

## GENETIČKI POLIMORFIZAM IZOENZIMA CITOHROMA P450

ANITA RAKIĆ, BRANISLAVA MILJKOVIĆ, MILENA POKRAJAC

*Institut za farmakokinetiku, Farmaceutski fakultet, Beograd*

**Ključne reči:** izoenzimi CYP450, metabolizam lekova, genetički polimorfizam, klinički značaj

Ponašanje lekova u organizmu je u velikoj meri određeno genetičkim faktorima bolesnika. Disciplina koja se bavi proučavanjem nasledne osnove interindividualnih razlika u odgovoru na lek naziva se **farmakogenomika**. Termin je uveden da se produbi oblast proučavanja **farmakogenetike** kao discipline, koja je u svom prvobitnom obliku bila ograničena na varijabilnosti u metabolizmu lekova. Pored gena koji kontrolišu enzime za metabolizam, farmakogenomika proučava i gene odgovorne za regulaciju receptora, transportera, brojnih proteina..., odnosno sve gene u genomu uključene u interakciju lek – organizam (1, 2).

Enzimi za metabolizam lekova su **genetički polimorfni** (od grčke reči *poly*, *morphe* = mnogoobličnost, postojanje različitih oblika), što znači da postoje genetički uslovljene razlike u njihovoj strukturi i aktivnosti. Ove razlike se mogu smatrati prihvatljivim, ako se ima u vidu činjenica da enzimi za metabolizam lekova (odnosno, biotransformaciju ksenobiotika) predstavljaju biohemijski odbrambeni sistem organizma, usmeren protiv malih lipofilnih molekula iz spoljašnje sredine. Zapravo, svi humani odbrambeni sistemi pokazuju velike genetičke razlike, koje su se razvile u procesu evolucije čoveka, sa ciljem da obezbede preživljavanje bar nekih članova populacije u toku različitih epidemija, ili eventualnih hemijskih katastrofa. Stepem genetičkih razlika među

enzimima za metabolizam lekova je zbog toga znatno veći nego među nekim drugim proteinima u organizmu, ili receptorima za lekove (3).

Polimorfizam enzima za metabolizam predstavlja važan faktor varijabilnosti u odgovoru bolesnika na iste doze lekova. Potreba za pravilnim sagledavanjem i proučavanjem pomenutih razlika postaje sve izraženija sa proširenjem saznanja o broju enzima čija je ekspresija polimorfna (mnogi enzimi i I i II faze metabolizma lekova) i porastom svesti o ozbiljnosti mogućih posledica takvog metabolizma, kada je krajnji ishod terapije u pitanju (4).

Najveći klinički značaj ima polimorfizam na nivou citohrom P450 zavisnog metabolizma lekova, s obzirom na činjenicu da ovaj složeni enzimski sistem učestvuje u metabolizmu preko 90% lekova unetih u organizam (5).

#### **Citohrom P450 (CYP450)**

Citohrom P450 (CYP450) ima centralnu ulogu u oksidativnom metabolizmu lekova (odgovoran je za 70-80 % ukupnog metabolizma I faze), različitih zagađivača iz spoljašnje sredine i drugih ksenobiotika, a učestvuje i u metabolizmu i sintezi mnogih endogenih supstanci (steroidni hormoni, holesterol, žučne kiseline, liposolubilni vitamini, masne kiseline, arahidonska kiselina i eikosanoidi). CYP450 je zajednički termin za veliku familiju hem-tiolatnih proteina (ima ih više od 50), koji su smešteni u glatkom endoplazmatskom retikulumu, prvenstveno u hepatocitima (ali su u izvesnoj meri prisutni i u gotovo svim ćelijama organizma), dok su pojedini enzimi smešteni u unutrašnjoj membrani mitohondrija. Pojedinačni enzimi – **izoenzimi**, su prema sličnosti u strukturi grupisani u familije i podfamilije (npr. CYP2C9: 2 je oznaka familije, C podfamilije, a 9 je individualan broj enzima). Kod čoveka je do sada identifikovano ukupno 17 familija, od kojih su familije 1, 2 i 3 uključene u metabolizam ksenobiotika (Tabela I). CYP3A4 je najznačajniji izoenzim, odgovoran za preko 50% CYP450 zavisnog metabolizma lekova. U specifičnosti pojedinih izoenzima postoji značajno preklapanje, tako da je isti lek često supstrat više od jednog izoenzima (3-7).

**Tabela I** - Supstrati glavnih izoenzima CYP450 u metabolizmu ksenobiotika (4,5)

<b>Izoenzim</b>	<b>Supstrati</b>
CYP1A2	kofein, paracetamol, teofilin, fenacetin, imipramin, arilamini, nitrozamini
CYP2A6	kumarin, nikotin
CYP2B6	bupropion, ciklofosfamid, ifosfamid
CYP2C8	taksol
CYP2C9	NSAIL (ibuprofen, diklofenak, naproksen), oralni hipoglikemici (tolbutamid, glipizid), S-varfarin, fenitoin, losartan, tetrahidrokanabinol
CYP2C19	inhibitori protonske pumpe(omeprazol, lansoprazol), diazepam, S-mefenitoin, progvanil, heksobarbital, propranolol, MAO-inhibitori
CYP2D6	antidepresivi (triciklični i selektivni inhibitori preuzimanja serotonina), $\beta$ blokatori, neuroleptici, antiaritmici (propafenon,spartein, enkainid, flekainid), opijati (kodein, tramadol, deksstrometorfan)
CYP2E1	paracetamol, hlorzoksazon, inhalacioni anestetici (enfluran, izofluran, halotan), etanol, nitrozamini, organski rastvarači (benzen, hloroform, anilin)
CYP3A4	makrolidni antibiotici, benzodiazepini, imunosupresivi, antineoplastici (taksol, tamoksifen), antihistaminici, blokatori Ca-kanala, steroidi (estrogeni, testosteron, progesteron), antivirolici, hinidin, karbamazepin i brojni drugi

Aktivnost enzima je rezultat složene interakcije spoljašnjih (ishrana, alkohol, pušenje, lekovi, različite supstance iz okruženja) i unutrašnjih faktora (fiziološki, patološki i genetički) i može da se menja pod uticajem istih. Od unutrašnjih faktora najveći uticaj imaju genetički (5).

## Farmakogenetički polimorfizam

Prema definiciji, farmakogenetički polimorfizam je monogenska osobina prouzrokovana prisustvom više od jednog alela na istom genskom lokusu i više od jednog fenotipa kada je u pitanju interakcija leka sa organizmom (u ovom slučaju metabolizam leka) u normalnoj populaciji ispitanika. Drugim rečima, određen enzim za metabolizam je polimorfan ukoliko se unutar ispitivane populacije javljaju različite varijante gena tog enzima (aleli), koje dalje indukuju razlike na nivou samog enzima. Da bi se zaista moglo govoriti o polimorfizmu, važna je i relativno visoka učestalost pojavljivanja određene genske varijante (najmanje 1% ispitanika treba da budu homozigoti za tu varijantu). U suprotnom, nije reč o polimorfizmu, već o retkim genskim varijantama (3,4,8,9).

**Aleli** su različite varijante (oblici) jednog istog gena i nalaze se uvek na istoj poziciji određenog hromozomskog para. Nastaju mutacijama na nivou jednog ili više parova nukleotida u DNK. Aleli određenog gena ispoljavaju različite nivoe aktivnosti, novu aktivnost, ili odsustvo aktivnosti tog gena (10). Geni se smatraju funkcionalno polimorfnim kada postoje stabilne alelne varijante unutar populacije koje menjaju aktivnost kodiranog proteina u odnosu na nemutiran gen (označava se kao „divlji” – *wild type*) (1).

Mutacije gena određenog enzima za metabolizam mogu da imaju za posledicu potpuno odsustvo enzimske aktivnosti (odsustvo enzima ili prisustvo neaktivnog enzima), smanjenu ili povećanu enzimsku aktivnost (usled promene u strukturi ili količini sintetisanog enzima), ili prisustvo enzima sa izmenjenom supstratnom specifičnošću (6). Nasledno uslovljene razlike u aktivnosti enzima dele bolesnike u dve ili više subpopulacija, koje se među sobom jasno razlikuju po kapacitetu za metabolisanje određenih lekova – supstrata genetički polimorfnog enzima. Rezultat je **bi-** ili **polimodalna distribucija** odgovarajuće mere enzimske aktivnosti *in vivo* (npr. metaboličkog odnosa) unutar populacije (11).

U većini slučajeva primarno mogu da se izdvoje dve podgrupe bolesnika – dva najčešća alternativna fenotipa: „oskudni” (spori, slabi) metabolizeri (***poor metabolizers–PM***) i „ekstenzivni” (normalni, brzi,

obimni, katalitički kompetentni) metabolizeri (*extensive metabolizers–EM*) (5,9). *PM* imaju smanjenu sposobnost metabolisanja određenih lekova u odnosu na većinu populacije, odnosno *EM* fenotip, koji predstavlja standard (normu) za metabolički kapacitet, što znači da je ekstenzivni metabolizam leka karakteristika normalne populacije (9,12). Iako su mutantni aleli uglavnom udruženi sa smanjenjem metaboličke aktivnosti kodiranog enzima, za pojedine enzime (npr. CYP2D6) postoje i takve genske varijante koje za rezultat imaju porast aktivnosti (1). Nosioци tih varijanti se označavaju kao „ultrabrzi” metabolizeri (*ultrarapid–UM* ili *utraextensive–UEM metabolizers*) (5,12).

### **Određivanje fenotipa i genotipa**

Postojanje genetičkog polimorfizma u okviru jedne populacije utvrđuje se na nivou samog enzima (određivanje fenotipa) i/ili na nivou gena za određeni metabolički enzim (određivanje genotipa) (13).

Pod genotipom se podrazumeva skup svih gena u organizmu. Fenotip je stvarni izgled organizma, tj. skup svih njegovih osobina nastalih delovanjem naslednih faktora - gena u određenim uslovima sredine. Ova dva pojma se mogu upotrebiti i u užem smislu, pri čemu se pod fenotipom podrazumeva specifična karakteristika organizma (npr. boja očiju), a pod genotipom kombinacija naslednih faktora pod čijom kontrolom se nalazi ta karakteristika (14).

#### Fenotip

Fenotip bolesnika za određeni metabolički enzim može se odrediti procenom aktivnosti i/ili određivanjem nivoa (količine) enzima (13).

Procena aktivnosti enzima *in vivo* vrši se primenom probne supstance (specifičan supstrat ispitivanog enzima) u pojedinačnoj dozi, nakon čega se u urinu, plazmi ili salivi prate i određuju nepromenjen lek i jedan ili više nastalih metabolita. Na osnovu dobijenih rezultata izračunava se vrednost određenog parametra koji kvantitativno opisuje aktivnost ispitivanog enzima (PIK-površina ispod krive  $C=f(t)$  nepromenjenog leka u plazmi,  $CL_{int}$  – intrinzički klirens leka tim metaboličkim putem, metabolički odnos ili  $Ae_m^\infty$ - ukupna kumulativna količina metabolita izlučenog u urinu). Određivanje fenotipa se najčešće vrši na osnovu vrednosti **urinarnog metaboličkog odnosa** (*urinary*

*metabolic ratio*), koji predstavlja odnos koncentracija nepromenjenog leka i metabolita u urinu (3,15,16). Za pojedine izoenzime (CYP1A2, CYP3A4) primenjuju se <sup>13</sup>C ili <sup>14</sup>C obeležene probne supstance i u izdahnutom vazduhu se meri brzina stvaranja <sup>13</sup>CO<sub>2</sub>/<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> – test izdisaja - **breath test** (Tabela II) (5,15-17).

U pojedinim slučajevima primenjuje se veći broj probnih supstanci u smeši, što omogućava simultanu procenu aktivnosti različitih izoenzima–tzv. **koktel pristup** (*coctail approach*) (5,15).

Ako su dostupni uzorci tkiva za analizu, može se vršiti procena enzimske aktivnosti *in vitro* (npr. u mikrozomima) i/ili određivanje nivoa enzima primenom obeleženih antitela (13).

**Tabela II** – Probne supstance za određivanje aktivnosti izoenzima CYP450 (12,16)

Izoenzim	Supstrat	METABOLIT
CYP1A2	kofein	demetil derivati
CYP2A6	kumarin	7-OH-kumarin
CYP2C9	tolbutamid <i>S</i> -varfarin	hidroksitolbutamid 6-OH- i 7-OH- <i>S</i> -varfarin
CYP2C19	<i>S</i> -mefenitoin omeprazol	4'-OH- <i>S</i> -mefenitoin 5-OH-omeprazol
CYP2D6	debrizokvin dekstrometorfan spartein	4-OH-debrizokvin dekstrorfan 2,3- i 5,6-dehidrospartein
CYP2E1	hlorzoksazon	6-OH-hlorzoksazon
CYP3A4	<sup>14</sup> C-N-metileritromicin midazolam	N-demetileritromicin + <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> 1'-OH- i 4-OH-midazolam

Određivanje aktivnosti enzima je od značaja i sprovodi se i za one izoenzime za koje još uvek ne postoje pouzdani dokazi o funkcionalnom i kliničkom efektu uočenih polimorfizama. Ovo se

prvenstveno odnosi na CYP3A4, a potom i CYP1A2, zbog velikih razlika u njihovoj aktivnosti, koje primarno nisu izazvane genetičkim faktorima, već su posledica indukcije/inhibicije enzima različitim spoljašnjim faktorima (4,16,18).

### Genotip

Određivanje genotipa podrazumeva analizu gena određenog enzima za metabolizam. DNK ispitanika se izoluje iz leukocita periferne krvi, folikula dlake ili tkiva, a potom se primenom različitih *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) tehnika (*allele-specific PCR - AS PCR* i *PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP*), zatim *SSCP* (*Single Strand Conformation Polymorphism*) analize, masene spektrometrije – *MS* (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Detection – MALDI-TOF MS* i *Electrospray Ionisation - EI MS*) i drugih metoda, nizom nezavisnih analiza, u uzorku ispituje prisustvo različitih poznatih (prethodno identifikovanih) alela gena od interesa (12,13,15,19). Najnovije dostignuće u sferi genotipizacije predstavlja tehnologija DNK mikronizova (DNK čipova) – *DNA microarray* (*DNA chip*) *technology*, koja omogućava analizu svih gena *CYP450* istovremeno, što predstavlja njenu najveću vrednost (2,11,20).

Osnovna razlika između rezultata dobijenih određivanjem fenotipa i genotipa je u tome što fenotip odražava stvarnu aktivnost metaboličkog enzima u trenutku određivanja, a ona je posledica interakcije genetičkih i svih ostalih faktora (oboljenja, prateće terapije, ishrane...), dok genotip otkriva samo genetički potencijal za aktivnost enzima. Istovremena primena drugih lekova, koji deluju kao induktori ili inhibitori ispitivanog enzima, odraziće se na fenotip. Poznato je da jaki inhibitori CYP2D6 (npr. hinidin i selektivni inhibitori preuzimanja serotonina) mogu da prevedu genetički determinisane *EM* u fenotipske *PM* (fenomen je poznat kao fenokopiranje – *phenocopying*). Za razliku od fenotipa, genotip je relativno nepromenljiva karakteristika pojedinca (5,19,21,22).

### **Nasledna osnova za fenotipsku ekspresiju**

Određivanjem genotipa za različite metaboličke enzime otkriven je čitav niz promena na nivou gena, počevši od delecije celog gena do promena na nivou pojedinačnih nukleotida – tzv. polimorfizmi

pojedinačnih nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphisms–SNPs*), koji predstavljaju najčešći uzrok genetičkih varijabilnosti (2,13).

*Oskudan metabolizam* leka je autozomno recesivna osobina. Uslov za fenotipsku ekspresiju je mutacija i/ili delecija oba genska alela određenog enzima za metabolizam. Zbog promene na nivou oba alela, metabolički kapacitet *PM* je veoma ograničen (uglavnom ih karakteriše potpuno odsustvo funkcionalnog enzima), ukoliko ne postoji alternativni metabolički put koji ne uključuje polimorfni enzim (12,16,22).

*Ultrabrz metabolizam* je autozomno dominantna osobina i posledica je duplikacije ili amplifikacije gena. *UM* imaju višestruke kopije aktivnog gena na jednom hromozomu (na drugom hromozomu je prisutan uobičajen, „divlji” - *wild type* alel). Najčešće su u pitanju dve kopije, ali su identifikovani nosioci i 13 kopija, pri čemu je enzimska aktivnost direktno srazmerna broju kopija gena (12,16,22).

Među *EM*, heterozigoti (jedan nepromenjen - „divlji” i jedan mutantan, nefunkcionalan alel) imaju nižu prosečnu enzimsku aktivnost u poređenju sa homozigotima za „divlji” alel (dva funkcionalna alela). Njihov metabolički kapacitet je između kapaciteta homozigotnih *EM* i *PM*, zbog čega se ova subpopulacija nekada označava kao „srednji” metabolizeri (*intermediate metabolizers-IM*) (12,16).

### **Polimorfizmi izoenzima**

Polimorfizam je prvi put ustanovljen za CYP2D6 (1975. godine u toku sprovođenja kliničkih studija sa debrizokvinom i sparteinom), kada je kod malog broja ispitanika došlo do pojave neuobičajeno jakog odgovora i izraženih neželjenih efekata, već pri primeni subterapijskih doza ispitivanog leka (22).

Danas je poznato da su svi izoenzimi CYP450 koji su uključeni u metabolizam lekova u izvesnom stepenu genetički polimorfni (nedavno je otkriven i polimorfizam CYP3A4) (23). Međutim, na osnovu broja identifikovanih alela, učestalosti njihovog pojavljivanja i efekta na funkciju enzima, može se zaključiti da su pojedini izoenzimi „dobro konzervirani” (stabilan, relativno nepromenljiv) u poređenju sa ostalima (13). Tako je za CYP2E1 poznato sedam alela, od kojih samo jedan



(*CYP2E1*\*2) dovodi do smanjene ekspresije katalitički aktivnog enzima, dok ostale varijante nemaju funkcionalni efekt (23,24).

Relativno visok stepen konzerviranosti je uočen i za *CYP3A4* gen. Iako je do danas identifikovano 19 alela ovog gena, izgleda da je broj onih varijanti koje imaju potencijal da menjaju funkciju enzima vrlo ograničen (6,24). Mutacije koje dovode do potpunog odsustva enzimske aktivnosti još uvek nisu otkrivene. Osim toga, učestalost pojavljivanja mutantnih alela je prilično niska (<5%) (1,18).

Gen *CYP2D6* pokazuje najveći stepen varijabilnosti. To je ujedno i najviše proučavan i najbolje okarakterisan polimorfizam među izoenzimima CYP450. Do sada je poznato 42 alela *CYP2D6* gena, koji se prema važećoj nomenklaturi označavaju sa *CYP2D6*\*1- *CYP2D6*\*42 (oznaku 1 uvek nosi "divlji" alel, u ovom slučaju *CYP2D6*\*1) (24). U okviru svake grupe alela postoje i podgrupe (aleli sa istom ključnom mutacijom, ali i neznatnim dodatnim promenama u strukturi, npr: *CYP2D6*\*4A i *CYP2D6*\*4B), tako da je ukupan broj genskih varijanti još veći. Međutim, u zavisnosti od etničke grupe, određivanjem genotipa za samo 5-6 najčešćih mutantnih alela, može se u 95-99% slučajeva predvideti fenotip ispitanika. Zbog toga se pri određivanju genotipa uobičajeno ispituje prisustvo samo onih mutantnih alela koji su u ispitivanoj populaciji dominantni (22,23).

Uz *CYP2D6*, najveći stepen genetički uslovljenih varijabilnosti uočava se u aktivnosti *CYP2C9* i *CYP2C19*. Većina mutantnih alela *CYP2C19* gena je udružena sa potpunim odsustvom katalitički aktivnog enzima (15,24). U slučaju *CYP2C9*, dva najčešća mutantna alela (*CYP2C9*\*2 i *CYP2C9*\*3), oba nastala zamenom samo jedne aminokiseline u strukturi "divljeg" alela (*CYP2C9*\*1), imaju za posledicu znatno smanjenje aktivnosti kodiranog enzima (aktivnost je redukovana na 12% u slučaju *CYP2C9*\*2, odnosno 5% kada je u pitanju *CYP2C9*\*3). Za razliku od *CYP2D6*, za ove izoenzime nisu identifikovani *UM* (11,25).

Učestalost pojavljivanja različitih alela, a shodno tome i fenotipova, za sve izoenzime varira među rasama i pripadnicima različitih etničkih grupa (Tabela III).

**Tabela III – Distribucija glavnih mutantnih alela izoenzima CYP450 (13,20,23,26)**

IZOENZIMI	Najčešći mutantni aleli	Posledice	Učestalost alela			
			Belci	Azijci	Američki crnci	Etiopljani
<b>CYP2A6</b>	<i>CYP2A6*2</i>	neaktivan enzim	1-3	0	/	/
	<i>CYP2A6*4</i>	odsustvo enzima	1	15	/	/
	<i>CYP2A6*5</i>	neaktivan enzim	0	1	/	/
<b>CYP2C9</b>	<i>CYP2C9*2</i>	smanjen afinitet za CYP reduktazu	8-13	0	1-3,6	/
	<i>CYP2C9*3</i>	izmenjena supstratna specifičnost	7-9	2-3	0,5-1,5	/
<b>CYP2D6</b>	<i>CYP2D6*2xN</i>	povećana enzimaska aktivnost	1-5	0-2	2	16
	<i>CYP2D6*4</i>	neaktivan enzim	12-21	1	7-8	1-2
	<i>CYP2D6*5</i>	odsustvo enzima	4-6	6	6-7	1-4
	<i>CYP2D6*10</i>	nestabilan enzim	1-2	50	5	8-9
	<i>CYP2D6*17</i>	smanjen afinitet za supstrate	0	1	26	9
<b>CYP2E1</b>	<i>CYP2E1*2</i>	manja količina (aktivnog) enzima	0	1	/	/
<b>CYP3A4</b>	<i>CYP3A4*2</i>	viši <i>K<sub>m</sub></i> za supstrate	3	0	/	/
	<i>CYP3A4*3</i>	nepoznate	0	<1	/	/

Ovako velike razlike zahtevaju mere opreza pri ekstrapolaciji rezultata kliničkih studija. Iz tog razloga se npr. Agencije za lekove u Japanu, u cilju optimizacije doziranja novih lekova, ne oslanjaju na rezultate farmakokinetičkih studija sprovedenih među belcima, već insistiraju na sopstvenim u koje se uključuju njihovi ispitanici (13).

#### **Klinički značaj genetičkog polimorfizma i moguće posledice**

Da bi se procenio značaj genetičkih polimorfizama, moraju se sagledati sledeći aspekti: a) udeo metaboličkog puta koji je pod kontrolom polimorfnog enzima u ukupnoj eliminaciji leka, b) terapijski indeks (TI) leka, odnosno aktivnog metabolita i c) učestalost pojave

određenog polimorfizma u ispitivanoj populaciji i efekt polimorfizma na funkciju enzima (polimorfizam sekvenci DNK unutar gena i sekvenci aminokiselina u enzimu ne znače nužno i funkcionalni, fenotipski polimorfizam – ne menja svaka mutacija gena strukturu kodiranog proteina, kao što ni svaka promena u strukturi proteina ne mora da se odražava na njegovu aktivnost). Ukoliko je funkcija enzima promenjena i ako je kombinacija pomenutih aspekata nepovoljna (učestalost pojave dovoljno visoka, TI leka/metabolita mali, a enzim uključen u glavni metabolički put), polimorfizam ima klinički značaj (15). Najznačajniji je polimorfizam na nivou CYP2D6 zavisnog metabolizma, s obzirom na ogroman broj mutantnih alela *CYP2D6* gena i činjenicu da je aktivnost ovog izoenzima presudna za metaboličku transformaciju lekova koji pripadaju vrlo važnim farmakoterapijskim grupama, a od kojih veći broj ima mali TI (Tabela I) (13).

Najčešće posledice genetičkog polimorfizma su veća učestalost pojave neželjenih efekata kod *PM* (visoke koncentracije leka u krvi često dostižu toksične vrednosti) i neefikasnost uobičajenih doza leka kod *UM* (5). Ukoliko se lek primeni u obliku prekursora, situacija je obrnuta – kod *PM* se formira samo mala količina aktivnog metabolita i terapijski efekt često izostaje (5,21). Za ilustraciju poslednjeg slučaja, u literaturi se uglavnom navodi primer kodeina: 10% primenjene doze leka se metabolizuje do morfina i smatra se da je upravo on odgovoran za analgetičku aktivnost kodeina. Kod *PM* je uočeno odsustvo analgetičkog efekta (22,23).

Može se zaključiti da će standardne doze leka samo kod *EM* proizvesti očekivan terapijski efekat. U slučaju *PM* i *UM*, doziranje je potrebno prilagoditi njihovim metaboličkim kapacitetima. Naročit oprez zahteva primena lekova malog TI, kao što su triciklični antidepresivi, neuroleptici i antiaritmici (supstrati CYP2D6) (13,27).

Uopšteno govoreći, *EM* imaju 2-5 puta veći metabolički kapacitet za metabolizam supstrata CYP2D6 u odnosu na *PM*. Zbog toga će *PM* postići iste ravnotežne koncentracije -  $C^{SS}$  (stanje ravnoteže = *steady state* –*SS*) pri primeni doza koje su 50-80% niže od standardnih (doze koje odgovaraju *EM*) (13). Ukoliko se doziranje npr. tricikličnih antidepresiva ne prilagodi, *PM* će biti izloženi toksičnim koncentracijama

i doći će do potenciranja neželjenih efekata ovih lekova: suva usta, hipotenzija, tremor, sedacija i izražena kardiotoksičnost, koja u pojedinim slučajevima može da ugrozi život bolesnika (12).

Primena standardnih doza neuroleptika kod *PM* je praćena izraženim ekstrapiramidalnim neželjenim efektima, dok antipsihotički efekat nije pojačan u odnosu na *EM* (13).

Polimorfizam CYP2C19 je takođe dobro okarakterisan, ali je njegov klinički značaj manji, s obzirom na činjenicu da većina supstrata ovog izoenzima ima relativno veliki TI (Tabela I) (11). Međutim, interesantna situacija je uočena pri primeni omeprazola u terapiji peptičkog ulkusa i infekcija izazvanih *Helicobacter pylori*. Omeprazol u kombinaciji sa amoksicilinom daje veći stepen izlečenja kod *PM* u odnosu na *EM* (100% *PM*, 60% *IM* i 28,6% *EM* je izlečeno pod istim uslovima terapije) (2). Zbog znatno produženog poluvremena eliminacije, da bi se postigli nivoi u plazmi koji odgovaraju *EM*, *PM* bi umesto preporučenih 20 mg omeprazola dnevno, trebalo da uzimaju samo 1 – 2 mg (23).

CYP2C9, slično CYP2D6, metabolizuje veći broj lekova malog TI (Tabela I). Da bi terapijska primena bila bezbedna, veoma je važno pravilno sagledati genetičku osnovu bolesnika za metabolizam pomenutih lekova, odnosno aktivnost CYP2C9. Tako npr. standardne doze oralnih antidijabetika kod *PM* dovode do vrlo jake i produžene hipoglikemije, zbog čega se doziranje mora prilagoditi (13,27).

CYP2C9 je i glavni metabolički enzim koji ograničava dužinu trajanja antikoagulantnog efekta varfarina, katalizom konverzije farmakodinamički aktivnijeg *S*-enantiomera do njegovih neaktivnih metabolita. Kod bolesnika koji su homozigoti za mutantni *CYP2C9\*3* alel (*CYP2C9\*3/\*3*), klirens *S*-varfarina je smanjen 90% u poređenju sa homozigotima za "divlji" alel (*CYP2C9\*1/\*1*). Ovi bolesnici su izloženi najvećem riziku od pojave fatalne hemoragije pri primeni standardnih doza. Istraživanja su pokazala da postoji značajna zavisnost potrebne doze održavanja varfarina i genotipa bolesnika za CYP2C9 (23,25). Rezultati jednog takvog istraživanja sprovedenog u populaciji od 185 belaca prikazani su u Tabeli IV.

**Tabela IV-** Efekt CYP2C9 genotipa na dozu održavanja varfarina (26)

	Genotip					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
prosečna vrednost doze održavanja (mg/dan)	5,6	4,9	3,3	4,07	2,3	1,6
% smanjenja u odnosu na *1/*1		13	41	27	59	71

Zbog učešća pojedinih izoenzima u metaboličkoj aktivaciji prokarcinogena, polimorfizam se dovodi i u vezu sa razvojem pojedinih vrsta maligniteta i nekih drugih oboljenja, kao što je Parkinsonova bolest, iako za to još uvek ne postoje pouzdani dokazi (6,16,22). Takođe, zbog presudne uloge CYP2A6 u metabolizmu nikotina, sve se češće govori o mogućem uticaju njegovog polimorfizma na razvoj nikotinske zavisnosti kod pušača (6,23).

Veruje se da su najznačajniji polimorfizmi koji prouzrokuju genetički uslovljene razlike u metaboličkim reakcijama I faze poznati i da se neefikasnost primenjene terapije i neželjene reakcije izazvane polimorfnim genima, u velikoj meri mogu predvideti (23). Određivanje fenotipa/genotipa bolesnika pre započinjanja terapije lekom malog TI, omogućuje da se od samog početka doziranje prilagodi individualnim potrebama bolesnika (21). Ispitivanje genetičkog polimorfizma nije značajno samo za individualizaciju terapije, već i za planiranje kliničkih studija u procesu razvoja savremenih lekova. Ukoliko sa u njih ne uključuje ispitanici sa različitim kapacitetom enzima za metabolizam leka, može se prevideti važan izvor interindividualnih razlika u farmakokinetici i odgovoru na lek, sa potencijalno fatalnim posledicama nakon njegovog uvođenja u terapiju (8).

## GENETIC POLYMORPHISM OF CYTOCHROME P450 ISOENZYMES

ANITA RAKIĆ, BRANISLAVA MILJKOVIĆ, MILENA POKRAJAC

*Institute of Pharmacokinetics, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade*

### **Abstract**

The aim of this review is to explain genetic basis of interindividual variability in cytochrome P450 (CYP450) dependent drug metabolism and highlight the clinical significance of different polymorphisms. Nearly all CYP450 isoenzymes involved in drug metabolism have been shown to be polymorphic, although some of them are functionally well conserved (CYP2E1 and CYP3A4) in comparison with others (CYP2D6, CYP2C19 and CYP2C9). Genetic variability in drug metabolizing enzymes can be assessed at the level of *phenotype* (by investigating enzyme level/activity) and/or *genotype* (by determining which alleles are present). Polymorphism divides a population into at least two phenotypes: individuals with deficient metabolism are termed „*poor metabolizers*” (*PM*), as compared to normal or „*extensive metabolizers*” (*EM*). In case of CYP2D6, „*ultrarapide metabolizers*” (*UM*) with extremely high enzyme activity, have also been identified. The clinical significance of particular polymorphism depends on the importance of metabolic pathway under polymorphic control, therapeutic index (*TI*) of a drug and its active metabolites, and incidence of the polymorphism in a particular population. Therapeutic consequences vary from increased risk of adverse reactions in *PM*, to therapeutic failure at standard drug doses in *UM* (if drug metabolites are inactive). Drug dosage, especially for narrow *TI* drugs, should be adjusted to the metabolic capacity of a patient, by phenotyping/genotyping prior to drug therapy.

**Key words:** CYP450 isoenzymes, drug metabolism,  
genetic polymorphism, clinical significance

## Literatura

1. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science* 1999; 286: 487-91.
2. Rusnak JM, Kisabeth RM, Herbert DP, McNeil DM. Pharmacogenomics: a clinician's primer on emerging technologies for improved patient care. *Mayo Clin Proc* 2001; 76: 299-309.
3. Kalow W, Grant DM. Genetic variation of drug metabolizing enzymes. In: Pacifici GM and Fracchia GN. ed. *Advances in Drug Metabolism in Man*. Brussels: European Commission, 1995: 59-84.
4. Ritchel WA, Kearns GL. *Handbook of Basic Pharmacokinetics...including Clinical Applications*. 5th ed. Washington: American Pharmaceutical Association, 1999: 136-44.
5. Pokrajac M. *Farmakokinetika*. 2. izd. Beograd: Grafolik, 2002: 89-96.
6. Ingelman-Sundberg M. Polymorphism of cytochrome P450 and xenobiotic toxicity. *Toxicology* 2002; 181-182: 447-52.
7. Hukkanen J. Xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 enzymes in human lung. *Acta Univ Oul D* 621, 2000:17.
8. Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications*. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995: 220-9.
9. Meyer UA, Zanger UM, Grant D, Blum M. Genetic polymorphism of drug metabolism. In: Testa B. ed. *Advances in Drug Research*. London: Academic Press, 1990; Vol. 19: 197-241.
10. Griffiths AJF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC. *Modern Genetic Analysis*. New York: W.H. Freeman and Company, 1999: 14-17.
11. McKinnon RA, Evans AM. Cytochrome P450. *Aust J Hosp Pharm* 2000; 30: 102-5.
12. Linder MW, Prough RA, Valdes R. Pharmacogenetics: a laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem* 1997; 43 (2): 254-66.
13. Hasler JA, Estabrook R, Murray M, Pikuleva I, Waterman M, Capdevila J et al. Human cytochrome P450. *Mol Asp Med* 1999; 20: 1-137.
14. Marinković D. *Genetika*. Beograd: Naučna knjiga, 1974: 17.
15. Rodrigues DA, Rushmore TH. Cytochrome P450 pharmacogenetics in drug development: *in vitro* studies and clinical consequences. *Curr Drug Metab* 2002; 3 (3): 289-309.
16. Kivistö KT, Kroemer HK. Use of probe drugs as predictors of drug metabolism in humans. *J Clin Pharmacol* 1997; 37: 40S-48S.
17. Wagner DA. How to calculate ERMBT results. *Clin Pharm Ther* 1998; 63: 129-30.
18. Jatinder KL, Yvone SL, Schuetz EG, Thummel KE. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1271-1294.

19. Mc Elroy S, Richmond J, Lira M, Friedman D, Silber BM, Milos PM. CYP2D6 genotyping as an alternative to phenotyping for determination of metabolic status in a clinical trial settings. *AAPS Pharmsci* 2000; 2 (4): article 33.
20. Tribut O, Lessard Y, Reynann JM, Allain H, Bentue-Ferrer D. Pharmacogenomics. *Med Sci Monit* 2002; 8 (7): 152-63.
21. Van der Weide J, Steijns LSW. Cytochrome P450 enzyme system: genetic polymorphism and impact on clinical pharmacology. *Ann Clin Biochem* 1999; 36: 722-29.
22. Abraham BK, Adithan C. Genetic polymorphism of *CYP2D6*. *Ind J Pharm* 2001; 33: 147-169.
23. Ingelman-Sundberg M. Implications of polymorphic cytochrome P450-dependent drug metabolism for drug development. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 570-573.
24. Home Page of the Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee. <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>.
25. Taube J, Hallsal D, Baglin T. Influence of cytochrome P-450 polymorphisms on warfarin sensitivity and risk of over-anticoagulation in patients on long-term treatment. *Blood* 2000; 96 (5): 1816-19.
26. Wittkowsky AK. Pharmacogenomics of warfarin. *Anticoagul For* 2002; 6 (3): 1-4
27. Rogers JF, Nafziger AN, Bertino JS. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. *Am J Med* 2002; 113: 746-50.