

KLİNİK LABORATUVARDA İLAÇ TEDAVİLERİNİN İZLENMESİ ve SİTOKROM P450 İZOENZİMLERİNİ FENOTİPLEME ve GENOTİPLEME ENDİKASYONLARI. HANGİ TETKİKLER GERÇEKTEN GEREKLİ?

Ayşegül Ayyıldız*

ÖZET

İlaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerindeki hastalararası büyük varyasyonların biyolojik temeli, diğer sistematik faktörlerle birlikte, ilaç metabolizmasında görev alan "sitokrom P450" gibi enzimlerin, genotipik ve fenotipik farklılıklarından da köken almaktadır. Farklılıkların çeşitliliği, her bireyin fonksiyonel sitokrom P450 kombinasyonu açısından 'kişisel parmak izi' taşıyacağını düşündürmüştü ve bu özellik, tedavide, etkin ve güvenli konsantrasyonların dar bir aralıkta izlendiği ilaçların metabolizmasını öngörmede, laboratuvar kaynaklı analitik bir klinik yardımcı olarak, sitokrom P450 profilinin kullanılabileceğini düşündürmüştür.

Bu yazıda, genel anlamıyla deneysel aşamadaki laboratuvar testlerinin, rutin kullanıma girmesi öncesi, belirlenmesi uygun olabilecek klinik ilişki tanımlayan bazı kavramlar hatırlanmış ve bu bağlamda sitokrom P450 genotipleme ve fenotiplemesinin metodolojisi ve klinik endikasyonları tartışılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sitokrom P450, izoenzim, hastalararası varyasyon, öngörü, ilaç metabolizması, genotip, fenotip, klinik laboratuvar, sonuç değeri ölçüsü

SUMMARY

Vytchrome P450 Genotyping and Phenotyping

The large interindividual variances in pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of some drugs are mostly dependent on the genotypical and phenotypical variations in the major drug metabolizing system "Cytochrome P450s" as well as other systematic factors. The diversity of variations give the notion that every individual has his/her own 'personal fingerprint' of functional 'cytochrome P450 isoenzyme combination'. This knowledge may be utilized in daily routine for prediction of the metabolism of some drugs which have their efficient and safe concentrations in a very narrow concentration limit.

This article reminds the clinician, of some laboratory statistical concepts which may be of use in the clinical interpretation of the diagnostic value of experimental level investigative tests, as well as addressing the indications and methodology of cytochrome P450 genotyping and phenotyping.

Key Words: Cytochrome P450, isoenzymes, interpatient variation, prediction, drug metabolism, genotyping, phenotyping, clinical laboratory, outcomes assessment

İlaç tedavisini izlemek, serum ilaç konsantrasyonu ile, farmakolojik yanıt arasında, doğrudan bir ilişkinin gösterilmiş olduğu, küçük bir grup ilaç için, etkin ve güvenli konsantrasyonların dar bir aralıkta gözlemlendiği tedavilerde, hastanın durumunu belirlemek için klinik gözlemleri destekleyen klinik laboratuvar çalışmalarıdır (1). Tıbbi uygulamada yerini bulması, 1970'lerde fenitoin tedavisi alan epilepsili hastalarda, kan ilaç konsantrasyonlarının, doz düzenlemede, hastanın ağırlığı temel alınarak yapılan standart uygulamalara göre daha az yan etki ve daha iyi epileptik atak kontrolü sağladığının belirlenmesiyle başlamıştır (2). İlaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerindeki hastalararası büyük varyasyonlar, uygulamada

en sık olarak, prospektif ilaç konsantrasyonu araştırmalarıyla irdelenmektedir (3). Bu varyasyonların biyolojik temeli diğer sistematik faktörlerle birlikte, ilaç metabolizmasında görevli olan "Sitokrom P450" (CYP) gibi enzimlerin, genotipik ve fenotipik farklılıklarından da köken almaktadır (4). Bu örnek her türlü tıbbi uygulamalarda, hastaya özel bireyselleştirmelerin önemini, bir kez daha vurgulamaktadır.

LABORATUVAR TESTLERİNİN KLİNİK ANLAMINI NASIL ÖLÇÜYORDUK?

Deneysel araştırmalar temel alındığında, günlük uygulamada izleminden fayda bulunabilecek çok sa-

* A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Uzman Araştırma Görevlisi

Tablo 1. Analitik uygulama kararı öncesi atılması uygun olan adımlar

1.	Klinik sorunun tanımlanması
2.	En uygun numunenin belirlenmesi
3.	En iyi analitik metodun seçilmesi
4.	Deneyin standardizasyonu
5.	Numunenin işlenmesi
6.	Analizin doğrulukla ve kesinlikle yapılması
7.	Sonuçların yorumlanması

yıda aday ilaç tetkiki belirlenebilir (5). Ancak pek çok nadir ilaç konsantrasyonu tayinleri, preparatif ön basamaklar içeren, zaman ve emek gerektiren metodlarla yapılmaktadır. Böylece herhangi bir laboratuvar, bir testi repertuarına almadan önce ekonomik verimlilik göstergelerini değerlendirmek durumundadır (6). Çeşitli meslek örgütleri kurdukları ağlarla nadir istenen tayinlerin topluca yapılabilmesi için referans laboratuvarlar katalogları oluşturmuşlardır (7). Bu şekilde tek tek kurumlar ekonomik kavramları korudukları halde hasta yararından da ödün vermemiş olmaktadır. Herhangi bir analizi uygulamaya koymadan önce klinik laboratuvarcının atacağı adımlar Tablo1'de gösterilmiştir.

Ekonomiklik düşüncesinin ötesinde bir ilaç izleme testinin klinik faydası, istemi yapacak klinik hekimize dikkatle değerlendirilmelidir. Bu değerlendirmede esas kriter, sonuç değeri ölçüsüdür (outcomes assessment) (8). Sonuç değeri ölçüsüye, ilaç tedavisi laboratuvar izleminin ve bu işleme etki eden değişkenlerin

Tablo 2. İlaç tedavisi izlenmesi ve diğer laboratuvar testlerinin klinik anlamını değerlendirmede kullanılan bazı istatistik tanımlar.

Kesim noktası (cut-off): Toksikiteden etkilenmiş hastaları, toksisiteden etkilenmemiş hastalardan ayıran sınır değeri
Pozitif tespit olasılığı (PTO): Test sonucu pozitif olup (> kesim noktası) gerçekten ilaç toksisitesinden etkilenmiş hastalar
Negatif tespit olasılığı (NTO): Test sonucu negatif olup (< kesim noktası) ilaç toksisitesinden gerçekten etkilenmemiş hastalar
Pozitif olabirlik oranı (POO): doğru pozitiflik oranı / yanlış pozitiflik oranı ya da pozitif test sonrası odd'lar/ test öncesi odd'lar
Negatif olabirlik oranı (NOO): yanlış negatiflik oranı / doğru negatiflik oranı ya da negatif test sonrası odd'lar/ test öncesi odd'lar
Net sonuç oranı (NSO) (Ratio of net consequences) = yanlış pozitiflikten sonuçlanan olgular/ yanlış negatiflikten sonuçlanan olgular ya da toksisite prevalansı / toksisite görülmemeye prevalansı x pozitif olabirlik oranı

klinik uygulamalara getireceği faydanın sayısal değerlendirilmesidir. Konunun hatırlanması açısından test performans karakteristikleri olarak isimlendirilen bazı istatistik tanımlar Tablo 2'de özetlenmiştir (9). Yeni testler klinik laboratuvarda uygulamaya katıldığında belirtilen veriler laboratuvar sorumlusu tarafından klinik hekime bildirilmeli ve istemlerin daha yüksek bilinçle yapılması kolaylaştırılmalıdır.

Bu kavramlara daha açıklık getirmek için Tablo 3'deki teofilin ve fenitoin değerlerini inceleyelim (10). Çoğunluk laboratuvarlarca kabul edilmiş olan kesim noktası (cut-off) değerleri teofilin için 20, fenitoin içinse 22mg/L'dir. Sınır değeri, burada toksisiteden etkilenmemiş hastaları, ilaç toksisitesinden etkilenmiş hastalardan ayıran, ilaç tedavisi izlemi kan konsantrasyon değerleridir. Tablodaki pozitif tahmini değer, sınır değerlerin üzerinde değerler tespit edilen teofilin tedavisindeki hastaların %43'ünün, fenitoin tedavisindeki hastaların ise %20'sinin gerçekten ilaç toksisitesinden etkilenmiş olduğunu, geri kalanların ise yanlış-pozitif değerler olduğunu göstermektedir. Buna karşın sınır değerinin altında ölçüm yapılan değerlerinse teofilin için %96'sı, fenitoin içinse %83'ü gerçekten non-toksik, geri kalanlara yanlış-negatif testlerdir. Aday testler için değerlendirilen araştırmalarda sınır değeri seçilirken optimumun nasıl belirlendiğini de dikkate almak doğru bir yaklaşımdır (11). Örneğin teofilin örneğinde sınır değer toksik hastaları daha yüksek olasılıkla teşhis edebilmek için düşük tutulmuş, buna karşın yanlış pozitif tespit olasılığı arttığından, belki gereksiz girişim bedel ve maliyetlerine yol açılmıştır. Burada dikkate alınabilecek bir ölçü Tablo 2 'deki tanımlar arasında yeralan net sonuç oranı (ratio of net consequences) dir. Tanımdan da anlaşıldığı gibi yanlış pozitif-

Tablo 3. Teofilin ve fenitoin serum ilaç konsantrasyonları için test performans özellikleri

	Serum kesim değeri konsantrasyonu (mg/L)	
	Teofilin,20mg/L	Fenitoin,22mg/L
PTO	0.43	0.20
NTO	0.96	0.83
POO	5.6	1.4
NOO	0.4	0.9
NSO	0.27	0.5
Tdc	0.33	0.33
Tct	0.08	0.26
Tt,dc	0.57	0.36

Smith DA et al. Biochem Pharmacol 1992;44:2089-2098

Wrighton SA et al. Crit Rev Toxicol 1992;22:1-21

Masimirembwa CM et al. Eur J Pharmacol 1995;48:35-38

lik olasılığının yanlış negatiflik olasılığına bölümüdür ve sınır değer kıymetlendirilmesi için yararlı bir ölçüdür. Bu değerler, populasyon kaynaklı verilerden esas aldığından, ortaya çıkacak populasyonlararası varyasyonlar da akılda tutulması gereken bir diğer noktadır. Fayda ölçümünde daha uygun olabilecek bir yaklaşım ise Bayes teoreminin uygulamasıdır. Hastalar klinik laboratuvara belli bir hastalık öyküsüyle gelirler, çoğu zaman yapılacak tek bir laboratuvar testi tanıyı güçlendirmede yeterli olmayabilir. Ülkemizde tıpta matematik ve istatistik uygulamaları diğer bilim dallarına göre daha az yaygın kullanıma ve anlaşılma düzeyindedir. Öyküsüyle gelen ve seyri takip edilen hastada tanı ve tedavi bilgi ve teknolojiyi daha çok kullanan kliniklerde hekimin önsezi gücünden ileriye taşınmış ve karar destek sistemlerinin kullanıma sokulmasıyla objektif ve sayısal hale getirilmiştir. Bu konuda daha fazla bilgi başka ayrıntılı kaynaklardan incelenebilir (12). Ancak burada bahsi geçen kavrama yaklaşmak için Bayes teoreminin uygulamasından bahsedilecektir. Bayes teoremi, yeni edinilen bilginin, öykü bilgilerine katılımının tanı konma olasılığına yaptığı katkının hesaplanması için kullanılan metoda esas teşkil eder (13). Basit bir gösterimle,

Koşulun test öncesi 'odd'ları x olabilirlik oranı = koşulun test sonrası 'odd'ları

Burada 'odd'lar = % olasılık / (100 - % olasılık)

Tablo 3'e göre teofilin için bulunacak bir pozitif sonuç (>20mg/lit) toksisite için test sonrası 'odd'ları, test öncesi 'odd'lara göre 5.6 kat artırmaktadır. Buna karşın negatif bir sonuç, test sonrası 'odd'lar test öncesine göre %40 oranında düşürecektir. Dikkat edilirse fenitoin testi, teofilin testine göre daha az bilgilendirecidir.

Tdc klinik hekiminin ilacı kesmek için belirlediği eşik olasılık değerini temsil etmektedir. Tc, t ve Tt, dc olasılık test penceresinin sınırları olup, Tc, t değerinin altındaki değerlerdeki bir 'pozitif olabilirlik oranı', pozitif bir test sonucunun, ilaca bağlı toksisite test sonrası olasılığını eşik karar düzeyinin (Tdc) üzerine aşırması için yetersiz, Tt, dc'nin üzerindeki değerlerdeyse negatif olabilirlik oranı, negatif bir test sonucunun, toksisite tanısı test sonrası olasılığını eşik karar düzeyinin altına düşürmede yetersizdir.

Rakamlara açıklama getirildiğinde, ilaca-bağlı toksisite kararı eşik değeri 0.33 değerinde bir olasılıkla sayısallaştırıldığında, teofilin için 0.08'in altında bir test öncesi olasılık, klinik hekime, herhangi bir teste gerek duymadan ilaca devam kararını önerirken, test öncesi olasılık >0.57 olduğu durumda, yine herhangi bir tes-

te gerek görülmeden ilacın kesilmesi önerisi ortaya çıkacaktır. Burada bir kez daha dikkat edilmesi gereken nokta Tdc değerlerinin farklı uygulayıcı grupların subjektif öncelik sıralamalarına göre göstereceği varyasyonlar ve bunun kliniğin performansı ve dolayısıyla hasta yararına edeceği doğrudan tesirdir. Sonuçta son tavsiye yetkisi yine uygulayıcı olan klinik hekiminin ve son karar en nihayetinde hastanınıdır.

Bahsettiğimiz teorileri pratikte uygulamaya hizmet eden laboratuvar karar-destek bilgisayar programları (14,15) klinikçi ve klinik laboratuvarcı meslektaşlarımızı, New York metrosunda bir zamanlar asılmış bir ilandaki gibi (16) "Bu elektrik devresi sizin işinizi yapmayı öğrendiğinde siz ne yapacaksınız?" sorusuyla korkutmamalı, bilakis, şüpheli teşhislerin vicdan azabından korunmanın ve rapor kontrol etmekle geçen zamanın kurtarılması düşüncesiyle sevindirmelidir.

Bu genel yaklaşımlardan sonra, klinik laboratuvar da güncel bir araştırma hedefi olan sitokrom P450 grubu enzim profillerinin, hastaya ve ilaca özel ilaç metabolizmasının öngörülmesinde bir laboratuvar tanısı testi olarak kullanılabilirliği tartışılacaktır.

FARMAKOGENETİK, EKOGENETİK ve SİTOKROM P450 AİLESİ

Farmakogenetik ilaçlara cevaptaki farklılıkların kalıtsal temelini araştıran bir bilim dalıdır. Ekogenetik ise tüm çevresel, kimyasal ve fiziksel etkenlere (ağır metaller, insektisidler, yanma sonucu meydana gelen kimyasallar, UV radyasyon gibi) cevaben ortaya çıkan bireylerarası farklılıkları inceleyen daha geniş bir alandır*.

* Klinik hekiminin laboratuvar testleriyle ilgili olarak aklından çıkarmaması gereken bir nokta, in vitro testlerin de yukarıda sayılan in vivo faktörler gibi deney koşullarından aldığı etkidir. Bazı araştırma ve endüstriyel laboratuvarlarda analitik koşullardaki küçük sayılabilecek oynamaların analitik performansa etkisini ölçmek amacıyla kullanılan tanım, analitik metodun pürüzlü karakteridir. Burada "simplex" optimizasyon, 'response surface' optimizasyon gibi factoryal deneyler karmaşık kontrol problemlerinin çözümünde kullanılan metodlardır (20).

Farklılıkların çeşitliliğinin fazlasıyla farkedilmiş olması, günümüzde her bireyin kendine özgü ilaç metabolize edici enzim ve bu enzimleri düzenleyen reseptörleri kodlayan allellerin oluşturduğu bir çeşit 'Kişisel parmak izi' olduğu düşüncesini yaygınlaştırmıştır (17).

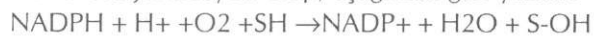
İnsanda düzinelere ilaç metabolize edici enzim polimorfizmi tarif edilmiştir (18). Bunlardan bazıları toksisite ve kanser gibi klinik durumlarla ilişkili bulunmuş, bazılarının klinik ilişkileri ise tam olarak anlaşıla-

mamıştır (19). İlaç metabolizması fenotipik varyasyonlarının biyokimyasal temelinde, ekspresyon düzenlenmesi, enzim inhibisyon ve indüksiyonu gibi daha kısa süreli katalitik, veya genetik mutasyon ya da geniş çaplı delesyon gibi kalıcı sebepler olabilir. 1950 ve 70'lerde enzimatik aktivite tayinleriyle ilaç metabolize edici enzim olarak tariflenmiş proteinlerin gerçek işlevlerinin sadece <1%'inden azının ilaç ve çevresel toksinlerin metabolizması olduğunu bugün bilmekteyiz. Ancak burada tartışılacak işlevi yönünden ilaç metabolize edici enzimlerin klasik sınıflamasını hatırlamakta yarar var.

İlaç metabolizmasının temel başamaklarının gerçekleştiği başlıca organ karaciğerdir. İlaç metabolizmasında yer alan karaciğer enzimleri iki grupta incelenir. Faz I enzimler ilacın primer yapısının direkt modifikasyonunu katalizler. Faz II enzimler, glukuronik asit, sulfat, glutatyon, ve amino asitler gibi polar ligandlarla kovalent bağlanmayı (konjugasyon) katalizler. Genetik polimorfizm tanımı, monogenik yada Mendelyan geçiş gösteren bir özelliğin, populasyonda bulunan en az iki fenotipinden en nadirinin en az %1 sıklıkta görülmesini gerektirir (21).

İlaç metabolize edici enzimlerde genetik polimorfizm, ilaç metabolizması yönünden üç tip fenotiple ortaya çıkar. Normal metabolizma, yavaş metabolizma ve hızlı metabolizma. Bazı terapötik maddelerle çevresel ve mesleki karsinojenler için genetik polimorfizmin yan etkiler ve kanser riskini artırmada önemli olduğu belirlenmiştir. Bu yüzden, genetik polimorfizmlerin ve bunların fenotipik sonuçlarının tayini, ilaç tedavisine yeterli ve non-toksik bir yanıt alabilmek açısından öngörüyle artırabilecek potansiyel bir araçtır (22).

Sitokrom P450'lerin katalizlediği genel reaksiyon bir mono-okisjenizasyon olup, aşağıdaki gibi yazılır.



Burada S substrat (steroid, yağasidi, ilaç ve diğer kimyasallar gibi) gurubunu temsil etmektedir.

Oksidasyon bileşiklerin aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yol açabilir. Diğer enzimler gibi CYP izoenzimlerinin de çeşitli substratlar için saturasyonlu Michealis-Menten kinetiği gösterdiği konsantrasyon aralıkları ve kofaktörleri vardır. Enzim affiniteleri de bireyler ve dokulararası farklılıklar gösterir (23,24). Karaciğer dışı organlarda yerleşik CYP'ler örneğin adrenallerde aldosteronun, testislerde testosteronun basamaksal metabolizmasında rol oynar.

Karaciğer CYP'lerinin aktivitesinin pek çok faktörle düzenlendiği yukarıda görülmüştü. Kombine ilaç te-

davilerinde ilaç etkileşmelerinin bir kısmını, metabolik yolda paylaşılan CYP izoenzimlerinin regülasyonundaki etkilerle açıklamak mümkündür. Örneğin CYP 3-A-4'ün karaciğerdeki protein olarak miktarı ve midazolam için belirlenen aktivitesinde tek bireydeki zaman içindeki farklılıklar 10 kata ulaşabilmektedir (21). CYP3-A-4'ün bir diğer substratı da triazolamdır. Triazolam alan hastalarda CYP3-A-4 aktivitesinin midazolam için baskılandığı bulunmuştur.

Bu ön bilgiyle Tablo 4 'ü incelediğimizde CYP alt ailelerinin bazı bireyleri için model substratların, inhi-

Tablo 4. CYP alt ailelerinin bazı substratları

İzoenzim	(Model) substrat	Inhibitör	İndüktör
CYP1A1	cimetidine		
CYP1A2	caffeine	furafylline	methylcholan threne
	antipyrine parasetamol phenacetin theophylline aflatoxine imipramine	fluvöxamine	sigara dumanı polisiklik hidrokarbonlar
CYP2C19	mephenytoin omeprazole diazepam propranolol imipramine citalopram clomipramine amitriptyline	sulfafenazole felbamate	phenobarbita omeprazole
CYP2D6	dextromethorfan debrisoquine sparteine bufuralol (dihidro)codeine ondansetron ecstasy anti-aritmikler	cimetidine quinidine ajmaline yohimbine norfluoxetine moclobemide primaquine chloroquine	
CYP2E1	chlorzoxazone ethanol acetone halothane enflurane isoflurane methoxyflurane nitrozaminler	disulfuram isoniazide benzene	ethanol
CYP3A4	lidocaine nifedipine dihidropiridinler verapamil quinidine cortizol midazolam taxol kokain imipramine terfenadin	cimetidine quinidine troleandomisin erythromisin	steroidler rifampisin fenobarbital

bitör ve indüktörlerin çeşitliliği hakkında kaba bir fikir edinilebilir (25).

CYP süperailisi, enzimin protein fraksiyonundaki amino asit dizi benzerliğinden yola çıkılarak çeşitli ailelere sınıflandırılır. 1993 yılına kadar insanda 8 CYP ailesi tanımlanmıştır (26). Her ailede farklı sayıda alt aileler mevcut olup, aile içi amino asit dizi benzerliği %36 ile %70 arasında değişmektedir. Alt aileler bir büyük harfle, herbir izoenzim de harfi, izleyen rakamla belirtilir. Ör: CYP 2-D-6. Her bir CYP farklı bir gen tarafından kodlanır. İnsanlarda aşağı yukarı 20-200 arasında P450 geni bulunduğu hesap edilmektedir.

İnsanlarda fenotiplemenin laboratuvar metodu, CYP izoenzimi tarafından oksitlenen model maddenin alımını takiben, biyolojik bir sıvıda (genellikle idrar) oksitlenmiş metabolitle, model bileşiğin oranını ölçmektir (27). Bu oranlar, enzimin in vivo oksitleme kapasitesinin dolaylı bir ölçümünü verecektir. Bu amaçla kullanılan test ilaçlarından bazıları ve fenotipleme kriterleri Tablo 5'de görülmektedir.

Genotipleme spesifik ilaç metabolik fenotiplerine temel oluşturan genetik mutasyonların tanımlanmasıdır. Mutasyonlar overekspresyonlar (gen duplikasyonları), aktif protein ürününün bulunmaması (null allel), ve mutant katalitik kapasitesi düşük proteinlerin sentezlenmesi (inactivating allel) şeklinde görülebilir. Tanıda kullanılan metodlar arasında RFLP (restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi), ve allel spesifik PCR (polimerize zincir reaksiyonu) sayılabilir. Bu mantıkla yapılan araştırmalarda belirlenmiş bazı CYP2D6 mutant allelleri Tablo 6'da gösterilmiştir. Metodoloji ve

diğer bazı CYP izoenzimlerinin genotipik özellikleriyle ilgili ayrıntılar Linder ve arkadaşlarının derlemesinde geniş olarak anlatılmıştır (22). Probların potansiyel toksik etkilerinden uzak durmak için invaziv olmayan in vitro testlerin geliştirilmesi de bir diğer hedeftir. Bu amaçla yapılan bazı araştırmalar, katalitik veya immün-seçimli inhibitörlü deneyler, elektroforetik ayırmalar, Western ve Northern Blotlardır (28-29)

YORUMDA KARIŞIKLIK

Yorumda karmaşaya yol açan diğer bir konu, model bileşiklerin gerçekte tek bir izoenzim tarafından değil, bir izoenzim gurubu tarafından oksitlenmesi ve her bir model bileşik için enzimlerin belirlenen in vivo aktiviteye bağlı katılım oranlarının bilinmemesidir. Bu çeşit hassas ölçümler iyi düşünülmüş planlarla, karmaşıklık analizi yeteneğine sahip iyi organize olmuş bilgilili araştırma guruplarının ilgi ve çabalarıyla, önümüzdeki yüzyıl klinik laboratuvarcılarının ihtiyaç duyacağı yeni bilgilere kaynak oluşturacaktır. Genom, proteome ve bio-processor chip alanlarındaki gelişmelere paralel olarak geleceğin bilgilerinin oluşumunu sabırla beklerken, biyokimyacılar da daha mükemmelin arayışında kombine dinamik testlerin avantajlarını araştırmaktadırlar. Bu gurup çalışmalarına çok güzel bir örnek, Frye ve arkadaşlarının, "Pittsburgh kokteyli" yaklaşımıdır (30). Bu araştırmada bireylerearası genotipik varyasyonların etkisini en azda tutabilmek amacıyla model bileşiklerden, kafein, chloroxazone, dapsone, debrisoquin ve mephenytoin hep birlikte in vivo uygulanarak CYP izoenzimlerinden, 1A2, 2E1, 3A, 2D6 ve 2C19'un toplam aktivite değerine ulaşılmaya

Tablo 5. CYP fenotiplemesinde kullanılan bazı ilaç fenotipleri

Test ilacı ya da ürünü	Fenotipleme kriterleri (Yavaş metabolizma=YM, Hızlı metabolizma=HM)
CYP2D6 Debrisoquin→4-hidroksidebrisoquin	YM>12.6, HM<0.50
Dextromethorphan→dextrophan	YM>0.3
Sparteine→2-ve5-dextrosparteine	YM>20
CYP2C19 Mephenytoin→log10 \bar{a} S-mephenytoin (dozu/4'-OH-mephenytoin (idrar)	YM=log hidroksilasyon indeksi>1.0
CYP2E1 Chlorzoxazone→chlorzoxazone (dozu)/ 6-OH-chlorzoxazone (8-st-idrar)	tanımsız
CYP3A4 Dapsone→dapsone hydroxylamine/ dapsone+dapsone hidroksilamin	tanımsız

Evans DAP et al J MED Genet 1980;17:102-105
East T et al J Chromatogr 1985;338:99-112
Eichelbaum M et al. Clin Pharmacol Ther 1982;31:184-6
Fleming CM et al. Pharmacologist 1990;32:140
Ward SA et al. Clin Pharmacol Ther 1987;42:96-99

Tablo 6. Mutant CYP2D6 allelleri

Mutasyon	Allel frekansı	PCR
CYP2D6 A A2637 Exon 5'de delesyon	2.7%	Var
CYP2D6 B G1934→A, aktivite yok	28.6%	Var
CYP2D6 C K281'de 3baz çiftlik delesyon	<1.5%	Var
CYP2D6 D CYP2D6 gen delesyonu	11.6%	Yok
CYP2D6 E A3023→C	1.5%	Var
CYP2D6 J C188→T, G4268→C, aktivite az	<1.5%	Var
CYP2D6 L C2938'→T, G4268→C, daha fazla aktivite	3.5%	Var

Nakachi K et al. Cancer Res 1991;51:5177-80
Tyndale R et al. Pharmacogenetics 1991;1:26-32
Balant-Gorgia AE et al. Ther Drug Monit 1989;11:415-420
Evert B et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1994;
350:434-439
Armstrong M et al. Pharmacogenetics 1994;4:73-81

çalışılmaktadır. Yazarların ölçüm, sonuç ve yorumlarına göre bu kombine uygulamada metabolik karşılıklı etkileşimler olmamakta, minimal invazyonla, 8 saatlik idrar ve üç plazma örneği tek deneysel oturumda, beş izoenzimin toplam aktivitesini tayin etmede etkili bir metod olarak ortaya çıkmaktadır. Frye'den önceki araştırmacıların da ilaç karışımları kullanımıyla ilgili kaygıları (31,32), karışıma eklenecek her bir ilacın neden olacağı matriks etkisi ve in vivo etkileşimlerin tanısal duyarlılık ve seçiciliğe yapacağı olumsuz etkidir. Ne yazık ki bu endişe sürmektedir ve günlük uygulamada gözden kaçırılmamalıdır.

Yazının başında fenotipik varyasyonların popülasyonlararası sınır değer farklılıkları vurgulanmıştı. Ülkemiz popülasyonunda epidemiyolojik belirlemelere ilişkin araştırmalar, Bozkurt ve arkadaşları tarafından ele alınmıştır. Yapılan çalışmalarda en kalabalık popülasyon, debrisoquin metabolizması için 326 gönüllüdür. 326 bireyin 11'i yavaş metabolize edici olarak belirlenmiş, popülasyon genelinin debrisoquin / 4-OH-debrisoquin oranları diğer beyaz ırk epidemiyolojik dağılımlarıyla uyumlu bulunmuştur (33,34).

SONUÇ

Bu yazıda amaç, odaklanmış bir laboratuvar araştırma sorununun irdelenmesi ya da çözüm önerilerinin tartışılması değildir. Doğru tanının vazgeçilmez bir parçası olan klinik laboratuvarın doğru ve etkin kullanımı için klinik hekimiyle, laboratuvarcı arasında etkin ve faydalı iletişimi sağlayacak sayısal bir dilin temel kavramlarına dokunmaktır. Bu amaçla diğer laboratuvar testlerinin bir alt örneği olan ilaç tedavisi izlem alanı ve deneysel bir rutin tetkik adayı olarak CYP fenotipleme ve genotipleme gerekçelerine değinilmiştir.

CYP fenotipleme ve genotiplemesinin toksisite kararına bağlı tedavi seçeneği üzerine etkisiyle ilgili klinik anlam ölçüsü veren herhangi bir araştırmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu bilgilerin eksik olduğu tüm aday laboratuvar araştırmaları, ilaç etkileşimleri de akılda tutularak, uygulamada deneysel kategorisi al-

tında sınıflandırılmalı ve hasta bakımında kullanılmasına şüphe ile bakılmalıdır (35,36).

CYP için tartışılanları özetlersek, içgüdüsel bir yaklaşımla, CYP genotiplemesi için, kullanılan terapötik ilacın polimorfik bir enzimin substratı olduğu durumlar endikasyon kabul edilebilir. Bundan başka, bireylerin, polimorfik enzim substratı olan ilaçlara suboptimal klinik yanıt gösterdiği durumlar da genotipleme endikasyonu listesine eklenebilir. Bu noktada bir uç hayal ilaç etkilerinin enzim aktivitesini düzenlemedeki net rolünün belirlenmesi sonrasında yavaş ya da hızlı metabolize edicilerin iatrojenik enzim regulasyonu ile düzenlenmesidir (37). Günümüz klinik laboratuvarının pratik uygulamalarından biri olan plazma ilaç ve metabolit konsantrasyonu belirlemeleriyle, genotipleme yaklaşımının araştırma düzeyinde kombinasyonu, yavaş ve hızlı metabolize edici alt tiplerin belirlenmesi ve genotip bilgisinin, ilaç dozuna cevabın öngörülmesinde kullanımının uygulamaya sokulmasını mümkünleştirecektir. Tedaviye başlamadan önce yapılacak bu tür bir tarama hiç şüphesiz oldukça pahalıya mal olacak ancak toksik ataklar ve tedavinin başarısızlığında ortaya çıkacak maliyetin, bu kayıpla kıyaslanması tıp ekonomistlerini bir süre uğraştıracaktır.

Bu yazıda geçen istatistik terimlerinin türkçeleştirilmesindeki vazgeçilmez yardımları için Biyoistatistik anabilimdalımız araştırma görevlisi sevgili Yasemin Yavuz'a, 'Membran Biyokimyası' dersi için hazırladığı 'Sitokrom P-450 monooksijenazlar' başlıklı ödevle beni yönlendiren AÜTF Hepatoloji Enstitüsü lisansüstü öğrencisi Dr. Tijen Şengezer'e, yazının ön çıktısını kritik okuyarak değerlendiren sevgili hocam Prof. Dr. İsmail Hakkı Gökhan'a, klinik laboratuvar uygulamalarındaki anlayış, görüş ve eğitimime yaptıkları somut ve anlamlı katkılar için Prof. Dr. Levent Karaca ve Doç. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, ve ülkemizde zevkle çalışma yönündeki yüreklendirmeleri için Prof. Dr. Cankat Tulunay ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

1. Schumacher GE. Introduction to theurapeutic drug monitoring. In: Schumacher GE, ed. Theurapeutic drug monitoring. East Norwalk, CT:Appleton & Lange, 1995:2
2. Feldman RG, Pippenger CE. The relation of anticonvulsant drug levels to complete seizure control. J C Pharmacol 1976;16:51-9
3. Shaw LM, Kaplan B, Brayman KL. Prospective investigations of concentration-clinical response for immunosuppressive drugs provide the scientific basis for theurapeutic drug monitoring. Clin Chem 1998;44:381-387
4. Bowers LD. Analytical goals in theurapeutic drug monitoring. Clin Chem 1998;44:375-380

5. O'Kane DJ, Ebert TA, Hallaway BJ, Roberts SG, Bhuiyan AK, Tenner KS. A laboratorian's perspective on evaluation and implementation of new laboratory tests. *Clin Chem*.1997;43:1771-1780
6. Schumacher GE, Barr JT. Total testing process applied to therapeutic drug monitoring: impact on patients' outcomes and economics. *Clin Chem* 1998;44:370-374
7. Hicks JM, Young DS, eds. DORA'97-99: Directory of rare analyses. AACCC Press, Washington, DC, 1997
8. Ellwood PM. Outcome management: a technology of patient experience. *N Eng J Med* 1988;318:1549-56
9. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Evaluating Diagnostic Procedures. In: Basic and Clinical Biostatistics. Saunders BD, Trapp RG. Eds. London, Appleton & Lange, 1990, pp 229-244
10. Schumacher GE, Barr JT, Browne TR, Collins JF. Test performance characteristics of the serum phenytoin concentrations (SPC): The relationship between SPC and patient response. *Ther Drug Monit* 1991;13:318-24
11. Schumacher GE, Barr JT. Using population-based serum drug concentration cut-off values to predict toxicity: test performance and limitations compared with Bayesian interpretation. *Clin Pharm* 1990;9:88-96
12. Place JF, Truchard A, Ozawa K, Pardue H, Schnipelsky P. International Federation of Clinical Chemistry. Use of artificial intelligence in analytical systems for clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* 1994; 231: S5-S34
13. Schumacher GE, Barr JT. Bayesian and threshold probabilities in therapeutic drug monitoring: when can serum drug concentrations alter clinical decisions? *Am J Hosp Pharm* 1994;51:321-7
14. Regetiger A, Siede WH, Seiffert UB. Computer assisted interpretation of laboratory test data with 'MDI-Lablink'. *Clinica Chimica Acta* 1996; 248:107-118
15. Peters M, Broughton PMG. The role of expert systems in improving the test requesting patterns of clinicians. *Ann Clin Biochem* 1993;30:52-59
16. Stein SK, Barcellos A. Calculus and Analytical Geometry. Stein KS, Barcellos A. Eds. Mc Graw-Hill, Inc.NY.1992 p xxviii
17. Nebert DW. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: What is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet*.1997; 60:265-271
18. Nebert DW, Mc Kinnon RA, Puga A. Human drug metabolizing enzyme polymorphisms:effects on risk of toxicity and cancer. *DNA Cell Biol*.1996;15: 273-280
19. Nei M, Saitou N. Evolution of man. In: Kalow W, Goedde HW, Agarwal DP (eds) Ethnic differences in reaction to drugs and xenobiotics. Alan R Liss, New York, pp 21-37
20. Westgård JO, Klee GG. Quality management In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis CA, Ashwood ER. eds. WB Saunders Company 1994. Pp.589
21. Kerremans ALM. Cytochrome P450 isoenzymes-importance for the internist. *Netherlands J of Medicine* 1996;48:237-243
22. Linder MW, Prough RA, Valdes R. Pharmacogenetics: A laboratory tool for optimizing therapeutic efficiency. *Clin Chem* 1997;43:254-266
23. Ryan DE, Lewin W. Purification and characterization of hepatic microsomal cytochrome P450. *Pharmacol Ther* 1990;45:153-239
24. Gokhale MS, Bunton TE, Zurlo J, Yager JD. Cytochrome P450 isoenzyme activities in cultured rat and mouse liver slices. *Xenobiotica* 1997;27:341-355
25. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22:1-21
26. Nelson DR, Kamataki T, Waxman DJ et al. The P450 superfamily:update on new sequences, gene mapping, accession numbers,early trivial names of enzymes,and nomenclature. *DNA Cell Biol* 1993;12:1-51
27. Kivistö KT, Kroemer HK. Use of probe drugs as predictors of drug metabolism in humans. *J Clin Pharmacol* 1997;37 (1 Suppl):405-485
28. Kobayashi K, Chiba K, Yagi T, et al. Identification of cytochrome P450 isoforms involved in citalopram N-demethylation by human liver microsomes. *JPET* 1997; 280:927-933
29. Lipscomb JC, Garrett CM, Snawder JE. Cytochrome P450-dependent metabolism of trichloroethylene: interindividual differences in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;142:311-318
30. Frye RF, Matzke GR, Adedoyin A et al. Validation of the five-drug "Pittsburgh cocktail" approach for assessment of selective regulation of drug-metabolizing enzymes. *Clin Pharmacol Ther* 1997; 62:365-376
31. Berthou F, Goasduff T, Lucas D, Dreano Y, Le Bot MH, Menez JF. Interaction between two probes used for phenotyping cytochromes P4501A2 (caffeine) and P4502E1 (chlorzoxazone) in humans. *Pharmacogenetics* 1995;5:72-79
32. Schellens JHM, Janssens AR, Van Der Wart JHF, Va Der Velde EA, Breimer DD. Relationship between the metabolism of antipyrine, hexobarbital and theophylline in patients with liver disease as assessed by a "cocktail" approach. *Eur J Clin Invest* 1989;19:472-9
33. Bozkurt A, Başçı NE, Işimer A, Sayal A, Kayaalp SO. Polymorphic debrisoquin metabolism in a Turkish population. *Clin Pharmacol Ther* 1994; 55: 399-401
34. Bozkurt A, Başçı NE, Işimer A, Sayal A, Kayaalp SO. Metabolic ratios of four probes of CY2D6 in Turkish subjects: a cross-over study. *Eur J Drug Metab Pharmacokin* 1996;21:309-314
35. Lefebvre RA, Flouvat B, Kanolac-Tanuser S et al. Influence of lansoprazole treatment on diazepam plasma concentrations. *Clin Pharmacol Ther* 1992;52:458-463
36. Birkett DJ, Machenze PI, Veronese ME, Miners JO. In vitro approaches can predict human drug metabolism. *TIPS* 1993;14:292-294
37. Espinosa-Aguirre JJ, Rubio J, Lopez I, Nosti R and Asteinza J. Characterization of the CYP isoenzyme profile induced by cyclohexanol. *Mutagenesis* 1997;12:159-162
38. Smith DA, Jones BC. Speculations on the substrate-structure-activity relationship (SSAR) of cytochrome P450 enzymes. *Biochem Pharmacol* 1992;44:2089-2098
39. Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992; 22:1-21

40. Masimirembwa CM, Hasler JA, Johansson I. Inhibitory effects of antiparasitic drugs on cytochrome P450 2D6. *Eur J Clin Pharmacol* 1995;48:35-38 .
41. Evans DAP, Maghoub BA, Sloan TP, Idle JR, Smith RL. A family and population study of genetic polymorphism of debrisoquin oxidation in a white British population. *J Med Genet* 1980;17:102-5
42. East T, Dye D. Determination of dextromethorphan and metabolites in human plasma and urine by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1985;338:99-112
43. Eichelbaum M, Bertilsson L, Sawe B, Zekorn C. Polymorphic oxidation of sparteine and debrisoquine: related pharmacogenetic entities. *Clin Pharmacol Ther* 1982;31:184-6
44. Flemming CM, Branch RA, Wilkinson GR, Guengerich FP. Human liver microsomal N-hydroxylation of dapsone by cytochrome P4503A4. *Pharmacologist* 1990;32:140
45. Ward SA, Goto F, Nakamura K, Jacqz E, Wilkinson GR, Branch RA. S-mephenytoin 4-hydroxylase is inherited as an autosomal recessive trait in Japanese families. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:96-9
46. Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J. Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to cigarette smoking dose. *Cancer Res* 1991;51:5177-80
47. Tyndale R, Aoyama T, Broly F, Matsunaga T, Inaba T, Kalow W, et al. Identification of a new variant CYP2D6 allele lacking the codon encoding Lys-281: Possible association with poor metabolizer phenotype. *Pharmacogenetics* 1991;1:26-32
48. Balant-Gorgia AE, Balant LP, Garrone G. High blood concentrations of imipramine or clomipramine and therapeutic failure: a case report study using drug monitoring data. *Ther Drug Monit* 1989;11:415-20
49. Evert B, Griese EU, Eichelbaum M. A missense mutation in exon 6 of the CYP2D6 gene leading to a histidine 324 to proline exchange is associated with the poor metabolizer phenotype of sparteine. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1994;350:434-9
50. Armstrong M, Fairbrother K, Idle JR, aly AK. The cytochrome P450 CYP2D6 variant CYP2D6J and related polymorphisms in a European population. *Pharmacogenetics* 1994;4:73-81