

Polimorfizm genetyczny wybranych alleli cytochromu CYP2D6 u pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową i zapaleniem mięśnia sercowego*

Genetical polymorphism of chosen CYP2D6 alleles among
the patients with dilated cardiomyopathy and myocarditis

Sławomir Smolik, Dorota Domal-Kwiatkowska, Ludmiła Węglarz

STRESZCZENIE

Cytochrom CYP2D6 ma różne warianty sekwencji kodującego go genu, wpływające na jego aktywność enzymatyczną. Międzyosobnicze różnice w aktywności izoenzymu CYP2D6 mogą prowadzić do działań niepożądanych lub braku skuteczności terapeutycznej standardowych dawek leku. Celem pracy było genotypowanie wybranych alleli CYP2D6 w grupie pacjentów z potwierdzonym klinicznie stanem zapalnym mięśnia sercowego lub kardiomiopatią rozstrzeniową. W pracy zastosowano reakcję PCR z użyciem czterech starterów w celu detekcji alleli 3*,4* i 6* CYP2D6 w grupie 53 pacjentów. Do wykrycia allelu CYP2D6*5 zastosowano długołańcuchową reakcję PCR typu multipleks. Przeprowadzona analiza wykazała w badanej grupie pacjentów obecność jednej heterozygoty dla allelu CYP2D6*3, dwóch heterozygot dla allelu CYP2D6*6, dziesięciu heterozygot i dwóch homozygot dla allelu CYP2D6*4. Znaleziono także jedną osobę z delecją locus CYP2D6. Przedstawione metody ułatwiają i przyspieszają dokładną analizę farmakogenetyczną izoformy CYP2D6.

ADRES

DO KORESPONDENCJI:

Dr. n. farm. Sławomir Smolik
Katedra i Zakład Biochemii
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem
Medycyny Laboratoryjnej
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego
w Katowicach
ul. Narcyzów 1
41-200 Sosnowiec
tel. 32 364 10 03
e-mail: epimer@wp.pl

SŁOWA KLUCZOWE

cytochrom P-450, polimorfizm CYP2D6, genotypowanie, wolny metabolizer

ABSTRACT

Cytochrome P450 2D6 has been reported to possess variation in the encoding gene that affects enzymatic activity. Interindividual differences in

CYP2D6 activity can produce adverse effects or lack of therapeutic effect under standard therapy. The aim of the study was to genotype the chosen alleles of CYP2D6 among the patients with clinically confirmed myocarditis or dilated cardiomyopathy. Tetra-primer PCR assays was used to detect mutations in CYP2D6 *3, *4 and *6 alleles among 53 patients. A multiplex long PCR was used to genotype CYP2D6*5 allele. Analysis showed the presence of one heterozygote for CYP2D6*3, two heterozygote for CYP2D6*6, ten heterozygote and two homozygote for CYP2D6*4 among the examined patients. One person with deletion of CYP2D6 locus was also detected. Presented methods will facilitate and accelerate the detailed pharmacogenomic analysis of CYP2D6.

KEY WORDS

cytochrome P-450, CYP2D6 polymorphism, genotyping, poor metabolizer

WSTĘP

Cytochrom P-450 to najważniejszy składnik układu monooksygenazy, odpowiedzialnego za biotransformację związków endogennych i ksenobiotyków, w tym 70% najczęściej stosowanych leków [1]. Analiza ludzkiego genomu wykazała obecność 115 genów cytochromu P-450, w tym 57 genów funkcjonalnych, 58 pseudogenów, posiadających sekwencję podobną do genów kodujących, które są jednak zmodyfikowane i nie ulegają transkrypcji ani translacji [2,3]. Aż 90% aktywności metabolicznej cytochromu P-450 przypada na enzymy: CYP1A2 (4%), CYP3A4 (50%), CYP2C9 (10%), CYP2C19 (2%), CYP2D6 (30%) oraz CYP2E1 (2%), przy czym izoenzymy z rodzin 1–3 katalizują 70–80% reakcji I fazy biotransformacji leków stosowanych w praktyce klinicznej [4].

Enzym CYP2D6 wykazujący aktywność hydroksylazy debryzochiny to najlepiej poznana izoforma cytochromu P-450, wykazująca polimorfizm genetyczny. Zróżnicowanie genetyczne CYP2D6 ma istotne znaczenie farmakologiczne, ponieważ jest on odpowiedzialny za metabolizm około 25% wszystkich stosowanych leków [5]. Gen kodujący enzym CYP2D6 znajduje się na chromosomie 22q13.1 i składa się z 9 eksonów z otwartą ramką odczytu 1491 par zasad, które kodują 497 aminokwasów. Jest to gen 450 db1 z rodziny genów CYP2D obecny w wątrobie, mózgu i ścianie jelita [6]. W *locus* tym na chromosomie 22 zidentyfikowano ponad 80 alleli, determinujących typ aktywności metabolicznej CYP2D6. Opisano 196 polimorfizmów pojedynczego nukleotydu dla CYP2D6 [2]. Szczególne znaczenie w rutynowej praktyce klinicznej ma diagnostyka

osób o zmienionej szybkości metabolizmu leków. Allele 3*, 4*, 5*, 6* cytochromu CYP2D6 związane są upośledzeniem eliminacji leków na drodze CYP2D6-zależnych szlaków metabolicznych (*poor metabolizer* – PM), co prowadzi do zwiększenia ryzyka działań niepożądanych wywoływanych przez te leki lub może spowodować brak działania terapeutycznego w wyniku wolniejszego przekształcania postaci wyjściowej leku do aktywnego metabolitu. Allele 3* i 6* powstały na skutek delekcji pojedynczego nukleotydu, allel 4* na skutek tranzycji nukleotydowej, allel 5* związany jest z delecją całego genu (tab. I). Wybrane allele odpowiadają za blisko 95–97% przyczyn wolnego metabolizmu leków związanego z cytochromem CYP2D6 w populacji kaukaskiej [7].

Celem pracy było znalezienie nosicieli wybranych alleli izoenzymu CYP2D6 cytochromu P450 odpowiedzialnych za wolny metabolizm leków w grupie 52 pacjentów ze stanem zapalnym mięśnia sercowego i kardiomiopatią rozstrzeniową.

Tabela I. Warianty alleli CYP2D6 odpowiedzialne za wolny metabolizm leków

Table I. The variant CYP2D6 alleles responsible for the slow drug metabolism

Allel CYP2D6	Zmiana w genie
CYP2D6*3	2549A > del
CYP2D6*4	1846G >A
CYP2D6*5	delecja genu
CYP2D6*6	1707T > del

MATERIAŁ I METODY

Wstępnym etapem pracy było ekstrakcja DNA genomowego przy użyciu zestawu do izolacji DNAzol™ Reagent, zawierającego pochodną guanidyny, pozwalającego na selektywne wyodrębnienie kwasu nukleinowego z lizatu komórkowego. Do ekstrakcji wykorzystano 53 próbki pełnej krwi pochodzącej od pacjentów z kardiomiopatią rozstrzeniową i zapaleniem mięśnia sercowego. Próbki – dostarczone przez II Katedrę i Oddział Kliniczny Kardiologii w Zabrze – były przechowywane w Katedrze i Zakładzie Biochemii Wydziału Farmaceutycznego w Sosnowcu. Otrzymane ekstrakty DNA genomowego oceniono ilościowo za pomocą kalkulatora DNA i jakościowo poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym. Uzyskany ekstrakt stanowił matrycę w długołańcuchowej reakcji PCR typu multipleks, pozwalającej na amplifikację alleli 3*, 4* i 6* izoenzymu CYP2D6 z użyciem 4 starterów. W początkowym etapie reakcji dochodzi do syntezy preamplikonu obejmującego region genu CYP2D6 poprzez zastosowanie wyższej temperatury hybrydyzacji pierwszej pary starterów w stosunku do starterów stosowanych w etapie drugim, pozwalającym na selektywną amplifikację wybranych alleli CYP2D6.

Po wstępnej denaturacji w temperaturze 94°C przez 600 s, syntezę preamplikonu przeprowa-

dzono w 20 cyklach reakcji, stosując warunki 94°C 30 s, 63°C 30 s, 72°C 60 s, następnie amplifikację allelu 3*, 4* i 6* wykonano w 27 cyklach reakcji przy zastosowaniu warunków 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 60 s. Allel 5 CYP2D6 amplifikowano stosując warunki 94°C 60 s i 35 cykli o parametrach 94°C 60 s, 65°C 30 s, 72°C 300 s, końcowe wydłużanie 68°C 420 s. Sekwencję starterów zastosowanych do amplifikacji poszczególnych alleli CYP2D6 przedstawia tabela II [8].

Reakcje PCR wykonano stosując 5 pmoli każdego ze starterów, 5 pmoli mieszaniny dNTP, 2 µl matrycy DNA genomowego, 1 U polimerazy Tfl, 1,5 mmol/l MgCl₂. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 25 µl. Otrzymane produkty reakcji PCR rozdzielono na drodze elektroforezy agarozowej 2% żelu (allel 5) oraz poliakrylamidowej w 6% żelu (allel 3, 4 i 6) i określono długość uzyskanych amplikonów opierając się na porównaniu z wzorcem wielkości DNA (plazmid pUC19/Msp) za pomocą systemu dokumentacji żelowej, po uprzednim wybarwieniu solami srebra (allel 3*, 4* i 6*) lub detekcji za pomocą bromku etydydny (allel 5*).

WYNIKI

W analizie molekularnej dokonano detekcji najczęściej występujących alleli CYP2D6 od-

Tabela II. Sekwencja starterów użytych w reakcji PCR

Table II. Sequence of primers used in PCR reaction

Nazwa startera	Nazwa amplifikowanego allelu CYP2D6	Sekwencja startera	Położenie w genie CYP2D6 (od 5' do 3')
3	CYP2D6*3	5' GCGGAGCGAGAGACCGAGGA 3'	2098–2117
6	CYP2D6*3	5' GCTAACTGAGCACG 3'	2624–2637
4 new	CYP2D6*3	5' GGTCGGGCCCTGACACTCCTCT 3'	3181–3203
Awt	CYP2D6*3	5' TCCCAGTTCATCCT 3'	2637–2650
1 new	CYP2D6*4 i CYP2D6*6	5' TCCCAGCTGGAATCCGGTGTGC 3'	1388–1409
2 new	CYP2D6*4 i CYP2D6*6	5' GGAGCTCGCCCTGCAGAGACTCCT 3'	2114–2137
Bmut	CYP2D6*4	5' TCTCCACCCCAAA 3'	1921–1934
7	CYP2D6*4	5' CGAAAGGGGCGTCC 3'	1934–1947
Dup	CYP2D6*5	5' CACACCGGGCACCTGTACTCCTCA 3'	43–66
Dlow	CYP2D6*5	5' CAGGCATGAGCTAAGGCACCCAGAC 3'	7822–7846
DPKup	CYP2D6*5	5' GTTATCCAGAAAGGCTTTCAGGCTTC 3'	-259 do -232
DPKlow	CYP2D6*5	5' GCCGACTGAGCCCTGGGAGGTAGTA 3'	4819–4844
Tmut	CYP2D6*6	5' GTCGCTGGAGCAGG 3'	1782–1795
11	CYP2D6*6	5' TCCTCGGTACCCA 3'	1797–1808

powiedzialnych za zmniejszenie aktywności izoformy CYP2D6 cytochromu P-450. Średnie stężenie wyekstrahowanego DNA genomowego wynosiło $0,7 \pm 0,12 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. W celu szybkiej detekcji alleli CYP2D6*3, CYP2D6*4 i CYP2D6*6 odpowiedzialnych za fenotyp wolno metabolizujący zastosowano metodę tetra-primer PCR, polegającą na użyciu zestawu czterech komplementarnych starterów w dwuetapowej reakcji amplifikacji. Produkt pierwszego etapu reakcji stanowi matrycę dla drugiej pary starterów, umożliwiając powielenie sekwencji nukleotydowej danego allelu CYP2D6. W celu wykrycia allelu CYP2D6*5 przeprowadzono reakcję multiplex long PCR umożliwiającą wykrycie delecji całego CYP2D6 (CYP2D6*5) oraz detekcję regionu genu CYP2D6 [9,10].

W reakcji amplifikacji allelu 3 CYP2D6 podczas pierwszych 20 cykli reakcji PCR z udziałem starterów 3 i 4 new komplementarnych do sekwencji intronowej CYP2D6, powstaje preamplikon o długości 1106 pz, stanowiący wewnętrzną kontrolę specyficzności zastosowanej reakcji, który służy równocześnie jako matryca w drugim etapie reakcji PCR z udziałem starterów 6 i Awt. W przypadku obecności allelu 3 izoenzymu CYP2D6 w reakcji PCR powstaje produkt o długości 580 pz, osoby o dzikim genotypie dają produkt o długości 553 pz. Przeprowadzona analiza serii reakcji PCR ze zmienną temperaturą hybrydyzacji starterów (50–68°C) wykazała, że najbardziej optymalną temperaturą hybrydyzacji starterów z matrycą w pierwszym i drugim etapie reakcji PCR są odpowiednio wartości 63°C i 53°C. Wykonana analiza ujawniła w grupie badanych chorych obecność jednej heterozygoty względem allelu 3, dającej w rozdziale elektroforetycznym dwa produkty PCR o długości 580 i 553 pz. Wszyscy pozostali badani wykazali w rozdziale elektroforetycznym produkt o długości 533 pz. Nie stwierdzono obecności homozygot względem allelu 3 CYP2D6. W celu amplifikacji allelu 4 izoenzymu CYP2D6 zastosowano długołańcuchową reakcję PCR z użyciem czterech starterów (1 new, 2 new, 7 i Bmut). W czasie pierwszych 20 cykli reakcji otrzymano preamplikon o długości 750 pz. Temperatura hybrydyzacji starterów równa 63°C prowadziła do otrzymania największej ilości produktu pozbawionego efektów niespecyficznej hybrydyzacji. W drugim etapie reakcji, liczącym z udziałem starterów 7 i But, optymalna temperatura hybrydyzacji starte-

ra z matrycą była równa 53°C. W przypadku obecności u badanych osób allelu 4 otrzymano produkt PCR o długości 217 pz, typ dzięki prowadził do otrzymania produktu liczącego 560 pz. W grupie badanych osób zidentyfikowano 10 heterozygot względem allelu 4 (dających dwa produkty PCR o długości 217 pz i 560 pz) oraz 3 osoby homozygotyczne dające po reakcji PCR wyłącznie produkt o długości 217 pz. Pozostali badani przenosili allel dziki i prowadzili do uzyskania w rozdziale elektroforetycznym pojedynczego produktu o długości 560 pz.

Allel 6 izoenzymu CYP2D6 zidentyfikowano w reakcji PCR z zastosowaniem starterów 1 new, 2 new, Tmut i 11. W pierwszym etapie reakcji starterów 1 new i 2 new przy zastosowaniu temperatury hybrydyzacji równej 63°C otrzymano preamplikon o długości 750 pz, stanowiący matrycę w drugim etapie reakcji PCR biegnącym z udziałem starterów Tmut i 11. W etapie tym po przeprowadzeniu serii reakcji PCR jako optymalną wybrano temperaturę hybrydyzacji równą 55°C. W przypadku obecności allelu 6 CYP2D6 otrzymano produkt o długości 421 pz, typ dziki dawał produkt o długości 356 pz. Wśród badanych chorych wykryto dwóch nosicieli układu heterozygotycznego względem allelu 6, prowadzących do otrzymania dwóch produktów reakcji PCR o długościach 356 pz i 421 pz. Nie stwierdzono obecności homozygot względem allelu 6, wszyscy pozostali badani byli nosicielami allelu dzikiego i dawali w rozdziale elektroforetycznym jeden produkt o długości 356 pz.

W celu detekcji allelu 5 izoenzymu CYP2D6 zastosowano długołańcuchową reakcję PCR z mieszaniną reakcyjną o zwiększonej objętości 50 μl , zawierającą cztery startery (Dup, Dlow, DPklow, DPkup). Seria reakcji PCR o zmiennej temperaturze hybrydyzacji (55–68°C) wykazała, że optymalną jakość i specyficzność produktu uzyskano przy zastosowaniu 35 cykli reakcji PCR o temperaturze 65°C. Detekcji produktu dokonano przez rozdział produktów amplifikacji w 2% żelu agarozowym i detekcję z użyciem bromku etydyny. Osoby nie posiadające allelu 5 dały po reakcji PCR produkt o długości 5,1 kpz, nosiciele allelu 5, mający delecję genu CYP2D6, dawali w rozdziale elektroforetycznym produkt o długości 3,2 kpz. Stwierdzono obecność 2 nosicieli allelu 5 CYP2D6, pozostali badani wykazali w rozdziale elektroforetycznym produkt o długości 5,1 pz.

DYSKUSJA

Badania polimorfizmu genetycznego cytochromu P-450, stanowiącego najważniejszy układ enzymatyczny metabolizujący związki endogenne i egzogenne, w tym leki, są niezwykle ważne dla poznania międzyosobniczych różnic w farmakodynamice i farmakokinytyce substancji leczniczych, przyczyn wielu chorób oraz skomplikowanych mechanizmów molekularnych zachodzących w organizmie człowieka. Uzyskana częstość badanych alleli CYP2D6 jest zgodna z dotychczas opublikowanymi danymi [11,12,13]. Najczęstszym wariantem alleli CYP2D6 jest CYP2D6*4, pojawiający się w populacji kaukaskiej z częstością 19,4% (na podstawie przebadania 3568 chromosomów). Drugim pod względem częstości wariantem allelu jest CYP2D6*5 [14,15]. Wariant allelu CYP2D6*3 występuje u 1,2% populacji kaukaskiej (przebadano 3568 chromosomów), natomiast CYP2D6*6 u 0,8% tej populacji (przebadano 2260 chromosomów) [16].

Znaczenie polimorfizmu genetycznego cytochromu P-450 CYP2D6 w grupie pacjentów ze stanem zapalnym mięśnia sercowego jest znaczące klinicznie z uwagi na nasilone działania niepożądane wielu grup leków. W przypadku leków β -adrenolitycznych może dojść do nadmiernego zwolnienia czynności serca i obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, zaburzeń przewodnictwa w układzie bodźcotwórczo-przewodzącym serca, depresji, zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego, a także zaburzeń gospodarki lipidowej i węglowodanowej, a w przypadku leków nieselektywnie blokujących receptory β_1 - i β_2 -adrenergiczne może dojść także do nasilenia stanów skurczowych oskrzeli [17]. U osób o wolnym typie metabolizmu przyjmujących kaptopril, może dojść do nasilenia działań niepożądanych w postaci nadmiernego obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, zawrotów głowy, omdleń, zaburzeń widzenia, a także duszności i kaszlu, który może spowodować konieczność zmiany leku na antagonistę receptora angiotensynowego AT₁. U osób o wolnym typie metabolizmu przyjmujących flunaryzynę częściej dochodzi do osłabienia siły mięśniowej, uczucia senności po zażyciu leku, zaburzeń żołądkowo-jelitowych. U dzieci i osób starszych możliwe są objawy przypominające przedawkowanie, tj. paradoksalne pobudzenie, ataksja, drżenie i psychozy. Chorzy przyjmujący cinaryzynę mogą mieć

upośledzoną sprawność psychofizyczną, odczuwać wzmożone pragnienie, mogą też wystąpić u nich nasilone zaburzenia pozapiramidowe [18]. Amiodaron będący lekiem antyarytmicznym, jest szczególnie niebezpieczny w przypadku osób o wolnym typie metabolizmu, gdyż może dojść u nich do toksycznego uszkodzenia tkanki płucnej, zaburzeń rytmu serca, drżenia kończyn, nudności i wymiotów oraz zaburzeń koordynacji ruchowej. W przypadku enkainidu, który metabolizowany jest do O-desmetylenkainidu o 10-krotnie większej aktywności, fenotyp metabolizmu PM może powodować brak oczekiwanej skuteczności leku, co będzie skutkowało koniecznością zastosowania alternatywnej terapii. Leczenie propafenonem może u chorych o wolnym typie metabolizmu nasilić zawroty głowy, zaburzenia rytmu serca, niewydolność krążenia, spowodować nadmierny spadek ciśnienia tętniczego, nudności, wymioty i uczucie nadmiernego zmęczenia. Przyjmowanie lidokainy przez osoby z wolnym typem metabolizmu może spowodować nasilenie objawów niepożądanych w postaci zawrotów głowy, splątania, nerwowości, drżenia mięśni, zaburzeń oddychania, bezdechu, niedociśnienia tętniczego, a nawet zapaści krążeniowej i utraty przytomności [19].

Opracowano wiele nowoczesnych metod pozwalających określić typ metabolizmu poprzez genotypowanie. Wśród metod oznaczania genotypu CYP2D6, można wyróżnić metodę tetra-primer PCR oraz multiplex long PCR, AmpliChip, RFLP PCR, real time PCR, sekwencjonowanie, pirosekwencjonowanie oraz technikę wydłużania startera (PEXT) z hybrydyzacją paskową. Metoda RFLP-PCR, czyli analiza długości fragmentów restrykcyjnych, polega na trawieniu produktów PCR specyficznym enzymem restrykcyjnym, przecinającym fragment DNA tylko tam, gdzie występują mutacje. Uzyskane w wyniku cięcia fragmenty restrykcyjne rozdziela się na drodze elektroforezy [20,21,22].

Real time PCR jest techniką pozwalającą wykryć duplikację i multiplikację genów. W metodzie tej przeprowadza się monitoring zmian stężenia produktu PCR poprzez pomiar fluorescencji proporcjonalnej do jego ilości w rzeczywistym czasie trwania reakcji. Metoda sekwencjonowania polega na określeniu sekwencji nukleotydowej oczyszczonego fragmentu DNA, którego jedna nić jest znakowana na końcu 5' lub 3'. Powstałe produkty rozdzielane są w procesie elektroforezy.

Pirosekwencjonowanie to sekwencjonowanie w czasie rzeczywistym, wykorzystujące jednocześnie działanie polimerazy DNA, sulfurylasy, lucyferazy i apirazy. Główną zasadą jest wykorzystanie pirofosforanu uwalnianego podczas syntezy DNA. W wyniku kaskady reakcji enzymatycznych dochodzi do emisji światła, którego intensywność zależy od ilości uwolnionego pirofosforanu, a tym samym liczby wbudowanych nukleotydów. Reakcja zachodzi w temperaturze 28°C, co wiąże się z dużym ryzykiem powstawania dimerów i zapętleń. Matryca do pirosekwencjonowania jest produktem wcześniej wykonanej reakcji PCR i nie powinna przekraczać 300 pz. Pirosekwencjonowanie jest skuteczną metodą genotypowania polimorfizmów dla dużych grup, dzięki wysokiej dokładności i wydajności. Opracowano nowoczesną metodę genotypowania o nazwie AmpliChip CYP450, która jest pierwszą uznaną metodą mikromatrycową, dzięki której można wykryć równocześnie 29 polimorfizmów genetycznych CYP2D6 oraz 2 polimorfizmy CYP2C19. Metoda ta jest połączeniem techniki PCR opracowanej przez firmę Roche oraz mikromatrycowego układu GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Test AmpliChip jest pierwszym mikromatrycowym testem DNA zatwierdzonym przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (FDA), a jego akceptacja otwiera drogę do opracowywania podobnych testów w przyszłości, co może ulepszyć indywidualizację terapii [23]. Kolejną metodą jest reakcja wydłużania starterów (PEXT). W technice tej produkty reakcji PCR poddaje się bezpośredniej reakcji wydłużania starterów (PEXT), bez wcześniejszego oczyszczania produktów. Stosuje się tu 2 pary starterów, z czego jedna jest komplementarna do niezmienionego genu, a druga do zmutowanego. W przypadku obu par starterów przeprowadzane są 3 cykle elongacyjne, przebiegające w obecności biotynylowanego deoksyurydylotrifosforanu. Następnie wykonuje się test paskowy, w którym produkty elongacji oznaczają się wizualnie przez hybrydyzację. Zaletą tej techniki jest szybkość jej przeprowadzenia, a także niskie koszty [24,25].

Wydaje się, że określenie typu metabolizmu przy udziale danej izoformy enzymatycznej cytochromu P-450 może mieć znaczenie przy określaniu możliwych interakcji w fazie farmakokinetycznej i farmakodynamicznej między stosowanymi jednocześnie kilkoma lekami, jeżeli są one metabolizowane przez różne

izoformy tego układu enzymatycznego. Genotypowanie umożliwia szybkie podjęcie decyzji dotyczącej dawki leku, a także zapobiega sytuacji, w wyniku której mogłoby dojść do odstawienia prawidłowo wybranego leku, w przypadku pobieżnie ocenionego braku skuteczności jego działania, gdyby został zastosowany u osoby o metabolizmie UM. Określenie rodzaju metabolizmu w wielu przypadkach umożliwia zastąpienie monitorowania stężenia leków w klinice i ułatwia prawidłowe wdrożenie terapii nowym lekiem poprzez dostarczenie wskazówek dotyczących bezpiecznej pierwszej dawki.

Obecnie w wielu klinikach stosuje się już genotypowanie w kierunku aktywności CYP2D6 w przypadku leczenia pacjentów lekami przeciwpsychotycznymi i przeciwdepresyjnymi [26]. Badania genetyczne są łatwiejsze i szybsze w wykonaniu niż badania fenotypowe, szczególnie gdy badamy enzymy, których aktywność nie występuje we krwi, a taką właściwość ma CYP2D6. Mimo popularności metod genotypowania opartych na reakcji klasycznej reakcji PCR należy mieć jednak na uwadze trudności w genotypowaniu, spowodowane występowaniem rzadkich polimorfizmów występujących w genie *CYP2D6* oraz zmienności jego sekwencji.

W jednym z alleli *CYP2D6* wykryto jednokleotydową zmianę w sekwencji DNA w 5 intronie genu, nazwaną G2717. Zmiana ta była przyczyną nietypowego obrazu elektroforetycznego podczas detekcji polimorfizmu A2549del charakterystycznego dla allelu *3. Polimorfizm G2717A nie ma jednak znaczenia czynnościowego. Przypadek zakłócenia wyniku genotypowania spowodowany przez polimorfizm G2717A na intronie 5, wydaje się argumentem przeciwko tradycyjnym technikom biologii molekularnej wykorzystywanym w genotypowaniu, takim jak reakcja PCR i technika RFLP. Nadzieje wiąże się z nowszymi metodami diagnostyki, takimi jak PCR w czasie rzeczywistym oraz pirosekwencjonowanie [27].

WNIO SKI

1. Zastosowane warunki termiczne oraz użyte sekwencje starterów umożliwiają prawidłową amplifikację alleli *3, *4, *5 i *6 locus *CYP2D6* w reakcjach multipleks long PCR

- i Tetra-primer PCR z synteżą preamplikonu i nie prowadzą do powstania produktów niespecyficznych.
- Przeprowadzono analiza wykazała obecność jednej heterozygoty dla allelu CYP2D6*3, dwóch heterozygot dla allelu CYP2D6*6, dziesięciu heterozygot i dwóch homozygot dla allelu CYP2D6*4.
 - Znaleziono także jedną osobę z delecją locus CYP2D6.

PIŚMIENNICTWO

- Wojtczak A., Skrętkowicz J. Kliniczne znaczenie polimorfizmu wybranych genów cytochromu P-450: rodziny CYP1, podrodziny CYP2A, CYP2B oraz CYP2C. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2009; 26: 248–252.
- Wijnen P., Buijsch R., Drent M. The prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007; 26: 211–219.
- Zhou S.F. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance. *Clin. Pharmacokinet* 2009; 48: 689–723.
- Zanger U., Raimundo S., Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2004; 369: 23–37.
- Kurzawski M., Górnik W., Drożdżik M. Rzadkie polimorfizmy w genie CYP2D6 mogą zakłócać interpretację wyników badań farmakogenetycznych. *Probl. Ter. Monitorowanej* 2005; 16: 99–103.
- Wojtczak A., Skrętkowicz J. Kliniczne znaczenie polimorfizmu wybranych genów cytochromu P-450 podrodzin CYP2D, CYP2E i CYP3A – część II. *Pol. Merkuriusz Lek.* 2009; 27: 166–169.
- Shen H., He M., Liu H. i wsp. Comparative Metabolic Capabilities and Inhibitory Profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug. Metab. Dispos.* 2007; 35: 1292–1300.
- Hersberger M., Marti-Jaun J., Rentsch K. i wsp. Rapid Detection of the CYP2D6*3, CYP2D6*4, and CYP2D6*6 Alleles by Tetra-Primer PCR and of the CYP2D6*5 Allele by Multiplex Long PCR. *Clin. Chem.* 2000; 46: 1072–1077.
- Sistonen J., Fuselli S., Palo J. i wsp. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. *Pharmacogenet. Genomics* 2009; 19: 170–179.
- Kirchheiner J., Heesch C., Bauer S. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004; 76: 302–312.
- Sistonen J., Fuselli S., Palo J., Chauhan N., Padh H., Sajantila A. Pharmacogenetic variation at CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 at global and microgeographic scales. *Pharmacogenet. Genomics* 2009; 19: 170–179.
- Skrętkowicz J., Wojtczak A., Rychlik-Sych M. Polymorphism of dextromethorphan oxidation in Polish population. *Acta Pol. Pharm.* 2008; 65: 611–615.
- Buzkova H., Pechandowa K., Slanar O., Perlik F. Frequency of single nucleotide polymorphisms of CYP2D6 in the Czech population. *Cell. Biochem. Funct.* 2008; 26: 76–81.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005; 5: 6–13.
- Kirchheiner J. CYP2D6 Phenotype Prediction From Genotype: Which System Is the Best? *Clin. Pharmacol. Ther.* 2008; 83: 225–227.
- Gonzalez I., Penas-Lledo E., Perez B. Relation between CYP2D6 phenotype and genotype and personalisty in healthy volunteers. *Pharmacogenomics* 2008; 9: 833–840.
- Kirchheiner J., Heesch C., Bauer S. Impact of the ultrarapid metabolizer genotype of cytochrome P450 2D6 on metoprolol pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004; 76: 302–312.
- Doki K., Homma M., Kuga K. i wsp. Effect of CYP2D6 genotype on flecainide pharmacokinetics in Japanese patients with supraventricular tachyarrhythmia. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2006; 62: 919–926.
- Dorn G. Pharmacogenetic profiling in the treatment of heart disease. *Trans. Res.* 2009; 154: 295–302.
- Pułczyńska A., Łukaszewicz J., Zieliński W. i wsp. Wykrywanie mutacji w genie CYP2D6 jako element optymalizacji farmakoterapii. *Farm. Pol.* 2004; 60: 692–698.
- Zanger M., Fischer J., Raimundo S. i wsp. Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. *Pharmacogenetics* 2001; 11: 573–585.
- Ye S., Huphmries S., Green F. Allele specific amplification by Tetra-primer PCR. *Nucleic Acids. Res.* 1992; 20: 1152–1154.
- Jain K. Applications of AmpliChip CYP450. *Mol. Diagn.* 2005; 9: 119–127.
- Litos I., Emmanouilidou E., Glynou K. i wsp. Rapid genotyping of CYP2D6, CYP2C19 and TPMT polymorphisms by primer extension reaction in a dipstick format. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 389: 1849–1857.
- Konstantou K., Ioannou C., Christopoulos K. Dual-allele dipstick assay for genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension reaction. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009; 17: 105–111.
- Toscano C., Klein K., Blievernicht J. i wsp. Impaired expression of CYP2D6 in intermediate metabolizers carrying the *41 allele caused by the intronic SNP 2988G>A. *Pharmacogenet. Genomics* 2006; 16: 755–766.
- Kurzawski M., Górnik W., Drożdżik M. Rzadkie polimorfizmy w genie CYP2D6 mogą zakłócać interpretację wyników badań farmakogenetycznych. *Probl. Ter. Monitor.* 2005; 16: 99–103.