoria. Interessante notare che entrambi gli isomeri di qualsiasi IPP sono attivati, in modo pH dipendente, attraverso la trasformazione in un'identica forma ciclica sulfonamidica che non è più otticamente attiva. Dall'analisi comparativa dei vari trial clinici⁴⁰, la potenza e l'efficacia dei vari IPP, risulta essere abbastanza simile sulla base dei milligrammi di sostanza utilizzata. Infatti, somministrando dosaggi standard una volta al giorno, si ottiene la guarigione endoscopica in più del 90% dei pazienti con ulcera duodenale (dopo 1-4 settimane di trattamento), con ulcera gastrica (dopo 6 settimane) e con MRGE erosiva (dopo 8 settimane). Premesso che tutti gli IPP hanno dimostrato una efficacia clinica sovrapponibile, i criteri di scelta di un IPP sembrano basati, principalmente sulle formulazioni disponibili, sul profilo di sicurezza di impiego con altri farmaci e sui costi, ma non sulla farmacogenetica. Risulta invece diversa l'efficacia degli IPP quando valutati dal punto di vista farmacogenetico.

La maggior parte degli studi finora pubblicati che valutano la relazione tra CYP2C19 e IPP sono di farmacocinetica e sono condotti principalmente su casistiche di volontari sani e con un numero piccolo di soggetti.

In questo studio di farmacogenetica abbiamo scelto di analizzare l'influenza specifica dei polimorfismi genetici del CYP2C19 in quanto gli IPP sono stereoselettivamente metabolizzati da questo enzima. Questo è il primo studio clinico, condotto su una ampia casistica che valuta l'efficacia clinica di tre inibitori di pompa protonica nella esofagite da reflusso in relazione ai polimorfismi *2 e *17 del CYP2C19.

L'allele *2 è stato ampiamente studiato in popolazioni asiatiche in cui la prevalenza è significativamente maggiore rispetto ai soggetti caucasici. In soggetti trattati con IPP, le varianti fenotipiche di metabolizzatore rapido (genotipo wt/wt) sono state associate a ridotte percentuali di guarigione della esofagite e di eradicazione dell'infezione da H. pylori rispetto alle varianti di metabolizzatore lento (genotipo *2/*2)⁴¹. Nel nostro studio non abbiamo trovato differenze statisticamente significative nella guarigione dell'esofagite tra i soggetti wild-type e i soggetti con gli alleli mutati, tuttavia i soggetti omozigoti *2/*2 hanno ottenuto una guarigione del 100% come riportato nei precedenti studi asiatici⁴². Verosimilmente non è stata ottenuta la significatività statistica per la bassa prevalenza di tale polimorfismo nei nostri pazienti caucasici.

Interessanti sono i dati riguardanti l'allele CYP2C19*17 in soggetti svedesi ed etiopi³³. Gli autori di questo studio descrivono un'aumentata attività di trascrizione dell'allele *17 che porta a una AUC ridotta dell'omeprazolo dopo somministrazione di una dose singola, confermato dallo studio funzionale su topi transgenici.

Diversamente da quanto riportato in letteratura, nel nostro campione troviamo che i soggetti con gli alleli mutati (wt/*17 e *17/*17) ottengono la guarigione dell'esofagite in una

percentuale significativamente maggiore rispetto ai soggetti wild-type. Analizzando i pazienti suddivisi per tipo di trattamento il dato si conferma solo per i soggetti trattati con lansoprazolo e non per i soggetti in pantoprazolo o rabeprazolo.

Il pantoprazolo non sembra pertanto essere influenzato dal CYP2C19*17 come è stato dimostrato in un recente studio. Lo studio valutava l'effetto della variante *17 sulla eradicazione dell'infezione da H. pylori in 125 pazienti con ulcera peptica in terapia con pantoprazolo, amoxicillina e metronidazolo. I risultati dello studio indicano che il polimorfismo CYP2C19*17 non influenza l'efficacia di una triplice terapia di eradicazione quando viene utilizzato il pantoprazolo.⁴³

Anche il rabeprazolo sembra risentire meno dell'influenza del genotipo CYP2C19 come riportato da alcuni studi che ne hanno indagato il ruolo sia nella terapia di eradicazione dell'H. pylori che nell'esofagite da reflusso. Nell'eradicazione dell'H. pylori²⁰, una più bassa percentuale di eradicazione è stata osservata nei soggetti metabolizzatori rapidi che assumono lansoprazolo oppure omeprazolo, ma non con il rabeprazolo. Le percentuali di guarigione dell'esofagite sono risultate più basse nei metabolizzatori rapidi con lansoprazolo, ma non con il rabeprazolo⁴⁴. Questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il rabeprazolo a differenza degli altri IPP è metabolizzato principalmente attraverso una via di riduzione non enzimatica, con minore coinvolgimento degli enzimi CYP2C19 e CYP3A4.

In un altro studio⁴⁵ Rosenborg e collaboratori in 16 soggetti svedesi hanno valutato la farmacocinetica dell'omeprazolo in relazione all'allele CYP2C19*17 concludendo che è improbabile una differenza clinicamente significativa nella cinetica dell'omeprazolo tra i genotipi.

Un dato discordante invece viene riportato da uno studio che valutava l'effetto del CYP2C19*2 e *17 sulla farmacocinetica e farmacodinamica degli IPP, omeprazolo, o

lansoprazolo o pantoprazolo, condotto in 27 soggetti caucasici sani⁴⁶. Gli autori concludevano che i soggetti wild-type per l'allele*2 (wt/wt) e gli eterozigoti per l'allele *17 (wt/*17) necessitano di una forte soppressione acida specialmente durante il primo giorno di terapia o quando trattati al bisogno. Alla luce di questi risultati, nel nostro studio, la terapia protratta per 8 settimane potrebbe spiegare la migliore risposta in termini di guarigione dell'esofagite quando trattata con pantoprazolo o rabeprazolo.

A tutt'oggi non ci sono studi simili al nostro che valutino, in particolare, l'influenza della variante allelica *17, sulla efficacia clinica di differenti IPP nella malattia da reflusso gastroesofageo e pertanto i nostri risultati dovrebbero stimolare la ricerca promuovendo ulteriori studi clinici su altre casistiche.

Conclusioni: la sostituzione di un nucleotide (SNP) C⁻⁸⁰⁶→T nella regione del promotore del gene del CYP2C19 che identifica l'allele *17 può influenzare l'efficacia clinica del lansoprazolo nei pazienti con esofagite da reflusso. In questa popolazione caucasica, il ruolo del polimorfismo del CYP2C19*2 sembra meno rilevante rispetto al polimorfismo 17. L'analisi di questi genotipi del gene CYP2C19 può essere utile per identificare sottogruppi di pazienti con differente risposta clinica alla terapia con alcuni IPP.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Shi S, Klotz U. Proton pump inhibitors: an update of their clinical use and pharmacokinetics *Eur J Clin Pharmacol* 2008; 64:935–951.
- ² Furuta T, Shirai N, Watanabe F, Honda S, Takeuchi K, Iida T, Sato Y, Kajimura M, Futami H, Takayanagi S, Yamada M, Ohashi K, Ishizaki T, Hanai H. Effect of cytochrome P450C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole. *Clin Pharmacol Ther* 2002;72:453-60.
- ³ Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R; Global Consensus Group. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1900-20; quiz 1943
- ⁴ Fass R, Fennerty MB, Vakil N. Non-erosive Reflux Disease. Current Concepts and Dilemmas. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:303-14.
- ⁵ Amano K, Adachi K, Katsube T, Watanabe M, Kinoshita Y. Role of hiatus hernia and gastric mucosal atrophy in the development of reflux esophagitis in the elderly. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16:132-6.
- ⁶ Perkins AC, Wilson CG, Blackshaw PE, Vincent RM, Dansereau RJ, Juhlin KD, Bekker PJ, Spiller RC. Impaired oesophageal transit of capsule versus tablet formulations in the elderly. *Gut* 1994; 35: 1363-7.
- ⁷ Achem AC, Achem SR, Stark ME, DeVault KR. Failure of esophageal peristalsis in older patients: association with esophageal acid exposure. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 35-9.
- ⁸ Pilotto, A. and N. Salles, *Helicobacter pylori* infection in geriatrics. *Helicobacter* 2002; 7 Suppl 1: 56-62.
- ⁹ Locke GR, Talley NJ, Fett SL. Prevalence and clinical spectrum of gastroesophageal reflux: a population-based study in Olmsted Country, Minnesota. *Gastroenterology* 1997;112:1448-56.
- ¹⁰ Chiriatti A, Panzuto F, Bevilacqua S, et al. La MRGE, un progetto di collaborazione tra medici di medicina generale e specialisti gastroenterologi. *Atti del 55° Congresso Nazionale FIMMG, Salsomaggiore* 2003.
- ¹¹ Pilotto A, Franceschi M, Vitale D, Zaninelli A, Di Mario F, Seripa D, , Rengo F, F.I.R.I. (Fondazione Italiana Ricerca Invecchiamento) and the SOFIA Project Investigators. The Prevalence of Diarrhea and Its Association With Drug Use in Elderly Outpatients: A Multicenter Study. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1–8.
- ¹² Fennerty MB. Extraesophageal gastroesophageal reflux disease. Presentation and approach to treatment. *Gastroenterol Clin North Am* 1999; 28:861-73.

-
- ¹³ Pilotto A, Franceschi M, Vitale D, Zaninelli A, Masotti G, Rengo F; F.I.R.I. (Fondazione Italiana Ricerca Invecchiamento) and the SOFIA Project Investigators. Drug use by the elderly in general practice: effects on upper gastrointestinal symptoms. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62: 65-73.
- ¹⁴ Triadafilopoulos, G. and R. Sharma. Features of symptomatic gastroesophageal reflux disease in elderly patients. *Am J Gastroenterol* 1997; 92: 2007-11.
- ¹⁵ Morley, J.E.. Anorexia and weight loss in older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003; 58: 131-7.
- ¹⁶ Maekawa T, Kinoshita Y, Okada A, Fukui H, Waki S, Hassan S, Matsushima Y, Kawanami C, Kishi K, Chiba T. Relationship between severity and symptoms of reflux oesophagitis in elderly patients in Japan. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13: 927-30.
- ¹⁷ Pilotto A, Franceschi M, Leandro G, Scarcelli C, D'Ambrosio LP, Seripa D, Perri F, Niro V, Paris F, Andriulli A, Di Mario F. Clinical features of reflux esophagitis in older people: a study of 840 consecutive patients. *J Am Geriatr Soc* 2006. 54: 1537-42.
- ¹⁸ Collen MJ, Abdulian JD, Chen YK. Gastroesophageal reflux disease in the elderly: more severe disease that requires aggressive therapy. *Am J Gastroenterol* 1995; 90:1053-7.
- ¹⁹ Chong E, Ensom MH. Pharmacogenetics of the proton pump inhibitors: a systematic review. *Pharmacotherapy*. 2003; 23:460-71.
- ²⁰ Fock KM, Ang TL, Bee LC, Lee EJ. Proton pump inhibitors: do differences in pharmacokinetics translate into differences in clinical outcomes? *Clin Pharmacokinet*. 2008; 47:1-6.
- ²¹ Zhou Q, Yan X-F, Pan W-S, Zeng S. Is the required therapeutic effect always achieved by racemic switch of proton-pump inhibitors? *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2617-2619.
- ²² Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee
Web site (www.imm.ki.se/CYPalleles/)
- ²³ Danielson P. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr Drug Metab* 2002; 3: 561-97.
- ²⁴ Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ, Guengerich FP, Estabrook RW, Feyereisen R, Gonzalez FJ, Coon MJ, Gunsalus IC, Gotoh O, et al. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol*. 1993;12:1-51.
- ²⁵ Philpot RM. Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues. *Meth Enzymology* 1991; 206: 623-631.

-
- ²⁶ Parkinson A. An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. *Toxicol Phatol* 1996 24: 45-57.
- ²⁷ Gonzalez FJ. Human cytochromes P450: problems and prospects. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 346-352.
- ²⁸ Guengerich FP. Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1999; 39: 1-17.
- ²⁹ Lin JH, Lu AYH. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Arch Clin Pharmacokinet* 1998; 35: 361-390.
- ³⁰ de Morais SMF, Wilkinson G R, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer U A, Goldstein J A. The major genetic defect responsible for the polymorphism in humans. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 15419-15422.
- ³¹ Xie HG, Stein CM, Kim RB, Wilkinson GR, Flockhart DA, Wood AJ. Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world. *Pharmacogenetics* 1999; 9:539-549.
- ³² Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 2002; 41:913-958.
- ³³ Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79:103-13.
- ³⁴ Lundell LR, Dent J, Bennett JR, Blum AL, Armstrong D, Galmiche JP, Johnson F, Hongo M, Richter JE, Spechler SJ, Tytgat GN, Wallin L. Endoscopic assessment of oesophagitis: clinical and functional correlates and further validation of the Los Angeles classification. *Gut* 1999; 45:172-80.
- ³⁵ Kaul B, Petersen H, Myrvold HE, Grette K, Roysland P, Halvorsen T. Hiatus hernia in gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 1986; 21: 31-34.
- ³⁶ Misiewicz JJ, Tytgat GNJ, Goodwin CS et al. The Sydney system: a new classification of gastritis. Working Party Reports of the 9th World Congress of Gastroenterology, Melbourne: Blackwell Scientific, 1990: 1-10.
- ³⁷ Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* 1986; 51: 263-273
- ³⁸ Schneider S, Roessli D, Excoffier L. Arlequin ver 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland 2000.

-
- ³⁹ Guo SW and Thompson EA. A Monte Carlo method for combined segregation and linkage analysis. *Am J Hum Genet.* 1992; 51:1111-26.
- ⁴⁰ Klok RM, Postma MJ, van Hout BA, Brouwers JR. Meta-analysis: comparing the efficacy of proton pump inhibitors in short-term use. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003 May 15; 17:1237-45.
- ⁴¹ Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics* 2004; 5:181–202.
- ⁴² Klotz U. Clinical impact of CYP2C19 polymorphism on the action of proton pump inhibitors: a review of a special problem. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2006; 44:297–302.
- ⁴³ Kurzawski M, Gawrońska-Szklarz B, Wrześniewska J, Siuda A, Starzyńska T, Drożdżik M. Effect of CYP2C19*17 gene variant on *Helicobacter pylori* eradication in peptic ulcer patients. *Eur J Clin Pharmacol* 2006; 62:877-80.
- ⁴⁴ Kawamura M, Ohara S, Koike T, Iijima K, Suzuki J, Kayaba S, Noguchi K, Hamada S, Noguchi M, Shimosegawa T; Study Group of GERD. The effects of lansoprazole on erosive reflux oesophagitis are influenced by CYP2C19 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 1;17: 965-73.
- ⁴⁵ Ohlsson Rosenberg S, Mwinyi J, Andersson M, Baldwin RM, Pedersen RS, Sim SC, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M, Eliasson E. Kinetics of omeprazole and escitalopram in relation to the CYP2C19*17 allele in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 2008; 64:1175-9.
- ⁴⁶ Hunfeld NG, Mathot RA, Touw DJ, van Schaik RH, Mulder PG, Franck PF, Kuipers EJ, Geuss WP. Effect of CYP219*2 and *17 mutations on pharmacodynamics and kinetics of proton pump inhibitors in Caucasians. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65:752–760.