

*Urszula Pych, Jowita Moroz-Kalata,  
Andrzej Bidziński, Adam Płaźnik*

## **Fenotypowanie metabolizmu leków**

Zakład Biochemii Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie  
Zakład Farmakologii i Fizjologii Układu Nerwowego  
Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie  
Katedra i Zakład Farmakologii Doświadczalnej i Klinicznej  
Akademii Medycznej w Warszawie

### **Streszczenie**

Praca obejmuje zagadnienia z zakresu farmakogenetyki. Prezentowane są aktualne informacje dotyczące działania i funkcji enzymów z grupy cytochromów P-450 i ich polimorfizmu genetycznego. Scharakteryzowano trzy rodzaje fenotypów metabolicznych (EM, UM, PM), zwrócono uwagę na znaczenie rodzaju fenotypu dla oceny genetycznie uwarunkowanej odpowiedzi ustroju na podawany lek. Rozważono powiązanie rodzaju fenotypu z występowaniem niektórych chorób. Opisano sposoby fenotypowania (test deprizochinowy i test sparteinowy), a także najnowsze osiągnięcia biologii molekularnej w dziedzinie analizy struktury kwasów nukleinowych istotne przy metodach genotypowania.

### **Summary**

#### **Phenotyping of drug metabolism**

Current information about action, function and polymorphism of Cytochrome P450 enzymes is presented in the paper. The different phenotypes (EM, UM, PM), and the meaning of phenotypes for evaluation of genetically determinated reactions to administrated drugs are characterized. The kind of phenotype can be a genetic marker of many diseases. Phenotyping methods are described (Sparteine Test, Debrisoquine Test). The latest information on molecular biology achievements related to the problem of genotyping is also given.

### **Historia fenotypowania**

Farmakogenetyka jest działem nauk medycznych będącym na pograniczu farmakologii i genetyki. Dokonano wielu odkryć w dziedzinie farmakogenetyki zanim opracowano metodę fenotypowania pacjentów. Już w latach sześćdziesiątych zaobserwowano u ludzi przyjmujących izoniazyd zróżnicowaną acetylację tego leku. Na podstawie szybkości N-acetylacji izoniazydu można podzielić wszystkich ludzi na wolno i szybko metabolizujących ten lek. W Anglii i w Niemczech odkryto niezależnie polimorfizm hydroksylacji deprizochiny/sparteiny, który 10 lat później przypisano niedoborowi cytochromu P-450 2D6 (CYP2D6) (12, 14, 17, 27, 49). W roku 1984 odkryto polimorfizm hydroksylacji S-mefenytoiny (26, 49), a 10 lat później opisano mutację genu cytochromu P-450 2C19 (CYP2C19). CYP2C19 bierze udział w N-demetylacji trój-

pierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, diazepamu i hydroksylacji propranololu (16, 50). Stwierdzono także polimorfizm genetyczny CYP2E1, CYP2A6, CYP1A2 (34, 45), a podejrzewa się polimorfizm genetyczny izoenzymów cytochromu P-450 1A1, 3A5 (18, 33). CYP1A2 ma duże znaczenie dla metabolizmu wielu leków, bowiem bierze udział w metabolizmie kofeiny i innych pochodnych metyloksantyny, propranololu, fenacetyny, paracetamolu oraz N-demetylacji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych.

W latach 90-tych przeprowadzono wiele badań farmakogenetycznych na podstawie których zidentyfikowano molekularne podłoże odkrytych polimorfizmów enzymów metabolizujących leki. Umożliwiło to opracowanie testów diagnostycznych mających na celu wykrycie osobników z defektem enzymatycznym. Stało się to możliwe dzięki nowym technikom biologii molekularnej PCR (Polimerase Chain Reaction) i RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Enzymy, które metabolizują leki i wykazują polimorfizm są jeszcze słabo poznane. Należą do nich te, które biorą udział w biotransformacji leków przeciwnowotworowych: dehydrogenaza aldehydu 1 (cyklofosamid, ifosfamid), dehydrogenaza dihydropirymidyny (fluorouracyl) oraz metylotransferaza tiopuryny (merkaptopuryna, azotioprin) (18, 20). Odkryto również polimorfizm innych (oprócz N-acetylacji) reakcji sprzęgania, takich jak glukuronizacja bilirubiny, morfiny i innych fenolowych metabolitów leków i ksenobiotyków oraz sprzęganie z glutationem nowotworogennych epoksydów (33).

## Cytochromy P-450

Cytochromy P-450 stanowią grupę enzymów o budowie hemoproteinowej zlokalizowaną w siateczce śródplazmatycznej komórek wątroby, jelit, płuc i mózgu. Tworzą liczną rodzinę monoooksygenaz. Pełnią wiele różnorodnych funkcji w organizmie. Cytochromy P-450 katalizują reakcję opisaną równaniem:  $R-H + O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightarrow ROH + H_2O$  (15). Opisano 30 rodzin cytochromu P-450 (w tym 10 u ssaków, 1 u węży, 2 u insektów, 1 u roślin, i 6 u bakterii) oraz ponad 200 jego izoenzymów (tabela 1). Cytochromy P-450 w dużym stopniu są odpowiedzialne za metabolizm leków oraz za biosyntezę i przekształcanie związków takich jak hormony steroidowe, tromboksany, prostacyklina, cholesterol, kwasy żółciowe itp. Poprzez udział w metabolizmie kwasu arachidonowego są zaangażowane w proces uwalniania hormonów peptydowych z podwzgórza, biorą również udział w regulacji poziomu hormonów steroidowych takich jak progesteron, kortykosteroidy, co może mieć wpływ na nastrój czy na poziom czuwania. Prawdopodobnie enzymy te biorą udział w syntezie neuroprzekazników: serotoniny i dopaminy, a ponadto powodują unieczynnienie toksyn roślinnych zawartych w pożywieniu zwierząt roślinożernych (15, 30, 38).

Takie izoenzymy jak: CYP11A, CYP11B, CYP17, CYP19, CYP21 biorą udział w syntezie hormonów steroidowych w nadnerczach i gonadach, co ma znaczenie m.in. dla procesów homeostazy elektrolitowej, stężenia glukozy,

Tabela 1. Rodziny cytochromów P-450 u człowieka (38)

1A1	2A6	3A3/4	4A9	7	11A1	17	19	21A2	27
1A2	2A7	3A5	4B1		11B1				
	2B6	3A7	4F2		11B2				
	2C8		4F3						
	2C9								
	2C18								
	2C19								
	2D6								
	2E1								
	2F1								

różnicowania płciowego i czynności reprodukcyjnych. Większość enzymów z tej grupy ma charakter indukowalny, bowiem obecność pewnych związków z reguły (choć nie zawsze) będących substratami dla danego enzymu powoduje nasilenie ich aktywności. Doprowadza to nieraz do przyspieszenia metabolizmu danego substratu; w taki sposób rozwija się tolerancja na niektóre leki, a także dochodzi do przyspieszenia metabolizmu wszystkich substratów, wobec których dany enzym wykazuje aktywność.

Wśród izoenzymów cytochromu P-450 występujących u ludzi, szczególnie istotną rolę odgrywa izoenzym CYP2D6, który katalizuje oksydację ponad 40 klinicznie ważnych leków; uczestniczy w biotransformacji trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych i ich aktywnych metabolitów: amitryptyliny, imipraminy, dezipraminy, nortryptyliny oraz leków przeciwpsychotycznych – perfenazyny, tiordazyny, haloperidolu (tabela 2). Bierze również udział w metabolizmie leków antyarytmicznych, przeciwbólowych i przeciwkaszlowych (28, 39). Cytochromy P-450 umożliwiają ostateczne unieczynnienie i eliminację leku na drodze sprzęgania powstałych produktów utleniania (z kwasem glukuronowym, siarkowym, glutationem) i utworzenie hydrofilnych produktów, dających wydaląć się z moczem lub żółcią.

Występuje zróżnicowana szybkość metabolizowania leków przez izoenzymy z rodziny CYP, bowiem niektóre z nich wykazują polimorfizm genetyczny (tabela 3), poza tym ma na to wpływ indywidualna ekspresja genu kodującego dany izoenzym. Pod względem metabolizowania leków przy udziale cytochromu P-450 ludzi można podzielić na trzy grupy odmienne fenotypowo, a mianowicie osobnicy w znacznym stopniu utleniający leki tzw. szybko metabolizujący ('extensive metabolizer' – EM), osobnicy utleniający leki w znikomym stopniu – słabo metabolizujący ('poor metabolizer' – PM) oraz osobnicy określane jako ultra-szybko metabolizujący ('ultra-rapid metabolizer' – UM).

CYP2D6 jest odpowiedzialny za oksydację między innymi debrizochiny i sparteiny. Debrizochina jest lekiem hipotensyjnym, który wpływa na proces

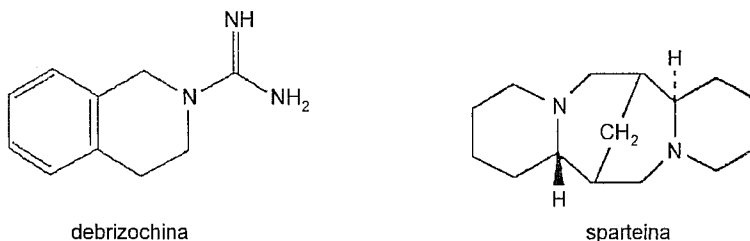
Tabela 2. Substraty dla cytochromu CYP2D6 (28)

grupy leków	leki należące do danej grupy leków
leki przeciwartymiczne	enkainid, flekainid, meksyletyna, propafenon
leki blokujące receptory $\beta$ -adrenergiczne	alprenolol, bufarolol, metoprolol, propranolol, timolol
leki neuroleptyczne	haloperidol, perfenazyna, tioridazyna, klozapina, risperidon, remoksypzyd
opioidy	kodeina, dekstrometorfan, etylomorfin
SSRI*	fluoksetyna, N-demetylocitalopram, norfluoksetyna, paroksetyna, fluwoksamina
TLPD**	amitryptylina, klomipramina, dezypramina, imipramina, nortryptylina
inne leki	amfetamina

\* SSRI – selektywne inhibitory wychwytu serotoniny

\*\* TLPD – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

uwalniania amin katecholowych z neuronów pozazwojowych układu współczulnego (rysunek 1). Sparteina jest alkaloidem, który występuje w żarnowcu miotlastym. U niektórych pacjentów obserwuje się niezwykle silne hipotensyjne działanie debrizochiny. Jest to spowodowane zwolnionym metabolizmem tej substancji. Osobnicy wolno metabolizujący leki są zwykle homozygotami recesywnymi, gdyż posiadają dwa allele recesywne odpowiedzialne za wytworzenie enzymu CYP2D6 (allele są to alternatywne formy genu, zajmujące w genie to samo miejsce, czyli locus) (25). Izoenzymy cytochromu P-450 są odpowiedzialne za hydroksylację substratów, które posiadają zasadowy azot oraz region hydrofobowy (tabela 2). Debrizochina i sparteina przez wpływ na CYP2D6 hamują z kolei O-demetylację leku przeciwkaszlowego dekstrometofanu, natomiast flekainid hamuje hydroksylację bufurolołu i O-demetylację debrizochiny. Debrizochina ponadto zwalnia 4-hydroksylację propranololu. Działanie niektórych leków może więc być odmienne u osób o różnym metabolizmie zachodzącym przy udziale CYP2D6. Małe dawki adrenolityków silniej działają u PM niż u EM. Kodeina działa silniej przeciwbólowo u osób szybko metabolizujących debrizochinę, ale nie wpływa na próg bólowy u osób



Rys. 1. Wzór strukturalny debrizochiny i sparteiny (28)

Tabela 3. Izoenzymy cytochromu P-450 najistotniejsze z punktu widzenia farmakogenetyki (15, 23, 30, 38, 39)

	CYP1A2	CYP2C9/10	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
charakterystyka	enzym wątrobowy, 68% homologii sekwencji aminokwasów z CYP1A1	stwierdzono znaczny polimorfizm związany z rasą	stwierdzono znaczny polimorfizm związany z rasą	prawdopodobnie związek z karcynogenezą	różna aktywność u poszczególnych osób	stanowi 40–60% wszystkich izoenzymów układu cytochromu P-450, występuje w wątrobie i nabłonku jelit
genetyczny polimorfizm	występuje	występuje	występuje	występuje	występuje	brak
podstawowe substraty	teofilina, kofeina, acetaminofen, amitryptylina, klomipramina, imipramina, paracetamol, fenacetyna, propranolol, klozapina	glipizyd, tolbutamid, fenytoina, losartan, warfaryna	omeprazol, diazepam, imipramina, heksobarbital, fenytoina, citalopram, moklobemid	propranolol, enkanid, TLPD*, SSRI**, haloperidol, perfenazyna, risperidon, tiordazyna	etanol, paracetamol, haloftan, teofilina, propranol	cyklosporyna, erytromycyna, estrogeny, chinidyna, benzodiazepiny, amitryptylina, nefazodon, alprazolam, midazolam, klomipramina, imipramina, karbamazepina

\* TLPD – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

\*\* SSRI – selektywne inhibitory wychwytu serotoniny

wolno metabolizujących. Dzieje się tak ponieważ u tych osób (EM) metylo-morfina (kodeina) jest szybciej przekształcana do aktywnej biologicznie morfiny i stężenie morfiny w organizmie osiąga wyższe poziomy (29).

### **Biotransformacja leków**

Procesem biotransformacji określa się ciąg przemian biochemicznych, jakim podlega lek w żywym organizmie. W jego skład wchodzi zjawiska związane z wchłanianiem, transportem i rozmieszczeniem leku oraz metabolizmem i wydalaniem jego metabolitów z organizmu. Leki podlegają w organizmie takim reakcjom enzymatycznym jak: reakcje utleniania, redukcji i hydrolizy (reakcje I fazy) oraz reakcje sprzęgania (reakcje II fazy). Enzymy, które należą do grupy cytochromów P-450 katalizują głównie reakcje utleniania (hydroksylacja pierścieni aromatycznych i alkiowych łańcuchów bocznych, oksydatywna deaminacja oraz dealkilacja) (24).

Proces metabolizmu leków zależy od wielu czynników. Nie tylko od stanu czynnościowego organizmu (tj. przebyte choroby, wiek, płeć, dieta) czy od polimorfizmu genetycznego cytochromów P-450, ale także od samych leków i ich metabolitów. Metabolity, te w zależności od rodzaju podawanego leku wykazują różne właściwości:

- mogą być dalej czynne, na przykład: kodeina-morfina (O-dealkilacja); wzdian chloralu-trichloroetanol (redukcja)
- metabolity są nieczynne, na przykład: meprobamat-hydroksymeprobamat (hydroksylacja łańcuchów bocznych)
- metabolity wykazują inne działanie, na przykład: fenylobutazon (działa przeciwwzapalnie) fenylhydroksybutylofenazon (wzmaga wydalanie kwasu moczowego)
- metabolity są związkami toksycznymi, na przykład: anilina-nitrobenzen (N-hydroksylacja) (24).

Innym procesem wpływającym na biotransformację są interakcje pomiędzy poszczególnymi klasami leków. Interakcje między lekami metabolizowanymi przez izoenzymy cytochromu P-450 pociągają za sobą różne następstwa w zakresie efektów terapii, jak też tolerancji i objawów niepożądanych w grupach EM i PM. Mogą one być przyczyną mniejszej efektywności terapii, pojawienia się nasilonych objawów niepożądanych, niekiedy groźnych powikłań, mogą też być wykorzystane do poprawienia wyników leczenia chorych mało wrażliwych na monoterapię (7, 32, 37, 38, 39) (tabela 4). Poza tym interakcje między lekami mogą być modyfikowane przez jeden lub kilka czynników takich jak: szybkość metabolizmu leków, stany chorobowe, dieta, wiek, rasa, dawka leku (23).

### **Rola czynników genetycznych**

Informacja genetyczna jest zapisana w strukturze kwasów nukleinowych w postaci kodu, w którym trójki kolejnych zasad czyli kodony (tryplety), odpowiadają

Tabela 4. Selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny i izoenzymy cytochromu P-450 (38, 39)

SSRI* (metabolit)	Izoenzymy uczestniczące w biotransformacji leku	Hamujący wpływ na izoenzymy P-450				
		1A2	2C9/10	2C19	2D6	3A3/4
Citalopram (Desmetylocitalopram)	2C19, 3A3/4, 2D6	+	-	-	-	-
Fluoksetyna (Norfluoksetyna)	2C9, 3A3/4, 2D6	+	++	++	+++	++
Fluwoksamina	1A2, 2D6	+++	++	+++	+	++
Paroksetyna	2D6	+	+	+	+++	+
Sertralina (Desmetylsertralina)	2C9, 3A	+	+	++	+	+

+ słaby wpływ hamujący

++ umiarkowany wpływ hamujący

+++ silny wpływ hamujący

- brak wpływu hamującego

\* SSRI – selektywne inhibitory wychwytu serotoniny

specyficznym aminokwasom w strukturze syntetyzowanego białka. Genem określa się odcinek nici DNA potencjalnie zdolny do produkcji funkcjonalnej cząsteczki RNA (46). To właśnie struktura wszystkich białek jest wyznaczona przez odpowiednie geny. Droga prowadząca od informacji genetycznej zapisanej w DNA do wykształcenia organizmu jest skomplikowana i podlega wpływom różnych czynników. Czy i w jakim stopniu informacja ta zostanie wykorzystana, zależy od czynników środowiska zarówno zewnętrznych, jak i wewnętrznych. Natomiast fenotyp czyli zespół cech osobnika jest wynikiem współdziałania zespołu genów, czyli genotypu, oraz środowiska. Część obserwowanej zmienności fenotypowej u osobników będących w tym samym wieku ma podłoże dziedziczne. Różnice w sekwencji DNA mogą dotyczyć jednego locus genowego, w obrębie którego występują tylko dwie formy alleliczne. W innym przypadku różnice dotyczą dużej liczby genów, z których każdy posiada dwie lub więcej form allelicznych. W populacjach organizmów pierwotna zmienność sekwencji DNA powstaje w wyniku mutacji, a dzięki rekombinacjom allele różnych loci układane są w coraz to nowe kombinacje. Rekombinacje genetyczne polegają na przegrupowaniu genów w czasie mejozy i zapłodnienia. Stanowią one główne źródło zmienności fenotypowej. Można wyróżnić dwa rodzaje zmienności:

- zmienność nieciągła – przejawia się równoczesnym występowaniem osobników o wyraźnie różnym wyglądzie. Taki rodzaj zmienności charakteryzuje cechy jakościowe i określa się to zjawisko mianem polimorfizmu.
- zmienność ciągła – obejmuje cechy o charakterze ilościowym, które są uwarunkowane przez wiele genów (cechy poligenowe) (46).

Opisano wiele rodzajów polimorfizmu, które dotyczą enzymów (31) na przykład:

- a. polimorfizm enzymów metabolizujących etanol

b. polimorfizm glutationu S-transferazy (GST)

c. polimorfizm N-acetylotransferazy

Dla przykładu, głównymi enzymami odpowiedzialnymi za rozkład etanolu są: ADH (dehydrogenaza alkoholowa), oraz ALDH (dehydrogenaza aldehydowa). Stwierdzono występowanie polimorfizmu zarówno ADH jak i ALDH, a także etniczne zróżnicowanie polimorfizmu tych enzymów. Są trzy formy alleli odpowiedzialne za wytworzenie ALDH2, które mają znaczący wpływ na szybkość rozkładu etanolu (tabela 5). Wykonano badania w różnych grupach etnicznych m.in. w Chinach (36). Do eksperymentu wybrano grupę osób, a następnie fenotypowano ją ze względu na geny odpowiedzialne za wytworzenie ALDH2. Badania miały na celu stwierdzenie jaka jest zależność między fenotypem, a szybkością metabolizowania etanolu. Okazało się, że nosiciele ALDH2\*2/\*2 (\*2/\*2 – oznaczenie homozygoty dominującej) tolerowali wyłącznie niskie dawki alkoholu (we krwi bardzo długo utrzymywało się wysokie stężenie acetaldehydu). Ta grupa charakteryzuje się także brakiem rozwoju tolerancji alkoholu i tym samym opornością na jego uzależniające działanie. Badania nad etnicznym zróżnicowaniem polimorfizmu genetycznego wykazały, że aż około 50% Azjatów (Chińczycy, Japończycy, Koreańczycy) jest nosicielami fenotypu typu ALDH2\*2/\*2 (7, 36, 45). Inny rodzaj polimorfizmu genetycznego dotyczy S-transferazy glutationowej (GST), kodowanej przez geny GSTM1\*1/\*1 (\*1/\*1 – oznaczenie homozygoty recesywnej), GSTT1\*1/\*2 (oznaczenie heterozygoty) i GSTT1\*2/\*2 (10). Homozygoty typu GSTM1\*1/\*1 nie wykazują ekspresji enzymu (36). Substratami dla GST są epoksydy wielocyklicznych węglowodorów zawarte między innymi w dymie papierosowym oraz kancerogenne arylaminy takie jak epoksyd, aflatoksyny.

Tabela 5. Wpływ fenotypu na metabolizm alkoholu etylowego (36, 45)

Rodzaj fenotypu	Oznaczenie fenotypu	wpływ danego fenotypu na rozkład alkoholu
homozygota dominująca	ALDH2*2/*2	bardzo wolny rozkład alkoholu
heterozygota	ALDH2*1/*2	szybki rozkład alkoholu
homozygota recesywna	ALDH2*1/*1	bardzo szybki rozkład alkoholu

\*1/\*1 – homozygota recesywna

\*1/\*2 – heterozygota

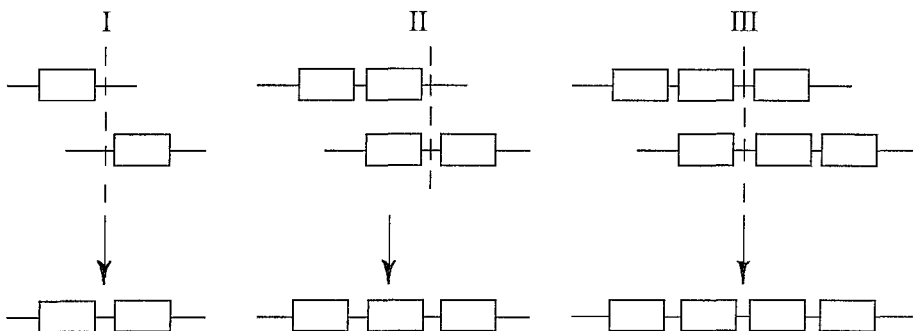
\*2/\*2 – homozygota dominująca

Inny przykład polimorfizmu dotyczy procesu acetylacji. Bierze w nim udział N-acetylotransferaza (NAT). NAT1 acetyluje kwas p-aminosalicylowy i p-aminobenzoowy, sulfamilamid i sulfametoksazol. NAT2 także jest odpowiedzialna za acetylację izoniazydu, sulfonamidów, hydralazyny, fenelzyny, nitrazepamu, oraz metabolitu kofeiny 5-acetyloamino-6-feniloamino-3-metyloouracylu. Stwierdzono występowanie PM i EM w odniesieniu do acetylacji izoniazydu (hydrazyd kwasu izonikotynowego – leku stosowanego w leczeniu i profilaktyce gruźlicy). Podobnie jest w przypadku hydralazyny (stosowanej



przy leczeniu nadciśnienia), prokainamid (leku przeciwaritmicznego), a także sulfasalazyny, sulfapirydyny, dapsonu, nitrazepamu i kofeiny. Przykładem może być także suksametonium. Jest to lek używany do zwiotczenia mięśni (10).

Analizując sekwencję aminokwasów w białkach lub sekwencje nukleotydów w DNA zidentyfikowano wiele odcinków homologicznych występujących zarówno w obrębie tego samego genu, jak i w różnych genach. Stanowiło to punkt wyjścia dla koncepcji sugerującej, że w toku ewolucji nowe geny powstają drogą duplikacji i dywergencji genów wyjściowych. Duplikacje takie są spowodowane najczęściej niesymetrycznym „crossing over”. „Crossing-over” polega na wymianie odcinków chromosomowych w chromosomach homologicznych. Zjawisko to jest możliwe, ponieważ homologiczne odcinki skoniugowanych chromosomów nie leżą dokładnie naprzeciwko siebie, lecz są przesunięte (rysunek 2), tak że miejsce pęknięcia wypada w jednym chromosomie przed genem, a w drugim już poza nim. Po wymianie powstaje chromosom pozbawiony tego genu, a drugi aż z dwoma genami. Obecność jednej duplikacji sprzyja powstawaniu następnych, gdyż wskutek powtórzenia identycznych odcinków w chromosomach zwiększa się prawdopodobieństwo ich prawidłowej koniugacji. Jeżeli proces taki zajdzie wielokrotnie to powstaje szereg tzw. tandem zduplikowanych genów (ułożenie tandemowe tzn. jeden za drugim). Dalsze losy powielonych kopii DNA mogą się potoczyć w trzech kierunkach, jako wydłużenie się genu, dywergencja zduplikowanych genów lub zwielokrotnienie kopii tych samych genów (25). Wydłużanie się genu powstaje w wyniku połączenia ze sobą zduplikowanych kopii. Dywergencja zduplikowanych genów zachodzi poprzez gromadzące się mutacje. Ponieważ jeden gen pełni dalej swe funkcje, to jego zduplikowana kopia jest uwolniona od presji selekcyjnej i zachodzące w niej mutacje, nawet drastyczne nie są letalne. Może to doprowadzić do wykształcenia nowego genu o zmienionych właściwościach albo też do całkowitej utraty funkcji, w wyniku czego powstaje tak zwany pseudogen (pseudogen jest to odcinek homologiczny do genu, ale niefunkcjonalny) (25).



Rys. 2. Zwielokrotnienie kopii genu wskutek wielokrotnego zajścia niesymetrycznego *crossing over*.  
Linie przerywane wskazują miejsca pęknięć w homologicznych chromosomach.  
Prostokąty oznaczają odcinki homologiczne (geny) (25)

Pierwotnym źródłem zmienności genetycznej organizmów są mutacje czyli zmiany zapisu informacji genetycznej. Częstotliwość mutacji, w przeliczeniu na 1 zasadę i 1 replikację wynosi  $10^{-8}$ . Wyróżnia się trzy kategorie mutacji:

1. genowe
2. aberracje chromosomowe
3. mutacje genomowe (dotyczą zmiany liczby chromosomów).

Aberracje chromosomowe (mutacje chromosomowe) są to zmiany struktury chromosomów, powstające wskutek pęknięć a następnie łączenia się odcinków w odmiennym niż poprzednio porządku. Aberracje dzieli się na cztery grupy:

- a. delecje – ubytek odcinka chromosomu
- b. duplikacje – podwojenie fragmentu chromosomu
- c. inwersje – odwrócenie odcinka chromosomu o  $180^\circ$

Aberracje mają ogromne znaczenie dla ewolucji, gdyż zmieniając układy genów wpływają na szanse rekombinacji między nimi. Duże znaczenie mają duplikacje, które stanowią źródło nowych loci genowych oraz niektóre inwersje i translokacje prowadzące do ścisłego sprzężenia grupy genów. W wyniku translokacji zmieniają się grupy sprzężeń genowych, a nawet może ulegać zmianie liczba chromosomów (25). Także polimorfizm genów kodujących cytochromy P-450 mógł powstać na drodze wyżej opisanych mutacji.

### **Polimorfizm cytochromów P-450 a różnicowanie etniczne**

Jak wspomniano powyżej dywergencja zduplikowanych genów może doprowadzić do wykształcenia nowego genu o zmienionych właściwościach, albo też do całkowitej utraty funkcji w wyniku czego powstaje tak zwany pseudogen (25). Gdy przeprowadzono w Etiopii badania, które miały na celu stwierdzenie czy w populacji tego kraju istnieją zduplikowane geny odpowiedzialne za wytworzenie CYP2D6, to okazało się, że takich przypadków jest bardzo wiele (tabela 6). Najwyższa frekwencja zduplikowanych form genów występuje w Etiopii, Arabii Saudyjskiej i Hiszpanii, a najniższa częstotliwość nosicieli omawianych genów występuje w północnej Europie. Wysznuło hipotezę która zakłada, że specyficzna dla rejonu dieta wywarła selekcyjny nacisk na multiplikację genów odpowiedzialnych za syntezę CYP2D6. CYP2D6 metabolizuje wiele alkaloidów, a więc dodatkowe kopie genu odpowiedzialnego za wytworzenie CYP2D6 przyczyniają się do zwiększonej detoksyfikacji diety zawierającej roślinne toksyny. W Hiszpanii występowanie wysokiej frekwencji zduplikowanych genów, jest być może także związane z migracją muzułmanów, około 400 lat temu, na tereny Hiszpanii z terenów Afryki i Azji Mniejszej (5, 21, 43, 44).

W innych badaniach prowadzonych na pacjentach przyjmujących nortryptylinę, wykazano możliwość istnienia zduplikowanego genu CYP2D6, odpowiedzialnego za metabolizm tego leku. Osoby, które posiadały pomnożone geny wymagały zwiększenia dawki nortryptyliny dla osiągnięcia efektu terapeutycznego.

Tabela 6. Kraje o najwyższej częstotliwości występowania w populacji zduplikowanych genów odpowiedzialnych za biosyntezę CYP2D6 według (21, 44)

Kraje	Częstość występowania zduplikowanych genów odpowiedzialnych za syntezę CYP2D6
Etiopia	29%
Arabia Saudyjska	20%
Hiszpania	7–11%
Szwecja	1– 2%

Wykazano na przykład, że pacjent który wymagał stosowania trzykrotnie wyższej dawki nortryptyliny, posiadał potrójne geny kodujące CYP2D6 (21).

W konkluzji tej części pracy należy stwierdzić, że wyżej opisane zjawisko może być istotne w farmakoterapii, bowiem istnieje związek między liczbą kopii genów, a metabolizmem leku. Wiadomo na przykład, że aktywnym metabolitem kodeiny jest morfina. Stąd tempo metabolizmu kodeiny wpływa na koncentrację morfiny i efekt przeciwbólowy. Klomipramina jest kolejnym przykładem leku, którego działanie jest zależne od częstości występowania alleli kodujących CYP2D6. Badania wykazały, że przyczyną dłuższego działania klomipraminy u osobników rasy orientalnej jest przede wszystkim częste występowanie alleli CYP2D6\*10 (50% w porównaniu z rasą kaukaską – 5%) prowadzących do syntezy mniej stabilnego enzymu. Ważnym czynnikiem determinującym aktywność enzymów cytochromu P-450, oraz przyczyną występowania etnicznych różnic w metabolizmie leków może być także dieta (tabela 7) (4, 21).

Tabela 7. Substancje, produkty i inne czynniki nasilające lub hamujące aktywność izoenzymów cytochromu P-450 (15, 23)

Enzym	Substancje, produkty i inne czynniki nasilające aktywność enzymu	Substancje, produkty i inne czynniki hamujące aktywność enzymu
CYP 1A2	Palenie tytoniu, spożywanie niektórych warzyw: kapusty, brukselki, produkty żywnościowe przygotowane na grillu (obecność węglowodórów aromatycznych), dieta bogata w białko a uboga w węglowodany	Sok z grapefruita, psoraleny zawarte w pietruszce, selerach i pasternaku, dieta uboga w białko i bogata w węglowodany
CYP 2E1	Głodzenie, przewlekłe nadużywanie alkoholu	Substancje zawarte w kapuście i brukselce
CYP 3A4	–	Sok z grapefruita

Badania nad częstotliwością występowania fenotypu PM względem CYP2D6 wykazały, że wśród Buszmenów jest aż 18,8 % takich osobników, natomiast najmniej nosiciele fenotypu PM CYP2D6 występuje wśród Japończyków, Chińczyków, Koreańczyków i Arabów (w granicach 1–2%) (tabela 8) (26, 29).

Tabela 8. Częstotliwość występowania fenotypu PM względem CYP2D6 (26, 29)

Rasa	Rasa biała	Jordańczycy	Japończycy, Chińczycy, Koreańczycy, Arabowie	Buszmeni
częstość występowania fenotypu PM dla CYP2D6 (%)	6-10	7,1	1-2	18,8

### Ryzyko chorób związane z występowaniem polimorfizmu cytochromu P-450

Od wielu lat prowadzone są badania, które mają na celu potwierdzenie istnienia związku pomiędzy polimorfizmem cytochromu P450 a ryzykiem występowania takich chorób jak: nowotwory płuc, nerek, pęcherza moczowego, wątroby, niektóre postaci białaczki, choroba Parkinsona, schizofrenia czy choroba Alzheimera (AD) (6, 9). Związki polimorfizmu cytochromów z ryzykiem wystąpienia nowotworów wynikają z faktu, że niektóre izoenzymy cytochromu P-450 (np. CYP1A1, CYP3A4, CYP2E1) mają zdolność do metabolizmu wielu związków pro-karcynogennych (na przykład: benzopirenu, dibenzantracenu, nitrozoaminy występującej w dymie tytoniowym, czy aflatoksyny  $\beta$ 1 w pożywieniu) (9, 13, 30). U osób o typie PM względem CYP2E1 stwierdzono zwiększoną zachorowalność na raka płuc w porównaniu z grupą kontrolną, dotyczyło to szczególnie palaczy tytoniu (3). Potrzebne są jednak dalsze badania dla potwierdzenia roli fenotypu metabolicznego jako predyktora występowania nowotworów (3, 8). Osobnicy o fenotypie PM wobec CYP2C19 wykazują częstszą zachorowalność na niektóre postaci nowotworu skóry (48). CYP2C19 występuje w dużej ilości w wątrobie, można więc podejrzewać, że zmiany w jego aktywności odgrywają także istotną rolę w symptomatologii niewydolności wątroby (48). Na ryzyko pojawienia się objawów choroby Parkinsona może mieć wpływ genetycznie uwarunkowany niedobór CYP2D6. Przyczyną tego zjawiska jest mutacja genowa, na skutek której arginina zostaje zastąpiona cysteiną (2, 9, 41). Sugeruje się, że niedobór CYP2D6 może zwalniać metabolizm i tym samym inaktywację różnego rodzaju neurotoksyn pochodzenia endo- i egzogenego.

Naturalnie, nie we wszystkich rodzajach zaburzeń psychicznych i neurologicznych cytochrom P-450 odgrywa istotną rolę. U chorych na schizofrenię aktywność enzymu CYP2D6 była porównywalna z aktywnością tego enzymu u osób zdrowych (47).

Nie stwierdzono też jednoznacznej korelacji między występowaniem dyskinez na tle stosowania neuroleptyków, a obniżoną aktywnością CYP2D6 (47). W sumie wydaje się, że zbyt mało badań przeprowadzono wśród ludzi cierpiących na wyżej wymienione choroby, aby można było potwierdzić korelację pomiędzy polimorfizmem cytochromu P-450, a pojawieniem się ich symptomów.

## Metodyki fenotypowania

Polimorfizm metaboliczny można określić przy pomocy techniki fenotypowania lub genotypowania. Fenotypowanie pozwala na podzielenie pacjentów na grupy: PM, EM i UM, pod względem szybkości metabolizowania leków. Dla oceny typu metabolizmu używa się substancji modelowych (tabela 9). Ich metabolizm przebiega tym samym torem co leków, na przykład, z grupy środków przeciwdepresyjnych czy neuroleptycznych. Jednym z najczęściej stosowanych testów jest tak zwany test debrizochinowy. W tym celu jako substrat podaje się debrizochinę (D), w dawce doustnej (10 mg), a następnie oznacza się ilość wolnej debrizochiny w stosunku do jej zhydrolizowanego metabolitu (4-OH debrizochina), w ośmiogodzinnej zbiórce moczu. Z uzyskanych wartości stężeń oblicza się współczynnik metabolizmu  $MR = D/4OHD$ . Przyjmuje się, że osobnicy wykazujący wartości MR powyżej 12,6 reprezentują fenotyp „słabo metabolizujący” (PM), osoby o współczynniku MR poniżej 12,6 należą do grupy „szybko metabolizujących” (EM). Rzadko spotyka się natomiast ludzi ultra-szybko metabolizujących posiadających zduplikowaną formę genu odpowiedzialnego za wytworzenie CYP2D6. Tacy pacjenci wykazują wartość współczynnika  $MR < 0,1$  (10).

Tabela 9. Substraty modelowe używane w badaniach *in vitro* (15)

	CYP1A2	CYP2C9/10	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
substraty używane w badaniach	kofeina	tolbutamid	mefenytolna	sparteina debrizochina dekstrometorfan*	chlorkoksazon	erytromycyna midazolam dekstrometorfan** dapson

\* Oznaczanym metabolitem jest, powstający w wyniku reakcji O-demetylacji dekstrometofanu przeprowadzonej przez CYP3A4, metoksymorfinan

\*\* Oznaczanym metabolitem jest, powstający w wyniku reakcji N-demetylacji dekstrometofanu przeprowadzonej przez CYP2D6, dekstrotorfan

Test sparteinowy jest wykonywany podobnie: po podaniu 100 mg sparteiny (S) doustnie dokonuje się pomiaru ilości wydalonej substancji i jej hydroksymetabolitu, w sześciogodzinnej zbiórce moczu. Wartości poniżej 20 świadczą o fenotypie EM, wartości powyżej 20 o fenotypie PM. Alternatywą do testów D/S (22) jest stosowanie dekstrometofanu i ocenianie zawartości jego metabolitów w ślinie. Przy wymienionych testach pomiar metabolitu oraz substratu w moczu lub ślinie wykonuje się metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (High Performance Liquid Chromatography) (1, 10, 11, 19).

Rozwój biologii molekularnej przyczynił się także do dokładnego badania genotypów metabolicznych. Opracowano odpowiednie testy diagnostyczne, które mają na celu wykrycie osób z defektami enzymatycznymi. Stało się to możliwe dzięki rozwinięciu nowych technik, takich jak PCR (Polimerase Chain

Reaction) i RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism). Testy te stosowane są nie tylko do diagnostyki chorób uwarunkowanych genetycznie, ale również w innych dziedzinach biologii np. w diagnostyce wirusologicznej, przy wykrywaniu antygenów HLA, czy w medycynie sądowej. Metoda RFLP pozwala na bezpośrednie badanie zmienności DNA. Badanie to polega na analizie wielkości fragmentów uzyskanych przez cięcie cząsteczek DNA enzymami restrykcyjnymi lub sekwencjonowaniu wybranych fragmentów. Znalezienie określonych genów czy innych homologicznych sekwencji DNA u różnych osobników nie jest proste, z powodu ogromnych rozmiarów genomu, który u Eucaryota zawiera od  $10^8$  do  $10^{11}$  par zasad (25).

Jak wspomniano do określania zmienności DNA stosuje się enzymy restrykcyjne. Rozpoznają one specyficzne sekwencje kilku nukleotydów. Uzyskane w ten sposób fragmenty DNA rozdziela się metodą elektroforetyczną. Tempo wędrówki DNA jest odwrotnie proporcjonalne do wielkości cząsteczek, a wynikiem są prążki zlokalizowane w różnej odległości od punktu startowego. Ich obecność wykrywa się przy użyciu autoradiografii albo przez barwienie srebrem lub barwnikiem fluoryzującym. Wielkość fragmentów DNA określa się przez porównanie ich położenia w stosunku do umiejscowienia fragmentów o znanej wielkości, zwanych standardami. Różnice w układzie prążków między osobnikami świadczą o polimorfizmie długości fragmentów uzyskanych przy pomocy enzymów restrykcyjnych. Do identyfikacji badanych sekwencji DNA wykorzystuje się sondy. Sondę stanowi najczęściej wyizolowany fragment DNA, namnożony w bakteriach przez klonowanie w wektorach (wektorami są głównie plazmidy bakteryjne – niewielkie, zamknięte w pierścieniu cząsteczki DNA odpowiedzialne między innymi za oporność bakterii na antybiotyki – lub też bakteriofagi). Zrekombinowany DNA wektora zawiera wprowadzony do niego fragment DNA innego organizmu. Ze względu na zdolność każdej nici DNA do łączenia się z nicią komplementarną, sondy takie umożliwiają znalezienie w gigantycznych genomach sekwencji homologicznych. Sondy pozwalają więc na zidentyfikowanie homologicznych odcinków DNA (46).

Oprócz badań *in vivo* na uwagę zasługują rozwijające się techniki badań *in vitro*. Dzięki nim można uzupełnić szereg wiadomości z zakresu roli specyficznych enzymów cytochromu P-450 w metabolizmie leków i ich interakcjach. Leki mogą oddziaływać w dwojaki sposób na enzymy: jako substraty oraz poprzez wpływ na ich aktywność (jako inhibitory lub induktory) (tabela 10). W badaniach *in vitro* wykorzystuje się tkanki wątroby, kolonie drożdży, bakterie, komórki owadów, posiadające specyficzne enzymy cytochromu P-450. Należy jednak zawsze brać pod uwagę fakt, że aktywność czy stężenie enzymu w żywym organizmie, w badanej tkance, może być inne niż w klonach komórek wyhodowanych w warunkach laboratoryjnych. Żywy organizm bowiem poprzez całe życie narażony jest na szereg czynników, które mogą modyfikować aktywność enzymów. Do tych czynników należą leki, palenie tytoniu, przebyte choroby, a także wiek i płeć. Użycie komórek innych niż ludzkie do pewnego stopnia utrudnia więc interpretację wyników (15).

Tabela 10. Podstawowe inhibitory i induktory enzymów z rodziny cytochromu P-450 (15, 23, 30, 36, 42)

	inhibitory	induktory
CYP1A2	amiodaron, cimetydyna, fluorocho- lony, fluwoksamina, furafilina,	insulina, metylocholan- tren, nafcylina, omeprazol
CYP2C9/10	amiodaron, flukonazol, fluwastatyna, fluwoksamina, isoniazyd, fenytoina	barbiturany, rifampicyna
CYP2C19	ketokonazol, cimetydyna, felbamat, fluoksetyna, fluwoksamina	barbiturany, fenytoina, rifampicyna
CYP2D6	cimetydyna, większość SSRI*, neuroleptyki, TLPD**, chinidyna	karbamazepina, rifampicyna, fenobarbital (?)***
CYP2E1	dietyloditiokarbaminian, disulfiram	etanol, izoniazyd, izopropanol, kłofibrat
CYP3A4	cimetydyna, erytromycyna, ketokonazol, flukonazol, etynyl estradiol, progestyny	barbiturany, erytromycyna, estradiol, karbamazepina, fenytoina, rifampicyna

\* SSRI – selektywne inhibitory wychwytu serotoniny

\*\* TLPD – trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne

\*\*\* O możliwości indukcji CYP2D6 donosili Spina i wsp. (1995) – karbamazepina – oraz Parkinson (1996) – rifampicyna, fenobarbital.

Informacje te nie znalazły jednak do chwili obecnej jednoznacznego potwierdzenia.

## Znaczenie fenotypowania

W ostatnich latach dzięki osiągnięciom farmakogenetyki możliwe jest określenie fenotypu, a także genotypu pacjenta w celu doboru indywidualnego dawkowania leku, wyboru właściwego leku, oraz uniknięcia niepożądanych działań leków. Fenotypowanie i genotypowanie uzupełniają się wzajemnie. Fenotypowanie może dostarczyć lekarzowi informacji bardziej bezpośrednio związanej z praktyką lekarską, gdyż umożliwia szybkie podjęcie decyzji co do dawkowania leku, a zatem służy poprawie skuteczności i tolerancji terapii. Osoby należące do grupy słabo metabolizujących często wymagają odstawienia leku z powodu braku jego tolerancji. Fenotypowanie może także zastąpić, do pewnego stopnia, monitorowanie stężenia leków w klinice, co ma szczególne znaczenie w przypadku pacjentów nie reagujących na lek, lub nie tolerujących leków ze względu na działanie niepożądane, oraz u osób starszych ze współistniejącymi schorzeniami układu krążenia, nerek czy wątroby. Fenotypowanie umożliwia prawidłowe dawkowanie leku poprzez indywidualne dostosowanie dawki. Wystarczy wykonać je raz w życiu, a wyniki mogą służyć przy stosowaniu wielu leków będących substratami danego cytochromu, przez całe życie pacjenta. Dlatego koszty badania fenotypu są mniejsze niż prowadzenie terapii monitorowanej. Naturalnie, chociaż obie metody uzupełniają się do pewnego stopnia, nie mogą się natomiast zastąpić. Terapia monitorowana umożliwia zbadanie nie tylko genetycznie uwarunkowanego indywidualnego typu metabolicznego, ale ponadto uwzględnia zmiany w biodostępności leków, ich dystrybucji w organizmie, eliminacji przez nerki itp.

**Piśmiennictwo**

1. Adnan E.Y., Kutaiba C., Cazemiro R.M.: A simplified and rapid test for acetylator phenotyping by use of peak height ratio of two urinary caffeine metabolites. *Clin.Chem.*1989, 35/5, 848–851.
2. Armstrong M., Daly A.K., Cholerton S., Bateman D. N., Idle J. R.: Mutant debrisoquine hydroxylation genes in Parkinson's disease *Lancet* 1992, 339, 1017–1018.
3. Ayesh R., Idle J.R., Ritchie J.C., Crothers M.J., Hetzel M.R.: Metabolic oxidation phenotypes as markers for susceptibility to lung cancer. *Nature* 1984, 312, 169–170.
4. Balant-Gorgia A.E., Gex-Fabry M., Balant L.P.: Clinical pharmacokinetics of clomipramine. *Clin. Pharmacokinet.* 1991, 20(6), 447–62.
5. Beszlej J.A., Kiejna A.: Znaczenie dla psychiatrii badania genetycznego polimorfizmu utleniania leków. *Psychiatria Pol.* 1995, 29, 45–56.
6. Cervilla A., Russ C., Holmes C., Aitchison K., Smith C. A. D., Powell J., Lovestone S.: CYP2D6 polymorphisms in Alzheimer's disease, with and without extrapyramidal signs, showing no apolipoprotein E 4 effect modification. *Biological Psychiatry* 1999, 45, 426–429.
7. Chang W.H., Augustin B., Lane H.C., ZumBrunnen T., Liu H.C., Kazmi Y., Jann M.W.: In-vitro and in-vivo evaluation of the drug-drug interaction between fluvoxamine and clozapine. *Psychopharmacology* 1999, 145, 91–98.
8. Christensen P.M., Gotzsche P.C., Brosen K.: The sparteine/debrisoquine (CYP2D6) oxidation polymorphism and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 51, 389–393.
9. Coutts T.R., Urichuk L.J.: Polimorphic cytochromes P450 and drugs used in psychiatry *Cellular and Molecular Neurobiology* 1999, 3, 325–354.
10. Daniel W. A. : Farmakogenetyka: polimorfizm genetyczny metabolizmu leków – charakterystyka ogólna, znaczenie kliniczne, fenotypowanie. Nalepa I., R.Przewłocki, *Biomedycyna Molekularna*, XIV Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN Mogilany 1997, 39–48.
11. Derenne F, Joanne C., Vandel S., Bertschy G., Volmat R., and Bechtel P.: Debrisoquine Oxidative Phenotyping and Psychiatric Drug Treatment. *Eur. J.Clin.Pharmacol* 1989, 36, 53–58.
12. Dreyer M., Rudiger H. W.: Genetic defects of human receptor function. *Trends Pharmacol. Sci.* 1988, 9, 98–102.
13. Eaton D.L., Gallagher E.P., Bammler T.K.: Role of cytochrome P4501A2 in chemical carcinogenesis: implikations for human variability in expression and enzyme activity. *Pharmacogenetics* 1995, 5, 259–74 (abstract).
14. Eichelbaum M., Spannbruckner N., Steincke B., Dengler H. J.: Defective N-oxidation of sparteine in man: a new pharmacogenetic defect. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1979, 16, 183–187.
15. Glue P., Clement R. P.: Cytochrome P450 enzymes and drug metabolism-basic concepts and methods of assessment. *Cellular and Mol. Neurob.* 1999, 3, 309–323.
16. Goldstein J. A., Faletto M. B., Romkes-Sparks M., Kitareewan S., Raucy J. L., Lasker J. M., Ghanayen B. I.: Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4'-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 1994, 33, 1743–1752.
17. Gonzales F. J., Skoda R. C., Kimura S.: Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. *Nature* 1988, 331, 442–446.
18. Gonzalez F. J., Idle J. R.: Pharmacogenetic Phenotyping and Genotyping. Present status and future potential *Clin. Pharmacokinet.*, 1994, 26, 59–70
19. Henthorn T.K., Benítez J., Avram M.J., Martinez C., Llerena A., Cobadela J., Krejciec T.C., and Gibbons R.D.: Assessment of the debrisoquin and dextromethorphan phenotyping tests by gaussian mixture distributions analysis. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1989, 328–33.
20. Inaba T., Nebert D. W., Burchell B., Watkins P. B., Goldstein J. A., Bertilsson L., Tucker G.T.: Pharmacogenetics in clinical pharmacology and toxicology. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995, 73, 331–338.



21. Eva Lundquist, Inger Johansson, Magnus Ingelman-Sundberg M.: Genetic mechanisms for duplication and multiduplication of the human CYP2D6 gene and methods for detection of duplicated CYP2D6 genes. *Gene* 226, 1990, 327–338.
22. Jarema M.: Wybrane zagadnienia z psychofarmakologii. Kostowski W., Pużyński S. (red.) *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna PZWL*, Warszawa 1996, 229–235.
23. Johnson M.D., Newkirk G., White J.R.: Istotne klinicznie interakcje lekowe. *Medycyna po Dyplomie* 2000, 1, 111–123.
24. Kubikowski P., Kostowski W.: Biotransformacja leków w organizmie w.: Kostowski W., Kubikowski P. (red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej. PZWL Warszawa*, 1996, 39–43.
25. Krzanowska H.: Zapis informacji genetycznej. Krzanowska H., Łomnicki A., Rafiński J., Szarski H., Szymura J. M.: *Zarys mechanizmów ewolucji. PWN Warszawa* 1997, 91–93
26. Lin H. J., Han Ch-Y., Lin B.K., Hardy S.: Slow acetylator mutations in the human polymorphic N-acetyltransferase gene in 786 Asians, Blacks, Hispanics and Whites: Application to metabolic epidemiology. *Am. J. Hum. Genet.* 1993, 52, 827–834.
27. Mahgoub A., Idle J.R., Dring D.G., Lancaster R., Smith R.L.: Polymorphic hydroxylation of debrisoquine in man. *Lancet* 1977, 2, 584–586.
28. Mazur M., Szadowska A.: Układ autonomiczny II – Mechanizmy adrenergiczne w.: Kostowski W., Kubikowski P. (red.): *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii i farmakologii klinicznej. PZWL Warszawa*, 1996, 326.
29. McLellan, R. A., Oscarson M., Seidegard J., Evans D. A. P., Rannung A. and Ingelman-Sundberg M.: Frequent occurrence of CYP2D6 gene duplication in Saudi Arabians. *Pharmacogenetics*. 1997, 7, 187–91.
30. Meszaros J.: Enzymów i leków ciąg dalszy, czyli po co nam cytochrom P450. *Terapia i leki*. 1999, 3–4, 22.
31. Muiras M L., Verasdonck P., Cottet F., Schachter F.: Lack of association between human longevity and genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes at the NAT2, GSTM1 and CYP2D6 loci. *Hum Genet.* 1998, 102, 526–32.
32. Naranjo C.A., Sproule B.A. and Sproule D.M.: Metabolic interactions of central nervous system medications and selective serotonin reuptake inhibitors. *International Clinical Psychopharmacology* 1999, 14, 35–47.
33. Nebert D. W., Mc Kinnon R. A., Puga A.: Human Drug metabolizing Enzyme Polymorphisms: Effect on Risk of Toxicity and Cancer. *DNA Cell Biol.* 1996, 15, 273–280.
34. Oscarson M., Gullsten H., Rautio A., Bernal M. L., Sinues B., Dahl M. L., Stengard J. H., Pelkonen O., Raunio H., Ingelman-Sundberg M.: Genotyping of human cytochrome P450 2A6 (CYP2A6), a nicotine C-oxidase. *FEBS-Lett.* 1998 Nov 6; 438(3): 201–5.
35. Parkinson A.: An overview of current cytochrome P450 technology for assessing the safety and efficacy of new materials. 1996, *Toxicol. Pathol.* 24: 4–57.
36. Peng G.S., Wang M.F., Chen C.Y., Luu S.U., Chou H.C., Li T.K. and Yin S.J.: Involvement of acetaldehyde for full protection against alcoholism by homozygosity of the variant allele of mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene in Asians. *Pharmacogenetics* 1999, 9, 463–476.
37. Płużnik A.: Praca zbiorowa pod redakcją Daniel W. A.: *Materiały na sympozjum pt.: „Leczenie skojarzone schorzeń psychicznych”* wydane przez Instytut Farmakologii PAN I.C.B.M., Kraków 1996, 37–50
38. Preskorn S.H., MD *Clinical Pharmacology of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors*. 1996
39. Pużyński S.: Interakcje selektywnych inhibitorów wychwytu serotoniny (SI-5HT, SSRI). *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii* 1999, 2, 74–116.
40. Pużyński S.: Leki przeciwdepresyjne. Kostowski W., Pużyński S. (red.) *Psychofarmakologia doświadczalna i kliniczna PZWL*, Warszawa 1996, 397.
41. Smith C.A.D., Gough A.C., Leigh P. N.: Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992, 339, 1375–1377.

42. Spina E., Avenoso A., Campo G. M., Caputi A. P., Perucca E.: The effect of carbamazepine on the 2-hydroxylation of desipramine. *Psychopharmacology* 1995, 117, 413–416.
43. Steijns LS, Van Der Weide J.: Ultrarapid drug metabolism: PCR – based detection of CYP2D6 gene duplication. *Clin Chem.* 1998, 44, 914–7.
44. Steiner E., Bertilsson L., Juliette Swe, Ingegrd Bertling, and Folke Sjqvist.: Polymorphic Debrisoquin hydroxylation in 757 Swedish subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 1988, 44, 431–435.
45. Sun F., Tsuritani I., Honda R., Ma Z. Y., Yamada Y.: Association of genetic polymorphisms of alcohol-metabolizing enzymes with excessive alcohol consumption in Japanese men. *Hum Genet* 1999, 105, 295–300.
46. Szymura J.M.: Zmienność w populacjach naturalnych.: Krzanowska H., Łomnicki A., Rafiński J., Szarski H., Szymura J. M.: Zarys mechanizmów ewolucji. PWN Warszawa 1997, 91–93.
47. Tyczyński K., Niedzwiedzka I.: Późne dyskinezy. *Farmakoterapia w psychiatrii i neurologii.* 1999, 326–58.
48. Tsuneoka Y., Fukushima K.: Genotype analysis of the CYP2C19 gene in the Japanese population. *Life Sciences* 1996, 20, 1711–1715.
49. Wedlund P.J., Aslanian W.S., McAllister C.B., Wilkinson G.R., Branch R.A.: Mephenytoin hydroxylation deficiency in Caucasians: Frequency of a new oxidative drug metabolism polymorphism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1984, 36, 773–780.
50. Wrighton S.A., Stevens J.C., Becker G.W., Vanden-Branden M.: Isolation and characterization of human liver cytochrome P-450 2C19: correlation between 2C19 and S mephenytoin 4'-hydroxylation. *Arch Biochem. Biophys.* 1993, 306, 240–245.
51. Yokota Q. I., Tamura S., Furuja H., Kimura S., Watanabe M., Kanazawa I., Kondo I., Gonzales F. J.: Evidence for a new variant CYP2D6J in a Japanese population associated with lower *in vivo* rates of sparteine metabolism. *Pharmacogenetics* 1993, 3, 256–263.